**T.C.**
**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

# MİSEL OLUŞTURAN, BİYOBOZUNUR, BİYOUYUMLU, KATYONİK POLİMERLER İLE İLAÇLARIN NAZAL YOL İLE UYGULANMASI

**EMİNE KAHRAMAN**

**DANIŞMAN**
**PROF. DR. YILDIZ ÖZSOY-ERGİNER**

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI/**
**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI**

**İSTANBUL, 2011**

## TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Farmasötik Teknoloji Programında Emine KAHRAMAN tarafından hazırlanan "Misel Oluşturan, Biyobozunur, Biyouyumlu, Katyonik Polimerler ile İlaçların Nazal Yol ile Uygulanması" başlıklı Yülsek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

26 / 07 / 2011

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) İmzası

1.Prof. Dr. Yıldız ÖZSOY-ERGİNER (Danışman) (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı)

2.Prof. Dr. Ahmet Oğul ARAMAN (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı)

3.Doç. Dr. Sevgi GÜNGÖR (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı)

4.Yrd. Doç. Dr. Timuçin UĞURLU (Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı)

5.Yrd. Doç. Dr. Sedef ERDAL (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı)

# BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Emine KAHRAMAN

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgisi, sıcak ilgisi ve motive edici yaklaşımını her an hissettiğim danışman hocam Prof. Dr. Yıldız Özsoy-Erginer'e;

Yıldız Teknik Üniversitesi'ndeki çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen ikinci danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Sevil Dinçer'e;

Yardım ve desteklerinden dolayı Eczacılık Teknolojisi Bölüm Başkanı ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet Araman'a;

Çalışmalarımın en kritik anında Farmakognozi Anabilim Dalı'nın bütün imkanlarını sağlayan değerli hocalarım, Prof. Dr. Afife Mat'a ve Prof. Dr. Ali Hikmet Meriçli'ye;

Çalışmalarımdaki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Erdal Cevher'e, Doç. Dr. Sevgi Güngör'e ve Yrd. Doç. Dr. Sedef Erdal'a;

Etken maddemin teminini sağlayan Ali Raif İlaç'a;

SPM çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Arş. Gör. Yeliz Başaran'a;

Yüksek lisans öğrenimime başladığım günden beri bana destek olan bütün arkadaşlarıma;

Tüm yaşamım boyunca hiç bir fedakarlığı ve sevgiyi benden esirgemeyen, maddi-manevi desteklerini hep hissettiğim aileme teşekkürlerimi sunarım.

Ecz. Emine Kahraman

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 5131

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
TEŞEKKÜR ..... İV
İÇİNDEKİLER ..... V
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİİ
ÖZET ..... XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ ..... 1
2. GENEL BİLGİLER ..... 2
2.1. Karvedilol Hakkında Genel Bilgiler ..... 2
2.1.1. Miktar Tayini ..... 3
2.1.1.1. Spektrofotometrik Yöntem ..... 3
2.1.1.2. Spektrofluorometrik Yöntem ..... 3
2.1.1.3. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ..... 3
2.1.1.4. Voltametrik Yöntem ..... 5
2.1.1.5. Kapiller Elektroforez Yöntemi ..... 5
2.1.1.6. Diğer Yöntemler ..... 5
2.1.2. Farmakolojik Özellikleri ..... 5
2.1.2.1. Etki Mekanizması ..... 5
2.1.2.2. Farmakokinetik Özellikleri ..... 7
2.1.3. Farmasötik Teknoloji Alanındaki Çalışmaları ..... 9
2.1.4. Türkiye Piyasasında Bulunan Farmasötik Preparat Şekilleri, Dozu ve Üretici Firmaları ..... 12
2.2. Nazal Yolla İlaç Uygulamalarına Ait Genel Bilgiler ..... 14
2.2.1. Nazal Yolun Avantajları ve Dezavantajları ..... 14
2.2.2. Nazal Pasajın Anatomisi ..... 15
2.2.3. Nazal Mukus Sekresyonu ve Mukosiliyer Klirens ..... 16
2.2.4. Nazal Mukozadan İlaçların Geçiş Mekanizmaları ..... 17
2.2.5. Nazal Mukozadan Geçişi Etkileyen Faktörler ..... 18
2.2.6. Nazal Mukozadan Geçişin Artırılması ..... 19

2.3. Polimerik Miseller Hakkında Bilgiler ..... 21
2.3.1. Polimerik Misellerin Tanımı ve Özellikleri ..... 21
2.3.1.1. Misel Oluşum Mekanizması ..... 22
2.3.1.2. İdeal Bir Misel Sisteminin Taşıması Gereken Özellikler ..... 23
2.3.1.3. Miseller Sistemlerin Biyolojik Performansı ..... 23
2.3.1.4. Misellerin Toksisitesi ve Vücutta Dağılımı ..... 25
2.3.1.5. Misellerin Hedeflendirmesi ..... 26
2.3.1.6. Miseller Sistemlerin Avantajarı ve Dezavantajları ..... 29
2.3.1.7. Polimerik Misellerin Farmasötik Alanda Kullanımı ve Vücuda Veriliş Yolları ..... 29
2.3.2. Genel Olarak Polimerik Misellerin Yapı Taşları ..... 34
2.3.2.1. Sentezlenen Polimerlerin Yapı Taşları ..... 35
2.3.3. Misel Oluşum Yöntemleri ..... 38
2.3.4. Misellere İlaç Yüklenmesi ..... 38
2.3.4.1. İlaç Yükleme Yöntemleri ..... 38
2.3.4.2. İlaç Yükleme Etkinliğini Belirleyen Faktörler ve Yükleme Etkinliği ..... 40
2.3.5. Polimerik Misellerin Karakterizasyonu ..... 41
2.3.5.1. Kritik Misel Konsantrasyonu ..... 41
2.3.5.2. Boyut ve Boyut Dağılımı ..... 42
2.3.5.3. Misellerin Yükü ..... 44
2.3.5.4. Misellerin Morfolojisi ..... 45
2.3.5.5. Stabilite ..... 45
2.3.6. Polimerik Misellerden Etkin Madde Salımı ve Etkin Madde Salımını Etkileyen Faktörler ..... 48
2.3.7. Polimerik Misellerin Nazal Mukozadan Geçişine Ait bilgiler ..... 49
3. GEREÇ VE YÖNTEM ..... 50
Kullanılan Kimyasal Maddeler ..... 50
Kullanılan Araç ve Gereçler ..... 51
Kullanılan Bilgisayar Programları ..... 51
3.1. Karvedilol Üzerinde Yapılan Çalışmalar ..... 52
3.1.1. Infrared Spektrumu ..... 52
3.1.2. Karvedilolün Termal Analizi ..... 52
3.1.3. Karvedilolün Spektrofotometrik Yöntem ile Miktar Tayini ..... 52
3.1.3.1. Karvedilolün Spektrofotometrik Yöntem ile Miktar Tayini Validasyonu ..... 52
3.1.4. Karvedilolün HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini ..... 54

3.1.4.1. Karvedilolün HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini Validasyonu ..... 54
3.1.5. Karvedilolün 37°C de Stabilitesinin Tayini ..... 56
3.1.6. Karvedilolün Çözünürlük Tayini ..... 57
3.2. Polimerlerin Sentez Çalışmaları ..... 57
3.2.1. PCL-b-mPEG ve PLL-b-mPEG Diblok Kopolimerlerin Sentezi ..... 57
3.2.2. Diblok Kopolimerlere Polietilenimin (PEI) Bağlanması ..... 58
3.3. Polimerler Üzerinde Yapılan Çalışmalar ..... 59
3.3.1. Polimerlerin Yapı ve Fonksiyonel Grup Analizleri ..... 59
3.3.2. Molekül Ağırlığı ve Dağılımı Analizi ..... 59
3.3.3. PEI Bağlı Polimerlerde Amin Grubu MiktarınınTespiti ..... 60
3.3.4. Sitotoksisite Çalışmaları ..... 60
3.4. Polimerik Misel Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalar ..... 60
3.4.1. Polimerik Misel Formülasyonlarının Hazırlanmasında Ön Formülasyon Çalışmaları60
3.4.2. Etkin Madde İçermeyen Polimerik Misel Formülasyonlarının Hazırlanması ..... 61
3.4.3. Etkin Madde İçeren Polimerik Misel Formülasyonlarının Hazırlanması ..... 62
3.4.4. Polimerik Misellerin Karakterizasyonu ..... 63
3.4.4.1. Kritik Misel Konsantrasyonu Tayini ..... 63
3.4.4.2. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Tayini ..... 64
3.4.4.3. Polimerik Misellerin Yük Tayini ..... 64
3.4.4.4. Taramalı Prob Mikroskobu (SPM) ile Polimerik Misellerin Morfolojilerinin Tayini ..... 64
3.4.5. Polimerik Misellerin Etkin Madde Yükleme Kapasitesi Tayini ..... 65
3.4.6. *İn vitro* Salım Çalışmaları ..... 65
3.4.7. Sığır Nazal Mukozasından *Ex Vivo* Geçiş Çalışmaları ..... 66
3.4.8. İstatiksel Değerlendirmeler ..... 68
4. BULGULAR ..... 69
4.1. Karvedilol Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular ..... 69
4.1.1. Infrared Spektrumu ..... 69
4.1.2. Karvedilolün Termal Analizi ..... 70
4.1.3. Karvedilolün Spektrofotometrik Yöntem ile Miktar Tayinine Ait Bulgular ..... 70
4.1.3.1. Spektrofometrik Yöntem ile Miktar Tayini Validasyonuna Ait Bulgular ..... 70
4.1.4. Karvedilolün HPLC Yöntemi ile Miktar Tayinine Ait Bulgular ..... 74
4.1.4.1. HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini Validasyonuna Ait Bulgular ..... 74
4.1.5. Karvedilolün 37°C'de Stabilitesine Ait Bulgular ..... 77

4.1.6. Karvedilolün Çözünürlük Tayinine Ait Bulgular ..... 78
4.2. Polimerlerin Sentez Çalışmalarına Ait Bulgular ..... 79
4.3. Polimerler Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular ..... 79
4.3.1. Polimerik Yapı ve Fonksiyonel Grup Analizlerine Ait Bulgular ..... 79
4.3.2. Molekül Ağırlığı ve Dağılımı Analizine Ait Bulgular ..... 79
Sentezlenen diblok kopolimelerin molekül ağırlıkları Tablo 4-13'te verilmiştir. ..... 79
4.3.3. PEI Bağlı Polimerlerde Amin Grubu MiktarınınTespitine Ait Bulgular ..... 80
4.3.4. Sitotoksisite Çalışmalarına Ait Bulgular ..... 80
4.4. Polimerik Misel Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular ..... 81
4.4.1. Polimerik Misel Formülasyonlarının Hazırlanmasında Ön Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular ..... 81
4.4.2. Etkin Madde İçermeyen Polimerik Misel Formülasyonlarının Hazırlanmasına Ait Bulgular ..... 82
4.4.3. Etkin Madde İçeren Polimerik Misel Formülasyonlarına Ait Bulgular ..... 82
4.4.4. Polimerik Misellerin Karakterizasyonuna Ait Bulgular ..... 82
4.4.4.1. Kritik Misel Konsantrasyonuna Ait Bulgular ..... 82
4.4.4.2. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Tayinine Ait Bulgular ..... 84
4.4.4.3. Polimerik Misellerin Yük Tayinine Ait Bulgular ..... 88
4.4.4.4. Taramalı Prob Mikroskobu (SPM) ile Polimerik Misellerin Morfolojilerinin Tayini ..... 88
4.4.5. Polimerik Misellerin Etkin Madde Yükleme Kapasitelerine Ait Bulgular ..... 89
4.4.6. Polimerik Misellerin *İn vitro* Salım Çalışmalarına Ait Bulgular ..... 91
4.4.7. Polimerik Misellerin *Ex vivo* Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular ..... 94
5. TARTIŞMA ..... 98
KAYNAKLAR ..... 107
HAM VERİLER ..... 122
FORMLAR ..... 123
ETİK KURUL KARARI ..... 124
PATENT HAKKI İZNİ ..... 125
TELİF HAKKI İZNİ ..... 126
ÖZGEÇMİŞ ..... 127

# TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Karvedilolün Türkiye piyasasında bulunan farmasötik preparat şekilleri, dozu ve üretici firmaları ..... 13
Tablo 2-2: Nazal yolu diğer ilaç uygulama yolları ile mukayesi (Ingemann ve ark. 2000 pp. 16
Tablo 3-1: Karvedilol yüklü olmayan polimerik misel formülasyonları ve polimer miktarları ..... 61
Tablo 3-2: Karvedilol yüklü polimerik misel formülasyonları ve polimer-etkin madde oranları (a/a) ..... 62
Tablo 4-1: Karvedilolün spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin doğrusallığına ait bulgular (n=6) ..... 71
Tablo 4-2: Karvedilolün spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin doğruluğuna ait bulgular (n=6) ..... 72
Tablo 4-3: Karvedilolün spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin gün içi kesinliğine ait bulgular (n=6) ..... 72
Tablo 4-4: Karvedilolün spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin günler arası kesinliğine ait bulgular (n=6) ..... 72
Tablo 4-5: Karvedilolün spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin stabilitesine ait bulgular (n=6) ..... 73
Tablo 4-6: Karvedilolün HPLC yöntemi ile miktar tayininin doğrusallığına ait bulgular (n=3) ..... 75
Tablo 4-7: Karvedilolün HPLC yöntemi ile miktar tayininin doğruluğuna ait bulgular (n=3) 75
Tablo 4-8: Karvedilolün HPLC yöntemi ile miktar tayininin gün içi kesinliğine ait bulgular (n=3) ..... 76
Tablo 4-9: Karvedilolün HPLC yöntemi ile miktar tayininin günler arası kesinliğine ait bulgular (n=3) ..... 76
Tablo 4-10: Karvedilolün HPLC yöntemi ile miktar tayininin stabilitesine ait bulgular (n=3) ..... 77
Tablo 4-11: Karvedilolün 37 °C ultra saf su içerisindeki stabilitesine ait bulgular (n=3) ..... 78
Tablo 4-12: Karvedilolün çeşitli ortamlarda ve sıcaklıkta çözünürlüğü (n=3) ..... 78
Tablo 4-13: Sentezlenen polimerlerin molekül ağırlıkları ..... 79
Tablo 4-14: TNBS yöntemi ile belirlenen amin grup miktarları ..... 80
Tablo 4-15: Misellerin partikül büyüklüğü ve dağılımı (n=3) ..... 84
Tablo 4-16: Seçilen misellerin Zeta potansiyelleri (n=3) ..... 88

Tablo 4-17: Misellerin % enkapsülasyon etkinliği ve % yükleme kapasitesi (n=3) ..... 90
Tablo 4-18: F1C1 ve F1C3 misel formülasyonlarından karvedilolün salımına ait bulgular (n=3) ..... 91
Tablo 4-19: F4C1 ve F4C3 misel formülasyonlarından karvedilolün salımına ait bulgular (n=3) ..... 92
Tablo 4-20: F5C2 ve F5C3 misel formülasyonlarından karvedilolün salımına ait bulgular (n=3) ..... 93
Tablo 4-21: F1C1 ve F1C3 misel formülasyonlarınıdaki karvedilolün nazal sığır mukozasından geçişine ait bulgular (n=3)..... 94
Tablo 4-22: F4C1 ve F4C3 misel formülasyonlarınıdaki karvedilolün nazal sığır mukozasından geçişine ait bulgular (n=3)..... 95
Tablo 4-23: F5C2 ve F5C3 misel formülasyonlarınıdaki karvedilolün sığır nazal mukozasından geçişine ait bulgular (n=3)..... 96
Tablo 4-24: Sığır nazal mukozasından geçen karvedilol miktarına ait hesaplamalar (n=3) .... 97

# ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Karvedilolün açık formulü (British Pharmacopeia 2006 pp. 1193-1194) ..... 2
Şekil 2-2: Burnun anatomik yapısı-(Putz ve Pabst 1997)..... 15
Şekil 2-3: 1.Paraselüler yol 1a) interselüler alanlar, 1b) sıkı (tight) yapılar; ..... 18
Şekil 2-4: Misel Oluşumu..... 21
Şekil 2-5: Polimerik misellere genel ilaç yükleme yöntemleri A) Doğrudan B) Diyaliz Yöntemi C) Y/S Emülsiyon Yöntemi, D) İnce Film Yöntemi, E) Dondurma-Kurutma Yöntemi (Gaucher ve ark. 2005) ..... 40
Şekil 2-6: Foton korelasyon spektrofotometresinin çalışma esası ..... 44
Şekil 3-1: PCL-b-PEG sentezi (Karagöz 2009)..... 57
Şekil 3-2: PLL-b-mPEG sentezi (Karagöz 2009)..... 58
Şekil 3-3: CDI aktivasyonu ile PEI bağlanma reaksiyonu (Karagöz 2009) ..... 59
Şekil 3-4: Modifiye Franz difüzyon hücre yapısı (Yenil 2008) ..... 67
Şekil 4-1: Karvedilolün IR spektrumu ..... 69
Şekil 4-2: Karvedilolün DSC termogramı ..... 70
Şekil 4-3: Karvedilolün kalibrasyon doğrusu grafiği ..... 71
Şekil 4-4: Karvedilolün kalibrasyon doğrusu grafiği ..... 74
Şekil 4-5: Farklı miktarlarda, PEI bağlı polimerlerin fibroblast hücre canlılığına etkisi ..... 81
Şekil 4-6: Diblok kopolimer konsantrasyonu ile yoğunluk değişimi ..... 83
Şekil 4-7: PEI PEI bağlı diblok kopolimer konsantrasyonu ile yoğunluk değişimi ..... 83
Şekil 4-8: F1C1 misel formülasyonuna ait partikül büyüklüğü kromatogramı ..... 86
Şekil 4-9: F1C3 misel formülasyonuna ait partikül büyüklüğü kromatogramı ..... 86
Şekil 4-10: F4C1 misel formülasyonuna ait partikül büyüklüğü kromatogramı ..... 86
Şekil 4-11: F4C3 misel formülasyonuna ait partikül büyüklüğü kromatogramı ..... 87
Şekil 4-12: F5C2 misel formülasyonuna ait partikül büyüklüğü kromatogramı ..... 87
Şekil 4-13: F5C3 misel formülasyonuna ait partikül büyüklüğü kromatogramı ..... 87
Şekil 4-14: F4C1 formülasyonuna ait SPM görüntüsü (Tarama alanı 1,00 µm x 1,00 µm) .... 89
Şekil 4-15: F4C3 formülasyonuna ait SPM görüntüsü (Tarama alanı 1,00 µm x 1,00 µm) .... 89
Şekil 4-16: F1C1 ve F1C3 misel formülasyonlarına ait *in vitro* salım grafiği (n=3) ..... 91
Şekil 4-17: F4C1 ve F4C3 misel formülasyonlarına ait *in vitro* salım grafiği (n=3) ..... 92
Şekil 4-18: F5C2 ve F5C3 misel formülasyonlarına ait *in vitro* salım grafiği (n=3) ..... 93
Şekil 4-19: F1C1 ve F1C3 misel formülasyonlarındaki karvedilolün sığır nazal ..... 95

Şekil 4-20 : F4C1 ve F4C3 misel formülasyonlarındaki karvedilolün sığır nazal mukozasındangeçişine ait grafik (n=3) .....96
Şekil 4-21: F5C2 ve F5C3 misel formülasyonlarındaki karvedilolün sığır nazal mukozasından geçişine ait grafik (n=3).....97

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|---|---|
| °C | Santigrat Derece |
| µl | Mikrolitre |
| mM | Milimolar |
| Tm | Erime Sıcaklığı |
| Tg | Camsı Geçiş Sıcaklığı |
| Mn | Sayıca Ortalama Molekül Ağırlığı |
| Mw | Ağırlıkça Ortalama Molekül Ağırlığı |
| MA | Molekül Ağırlığı |
| ml | Mililitre |
| PEG | Polietilenglikol |
| mPEG | Metoksi Polietilenglikol |
| PEI | Polietilenimin |
| UV | Ultra Violet |
| FDA | Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi |
| PDLLA | Poli(D,L- laktat) |
| PCL | Poli ε-kaprolakton |
| $^{1}$H-NMR | Nükleer Manyetik Rezonans |
| FTIR | IR-spektroskopisi |
| GPC | Jel Geçirgenlik Kromatografisi |
| SPM | Taramalı Prob Mikroskobu |
| CDI | Karbonildiimidazol |
| TNBS | 2,4,6-trinitrobenzensülfonik asit |
| CMC | Kritik Misel Konsantrasyonu |
| $SnOct_2$ | Stannous (II) 2-hexyl-hexanoate |
| PDI | Poli Dispersite İndeksi |

# ÖZET

Kahraman, E. (2011). Misel Oluşturan, Biyobozunur, Biyouyumlu, Katyonik Polimerler İle İlaçların Nazal Yol İle Uygulanması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Karvedilol hipertansiyon, anjina pektoris, kronik kalp yetmezliği ve koroner kalp hastalığı tedavisinde kullanılan bir adrenerjik reseptör blokörüdür. Karvedilol, gastrointestinal kanaldan absorbe olur, fakat karaciğerde ilk geçiş metabolizmasına uğradığından biyoyararlanımı % 25-35 civarındadır. Karvedilol, log P'si 3,12 olan oldukça lipofilik bir ilaçtır.

Nazal yol, oldukça geniş bir absorpsiyon alanına sahip olması, poröz ve ince endotelinin olması, damarlanmanın fazla, kan akış hızının hızlı olması, karaciğer ilk geçiş etkisinin olmaması, doz aşımı riskinin düşük olması ve iyi hasta uyuncu gibi avantajları nedeniyle ile pek çok ilacın alternatif veriliş yoludur.

Polimerik miseller; "çekirdek-kabuk" tipi yapı içerirler. "Çekirdek" denilen iç kısım, hidrofobik yapıdadır ve hidrofobik-hidrofobik etkileşimler sonucu hidrofobik ilaçların çözünürlüğünü artırmaktadır. "Kabuk" denilen dış kısım, hidrofilik yapıdadır ve ilacın kan dolaşımında kalış süresinin uzatılmasında ve mukozadan geçişte rol oynamaktadır. Miseller, çözünürlüğü az olan ilaçların çözünürlüğünü arttırmaları ve nano boyutta hazırlanabilmeleri nedeniyle, mukoza membranlarından geçişte uygun ilaç taşıyıcı sistemler olarak düşünülmektedir.

Çalışmada, diblok kopolimerler ve polietilenimin bağlı kopolimerler sentezlenmiş ve bu polimerler kullanılarak karvedilol yüklü miseller oluşturulmuştur. Misellerin karakterizasyonunu takiben in vitro salım ve ex vivo geçiş çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak; çalışmada anyonik ve katyonik yapılı polimerler ile karvedilol yüklü misellerin hazırlanabileceği ve nazal olarak uygulanabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler : Polimerik Misel, Karvedilol, Nazal İlaç Salımı, Nazal Geçiş, Biyopolimerler

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 5131

## ABSTRACT

Kahraman, E. (2011). Nasal administration of drugs with biodegradable, biocompatible and cationic polymers that compose micelle, Istanbul University Institute of Medical Sciences, Department of Pharmaceutical Technology, Postgraduate Thesis. Istanbul

Carvedilol, which is used in the therapies of hypertension, angina pectoris, chronic heart failure and coronary heart disease, is an adrenergic receptor blocker. Carvedilol is absorbed through gastrointestinal tract; however when it passes first-passage metabolism in liver, its bioavailability is there about % 25-35. The log P of carvedilol is 3.12, which means that it is a lipophilic drug.

Nasal route is the alternative delivery method of most of the drugs due to its advantages that it has a rather large absorption area, porous and thin endotelin, it makes vascularization higher and blood flow velocity faster, there is no first-passage effect of liver, the overdose risk is low and it has a good patient-compliance.

Polymeric micelle includes a “core – corona” type of structure. The internal side, called as “core” is based on a hydrophobic structure and it increases the dissolution of hydrophobic drugs resulted from hydrophobic-hydrophobic interferences. The external side, called as “corona” has also a hydrophobic structure and is responsible for extending the remaining length of drug in blood circulation and transferring it through mucous. Since micelles increase the dissolution of the drugs that have low dissolubility and have them composed in nano-dimension, they are thought as pertinent drug transferring systems through the transmission from mucous membranes.

In this study, diblock copolymers and copolymers bonded with polyethylenimine are synthesized and composed micelle loaded with carvedilol by using polymers. Following with the characterization of micelle, in vitro release and ex vivo transmission are achieved.

In conclusion, it is presented that micelle loaded with carvedilol can be composed with the use of anionic and cationic structured polymers and practiced through the nasal route.



Key Words: Polymeric Micelle, Carvedilol, Nasal Drug Release, Nasal Transport, Biopolymers

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 5131

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Oldukça geniş bir absorpsiyon alanına sahip olması, poröz ve ince endotel yapısı, damarlanmanın fazla ve kan akış hızının hızlı olması, karaciğer ilk geçiş etkisinin olmaması, hastanın kendisinin uygulayabileceği bir yol olması ve doz aşımı riskinin düşük olması avantajları ile birlikte nazal yol pek çok ilacın alternatif veriliş yolu haline gelmiştir (Myging ve Dahl 1998; Güngör ve Özsoy 2009).

Lipozomlar, mikropartiküller, nanopartiküller, nano-birleşimler (associates), ilaç-polimer konjugatları ve polimerik miseller gibi çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler özellikle düşük terapötik indeksli ilaçların organizmaya verilmelerinde absorpsiyon arttırıcı olarak tercih edilmektedir (Jones ve Leroux 1999). Çözünürlüğü iyi olmayan ilaçların formülasyonunda sürfaktanlardan oluşan misellerin kullanımı mevcuttur (Torchilin 2005). Son zamanlarda ise sulu bir ortamda amfifilik blok kopolimerlerden oluşan polimerik miseller suda çözünürlüğü iyi olmayan etkin maddelerin çözünürlüğünü artırmak için gelecek vaad eden formülasyonlar olarak ilgi çekmektedir. Blok kopolimer miseller tipik çekirdek-kabuk yapısında nano boyutlu partiküllerdir. Sulu bir ortamda kabuk misel süspansiyonunu sağlarken çekirdek de hidrofobik etkin maddeyi hapseder (Amiji 2007 pp. 385-408).

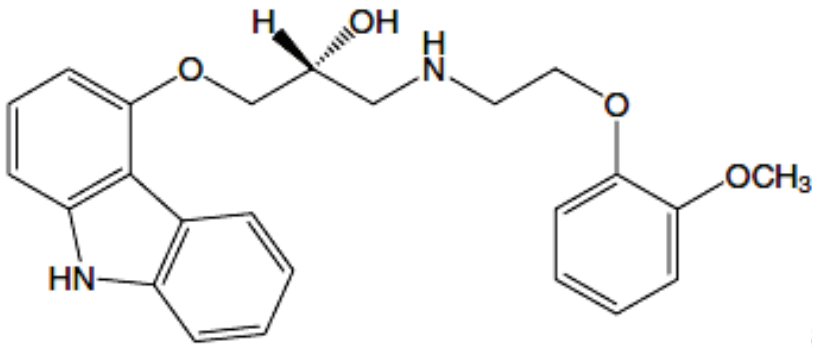
Çalışmamızda, etkin madde olarak yüksek ilk geçiş metabolizmasından dolayı oral biyoyararlanımı düşük olan (% 25-35) (Sweetman 2002 pp. 855-856; Üstünes 2011) ve oldukça lipofilik bir madde olan (log P 3,12) (http://www.tsrlinc.com/resources/services/) karvedilol kullanılmıştır. Karvedilol hipertansiyon, anjina pektoris, kronik kalp yetmezliği ve koroner kalp hastalığı tedavisinde kullanılan bir adrenerjik reseptör blokörüdür (Üstünes 2011). Polimerik miseller ile nazal yolla hidrofobik etkin madde uygulanışı ile ilgili yeterli araştırmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, vücutta bozunabilen polimerler kullanılarak diblok kopolimerler (mPEG2000-b-PCL, mPEG5000-b-PCL, mPEG2000-b-PLL, mPEG5000-b-PLL) ve bunların PEI bağlı yapları sentezlenmek suretiyle karvedilol içeren polimerik misellerin oluşturulması ve nazal yolla uygulanması amaçlanmıştır.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. Karvedilol Hakkında Genel Bilgiler

Karvedilol hem alfa ($\alpha_1$-) hem de selektif olmayan (β)-blokörü etkileri olan bir adrenerjik reseptör blokörüdür. Hipertansiyon, anjina pektoris, kronik kalp yetmezliği ve koroner kalp hastalığı tedavisinde kullanılmaktadır (Üstünes 2011). Ayrıca karvedilolün antimitojenik ve antioksidan etkileri de vardır (Wu ve ark. 2007; Üstünes 2011).

Kapalı formülü $\mathbf{C}_{24}H_{26}N_2O_4$ olan karvedilolün açık formülü Şekil 2-1'de gösterilmiştir.




**ve enantiyomeri**

((2*RS*)-1-(9*H*-karbazol-4-iloksi)-3-[[2-(2-metoksifenoksi)etil]amino]propan-2-ol)

**Şekil 2-1: Karvedilolün açık formulü (British Pharmacopeia 2006 pp. 1193-1194)**

**Molekül ağırlığı:** 406,5 (British Pharmacopeia 2006 pp. 1193-1194).

**Fizikokimyasal özellikleri:** Beyaz veya kısmen beyaz kristal tozdur. Suda ve seyreltik asitlerde hemen hemen hiç çözünmez (British Pharmacopeia 2006 pp. 1193-1194). Kısmen alkolde (British Pharmacopeia 2006 pp. 1193-1194) ve etil eterde (The Merck Index 2001) çözünür. Kolayca dimetil sülfoksitte, metilen klorürde ve metanolde çözünür (The Merck Index. 2001). Polimorfizm gösterir (British Pharmacopeia 2006 pp. 1193-1194).

### 2.1.1. Miktar Tayini

#### 2.1.1.1. Spektrofotometrik Yöntem

Metanol kullanılarak (Yöntem A) ve polietilen glikol-400: su (2:1) (Yöntem B) tabletlerde saf formdaki karvedilolün belirlenmesi için iki tane basit, hızlı, kesin, uygun ve tekrarlanabilir UV spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Karvedilolün UV spektrumu metanolde en yüksek 242 nm ve PEG-400:su (2:1)'da en yüksek 245 nm absorpsiyon göstermiştir (Chaurasia ve ark. 2005).

Karvedilol ve ezetimibin tespiti için UV spektroskopik yöntem geliştirilmiştir. Her iki ilaç için de çözücü sistemi olarak asetonitril:su (20:80) kullanılmıştır. Karvedilolün doğrusallık eğrisi 232 nm dalga boyunda 2-50 µg/ml aralığında, ezetimibinki ise 238 nm dalga boyunda 2-20 µg/ ml aralığında saptanmıştır. Teşhis ve miktar tayini limitleri ise sırasıyla karvedilol için 0,4-1,3 µg/ml ezetimib için ise için 0,7-2,1 µg/ml bulunmuştur (İmran ve ark. 2006).

#### 2.1.1.2. Spektrofluorometrik Yöntem

Asidik, alkali ortamların ve organik çözücülerin karvedilolün floresans spektrumu üzerine etkileri incelenmiştir. Bağıl floresans şiddeti 254 nm uyarma dalga boyunda ve 356 nm emisyon dalga boyunda ölçülmüştür. 0,50-270 ng/ml aralığında doğrusallık tespit edilmiştir. Teşhis limiti ise 0,19 ng/ml olarak bulunmuştur (Xu ve ark. 2005).

Karvedilol ve ampisilin sodyum senkronize florimetri yöntemin ile saptanmıştır. Senkronize floresans yönteminde $\Delta\lambda = 80$ nm seçilmiş ve etkin maddelerin ikisi de aynı zamanda saptanmıştır (Xiao ve ark. 2005).

#### 2.1.1.3. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıçan plazmasında bulunan karvedilol katı faz ekstraksiyonunun ardından C18 kolon, floresans dedektörü kullanarak HPLC ile saptanmıştır. Mobil faz olarak metanol:50 mM $KH_2PO_4$(60:40, h/h) (pH=2,0) kullanılmış ve cihazın akış hızı 1,0 ml/dk'ya, eksitasyon dalga boyu 247 nm'ye emisyon dalga boyu sie 344 nm'ye ayarlanmıştır (Hokama ve ark. 1999).

İnsan plazmasında bulunan karvedilolün miktar tayini için floresans dedektörlü HPLC yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada sabit faz olarak Lichrosphere R CN (250 mm × 4,0 mm, 5µ), mobil faz olarak asetonitril: %0,1 trietilamin içeren 20 mM amonyum

asetat tamponu (pH =4,5) karışımı (40:60, h/h) ve iç standart olarak domperidon kullanılmıştır. Cihazın akış hızı 0,8 ml/dk'ya, uyarma dalga boyu 282 nm'ye ve emisyon dalga boyu 340 nm'ye ayarlanmıştır. 1-128 ng/ml aralığında doğrusallık tespit edilmiştir (Rathod ve ark. 2007).

İnsan plazmasında bulunan karvedilol florimetrik dedektörlü HPLC yöntemi ile tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada sabit faz olarak Develosil 3µ ODS 100 x4,6 mm I.D. kolon ve hareketli faz olarak asetonitril:30 mM potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH=2) karışımı (30:70, h/h), iç standart olarak dihidroergokristan mesilatı kullanılmıştır (Ptacek ve ark. 2003).

Karvedilol ve karvedilol M21-aglikonun plazmadaki miktarı elektrokimyasal dedektörlü HPLC ile tespit edilmiştir. Mobil faz olarak 65,2 mM sitrik asit, 69,6 mM disodyum hidrojen fosfat, 0,25 mM sodyum n-oktil sülfat ve 0,01 mM etilendiamin tetra-asetik asit disodyum tuzu içeren fosfat tamponu (pH 3,8) : metanol (47:53, h/h) kullanılmıştır. Cihazın akış hızı ise 0,47 ml/dk'ya ayarlanmıştır. Teşhis limiti ise her iki analit için de 0,10 ng/ml bulunmuştur (Machida ve ark. 2003).

Karvedilol ve safsızlıklarının tespiti için UV dedektörlü ters faz HPLC yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada sabit faz olarak Chromolit RP 8 (100x4,6 mm, 5 µ) kolon, mobil faz olarak asetonitril:su (45:55, h/h) karışımı ( pH =2,5) kullanılmıştır. Cihazın dalga boyu 280 nm'ye, akış hızı 0,5 ml/dk'ya ve kolon sıcaklığı 40°C'ye ayarlanmıştır (Stajanovic ve ark. 2005).

İnsan serumunda bulunan karvedilolün miktar tayini için UV dedektörlü ters faz HPLC yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada sabit faz olarak Kromasil KR 100, 5µ, C8 kolon ve mobil faz olarak asetonitril: %0,25 trietilamin içeren 15 mM $H_3PO_4$ karışımı (37:63, h/h) kullanılmıştır. Cihazın akış hızı 1 ml/dk'ya, dalga boyu 238 nm'ye ayarlanmıştır. 5-500 ng/ml aralığında doğrusallık tespit edilmiştir (Gannu ve ark. 2007).

Karvedilolün tayini için başka bir UV dedektörlü HPLC yönteminde ise dalga boyu 240 nm olarak seçilmiş, cihazın akış hızı olarak 1,0 ml/dk, enjeksiyon hacmi ise 20 µl olarak ayarlanmıştır. Sabit faz olarak da C8, 150 mm x 4.6 mm, 5µm kolon kullanılmıştır. Mobil faz hazırlamak içinse 1,77 g potasyum dihidrojen fosfat 1000 ml saf suda çözülüp bu çözeltinin pH'sı fosforik asit ile pH= 2,0'a ayarlanmıştır ve

potasyum dihidrojen fosfat çözeltisi:asetonitril (65:35, h/h) oranında karıştırılmıştır (British Pharmacopeia 2006 pp. 1193-1194).

#### 2.1.1.4. Voltametrik Yöntem

Karvedilolün pH=2,0-11,0 aralığında camsı karbon elektrotla doğrusal taramalı ve diferansiyel puls voltametrisiyle elektrokimyasal yükseltgenmesi çalışılmıştır. pH =8,0 Britton-Robinson tamponunda (BRT) diferansiyel puls voltametrisiyle miktar tayini yapılmıştır. Geliştirilen yöntem tablet dozaj formunda karvedilolün belirlenmesi için kullanılmıştır (Radi ve Elmogy 2005).

#### 2.1.1.5. Kapiller Elektroforez Yöntemi

Serumda bulunan karvedilol enantiomerlerinin kapiler elektroforez yöntemiyle, kiral seçici ajan olarak siklodekstrin kullanılarak tespit edilebileceği literatürde kayıtlıdır (Clohs ve McErlane 2001).

#### 2.1.1.6. Diğer Yöntemler

İdrarda karvedilolün ve metaboliterinin belirlenmesi için gaz kromatografisi - kütle spektrometresi yönteminin kullanıldığı literatürde kayıtlıdır (Myung ve Jo 2005).

Çoklu bir pompa akış sisteminde karvedilolün kemiluminometrik belirlenmesi literatürde kayıtlıdır (Pires ve ark. 2005).

### 2.1.2. Farmakolojik Özellikleri

#### 2.1.2.1. Etki Mekanizması

Karvedilol hem $\alpha_1$- hem de β-reseptörleri antagonize etmektedir. β-antagonisti etki S(-) karvedilol enantiyomerinden kaynaklanıyorken $\alpha_1$-antagonisti etki her iki enantiyomerde de eşit düzeydedir. Karvedilolün vazodilatör etkisi öncelikle $\alpha_1$-reseptörlerini bloke etmesi ile sağlanmaktadır. Ayrıca yüksek dozlarda, bazı damar yataklarında belirgenleşen kalsiyum kanallarını bloke etmesi de vazodilatör etkisine katkıda bulunmaktadır (Sweetman 2002 pp. 855-856; Üstünes 2011). Ayrıca bu etki mekanizması sonucunda karvedilolün beta-blokör etkisi de bulunduğu için refleks taşikardi meydana gelmez. Bunun yanısıra $\alpha_1$-blokörü özellikleri de β-blokörü etkisinden kaynaklanan olası periferik vazokonstriksiyonu da dengeler. İntrinsik sempatomimetik etkinlik göstermez (Üstünes 2011).

β-adrenerjik reseptörlerin iki alt çeşidi tanımlanmaktadır: $\beta_1$ ve $\beta_2$. $\beta_2$ reseptörleri bronşiyal dokuyu, periferal kan damarlarını, uterusu ve pankreası içeren kalp ile ilgili olmayan dokularda bulunuyorken $\beta_1$ reseptörleri çoğunlukla kalpte bulunur. $\beta_1$ reseptörlerinin karvedilol tarafından blokajı kalp hızını, miyokardiyal kontraktiliteyi ve impulsların iletim hızını azaltır. Ayrıca adrenerjik olarak uyarılmış renin salımını ve lipolizizi baskılar. $\beta_2$ reseptörlerinin karvedilol tarafından blokajı ise bronşiyal direncin artmasını ve katekolamin ile uyarılmış glikoz metabolizmasının inhibisyonunu sağlar (Sweetman 2002 pp. 855-856).

Kronik kalp yetmezliği olan hastalarda artmış durumdaki sempatik stimülasyon $\beta_1$-reseptörlerin down-regülasyonuna neden olur. Bu gibi hastalarda β-reseptörlerin sayısı azaldığı gibi adrenerjik uyarılara karşı duyarlılıkları da azalır. Karvedilolün kalp yetmezliği tedavisindeki etkisi öncelikle $\beta_1$-reseptörleri bloke etmesi ile meydana gelir. $\beta_1$-reseptör blokajı miyokardda bulunan $\beta_1$-reseptörleri up-regüle ederek artan sempatik stimülasyona yanıtların restorasyonunu sağlar (Üstünes 2011).

Koroner kalp hastalığı olan hastalarda karvedilol etkisini miyokard oksijen ihtiyacını ve sempatik aşırı aktiviteyi azaltarak göstermektedir. Ayrıca miyokard ön yük (pulmoner arter basıncı ve pulmoner kapiller wedge basıncı) ve ard yükü (total periferik dienci) azaltır (Calbicor 2011).

Karvedilol antioksidan etkisini lipit peroksidasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ederek oluşturur (Üstünes 2011). Wu ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada damar hasarından sonra neointima hiperplazi ve aterosklerozun ilerlemesinde büyük bir öneme sahip olan matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) ve matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) üzerinden karvedilolün antioksidan etkileri araştırılmıştır. Çalışmada damar hasarı yüksek miktarda kolestrol diyeti ile beslenen tavşanların karın aortlarına uygulanan balon kataterler ile sağlanmıştır. 21 günde tavşanlara oral olarak karvedilol (20 mg/kg/gün) veya probukol (100 mg/kg/gün) uygulanmasıyla önemli derecede azalan, artmış oksidatif DNA hasarı ve artmış MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonu ile beraber kaydadeğer derecede aortik neointima oluşumu tespit edilmiştir. Çalışmada karvedilolün redoks ile ilgili yolakları düzenleyerek MMP-2 veMMP-9'un *in vivo* ve *in vitro* ekspresyonunu inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır.

### 2.1.2.2. Farmakokinetik Özellikleri

**Absorpsiyonu:** Karvedilol iyi bir şekilde gastrointestinal kanaldan absorbe olur fakat karaciğerde ilk geçiş metabolizmasına uğrar. Bu nedenle genel biyoyararlanımı % 25-35 civarındadır. S(-) enantiyomerinin mutlak biyoyararlanımı % 15 ve R(+) enantiyomerininki % 31 dir. Oral biyoyararlanımı karaciğer hastalarında hafifçe ve yaşlılarda % 50 oranında artar. Besinler karvedilolün absorpsiyon hızını azaltır fakat absorbe olan ilaç miktarında değişikliğe neden olmaz. Karvedilolün en yüksek plazma konsantrasyonları ve antihipertansif etkisi 1-2 saatte görülür. Bu süre uygulanan doz ile doğrusal olarak ilişkilidir. Tekrarlanan dozlarda verildiğinde vücutta birikmez. Etki süresi yaklaşık 15 saattir (Sweetman 2002 pp. 855-856; Üstünes 2011).

**Dağılımı:** Karvedilol yüksek lipit çözünürlüğüne sahiptir. Anne sütü dahil olmak üzere bütün vücut sıvılarına geniş ölçüde dağılır. Karvedilolün % 98'inden fazlası plazma proteinlerine bağlanır ve R(+) enantiyomeri S(-) enantiyomerine göre plazma proteinlerine daha sıkı bağlanır (Sweetman 2002 pp. 855-856; Üstünes 2011).

**Metabolizayonu:** Karvedilol aromatik halka oksidasyonu ve sitokrom P450 2D6 enzimi ile glukuronidasyona uğratılarak büyük ölçüde karaciğerde metabolize olur. Beta-antagonisti ve zayıf alfa antagonisti etki gösteren üç aktif metaboliti mevcuttur. Bunlardan biri olan 4'-hidroksifenilkarvedilol bir beta-blokör olarak karvedilole göre 13 kat daha aktiftir (Üstünes 2011). Üç aktif metabolitin konsantrasyonları ana maddeden 10 kat daha düşüktür. Karvedilolün hidroksikarbazol metabolitlerinden ikisi karvedilolden 30-80 kat daha güçlü olan aşırı potent antioksidanlardır (Calbicor 2011).

**Eliminasyonu:** Metabolitlerin yaklaşık % 60 'ı safra içine itrah edilir ve feçesle elimine edilir; % 16 kadarı da idrar ile atılıma uğrar. İdrarla değişmeden atılan miktarı verilen dozun % 2'sinden azdır. S(-) enantiyomerinin eliminasyon yarı ömrü 7-11 saat ve R (+) enantiyomerinin yarı ömrü 5-9 saattir (Üstünes 2011).

**Dozu ve Uygulanması:** Hipertansiyon tedavisinde oral yolla günde bir defa 12,5 mg başlangıç dozu karvedilol verilir. Ardından bu miktar iki gün sonra günde bir defa 25 mg'a arttırılır. Başka bir alternatif olarak ise günde iki defa 6,25 mg başlangıç dozu verilir. Uygulama dozu 1-2 hafta sonra günde iki defa 12,5 mg'a arttırılır. Bu doz gerektiğinde en azından iki haftalık aralıklar ile günde bir defa veya bölünmüş olarak 50 mg'a artırılabilir. Yaşlı hastalarda günde bir defa 12,5 mg doz uygulanması yeterli olabilir.

Kronik kalp yetmezliği tedavisinde başlangıç dozu oral yol ile günde iki defa 3,125 mg'dır. Tolere edilebilirse doz iki haftadan sonra günde iki defa 6,25 mg'a arttırılmalı ve daha sonra iki haftadan daha az olmayan aralıklar ile doz artan bir şekilde hasta tarafından tolere edilebilen en yüksek doza artırılır. Fakat bu doz 85 kg'dan daha kilolu hastalarda günde iki defa 50 mg'ı veya 85 kg'dan daha zayıf olan hastalarda günde iki defa 25 mg'ı aşmamalıdır.

Anjina pektoris tedavisinde oral yolla günde iki defa 12,5 mg başlangıç dozu karvedilol verilir. Ardından bu miktar iki gün sonra günde iki defa 25 mg'a arttırılır (Sweetman 2002 pp. 855-856).

**Yan Etkileri:** β-blokörlerin en sık ve en ciddi yan etkileri β-adrenerjik bloklama aktiviteleri ile ilgilidir. En ciddi yan etkiler arasında kalp yetmezliği, kalp bloğu ve bronkospazm bulunmaktadır. Hasta uyuncunu zorlaştıran en sıkıntı verici yan etkiler ise yorgunluk ve ekstremitelerde soğukluktur (Sweetman 2002 pp. 855-856).

Bu yan etkilerin dışında hastalarda postüral hipotansiyon, sersemlik, baş ağrısı, gastrointestinal bozukluklar, bradikardi; gözlerde kuruluk, influenzaya benzer belirtiler; ender olarak anjina, intermittan klodikasyon alevlenmesi, alerji deri reaksiyonları, burun tıkanıklığı, hışıltı, depresif duygudurum, uyku bozuklukları, parastezi, karaciğer enzimlerinde değişiklikler, trombositopeni, lökopeni de bildirilmiştir (Kayaalp 2001).

**İlaç Etkileşimleri:** β-blokörler ile hem farmakodinamik hem de farmakokinetik etkileşimler rapor edilmiştir. Antihipertansif etkisi, kardiyodepresan etkisi, karbonhidrat metabolizması üzerinde etkisi olan veya bronşiyal $\beta_2$-reseptörleri üzerinde etkisi olan, $\beta_1$- ve $\beta_2$-reseptörlerinde β-blokörlerin çeşitli etkilerini antagonize eden veya artıran ilaçlar ile farmakodinamik etkileşimler meydana gelebilir (Sweetman 2002 pp. 855-856).

Karvedilol ile farmakodinamik etkileşimler gösteren ilaçlar;

- Klonidinin β-blokör ilaçlar ile birlikte uygulanması kan basıncını ve kalp atım hızını düşürücü etkilerini potansiyalize edebilir.
- Karvedilol ve diltiazem birlikte oral yolla uygulandığında izole olgularda ileti bozukluğu (nadiren hemodinamik denge bozukluğu ile birlikte) gözlenmiştir. β-blokör aktivitesi olan diğer ajanlarda olduğu gibi karvedilol birlikte uygulanan antihipertansif etkili (örneğin; $\alpha_1$ reseptör antagonistleri) veya yan etki profilinin bir parçası da hipotansiyon olan ilaçların etkisini güçlendirebilir.

- Anestezi sırasında karvedilol ve anestezik ilaçların sinerjistik negatif inotrop ve hipotansif etkileri risk oluşturabilir (Rıza Ommaty 2006; Calbicor 2011).

Farmakokinetik etkileşimler β-blokörlerin absorpsiyonunu ve metabolizasyonunu değiştiren ilaçlar ile birlikte meydana gelir. β-blokörlerin plazma konsantrasyonunu değiştirirler (Sweetman 2002 pp. 855-856).

Karvedilol ile farmakokinetik etkileşimler gösteren ilaçlar;

- Digoksin ve karvedilolün birlikte uygulanmasında digoksin konsantrasyonları % 15 kadar artar. Hem karvedilol hem de kalp glikozidleri AV iletimini yavaşlatır.
- β-blokör etkili ilaçlar insülin ve oral hipoglisemiklerin kan şekerini düşürücü etkisini artırabilirler. Hipoglisemi belirtileri maskelenebilir veya azalabilir (özellikle taşikardi).
- Karaciğer metabolizması indükleyici ve inhibitörlerinden olan rifampisin karvedilol plazma konsantrasyonlarını yaklasık % 70 azaltır.
- β-blokör özellikleri olan ilaçlar ile birlikte katekolamin deplesyonuna neden olan bir ilaç (örneğin; rezerpin ve/veya monoamin oksidaz inhibitörleri) alan hastalar hipotansiyon ve/veya bradikardi belirtilerini gösterebilirler.
- Verapamil, diltiazem ve diğer antiaritmikler karvedilolle kombinasyon halinde AV iletim bozuklukları riskini artırabilirler (Rıza Ommaty 2006; Calbicor 2011).

### 2.1.3. Farmasötik Teknoloji Alanındaki Çalışmaları

Karvedilol ile farmasötik teknoloji alanında birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar karvedilol taşıyıcısı olarak yeni terapötik sistemlerin kullanılması ve hem bu sistemler ile hem de klasik taşıyıcı sistemler ile nazal, rektal, transdermal, oral, bukkal uygulanan ilaç sistemlerini içermektedir.

Sanjay ve ark. (2009) ilk geçiş etkisini ortadan kaldırmak, hipertansiyon ve anjina pektoris tedavisinde terapötik etkinliği artırmak için nazal yolla uygulama amacıyla karvedilolün aljinat mukoadezif mikrokürelerini çalışmışlardır. 26,36-54,32 µm boyutunda, % 36,62-56,18 arasında enkapsülasyon etkinliğine sahip bu mikroküreler su içinde yağ (S/Y) emülsiyon tekniğiyle hazırlanmışlardır.

Karvedilolün nano çöktürme yöntemi kullanılarak Eudragit E100 nanopartikülleri hazırlanmıştır. Bu nanopartiküller 190-270 nm aralığında olup % 85-91 enkapsülasyon etkinliğine sahiptir. Karvedilol nanopartiküllerinden ilaç salımı 5 dk içinde gerçekleştiği için hipertansiyon tedavisi için uygun oldukları belirtilmiştir (Kalimuthu ve Yadav 2009).

Karvedilolün biyoyararlanımını artıran ve ilacın antihipertansif etkisini uzatmak, başlangıçta hipotansif pikini azaltmak için salımı uzatan karvedilol enkapsüle poli(laktik-co-glikolik asit) (PLGA) nanopartikülleri nanoprespitasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Nanopartiküllerin ortalama boyutu 132-234 nm, ilaç enkapsülasyon etkinliği ise % 77,6 bulunmuştur. Nanopartiküllerden *in vitro* kümülatif ilaç salımı 24 saatte % 72'dir. Tavşanlarda yapılan *in vivo* biyodağılım çalışmaları bu partiküllerin kalpte, karaciğerde ve böbrekte dağıldığı daha yüksek konsantrasyonlarda ise hedef alanlara salımına izin verilebildiğini ortaya koymuştur (Jawahar ve ark. 2009).

Karvedilolün çözünme hızı ve çözünürlüğünü artırmak için çözücü uçurma yöntemiyle polivinil pirolidon (PVP) K30 içeren katı dispersiyonları hazırlanmıştır. Yapılan çalışmada ilacın çözünürlüğü polimer konsantrasyonu artışıyla artmıştır. Katı dispersiyonlar karvedilolün çözünme hızını da fiziksel karışım ve saf ilaç ile kıyaslandığında artırmışlardır (Sharma ve Jain 2010).

Singh ve ark. (2009) absopsiyonu artırma potasiyeline sahip karvedilol yüklü kendiliğinden oluşan mikroemülsiyon salım sistemleri çalışmışlardır. Çalışmada faz diagramları ve çözünürlüğe dayanarak lauroglikol, Gelucire 44/14, Tween®20 sürfaktan olarak seçilmiştir. Mahmoud ve ark. (2009) yaptığı çalışmada da karvedilolün biyoyararlanımını artırmak için karvedilol içeren kendiliğinden oluşan emülsifiye olan tablet hazırlamışlardır. Bu şekilde hem klasik bir dozaj şekli olan tabletin hem de kendiliğinden oluşan nanoemülsiyon salım sisteminin avantajları kombine edilmiştir.

Hasta uyuncunu artırmak amacıyla günde bir defa kullanılmak üzere karvedilolün kontrollü salım formülasyonları hazırlanmıştır. Bu formülasyonların uygulanmasından sonra plazma konsantrasyon-zaman profilleri 24 saat boyunca kontrollü salımın günde iki defa alınan hemen salıma benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Plazma konsantrasyon-zaman eğrisi altındaki alan (AUC), en yüksek plazma konsantrasyonları ($C_{max}$) ve düşüş konsantrasyonları hemen salınan karvedilol ile kıyaslandığında kontrollü salınan karvedilole eşdeğerdir. Ayrıca karvedilolün kontrollü

salım ve hemen salım formülasyonları hipertansiyon ve kalp yetmezliği popülasyonlarında eşit kararlı durum (steady-state) farmakokinetik karakteristikleri sergilemişlerdir (Tenero ve ark. 2006).

Karvedilolün çözünürlüğü iyi olmadığından dolayı bu durum çözünme hızını da etkilemektedir. Çözünürlüğü artırma amacıyla mikronize karvedilol fosfat kullanılarak uzatılmış salım yapan matriks tableler hazırlanmıştır. Mikronize ürünün mikronize olmayana kıyasla *in vitro* salım hızında önemli bir artış gözlenmiştir (Chatterjee ve Pal 2010).

İlaç salım düzenleyicisi olarak hidroksipropil-β-siklodekstrin (HPβCD) ve biyoadezif uzatılmış salım platformu olarak da polietilen oksit (PEO) kullanılarak karvedilolün bukkal salımı için tablet hazırlanmış ve domuz mukozası kullanılarak *ex vivo* geçiş çalışmaları yapılmıştır. Çalışma sonucunda siklodekstrin içeren PEO tabletten geçen karvedilol miktarının sadece siklodekstrin içeren tabletlerdekinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca tablette HP-β-CD bulunması hazırlanan bu tabletin iyi olan adezyon özelliklerini önemli derecede değiştirmediğini görülmüştür (Cappello ve ark. 2006).

Karvedilolün sitrik asit ve β-siklodekstrin ile beraber üçlü kompleksini oluşturarak çözünme hızı ve çözünürlüğünü artırılmış ve ağızda çözünen tabletler formüle edilmiştir. Püskürtme-kurutma yöntemi ile elde edilen kompleks karvedilolün çözünürlüğünde 110 kat artış ve yüksek kompleksleşme etkinliği sağlamıştır. Uygun yardımcı maddeler kullanılarak püskürtme kurutma yöntemi ile formüle edilen ağızda çözünen tabletler 5 dakikada % 100 çözünme göstermişlerdir (Pokharkar ve ark. 2009).

Hidroksi propel metil selüloz (HPMC), Carbopol®934, Eudragit RS 100 ve etil selüoz kullanılarak karvedilol bukkal mukoadezif yamaları çalışılmıştır. *İn vitro* çalışmalarda yamalar 90 dakikada % 86,26-98,32 arasında ilaç salımı göstermişlerdir. İnsanlarda yapılan *in vivo* ilaç salım çalışmaları karvedilol HPMC-karbopol yamaları 90 dakikada % 74,63-88,02 arasında ilaç salımı sergiliyorken tavşanlarda yapılan çalışmalar ise % 90,85 salım göstermiştir. Karvedilolün *in vitro* salımı ile *in vivo* salımı arasında iyi bir korelasyon gözlenmiştir (Thimmasetty ve ark. 2008).

Kitozan ve pektin polimerleri kullanılarak karvedilol hidroklorürün biyoadezif yamaları hazırlanmış ve *in vitro* ve *in vivo* performansları değerlendirilmiştir.

Yamaların şişme indekslerinin pektin konsantrasyonuyla orantılı olduğu bulunmuştur. Formüle edilen biyoadezif yamaların yüzey pH'sı 6,2-7,2 arasında bulunmuştur. En uygun biyoadezif yama (kitozan:pektin 20:80) 22,10 ± 0,20 g biyoadezif direnç, % 98,73 *in vitro* salım ve 8 saat içinde 451 dakika *ex vivo* mukoadezyon süresi göstermiştir. İn vivo sonuçlarda ise patchler oral yol ile kıyaslandığında karvedilolün biyoyararlanımında önmeli bir artış göstermiştir (Kaur, A. ve Kaur, G. 2011).

Çözücü uçurma tekniği ile farklı oranlarda hidrofilik ve hidrofobik polimer kombinasyonları içeren matriks tipi transdermal terapötik sistemler hazırlanmış ve Franz difüzyon hücreleri kullanılarak *in vitro* geçiş çalışmaları yapılmıştır. Fizikokimyasal ve *in vitro* deri geçiş çalışmalarına dayanarak etil selüloz:PVP (7,5:2,5) ve Eudragit RL: Eudragit RS (8:2) *in vivo* çalışmalar için seçilmiştir. Sıçanlarda yapılan biyoyararlanım çalışmaları karvedilolün transdermal yamalarının kararlı durum plazma konsantrasyonlarını sağladığı ve oral uygulamaya kıyasla sırasıyla % 71 ve % 62 biyoyararlanımı artırdığı saptanmıştır (Ubaidulla ve ark. 2007).

Çözücü uçurma yöntemiyle ilaç deposu olarak hidroksi propil metil selüloz (HPMC) kullanılan transdermal karvedilol yamaları hazırlanmıştır. Çalışmada ilacın kontrollü salımını sağlamak için Eudragit RL 100 ve Eudragit RS100 kullanılmıştır. İlacın geçiş hızı Tween®80 ve Span®80 ile artırılmıştır. Ayrıca yamaların deri iritasyonu yapma olasılığının olmadığı saptanmıştır (Tanwar ve ark. 2007).

Karvedilolün gastrointestinal yan etkilerini yok etmek için agar-agar ve jelatin gibi suda çözünen polimerik maddeler ve plastifiyan madde olarak propilen glikol kullanılarak rektal supozituvarları hazırlanmıştır. Yapılan çalışmada jelatin-agarlı supozituvarlar dağılmıyor/erimiyor iken sadece jelatinli supozituvarlar dağılmış/erimişlerdir. Sonuçlar jelatin:agar oranı % 25'e (a/a) kadar çıktığında erime süresinin ve ilaç salımının etkilenmediğini göstermiştir. Agar oranları daha yüksek konsantrasyonlarda olduğunda ise yavaş salım görülmüştür (Swamy ve ark. 2009).

### 2.1.4. Türkiye Piyasasında Bulunan Farmasötik Preparat Şekilleri, Dozu ve Üretici Firmaları

Türkiye piyasasında bulunan karvedilol içeren ticari preparat şekilleri, dozu ve üretici firmaları Tablo 2-1'de verilmiştir (Üstünes 2011).

**Tablo 2-1: Karvedilolün Türkiye piyasasında bulunan farmasötik preparat şekilleri, dozu ve üretici firmaları**

| Müstehzar | Dozaj Şekli | Miktar/Doz | Firma |
|---|---|---|---|
| Dilatrend | Tablet | 6,25 mg | Deva |
| Dilatrend | Tablet | 12,5 mg | Deva |
| Dilatrend | Tablet | 25 mg | Deva |
| Arlec | Tablet | 3,125 mg | Ali Raif |
| Arlec | Tablet | 6,25 mg | Ali Raif |
| Arlec | Tablet | 12,5 mg | Ali Raif |
| Arlec | Tablet | 25 mg | Ali Raif |
| Calbicor | Tablet | 6,25 mg | Berksam |
| Calbicor | Tablet | 12,5 mg | Berksam |
| Calbicor | Tablet | 25 mg | Berksam |
| Carvesan | Tablet | 6,25 mg | Drogsan |
| Carvesan | Tablet | 12,5 mg | Drogsan |
| Carvesan | Tablet | 25 mg | Drogsan |
| Carvexal | Tablet | 6,25 mg | Sandoz |
| Carvexal | Tablet | 12,5 mg | Sandoz |
| Carvexal | Tablet | 25 mg | Sandoz |
| Coronis | Tablet | 6,25 mg | Bilim |
| Coronis | Tablet | 12,5 mg | Bilim |
| Coronis | Tablet | 25 mg | Bilim |
| Kinetra | Tablet | 6,25 mg | Sanovel |
| Kinetra | Tablet | 12,5 mg | Sanovel |
| Kinetra | Tablet | 25 mg | Sanovel |

## 2.2. Nazal Yolla İlaç Uygulamalarına Ait Genel Bilgiler

### 2.2.1. Nazal Yolun Avantajları ve Dezavantajları

Diğer yollarla mukayese edildiğinde nazal yol pek çok avantaja sahiptir (Behl ve ark. 1998; Ugwoke ve ark. 2001; Arora ve ark. 2002). Bu avantajlar aşağıda sıralanmıştır.

- Epitel hücrelerinde yer alan mikrovilliler ile oldukça geniş bir absorpsiyon alanının olması
- Poröz ve ince membran varlığı
- Yaygın damar ağı yapısı ve kan akışının hızlı olması
- Hızlı absorpsiyon ve çabuk etki sağlaması
- Gastrointestinal sistemde bozulan ilaçlar için alternatif yol olması
- Hepatik ilk geçiş etkisinin olmaması
- Hastanın kendisinin uygulayabileceği kolay bir yol olması
- Doz aşımı riskinin düşük olması
- İlaçların beyine hedeflendirilmesi

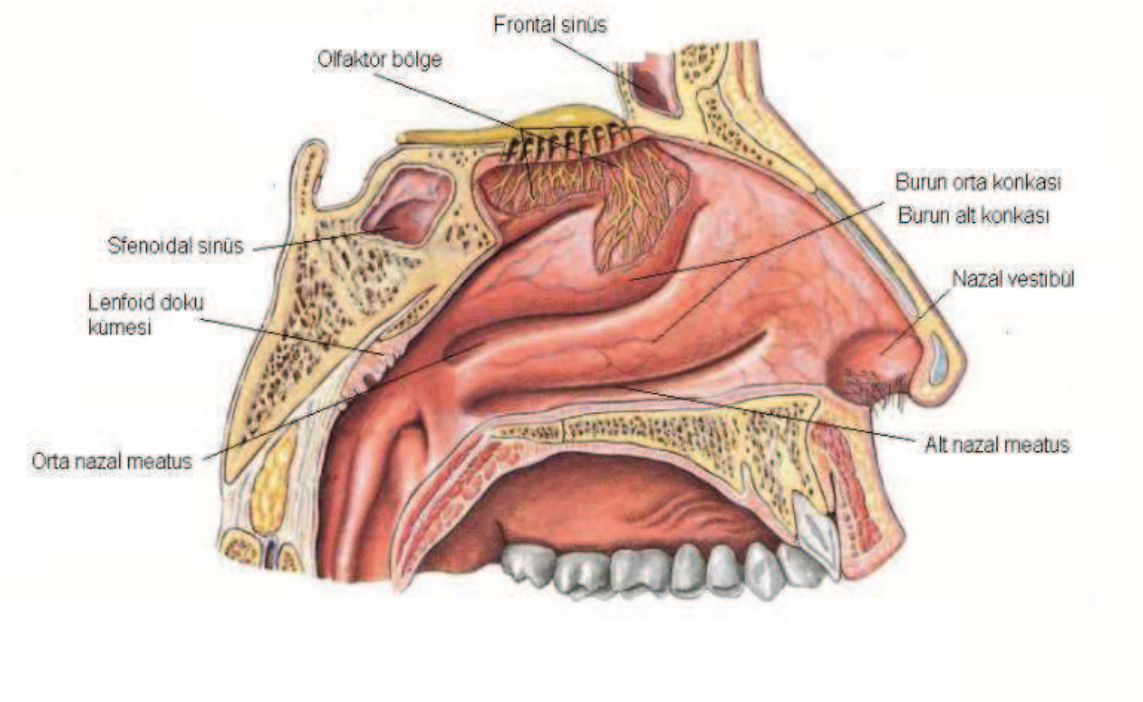
Bu avantajlara rağmen nazal yola ait bazı dezavantajlar da bulunmaktadır (Ugwoke ve ark. 2001; Arora ve ark. 2002).

- Nazal boşluğa uygulama hacmi drenaj nedeniyle 25-200 µl olarak sınırlanmıştır.
- 1000 Da'dan büyük olan ilaçların nazal mukozdan geçişleri zordur.
- Patalojik şartlar ilaç absorpsiyonunu etkiler.
- Nazal mukozanın normal defans mekanizması ilaçların permeabilitelerini etkiler.
- Uygulanan ilaçlar nazal mukozayı irrite edebilir.
- Peptit ve proteinler için az da olsa enzimatik degredasyon mevcuttur.

### 2.2.2. Nazal Pasajın Anatomisi

Burun vestibülünden başlayıp nazofarenkse kadar uzanan burun boşluğu yaklaşık 12-14 cm derinliğe ve 160 $cm^2$ yüzey alana sahiptir. Nazal boşluk üç farklı işlevsel bölgeden oluşur. Bu bölgeler önden arkaya doğru sıralanmıştır (Cornaz ve Buri 1994; Ugwoke ve ark. 2001), (Şekil 2-2).

- Vestibüler bölge (filtrasyon bölgesi)
- Olfaktör bölge (koku duyusu ile ilgili)
- Respiratör bölge (solunumla ilgili)




**Şekil 2-2: Burnun anatomik yapısı-(Putz ve Pabst 1997)**

Vestibüler bölge, solunan havadaki partiküllerin tutulması ile filtrasyonu sağlayan çok tabakalı titrek tüyler taşıyan bol miktarda çanak hücresinden oluşan epitel örtülü bir yapıya sahiptir (Cornaz ve Buri 1994; Ugwoke ve ark. 2001). Olfaktör bölge nazal septum ile lateral duvarlar arasındadır. Bu bölge koku alma duyusuyla ilgilidir. Respiratör bölge sütun şeklindeki epitel dokudan oluşan ve kalın bir mukus tabakasıyla kaplanmış bölümdür Nazal yolla kullanılan ilaçların absorpsiyonu respiratör bölgede meydana gelmektedir (Chien ve ark. 1989).

Nazal yolun diğer ilaç uygulama yolları ile absorpsiyon alanı ve proteolitik enzim seviyesi açısından mukayesesi Tablo 2-2'de verilmiştir. Düşük enzim aktivitesi ve geniş absorpsiyon yüzeyi ile nazal yol, ilaçların organizmaya verilişi için alternatif bir yol olarak düşünülmektedir.

**Tablo 2-2: Nazal yolu diğer ilaç uygulama yolları ile mukayesi (Ingemann ve ark. 2000 pp. 189-205).**

| Uygulama yolu | Absorpsiyon alanı | Proteolitik enzim seviyesi |
|---|---|---|
| Oral | 200 $m^2$ | +++++++ |
| Rektal | 200-400 $cm^2$ | +++ |
| Bukal | 100 $cm^2$ | ++ |
| Nazal | 150 $cm^2$ | ++ |
| Transdermal | 2 $m^2$ | + |
| Pulmonar | 75 $m^2$ | + |
| Vajinal | | ++ |
| Oküler | 1 $cm^2$ | - |

### 2.2.3. Nazal Mukus Sekresyonu ve Mukosiliyer Klirens

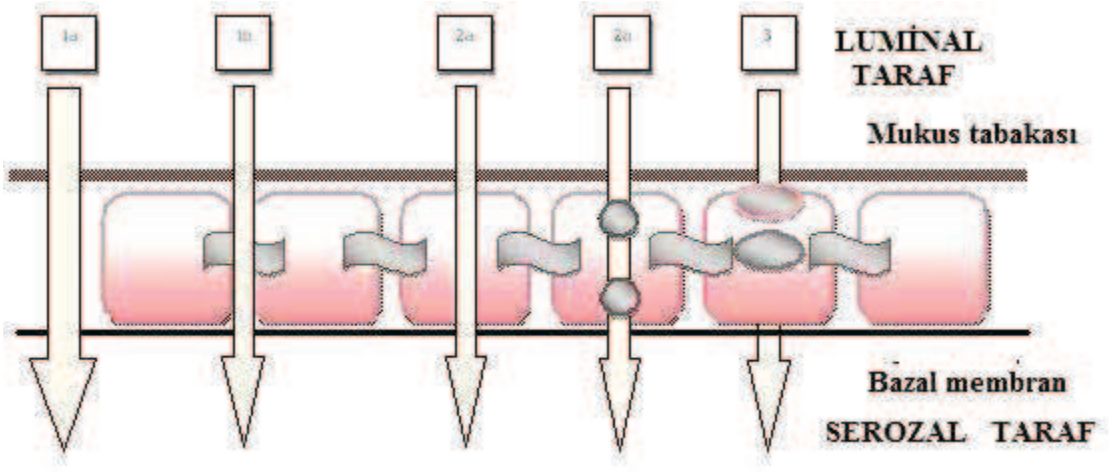
Nazal mukus sekresyonunun pH'sı yetişkinlerde 5,5-6,5 ve çocuklarda 5,0-6,7 aralığındadır. Mukus; 5 µm kalınlığında olup dış kısmı viskoz mukus tabakası (jel) ve mukozal yüzey boyunca yerleşmiş sulu (sol) tabakasından ibarettir. Mukus salgısı % 95 su, % 2 musin, % 1 tuzlar, % 1 albumin, immunoglobulin, lizozim, laktoferrin gibi diğer proteinler ve % 1 oranında lipidlerden oluşmaktadır. Mukusun jele benzer görünümünden glikoproteinler, özellikle mucin sorumludur. Her gün yaklaşık 1,5-2,0 litre mukus üretimi olur (Wermeling ve Miller 2002 pp. 727-748; Ozer 2007 pp. 99-112; Ozsoy 2008 pp. 143- 192). Mukus, mukozayı örterek onu fiziksel ve enzimatik olarak korur. Adenoid doku ve nazal mukoza tarafından gerçekleştirilen IgA üretimi, inhale edilen bakteri ve virüslere karşı olan immun korunmayı sağlamaya yardımcı olur. Mukus, su tutma kapasitesine ve yüzey elektriksel aktiviteye sahiptir, ısı transferine izin verir. Epitel yaklaşık her 10 dk'da bir yeni mukus tabakası ile kaplanır. Solunum yolu

ile dışarıdan hava ile alınan her türlü madde, nazal boşluktaki mukusa yapışarak veya mukusta çözünerek gastrointestinal kanala atılmak üzere nazofarinkste itilir. Bu mukusun ve adsorbe edilen/çözünen maddelerin gastrointestinal kanala klerensi "mukosiliyer klerens" olarak adlandırılır (Ozsoy 2008 pp. 143- 192). Bu mekanizma, üstte uzanan mukus tabakası ile altta uzanan silianın birlikteki dalgasal hareketi ile gerçekleşir. Silialar, epitel hücre yüzeyindeki tüysü oluşumlardır. Hücre başına yaklaşık 300 silia mevcuttur, her bir silia 5-10 μm uzunluğunda, 0,1-0,3 μm genişliğindedir ve vuruş hızları yaklaşık 10-13 Hz dir. Mukosiliyer klerens hızında bireyler arası değişkenlik bulunmasına rağmen, yaklaşık 6 mm/dk dır (Wermeling ve Miller 2002 pp. 727-748; Ozer 2007 pp. 99-112; Ozsoy 2008 pp. 143- 192).

Mukosiliyer klirens bu yolla uygulanan ilaçların nazal boşluktan nazofarenkse doğru hızlı bir şekilde uzaklaştırılmasından sorumludur. Bundan dolayı mukosiliyer klirens, intranazal uygulamada ilaçların absorbsiyonuna olumsuz yönde etki eden bir faktördür. Uygulanan ilaçlar ile mukosiliyer klirensin baskılanması sonucunda mukus içinde tutulan virüs ve bakterilerin, temas süresine bağlı olarak, infeksiyon yapma potansiyelleri söz konusudur. Bu nedenle ilaç ve yardımcı maddelerin mukosiliyer klirens üzerine olan etkilerini incelemek oldukça önemlidir.

### 2.2.4. Nazal Mukozadan İlaçların Geçiş Mekanizmaları

Sistemik etki göstermek isteyen ilaçlar önce nazal mukus tabakasından sonra da epitelden geçmek zorundadır. Mukus küçük, yüksüz partiküllere bir zorluk göstermez. Büyük ve/veya yüklü moleküller bu tabakadan geçişte zorlukları aşmak zorundadır. İlacın nazal mukozadan geçişi üç farklı mekanizma ile 5 ayrı yoldan gerçekleşir (Şekil 2-3) (Ingemann ve ark. 2000 pp. 189-205; Wermeling ve Miller 2002 pp. 727-748).




**Şekil 2-3: 1.Paraselüler yol 1a) interselüler alanlar, 1b) sıkı (tight) yapılar; 2.Transselüler yol 2a) pasif difüzyon, 2b) aktif transport 3.Transsitozis (Ozsoy ve ark. 2009)**

Birincisi; hücreler arası boşluk ve sıkı birleşme noktalarıyla (tight junction) ilişkili olan *paraselüler transporttur* (paracellular route). Paraselüler yolun peptit ve proteinlerin absorpsiyonu için önemli bir geçiş yolu olduğunu ve dolayısıyla peptitlerin absorpsiyon hızının artması için paraselüler yolun reversibl olarak açılması gerektiği ve maddenin hidrofilik özelliği azaldıkça mukozal absorpsiyonun arttığı bildirilmiştir (Corbo ve ark. 1989; Ungell ve ark.1992).

İkinci geçiş mekanizması, *transselüler yoldur*. Bu yol, pasif transport veya aktif transport olarak apikal hücre membranı, intraselüler boşluk ve basolateral membrandan geçiş ile ilişkilidir. Bu yol, lipofilik moleküllerin veya membran tarafından tanınan moleküllerin absorpsiyonunda (aktif taşıyıcı ile transport) önemlidir (Cornaz ve Buri 1994; Ingemann ve ark. 2000 pp. 189-205; Ugwoke ve ark. 2001).

Üçüncü geçiş mekanizması ise; *transitoz*dur. Burada partikül vezikül içine alınarak ve sonra hücreye doğru transfer olur ve sonunda interstitial boşlukta depolanır (McMartin ve ark. 1987; Tuma ve Hubbard 2003).

### 2.2.5. Nazal Mukozadan Geçişi Etkileyen Faktörler

İlaçların nazal mukozadan geçişinde etkili olan faktörler aşağıda özetlenmiştir (Washington N ve ark. 1989 pp. 199-220; Yamamoto ve ark. 1993; Behl ve ark. 1998;

Hussain 1998; Arora ve ark. 2002, Wermeling ve Miller 2002 pp. 727-748; Illum 2003; Jadhav ve ark. 2007; Ozsoy 2008 pp. 143- 192).

**a) Anatomik ve Fizyolojik Faktörler**

- Anatomik özellik
- Biyokimyasal değişiklikler
- Fizyolojik faktörler
- Patolojik durumlar
- Çevresel faktörler

**b) İlaca Ait Faktörler**

- Molekül ağırlığı ve şekli
- Çözünürlük
- Lipofilik özellik
- pKa

**c) Formülasyona Ait Faktörler**

- pH
- Viskozite
- Konsantrasyon
- Uygulama hacmi
- Dozaj şekli

### 2.2.6. Nazal Mukozadan Geçişin Artırılması

Nazal mukozanın 1000 Dalton (g/mol) dan büyük ilaçların geçişi için bir engel oluşturduğu bilinmektedir (Donovan ve Huang 1998). Daha düşük molekül ağırlıklı ve hidrofilik ilaçlar ise neredeyse i.v. verilişle mukayese edilebilecek hızda çabuk olarak nazal mukozadan absorbe edilirler (Illum 2003). Ancak ilaçların çözeltilerinin mukosilier klerens sebebiyle nazal mukozada kalış süreleri oldukça kısa olduğundan biyoyararlanımları oldukça düşük olmaktadır. Bu nedenle, ilaçların mukoadezif jel ve toz sistemleri (Ugwoke ve ark. 1999; Ozsoy ve ark. 2000; Callens ve ark. 2003a;

Callens ve ark. 2003b; Sambhaji ve ark. 2004; Tas ve ark. 2006; Bhise ve Yadav 2008) ve mikroküreler (Bjork ve Edman 1988; Hasçiçek ve ark. 2003; Yıldız ve ark. 2005; Gungor ve ark. 2010a; Gungor ve ark. 2010b; Gürcan ve ark. 2010) hazırlanarak ilaçların nazal biyoyararlanımlarının arttırılması ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca insertler (McInnes ve ark. 2005; Bertram ve ark. 2006; Yenil 2008) ile de ilaçların nazal biyoyararlanımı arttırılmıştır.

Bu sistemlere ayrıca penetrasyon arttırıcı bazı maddelerin ilavesi ile de ilaçların biyoyararlanımları arttırılabilmektedir. Nazal yolla kullanılan penetrasyon arttırıcıları; şelat oluşturucular (EDTA, sitrik asit, salisilatlar), sentetik yüzey etkin maddeler (sodyum lauril sülfat, polioksietilen alkil eterler ve esterler), doğal yüzey etkin maddeler (safra tuzları), yağ aitleri (oleik asit, sodyum kaprilat, sodyum kaprat, sodyum laurat) olarak sınıflandırılabilir (Yamamoto ve ark. 1993; Behl ve ark. 1998; Davis ve Illum 2003; Turker ve ark. 2004; Bhise ve Yadav 2008; Pires ve ark. 2009). Siklodekstrinlerin (Merkus ve ark. 1999) ve kitozanın (Yamamoto ve ark. 1993) nazal absorpsiyon arttırıcı olarak etkin olduğu kaydedilmiştir. Penetrasyon arttırıcı maddeler genellikle enzim aktivitesini inhibe ederek, mukus viskozitesi veya elastisitesini düşürerek, mukosiliyer klerensi azaltarak, sıkı birleşme noktalarını açarak ve ilacın çözünürlüğünü veya stabilitesini arttırarak etki gösterirler (Quraishi ve ark. 1997; Behl ve ark. 1998).

İlaçların nazal mukozadan sistemik absorpsiyonunun arttırılmasına yönelik yaklaşımlar aşağıda özetlenmiştir (Kublik ve Vidgren 1998).

a) İlacı nazal metabolizma etkisinden korumak

- Kimyasal modifikasyonlar yapmak
- Kovalan bağlar eklemek
- İlacı enkapsüle etmek
- Enzim inhibitörleri veya inaktivatörleri kullanmak

b) İlaç veya formülasyonda değişiklik yapmak

- Ön ilaçlar uygulamak
- Kimyasal modifikasyon yapmak

- Absorpsiyon arttırıcıları ilave etmek

c) İlacın nazal boşlukta kalış süresini uzatmak

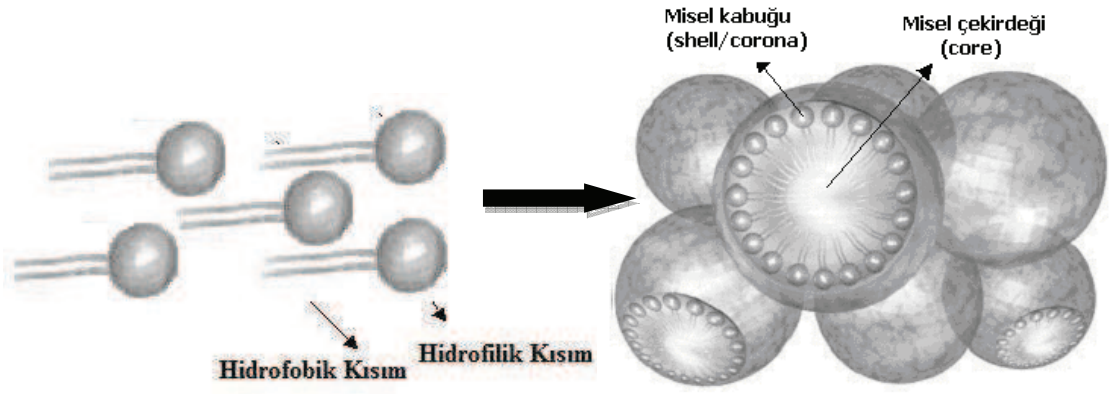
- Biyoadezif tozlar ile
- Hidrojeller ile
- Mikro- ve nanopartiküller ile

## 2.3. Polimerik Miseller Hakkında Bilgiler

### 2.3.1. Polimerik Misellerin Tanımı ve Özellikleri

Miseller, dispersiyon/devamlı bir fazda disperse olan fazı oluşturan veya partiküler haldeki maddelerden oluşan disperse sistemlerin bir sınıfına dahil olan kolloidal dispersiyonlar olarak tanımlanmaktadır. Biyolojik olarak etkin maddelerin miselizasyonu lipofilik ilaçların ve besin desteklerinin biyoyararlanımını artıran genel bir olgudur ve miselizasyon ilaç salımı alanında oldukça fazla çalışılmaktadır. Polimerik miseller, misellerin ayrı bir sınıfını temsil eder ve amfifilik blok kopolimerlerden meydana gelirler (Torchillin 2001; Amiji 2007 pp. 385-408).

Polimerik miseller, hidrofobik ve amfifilik etkin maddelerin salımı için uygun amfifilik blok kopolimerlerin nano boyutlu topluluğudur. Sulu bir ortamda miseller, mononükleer fagositik sistem (MPS) tarafından meydana getirilen klirensi en aza indiren aşağıda görüldüğü gibi iyonik olmayan hidrofilik bir kabuk (shell) ve hidrofobik ilaçlar için bir rezervuar olarak görev alan hidrofobik bir çekirdek (core) içerirler (Şekil 2-4) (Gaucher ve ark. 2005; Amiji 2007 pp. 317-356).




**Şekil 2-4: Misel Oluşumu**

Mevcut literatürlere göre farmasötik bir miselin genel boyutu 10-80 nm arasındadır, ideal kritik misel konsantrasyonu (CMC) ise milimolar düzeyde veya daha düşük olmalıdır. Hidrofobik bir ilacı yükleme etkinliği ise % 5-25 (a/a) arasında olmalıdır. Hemen hemen her olası ilaç uygulama yolu ile biyoyararlanımın artırılması veya yan etkilerin azaltılması açısından ilaçların misel şekillerinin kullanılmasından yararlanılmaktadır (Torchilin, 2005).

**2.3.1.1. Misel Oluşum Mekanizması**

Misel oluşumu, iki kuvvetin sonucu olarak oluşur. Biri moleküllerin birleşmesine (assosiasyon) yol açan çekici kuvvet, diğeri ise belli bir makroskobik faza kadar misellerin sınırsız büyümesini önleyen itici kuvvettir. Amfifilik kopolimerler, hem hidrofilik hem de hidrofobik polimer için seçici olan bir çözücüye konulduğunda kendiliğinden misel oluştururlar (Jones ve Leroux 1999). Amfifilik polimerlerin kendiliğinden misel oluşturmasındaki başlıca etken ise, sulu çevreden hidrofobik kısımların çekirdeğe itilip uzaklaştırılmasından dolayı sistemin serbest enerjisinin azalmasıdır (Torchilin 2005).

Amfifilik kopolimerlerin miselizasyon işlemi düşük molekül ağırlıklı sürfaktanlar için belirtilen işleme çok benzemektedir. Çok düşük konsantrasyonlarda polimerler sadece tek zincirler halinde bulunurlar. CMC olarak adlandırılan kritik bir değere ulaşmak için konsantrasyon arttırıldıkça polimer zincirleri miselleri oluşturmak için birleşmeye başlar, böylece kopolimerin hidrofobik kısmı polimerin bulunduğu sulu ortam ile temastan korunacaktır. CMC'de çözücünün önemli bir miktarı misel çekirdeğinin içinde bulunabilir ve CMC'de oluşan miseller daha yüksek konsantrasyonlarda oluşan misellerden daha büyük boyutlar sergileyen gevşek agregatlar olabilir. CMC'den biraz yüksek polimer konsantrasyonunda ise denge, misel oluşumu yönüne kayar, miseller düşük enerji durumundaki konfigürasyonlarını tercih ederler ve kalan çözücü misel boyutunda bir azalma ile sonuçlanarak hidrofobik çekirdekten yavaş yavaş uzaklaşır; miseller daha sıkışık ve stabil olur (Jones ve Leroux 1999;Torchillin 2001).

Amfifilik kopolimerler genellikle düşük molekül ağırlıklı sürfaktanlardakinden çok daha düşük bir CMC sergiler. Amfilik polimerin CMC'si ne kadar düşükse miseller *in vivo* olarak o kadar stabildir. Kandaki büyük hacimdeki seyreltme ile sadece düşük CMC'li miseller stabil kalabilirler. Yüksek CMC'ye sahip amfifiller ise sulu ortamda

ve kanda kolayca ayrılabilirler ve kanda içerikleri çökebilir. Bu nedenle yüksek CMC'ye sahip amfifillerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanımları uygun değildir (Jones ve Leroux 1999; Torchilin 2005).

Ayrıca miselizasyon işlemini tarif eden bir diğer önemli parametre de kritik misel sıcaklığı (CMT)'dır. Amfifilik polimerler bu sıcaklığın üstünde tekli yapılar ve agregatlar halinde bulunuyorken, bu sıcaklığın altında sadece tekli yapılar halinde bulunurlar. CMC değerini bulmak için kullanılan metotlar CMT'yi belirlemek için de başarı ile uygulanabilir. Sıcaklık ve konsantrasyona bağımlılıklarından dolayı CMT ve CMC değerleri serbest enerji ve miselizasyonun entalpisi gibi misel oluşumunun termodinamik parametrelerini belirlemek için basit bir yöntem sağlar (Torchillin 2001).

### 2.3.1.2. İdeal Bir Misel Sisteminin Taşıması Gereken Özellikler

İdeal bir misel sistemi;

- uygun bir boyuta sahip olmalı (10-100 nm arası),
- hem in vitro hem de in vivo olarak stabilitesi yüksek olmalı,
- etkin madde yükleme kapasitesi fazla olmalı,
- seçici bir şekilde hedef alanda birikebilmeli,
- hedef dokular ve hücreler ile temas ettiğinde ilacı salmalı,
- hedef alanda örneğin sıcaklık, ışık ve ultrasound gibi harici bir uyarı (eksternal uyarı) ile etkin maddenin salımını kontrol etme imkanını sunmalı,
- vücuttan kolayca atılabilen toksik olmayan ve inert yapılara ayrılmalı,
- renal yol vasıtasıyla vücuttan atılabilmesi için de 50 000 Dalton'dan daha az molekül ağırlıklı zincir parçalarına ayrılmalıdır (Torchillin 2001;Torchillin 2008 pp. 263-308).

### 2.3.1.3. Miseller Sistemlerin Biyolojik Performansı

Etkin maddenin hedef alana ulaşması için dolaşım sisteminde uzun süre kalması gerekmektedir (Torchillin 2008 pp. 263-308). Partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerde başlıca sorun olan yarılanma ömrünü uzatmak içinse, partikül boyutu ve yüzey özellikleri gibi iki faktörün düşünülmesi gereklidir. Partiküler sistemlerin çoğu vücutta hemen yabancı ürünler olarak tanınır ve RES (retiküloendotelyal sistem) hücreleri tarafından fagositoz vasıtası ile kan dolaşımından atılır (Kim ve ark. 1998). Bu nedenle kolloidal ilaç taşıyıcılarının uzun süre dolaşımda kalması için bir çözüm RES tarafından tanınmayı,

opsonizasyon derecesini ve hızını azaltmaktır. Sterik stabilizasyonun (örneğin; polietilen glikol (PEG) gibi hidrofilik polimerler ile partikül yüzeyini kaplama) etkili bir şekilde opsonik proteinler ile etkileşimi ve böylece dalak, karaciğer ve kemik iliğinin RES hücreleri tarafından polimerik misellerin alımını azalttığı gösterilmiştir. PEG tarafından opsonizasyonu azaltma, yüzey yükünün korunması ve hidrofilik yüzeyin artırılmasına bağlanır. Böylece protein adsorpsiyonunu yöneten elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler gibi iki temel kuvvet engellenir. Miseller kabuk yüzeyinde polietilenimin (PEI), poliakrilik asit, poliaspargin gibi bir polimerden dolayı bulunan yük ise, misellerin dolaşımda kalma süresi açısından sorun yaratır (Torchillin 2008 pp. 263-308). Kolloidal ilaç taşıyıcılarının uzun süre dolaşımda kalması için diğer çözüm ise, partikül boyutunun küçük olmasıdır. Çünkü RES alımı genelikle partikül boyutu ile artar. Bu nedenle ilaç taşıyıcısının uzun süre dolaşımda kalması için küçük taşıyıcı boyutu (<200 nm) istenilmektedir. Akciğerde ve dalakta filtrasyon ile mekanik klirensten korunmak için de partikül boyutu yeteri kadar küçük olmalıdır (Kim ve ark. 1998). 200 nm den daha büyük nanopartiküller dalaktaki interendotelyal hücre aralıkları tarafından mekanik filtrasyon ile uzaklaştırılır. 50 kDa dan daha küçük (hidrodinamik çapı 5-10 nm) molekül ağırlıklı partiküller içinse böbrekler yoluyla atılım söz konusudur. Polimerik misellerin boyutu 10-100 nm arasında olduğundan bu yollar ile atılım engellenir, fakat misel boyutunun tümör penetrasyonu ve RES alımının derecesi ile ilgili olduğu da görülmektedir. Ayrıca küçük partiküller daha fazla kıvraklığa sahip olduğu için proteinlerin misel yüzeyine adsorpsiyonu engellenir (Torchillin 2008 pp. 263-308).

Kısacası PEG yoğunluğunun yüksek olması, misel boyutunun küçük olması ve misel çekirdeğinin daha camsı olması misellerin dolaşım sürelerini artırır. Ayrıca nanopartiküllerin dolaşım sürelerini artırmak amacıyla eliminasyon mekanizmasını doygunluğa ulaştırmak için boş miseller ile ön dozlama da yapılabilir, fakat bu durum lipozomlarda kullanılmış olmasına rağmen misellerde henüz araştırılmamıştır (Torchillin 2008 pp. 263-308).

Kanda dolaşımın yanı sıra patolojik dokularda uzun dolaşım süresine artırılmış permeabilite ve kalış etkisi (EPR) vasıtası ile polimerik misellerin birikimi ile izin verilir. EPR etkisi bozulmuş lenfatik drenaj ve sağlam olmayan endotelden dolayı hastalık alanlarında damarın daha yüksek olan permeabilitesine atfedilebilir. Bu iki

özellik tümor ve iltihaplı alanlara "delik" endotel tabakasından kolloidal partiküllerin damar dışına çıkışına ve sonrasında orada kalmalarına olanak sağlar (Torchillin 2008 pp. 263-308). EPR-aracılı hedeflendirme için ideal olarak ilacın plazma konsantrasyonunun 6 saatin üstünde dolaşımda kalması istenmektedir. Fakat intravenöz uygulanmalarından sonra ilaç yüklü polimerik misellerin parçalanmaları hakkında az bilgi mevcuttur. Ayrıca bu patolojik dokulardaki pasif hedeflendirmenin yanı sıra misellerin dolaşımda uzun süre kalması için aktif hedeflendirmede kullanılmaktadır (Torchillin 2008 pp. 263-308).

#### 2.3.1.4. Misellerin Toksisitesi ve Vücutta Dağılımı

Polimerik misellerin tipik biyodağılımı $^{125}I$ ile işaretlenen PEG-b-PDLLA kopolimerlerini içeren polimerik misellerin sonuçları ile örneklendirilebilir. PEG-b-PDLLA miselleri intravenöz uygulamadan sonra dikkat çekecek derecede uzatılmış kan dolaşımı ($t_{1/2}$~18 saat) göstermiştir ve enjeksiyondan sonraki 24 saatte enjekte edilen dozun % 25'i dolaşımda kalmıştır. Misellerin kana plazma oranı ve merkezi kompartmanda dağılım hacmi ($V_0$), plazma boşluk değerine (=1 hematokrit) ve kan hacmine hemen hemen eşit hesaplanmıştır. Bu da polimerik misellerin uygulamadan sonra sadece kan kompartmanına dağılabildiğini ve hemen kan hücreleri ile etkileşmediğini göstermektedir. Polimerik misellerin bu şekilde stabil dolaşımı jel kromatografisi deneyi ile de onaylanmıştır. PEG-b-PDLLA miselleri enjeksiyondan 24. saate kadar normal organlarda (akciğer, böbrek, karaciğer ve dalak) vasküler alan hacmine (~0,2) kıyaslanabilir kana doku konsantrasyonu oranları ($K_b$) göstermiştir ve daha sonra ise ekstraselüler alan hacmine tekabül eden dalak ve karaciğerde (~0,3) minimal artışlar göstermiştir. Karaciğer ve dalaktaki polimerik misellerin bu tür düşük $K_b$ değerleri dolaşımda uzun süre kalabilen lipozomlarınki ile kıyaslanabilmiştir. Ayrıca blok kopolimerlerin glomerüler filtrasyonun eşiğinden daha düşük molekül ağırlıklarında dolayı idrarla atılabildikleri ortaya konulmuştur. Böylece polimerik misellerin vücutta kronik birikim riskinin düşük olması ile birlikte güvenli oldukları görülmüştür (Nishiyama ve Kataoka 2006).

Polimerik misellerin EPR etkisinden dolayı pasif hedeflendirme ile tümörlü ve iltihaplı vücut alanlarında birikmeleri beklenmektedir. Polimerik misellerin bu biyodağılımı yüzey özellikleri ile beraber ağırlıklı olarak partikül boyutu ve partikülün

stabilitesini de içeren pek çok faktöre bağlı olduğu bildirilmiştir (Torchillin 2008 pp. 263-308).

Liggins ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2002) mPEG-PDLLA (60:40) diblok kopolimer ile formüle edilen paklitaksel yüklü misel formülasyonlarının uygulanmasının ardından en yüksek konsantrasyonların karaciğer, böbrek, kan, dalak, akciğer ve kalpte bulunduğu tespit edilmiştir.

Polimerik misellerin toksisitesi incelendiğinde ise polikatyon içeren kopolimerlerin bu açıdan daha sorunlu olabileceği düşünülmektedir. PLL ve PEI gibi polikatyonların sitotoksisitesi membran hasarı aktivitesi ile korelasyonu bakımından araştırılmaktadır. Polikatyonlar negatif yüklü plazma membranlarına bağlanabilirler ve laktoz dehidrojeaz kaybı ile değerlendirilen oranda onları stabilize ederler. Bu etki zamana, doza, polikatyonun molekül ağırlığı ve kimyasal yapısına bağlıdır. Fakat hidrofilik polimer konjugasyonu hücre membranı etkileşiminin baskılanması ile membran toksisitesini azaltabilir (Kakizawa ve Kataoka 2002).

Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2001), *in vivo* olarak yapılan akut toksisite çalışmalarında mPEG-PCL misellerinin düşük toksisiteye sahip olduğu görülmüştür. Burt ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (1999), hayvanlarda yapılan in vivo biyogeçimlilik/toksikoloji testlerinin ve in vitro testlerin sonuçları PDLLA-PEG misellerinin biyogeçimli olduklarını ve toksik olmadıklarını göstermiştir. Ayrıca tavşanlarda yapılan oküler kronik toksisite testleri de mPEG-PDLLA nın oküler uygulamalarda güvenli olduğu saptanmıştır (Tu ve ark. 2007).

### 2.3.1.5. Misellerin Hedeflendirmesi

#### A. Pasif Hedeflendirme

Uzun süre dolaşımda kalan polimerik taşıyıcıların seçici ve etkili bir şekilde katı (solid) tümörlerde birikebildiği görülmüştür. Bu olgu tümörlerin bozulmuş lenfatik drenajı ve dolaşan makromoleküllere karşı tümör alanlarında mikrovasküler hiperpermeabilite ile açıklanmakta ve artırılmış permeabilite ve kalış etkisi (EPR) pasif hedeflendirme olarak adlandırılmaktadır (Nishiyama ve Kataoka 2006). Bu nedenle, misellere yüklenen anti-kanser ilaçlarının (adriamisin gibi) hedef olmayan dokulardakinden (kalp kası gibi) tümörlerde çok daha fazla birikimi görülmüştür (Jones ve Leroux 1999;Torchillin, 2001).

Ayrıca Lukyanov ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2004), PEG-PE miselleri deneysel miyokart enfarktüslü tavşanlara i.v. olarak uygulanmıştır. Misellerin kandaki yarılanma ömrü 2 saat olarak tespit edilmiştir. Miseller pasif hedeflendirme ile tümör nekroz alanlarına benzeyen miyokardiyal enfarktüs alanlarında kalp kasının hasar görmeyenkısımlarına kıyasla 8 kattan daha fazla birikmiştir.

**B. Aktif Hedeflendirme**

Aktif hedeflendirmede ise, hedeflendirilen miseller ile hedef hücrelere ilaç salımının etkinliği ve seçiciliğini artırmak amaçlanmaktadır. Böylece yan etkiler azaldığı gibi daha iyi etkinlik de sağlanmaktadır (Nishiyama ve Kataoka 2006). Aktif hedeflendirmeyi de;

a) Uyarı cevaplı hedeflendirme,

   1. Biyolojik uyarı ile hedeflendirme
   2. Dışarıdan uyarı ile hedeflendirme (eksternal hedeflendirme)

b) Spesifik ligandlar bağlayarak hedeflendirme şeklinde sınıflandırabiliriz.

***a) Uyarı Cevaplı Hedeflendirme***

***1. Biyolojik Uyarı ile Hedeflendirme***

Bu tür hedeflendirme, genellikle vücutta çeşitli doku ve organlardaki çoğu patolojik proseste bölgesel sıcaklık artışı ve/veya asidoz meydana gelmesine dayanmaktadır (Torchilin 2001). Örneğin; normal kan pH sı 7,4 ün aksine tümörlü alanlardaki hücre dışında pH değerleri 6,8-7,0 civarında belirlenmiştir. Bu durum çoğunlukla normal hücrelere kıyasla daha yüksek hızda aerobik ve anaerobik glikozize katkı sağlar. Endozomlar ve lizozomlar gibi hücre kompartmanları bile hemen hemen pH 5-6 dan daha düşük pH sergiler. Bu durumda tümör alanında birikmesi ile birlikte yüklenen ilaç molekülerinin serbestleşmesi ve/veya sitoplazmaya girmesi için pH seviyelerindeki azalma ile ayrılabilen pH ya hassas blok kopolimer miseller tasarlanmıştır (Gaucher ve ark. 2005).

Ayrıca biyolojik uyarı ile hedeflendirme Kataoka ve arkadaşlarının (2005) çalışmasında olduğu gibi hidrofobik ilacın aside duyarlı hidrazon bağları ile polimere konjuge edilmesi ile de elde edilebilir. Bu çalışmada polimerik miseller fizyolojik pH da

ilacı dış ortamdan koruyabilir fakat endozomlar ve lizozomlardaki pH nın azalması ile seçici bir şekilde ilaç salımı gerçekleşir.

İlaç taşıyıcı miseller sistem olarak sıcaklık veya pH değişimine hassas poli (N-izopropilakrilamid) ve onun PDLLA'lı kopolimerlerleri gibi polimerler kullanılmaktadır. Sıcaklığa hassas polimer, bölgesel sıcaklık değişimi ile ilaç salımını ve/veya vasküler transportu artırmak için kullanılır. pH a hassas miseller ise normal dokulardan daha düşük pH lı olduklarından dolayı tümörlere, enflamasyonlu dokulara veya endozomal kompartmanlara ilaçların salımında kullanılır (Jones ve Leroux 1999).

***2. Dışarıdan Uyarı ile Hedeflendirme (Eksternal Hedeflendirme)***

Patolojik alanlardaki uyarı cevaplı hedeflendirme dışında misellerin vücutta kendiliğinden biriktiği alanlara vücut dışından bir uyarı (mikrodalga ısıtma, ultrasound, termal ablasyon) ile de hedeflendirme uygulanabilir (Torchilin 2005). Bu amaçla poloksamer misellerden doksorubisinin in vivo ve in vitro salımını tetiklemek için ultrasound başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Rapoport 2004). Bununla birlikte solid tümör alanlarında lokal ısıtma da kullanılabilir (Gaucher ve ark. 2005).

***b) Spesifik Ligandlar Bağlayarak Hedeflendirme***

Misel yüzeyinde suya maruz kalan hidrofilik blokların uç kısmına kimyasal bağlar ile spesifik hedeflendirme ligandları eklenir. Bu şekilde reseptör proteinlerine ligandların bağlanması amaçlanır ve böylece miselin hedef hücre tarafından tanınması ve reseptör-aracılı endositozis ile hedef hücre içine alınımı artırılabilir. Spesifik monoklonal antikorlar, folat kalıntıları, transferrin başlıca ligandlar olmakla birlikte şeker parçaları da hedeflendirme için kullanılmaktadır (Torchillin 2001; Kakizawa ve Kataoka 2002;Torchilin 2005; Torchillin 2008 pp. 263-308).

Hedeflendirme bazen iki hedeflendirme çeşidinin kombinasyonu halinde de uygulanmaktadır. Bu amaçla pH uyarı cevaplı misellere spesifik ligand bağlanabilir (Torchilin 2005), pH uyarı cevaplı misellerde vücut dışından uygulanan ses dalgları kombinasyonları ile ilacın kontrollü salımı da sağlanabilir (Torchilin 2005).

### 2.3.1.6. Miseller Sistemlerin Avantajarı ve Dezavantajları

İlaç taşıyıcıları olarak polimerik miseller oldukça önemli avantajlara sahiptirler:

- Sulu ortamda çözünürlüğü iyi olmayan ilaçların çözünürlüğünü ve buna bağlı olarak da ilaçların biyoyararlanımını artırırlar.
- İlacın toksisitesini / istenmeyen diğer yan etkilerini azaltır veya yok ederler.
- Miseller formda olma ilacı (öncelikle çözünürlüğü iyi olmayan ilacı) biyolojik çevrenin etkisi altındaki inaktivasyon olasılığından iyi bir şekilde korur.
- PEG gibi hidrofilik bir blok varlığından dolayı yeteri kadar uzun süre vücutta (kanda) kalabilirlar.
- Boyutlarının küçük olması nedeniyle sızıntılı damarlanma olan vücut bölgelerinde birikebilirler.
- Dış yüzeye (kabuğa) spesifik bir ligand eklenmesi ile hedeflendirilebilirler.
- Büyük miktarlarda kolayca ve tekrarlanabilir bir şekilde hazırlanabilirler (Torchillin 2001; Amiji 2007 pp. 385-408).

Bütün bu avantajların yanısıra sınırlı miktarda etkin madde çözünmesi, etkin madde yüklendikten sonra suda stabilitenin zayıf olması ve ne kadar yüksek miktarda ilaç yüklenirse stabilitenin de o kadar azalması polimerik misellerin klinik uygulamalarını sınırlandırmaktadır (Amiji 2007 pp. 385-408). Polimerik misel salım sistemlerinin diğer bir dezavantajı ise; *in vivo* ilaç taşıyıcısı olarak uygulamalarını sınırlandıran CMC ile ifade edilen konsantrasyona bağımlı özelliklerinin bulunmasıdır (Cha ve ark. 2009).

### 2.3.1.7. Polimerik Misellerin Farmasötik Alanda Kullanımı ve Vücuda Veriliş Yolları

#### a) Polimerik Misellerin Farmasötik Alanda Kullanımı

Miseller diagnostik (görüntüleme) ajanlar ve terapötikler gibi çeşitli farmasötiklerin salımı için kullanılabilir ve her bir özel durumda belirli gereklilikleri sağlamalıdır. Bu nedenle diagnostik misellerde en yüksek olası hedefin hedef olmayana oranının (relatif birikim) bulunması birincil önemdedir. Oysaki terapötik ajan

yüklü miseller için genellikle hedefte en fazla olası birikim gereklidir ve artmış spesifik olmayan birikim bile tolere edilebilir (Torchillin 2001).

Polimerik miseller; pasif ve aktif hedeflendirme ile kanser ilaçlarının organizmaya verilmelerindeki çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Torchillin 2006 pp.57-94). Bu amaçla çeşitli polimerik misellere paklitaksel (Burt ve ark. 1999; Liggins ve ark. 2002; Shuai ve ark. 2004), kamptotesin (Watanabe ve ark. 2006), metotreksat (Yang ve ark. 2008), doksorubisin (Yin ve Bae 2009), β-lapakon (Blanco ve ark. 2007) gibi antikanser ilaçları çalışılmıştır. Kemoterapötik ilaç yüklü polimerik miseller ile ilgili formülasyonlardan dört tanesi (NK911-blok kopolimerleri-kovalent bağlar ile doksorubisin bağlı ve fiziksel olarak doksorubisin enkapsüle edilen PEG-b-poly (aspartik asit) miselleri, SP1049C-doksorubisin yüklü Pluronik miselleri, Genexol-PM®-paklitaksel yüklü mPEG-b-PLA miselleri ve NK105-paklitaksel enkapsüle edilmiş PEG-b-P(Asp) miselleri) klinik araştırma aşamasındadır. Faz I çalışmalarından elde edilen sonuçlar; polimerik misel formülasyonlarının ilaçların geleneksel formülasyonlarına kıyasla toksisiteyi azalttığını buna bağlı olarak daha yüksek dozlamaya izin verdiğini ve daha uzun süre dolaşımda kaldıklarını göstermiştir (Amiji 2007 pp. 317-356; Torchillin 2008 pp. 263-308).

Polimerik misellerin diğer bir kullanımı alanı ise nörodejeneratif hastalıkları tedavi etmek için beyne ilaç hedeflendirmedir. Kan beyin bariyeri engelini aşmak için beyin mikrodamar endotelyal hücrelerinden transitozis yapabilen ligand moleküllü / antikorlu polimerik miseller ve ilaç efflux sistemini inhibe etmek için Pluronik blok kopolimerler kullanılır. Bu misellerle yapılan ilk çalışmalardan biri poliklonal antikor ve insülin ile modifiye edilmiş Pluronik misellere haloperidol enkapsüle edilip farelere intravenöz olarak uygulanmasıdır. Bu çalışmada hayvanlarda haloperidolün nöroleptik etkisi şiddetli bir şekilde görülmüştür (Torchillin 2006 pp.57-94)

Oldukça yüksek toksisiteli antifungal ajanlar düşük çözünürlüğe sahiptirler. Bu tür etkin maddeler konvensiyonel blok kopolimerler ile oluşturulan polimerik misellerin çoğu çekirdeği ile düşük geçimliliğe sahiptir (Torchillin 2006 pp.57-94). Bu gruptaki ilaçlardan Yang ve arkadaşları (2008) Amfoterisin B'yi poli(etilen gikol)-b-poli(laktat) misellerine yüklemişlerdir. Croy ve arkadaşları (2004) ise çözünürlüğü iyi olmayan diğer bir antifungal ilaç olan nistatini Pluronik misellere enkapsüle edilebilmiştir.

Polimerik misel aracı ilaç salımının önemli bir alanı da gen salımıdır. Polimerik misellerin bir çeşidi olan poliiyon kompleks miseller (PICM) ile DNA ve antisens oligonükleotidlerin salımı gerçekleştirilir. Bu tür miseller DNA yı nötralize eden bir katyonik polimer ve genellikle PEG ten oluşturulur (Torchilin 2001;Torchillin 2006 pp.57-94). Park ve arkadaşları (Cho ve ark. 2006)) PEI-Pluronik®-PEI kopolimerlerini sentezleyerek PEI-Pluronik®-PEI kaplı dallanmış PEI/DNA poliplekslerinin gen transfeksiyon etkinliğini artırmış ve PEI'e kıyasla taşıyıcı sistemin sitotoksisitesini azaltmışlardır. Ayrıca polimerik miseller ile siRNA salımı çalışmaları da bulunmaktadır (Nishiyama ve Kataoka 2006).

Pluronik kopolimerlerin yeni ve etkili aşıların hazırlanması ve immün cevabın modülasyonu için immünolojik adjuvanlar olarak uygulaması bulunmaktadır. Pluronikler çeşitli antijenleri yükleyebilen miselleri oluştururlar. Bu tür misellerin yüksek adjuvan aktivitesi ifluenza virüsü aşı ile gösterilmiştir (Torchillin 2001).

Yukarıda bahsedilen gruplardaki terapötik ilaçların haricinde dihidrotestosteronun (Allen ve ark. 2000), progesteronun (Sant ve ark. 2004), lignokainin, prednisolonun (Riley ve ark. 1999), dipiridamolün, fenofibratın (Sant ve ark. 2005), siklosporin A'nın, rapamisinin, propofolun (Shin ve ark. 2009), folik asitin (Xu ve ark. 2010), kandesartan sileksetilin (Sattuwar ve ark. 2007), geldanamisinin yağ asidi ön ilaçlarının (Forrest ve ark. 2006), kloksasilin sodyumun (Khanal ve ark. 2005), beklometazon dipropionatın (Craparo ve ark. 2011), deksametazonun (Rafie ve ark. 2010), risperidonun (Ould-Ouali ve ark. 2005), klonezapamın (Jeong ve ark. 1998) da polimerik miseller ile taşınması yönündeki uygulamaları bulunmaktadır.

Ayrıca bütün bu hidrofobik ilaçların bu sistemlerle taşınmasına dair çalışmaların yanı sıra bu sistemlerin hidrofilik ilaçlar için de kullanılabileceğine ilişkin literatürde kayıtlı iki adet örnek çalışma da mevcuttur (Riley ve ark. 1999; Tu ve ark. 2007).

Polimerik miseller ile terapötiklerin salımı oldukça fazla çalışılması ve üzerinde durulmasına rağmen kontrast ajanlarının miseller transportu oldukça yeni bir alandır (Torchilin 2001; Torchilin 2005). Diagnostik ajanlar ile yüklü miseller kanser ve diğer hastalıkların teşhisi haricinde ilaç taşıyıcıların vücutta birikim alanlarını belirlemek için de kullanılmaktadır. Trubetskoy ve arkadaşları (1996) 20 nm çapındaki amfifilik PEO-lipit konjugatlarının misellerine $^{111}$In ve gadoliniyum dietilentriamin penta asetik asit-

fosfatidiletanolamin (Gd-DTPA-PE) yüklemişlerdir ve tavşan pençesinden subkutan uygulamadan sonra bölgesel lenf zincirinin görüntülenmesi sağlanmıştır.

Fotodinamik tedavi için dendritik fotosensitizer yüklü polimerik miseller de çalışılmıştır. Fotodinamik tedavi malignant tümörlerin ve maküler dejenerasyonun tedavisi için gelecek vaad eden bir uygulamadır. Fotodinamik tedavi fotosensitizerlerin ve ardından hastalık alanlarına belli dalga boyundaki lazerin uygulnmasını içerir. Fotodinamik tedavide fotosensitizerler için polimer-fotosensitizer konjugatları, PEG-lipozomları ve polimerik miseller gibi salım sistemlerinin geliştirilmesi deri hipersensivitesi gibi yan etkileri önlemek kadar fotodinamik tedavinin seçicilik ve etkinliğini artırmak için daha çok dikkat çekmektedir. Fotodinamik tedavinin amacı dendritik porfirin yüklü PEG-b-PLL miselleri hazırlanmıştır. Bu miseller Lewis akciğer karsinoma hücrelerinde çalışılmış ayrıca tavşan gözünde koroidal neovaskülarizayon alanlarında da biriktikleri tespit edilmiştir (Nishiyama ve Kataoka 2006).

Ayrıca son zamanlarda doksorubisinin misel formülasyonu olan NK911 tavşan karotid arterinde balon hasarından sonra neointimal oluşumunu önlemek için kullanılmıştır. Balon hasarı vasküler geçirgenlikte belirgin bir artışa neden olmuştur. Bu nedenle, balon hasarlı arterde NK911 in etkili birikimine izin verilir. Sonuç olarak 3 tane NK911 intravenöz enjeksiyonu balon hasarından sonra 4 haftada neointimal oluşumunu önemli derecede inhibe etmiştir. Serbest doksorubisin tedavisinde ise neointimal oluşumunun inhibisyonu hakkında önemli etkiler gözlenmemiştir. Bu sonuçlar koroner stent takılması ve balon anjiyoplastisinden sonra restenozun önlenmesi için polimerik nano taşıyıcıların yeni uygulamalarını öne sürebilir. Böylece polimerik nano taşıyıcıların artırılmış birikimi sadece tümörlerde değil aynı zamanda diğer hastalık alanlarında da kullanılabilir. Benzer şekilde polimerik misellerin miyokardiyal enfarktüs alanlarında da biriktiği rapor edilmiştir. Ayrıca son yapılan çalışmalarda polimerik misellerin tavşan gözünde koroidal neovaskülarizayon alanlarında da biriktiği kaydedilmiş ve oftalmik neovasküler hastalıkların nanoteknolojiye dayanan yeni bir tedavi şekli öne sürülmüştür (Nishiyama ve Kataoka 2006).

Polimerik misellerin sadece tümörlerde değil aynı zamanda tavşan karotit arterinde balon hasarlı alanda veya tavşan gözünde koroidal neovaskülarizayon alanlarında da biriktiği bulunmuştur. Bu nedenle kardiyovasküler ve oftalmik

hastalıkların hedeflendirilmiş tedavilerinde kullanılma olasılıkları öne sürülmektedir (Nishiyama ve Kataoka 2006).

**b) Polimerik Misellerin Vücuda Veriliş Yolları**

Teorik olarak polimerik misellerin oral salımdan uzatılmış salıma ve belirli alana ilacı hedeflendirmeye kadar çeşitli farmasötik alanlarda pratik uygulamaları olabilir. Bununla birlikte şimdiye kadar polimerik miseller çoğunlukla antikanser ilaçlarının (paklitaksel, adriamisin, metotreksat gibi) parenteral uygulaması için değerlendirilmiştir (Jones ve Leroux 1999; Amiji 2007 pp. 385-408).

Polimerik misellerin oftalmik salım sistemleri rapor edilmiştir. Ketorolak'ın oftalmik polimerik miselleri hazırlanmış ve Gupta ve ark. (2000) tarafından değerlendirilmiştir. Ketorolak polimerik miselleri korneal hasar olmaksızın oküler yararlanımda bir sulu süspansiyona kıyasla iki kat artış göstermiştir. Ayrıca deksametazon yüklü polimerik misellerinde *in vivo* uygulanmaları sonucunda inflamasyonlu tavşan gözlerini anlamlı fark olacak şekilde iyileştirdikleri kaydedilmiştir (Rafie ve ark. 2010).

Fenofibratın misel formülasyonunun oral biyoyararlanımı kaba süspansiyon formülasyonuna göre % 156 oranında meydana gelmiştir (Sant ve ark. 2005). Fenofibratın dışında ise kandesartan sileksitilin (Sattuwar ve ark. 2007), paklitakselin (Veltkamp ve ark. 2007), oktoetiltetra porfirin, meso-Tetrafenilporfin ve kamptotesinin (Sezgin 2004) de oral uygulamaları mevcuttur.

Polimerik misellerin uygulama yoluna ilişkin başka bir çalışma da beklometazon dipropionat yüklü fosfolipit poliaspartamit misellerinin pulmoner uygulanmalarına yöneliktir (Craparo ve ark. 2011).

Polimerik misellerin hemen hemen her olası ilaç uygulama yolu ile kullanılabilineceklerinin belirtilmesine (Torchilin 2005) rağmen pratikte literatür kaynaklarına girmiş nazal yol ile uygulanmaları ilaç yüklü polimerik misel uygulaması bulunmamaktadır. Polietilenimin-PEG konjugatları ile intranazal gen salımı çalışılmıştır (Kichler ve ark. 2002). Fakat bu kopolimerde hidrofobik kısım bulunmadığından dolayı tam olarak bu yapılara misel demek uygun olmayabilir.

### 2.3.2. Genel Olarak Polimerik Misellerin Yapı Taşları

Polimerik miseller; genellikle hidrofilik polimer (shell) (A) ve hidrofobik polimer (core) (B)'den oluşan A-B tipi diblok kopolimerlerden (Kim ve ark. 1998; Shin ve ark. 1998; Riley ve ark. 1999), ABA tipi triblok kopolimerlerden, BAB tipi triblok kopolimerlerden (Xu ve ark. 2010), ABC tipi triblok kopolimerlerden (C: hidrofilik/ hidrofobik polimer) (Yin ve ark. 2009; Karagöz 2009) veya star tipi (Kang ve Leroux 2004) meydana gelirler.

Kopolimerlerin misel oluşturabilmesi için misel kabuğunu oluşturan hidrofilik blok ve çekirdeği oluşturan hidrofobik bloklar arasında bir denge olmalıdır. Bu nedenle amfifilik unimerler için başlıca durumlarda bazı basit düzenlemeler aşağıdadır: 1-15 kDa molekül ağırlıklı PEG blokları kabuğu oluşturan genel bloklar olmalıdır ve çekirdeği oluşturan hidrofobik bloğun boyu, hidrofilik bloğun boyuna yakın veya hidrofilik bloğunkinden biraz daha kısa olmalıdır (Torchillin 2001).

İlaç salımında kullanılan amfifilik blok kopolimerlerin çoğu hidrofobik blok olarak ya bir poliester, polieter ya da bir poli(aminoasid) türevi içerir. Genellikle poli-ε-kaprolakton (PCL), poli(D,L-laktik asit) (PDLLA) veya poli(ß-benzoil-L-aspartat) (PBLA) gibi biyobozunur bir polimer içeren hidrofobik çekirdek, suda çözünürlüğü iyi olmayan etkin madde için bir rezervuar görevi görür ve onu sulu ortam ile temastan korur (Jones ve Leroux 1999). Ayrıca çekirdeği oluşturan blok; hidrofobik bir ilacın kimyasal konjugasyonu ile hidrofobik hale getirilen normalde suda çözünen bir polimer (örneğin; poliaspartik asit, P(Asp)), iyi bir stabilite kazandıran camsı durum özelliğinden dolayı polistiren (Pst) veya poli(metil metakrilat) (PMMA) gibi biyobozunur olmayan veya biyobozunurluğu kötü olan polimerler, alkil zinciri veya bir diasillipid (örneğin; distearoil fosfatidil etanolamin (DSPE)) gibi oldukça hidrofobik küçük zincirler de olabilir (Jones ve Leroux 1999).

Polimerik miselin kabuğunu oluşturan hidrofilik polimer plazma proteinleri ve hücre membranları ile etkileşimlerden sorumludur ve misel için etkili sterik korumayı sağlamak ile görevlidir. Misel hidrofilitesini, yükünü, boyunu hidrofilik blokların yüzey yoğunluğunu ve hedeflendirme parçalarının eklenmesi gibi uygun reaktif grupların varlığını belirler. Bu özellikler farmakokinetik, biyodağılım, biyogeçimlilik, dolaşımda kalış süresi, biyomakromoleküllere yüzey adsorpsiyonu, biyoyüzeylere adsorpsiyon ve hedeflendirme gibi miseller taşıyıcıların önemli biyolojik özelliklerini kontrol eder

(Torchilin 2001, Torchilin 2005). Hidrofilik blok olarak çoğunlukla poli(etilen glikol) (PEG) kullanılmasına rağmen poliakrilamit, polihidroksietilmetakrilat, poli(N-vinil-pirolidon) (PVP) ve poli(vinil alkol) (PVA)) da hidrofilik blok olarak kullanılabilir (Jones ve Leroux 1999; Torchillin 2001; Amiji 2007 pp. 317-356).

### 2.3.2.1. Sentezlenen Polimerlerin Yapı Taşları

**Metoksi Poli (etilen glikol) (mPEG):** PEG, poliiyonik (PICM) ve amfifilik misellerin çoğunluğunda hidrofilik segment olarak kullanılmaktadır. α-metoksi, ω-amino veya hidroksil gruplu asimetrik PEG'ler ticari olarak bulunmaktadır ve diblok kopolimerlerin polimerizasyonunda kullanılır (Gaucher ve ark. 2005).

Blok kopolimerlerde kullanılan PEG'in molekül ağırlıkları çekirdeği oluşturan bloğun boyundan daha uzun veya ona eşit uzunlukta bir zincir olmakla birlikte genellikle 1000 ve 12000 g/mol arasındadır. PEG 20 000 g/mol'den daha büyük molekül ağırlıklı olduğunda poli(etilen oksit) (PEO) olarak da adlandırılabilir (Amiji 2007 pp. 317-356; Torchillin 2008 pp. 263-308).

PEG'in çoğu yerde kullanımı düşük toksisite ve düşük immünojenitesinden ayrıca çeşitli farmasötik formülasyonlarda kullanımı için FDA tarafından onay almış olmasından dolayıdır. Ayrıca iyi derecede suda çözünürlük, yüksek elastikiyet ve iyi 'stealth' özellikleri ile sonuçlanan büyük eklüzyon hacmi gibi eşsiz fizikokimyasal özelliklere sahiptir (Torchillin 2008 pp. 263-308). İyi derecede suda çözünürlük, fazla hareketlilik ve geniş eklüzyon hacminden dolayı PEG misel çekirdeğinin yüzeyler arası serbest enerjisini en aza indirerek ve miseller arası hidrofobik etkleşimleri engelleyerek sterik stabiliteyi sağlar. $^{1}$H-NMR analizleri de bir poliester çekirdeğe bağlı PEG zincirlerinin dıştan sulu çevrenin içine doğru uzandığını ve bu moleküllerin suda çözünen PEG moleküllerine kıyasanabilir derecede hareketlilik ve esneklik gösterdiğini kanıtlar (Gaucher ve ark. 2005).

*In vivo* olarak hidrofilik PEG bloklarının görevi, RES tarafından opsonizasyonu ve atılmayı önleyerek miselin sterik stabilazyonunu sağlamaktır. Sulu ortama maruz kalan PEG zincirleri van der Waals bağlarının sebep olduğu partiküller arası çekimi engeller. *In vivo* olarak misel yüzeyine, opsoninleri içeren kan proteinlerinin adsorpsiyonunu önlerken in vitro olarak agregasyon sürecinin önlenmesini sağlar. Sadece ilaç taşıyıcıların yüzeylerine protein adsorpsiyonu ve RES aracılı klirensi

sağlamadığı aynı zamanda biyodağılım, stabilite, ilaç salım profili gibi önemli özellikleri de etkilediği için PEG kabuğunun koruyucu kapasitesi biricil öneme sahiptir. Doğal olarak koruma etkinliği hem PEG bloklarının yüzey yoğunluğu hem de koruyucu tabakanın kalınlığına bağlıdır (Torchillin 2001). RES tarafından opsonizasyonu ve atılmayı önleme özellikle pozitif yük kalıntılı çekirdeklerde mevcut olabilir. PEG kabuğunun nötral yapısının etkili bir şekilde PEI'yı koruyabildiğini ve biyolojik çevrede negatif yüklü plazma proteinleri ile spesifik olmayan etkileşimleri önleyebildiğini bilinmektedir (Gaucher ve ark. 2005).

Fakat PEG'in nanopartiküllerin sterik stabilizasyonu için altın bir standart olduğu düşünülmesine rağmen genellikle PEG'in inert olmadığı da öne sürülmektedir. PEG li lipozomlar ile yapılan çalışmalar kan proteinlerine bağlandığını ve tekrarlayan uygulamalar ile düşük lipit dozlarında stealth özelliklerinin kaybolduğunu göstermiştir (Torchillin 2008 pp. 263-308).

Bütün bunların haricinde PEG'in mukoadezyon artırıcı etkisinin olduğu bilinmektedir. Ayrıca PEG'ler nazal uygulanan ilaçların stabilitesini ve sudaki çözünürlüğünü artırmak için farmasötik formülasyonlarda yardımcı madde olarak da kullanılmıştır (Vila ve ark. 2005).

**Poli (ε-Kaprolakton) (PCL):** ε-Kaprolakton homopolimer, kristallerin boyutuna bağlı olarak 59-64ºC'de eriyen yarı kristal, biyogeçimli bir polimerdir ve uzun in vivo degradasyon süresine katkı sağlayan kristalinite ve hidrofobisiteye sahiptir. Bununla birlikte kısaltılmış degradasyon süresi için ε-kaprolaktonun dilaktatlı, diglikolidli, δ-valerolaktonlu ve PEG'li kopolimerleri çalışılmıştır ve biyobozunan polimerik taşıyıcılar olarak önerilmiştir. Bu kopolimerler ε-kaprolaktondan daha hızlı degrade olmuşlardır (Shin ve ark. 1998).

Poli ε-kaprolakton düşük camsı geçiş sıcaklığına (-60°C) sahip vücut tarafından tamamıyla emilebilen bir polimerdir. Düşük camsı geçiş sıcaklığından dolayı PCL'nin amorf fazı vücut sıcaklığında daha yüksek moeküler hareketlilik gösterir (Tay ve ark. 2007).

Poli ε-kaprolakton 1970'den beri yara örtü malzemesi olması için çalışılan bir polimerdir. PCL hem *in vivo* hem de *in vitro* biyouyumluluğundan ve etkinliğinden dolayı FDA tarafından medikal kullanım için onaylanmıştır. Toksik özellikleri düşük ve

birçok ilaç için yüksek geçirgenliğe sahip olduğu için kontrollü ilaç salımında da tercih edilmektedir. Ayrıca PCL hem yumuşak doku hem de sert doku ile uyumlu olduğundan dolayı doku iskelesi olarak da kullanılabilmektedir (Domb 1994).

**Poli (D,L Laktat) (PDLLA):** Poli(L-laktat) %37 kristalin bir polimerdir, erime sıcaklığı 175-178ºC, camsı geçiş sıcaklığı ise 60- 65ºC arasındadır. PLLA yüksek gerilme gücü ve düşük uzama özelliği gösterir.

Poli(D,L-Laktat) (PDLLA) laktik asitin gelişi güzel dağılmış izomerik formlarına sahiptir. Bu polimer düşük gerilme gücüne ve yüksek uzama özelliğine sahiptir. Yavaş bozunma süresine sahip olması PDLLA'yı ilaç salım sistemlerinde tercih sebebi yapmıştır. PLLA'nın bozunma süresi ise PDLLA'nın bozunma süresinden daha yavaştır. L-laktat ile glikolat ya DL-laktat'dan hazırlanan kopolimerleri L-laktatın kristalitinesini bozarak bozunma süresini hızlandırmaktadır (Middleton ve Arthur 2000).

**Polietilenimin (PEI):** PEI uzun zamandır suyun saflaştırılması, kağıt ve şampuan üretimi gibi farmasötik alan dışında kullanılmıştır. PEI'lerin insan ve hayvanlarda haricen kullanım için oldukça güvenli olduğu da rapor edilmiştir. Bu polimerler polimerik omurgalarının her üçüncü atomunda protanlanabilir bir azotun varlığından dolayı yüksek oranda pozitif yük içerir. Ayrıca tekrarlayan etilamin birimleri bulundurdukları için suda iyi çözünürler. PEI'lerin doğrusal ve dallanmış şekilleri bulunmaktadır. Hem in vivo hem de in vitro modellerde iyi düzeyde transfeksiyon etkinliği sağladıkları için PEI'ler son yıllarda viral olmayan gen salımı için taşıyıcı olarak çok fazla kullanılmaktadır (Yang ve ark. 2006). Ayrıca PEI^nin katyonik yükü bu tür çalışmalarda partiküllerin hücrelere girişinde anyonik hücre yüzeyi proteoglikanlarına bağlayan etkili bir araçtır (Kichler ve ark. 2002). Ayrıca PEI'nin hem prokaryotik hem de ökaryotik hücre tiplerinde etkili bir permeabilizör ve antimikrobiyal madde olduğu rapor edilmiştir (Andersson ve Hatti-Kaul 1999).

Yüksek molekül ağırlıklı dallanmış PEI ve DNA arasındaki nitrojen/fosfat oranının (N/P) artırılması ile ciddi toksik etkiler görülür. Bu toksik problemi çözmek için PEG-g-dallanmış PEI, PEG-b-dallanmış PEI ve kendi kendini degrade edebilen dallanmış PEI gibi PEI türleri sentezlenmiştir (Cho ve ark. 2006).

### 2.3.3. Misel Oluşum Yöntemleri

Misel hazırlamak için bütün yöntemler iki grupta incelenebilir:

a) Doğrudan çözme yöntemi

b) Diyaliz yöntemi

Yöntemin seçimi genellikle misel oluşturan blok kopolimerin sulu bir ortamda çözünürlük derecesi ile belirlenmektedir (Torchillin 2001).

Doğrudan çözme yönteminde kopolimer, CMC değerinin üstünde bir konsantrasyonda ve normal/yüksek sıcaklıkta sulu bir ortamda çözündürülür (Torchillin 2001). Gerekli ise misel oluşumu sırasında sıcaklık artırılır (Amiji 2007 pp. 385-408). Suda çözünürlüğü çok düşük olan kopolimeler ise dimetilsülfoksit, dimetilformamid, asetonitril, tetrahidrofuran, v.b. gibi su ile karışabilen bir organik çözücüde çözündürülür ve sonra suya karşı diyaliz yapılarak miseller oluşturulur (Torchillin 2001).

### 2.3.4. Misellere İlaç Yüklenmesi

Misel oluşturan amfifilik blok kopolimerler ile suda çözünmeyen ilaçların çözünme işlemi hem pratik hem de teorik bir problem olarak da araştırılmıştır. Çözünme işleminin çözünen ilaç ve misel çekirdeği arasındaki etkileşimlerin yeterliliğine ve çeşidine bağlı olduğu görülmüştür. Bununla birlikte ilaç ve çözücü (su) arasındaki yüzeyler arası etkileşimler kadar hidrofilik kabuk ve çözünen ilaç arasındaki etkileşimler de çözünme işlemini etkileyebilirler. Çözünme işleminin matematiksel simülasyonu başlangıçta çözünmenin misel çekirdeğinden çözücü (su) moleküllerinin çıkarılması vasıtası ile ilerlediğini ve daha sonra çözünen ilaç misel çekirdeğinin merkezinde birikmeye başladığını açıklamıştır. Fazla miktarda ilaç çözünmesi, çözünen ilaç ile birlikte çekirdeğin genişlemesinden dolayı misel boyutunun bir miktar artması ile sonuçlanabilir (Torchillin 2001).

#### 2.3.4.1. İlaç Yükleme Yöntemleri

Etkin madde, misel oluşturan kopolimerin hidrofobik bloğuna kimyasal veya elektrostatik bağlar ile eklendiyse misel çekirdeğine yüklenme misel oluşumu ile kendiliğinden gerçekleşir. Fakat ilaç misele fiziksel olarak yüklenirse misel hazırlama metoduna bağlı olarak misellere ilaç yüklemek için farklı protokoller kullanılır (Şekil 2-5).

**A) Doğrudan Çözündürme Yöntemi:** Sudaki kopolimer çözeltisi, bir organik çözücüde çözülüp kurutulan ilaca eklenir veya uçucu organik çözücüde çözünen ilaç önceden hazırlanan misellerin sudaki çözeltisine eklenir ve daha sonra sistemden çözücü uzaklaştırılır (Gaucher ve ark. 2005).

**B) Diyaliz Yöntemi:** Yüklenecek ilaç bir organik çözücüde (dimetilsülfoksit, N,N-dimetilformamid, asetonitril, THF, etanol, aseton veya dimetilasetamid gibi (Jones ve Leroux 1999; Gaucher ve ark. 2005; Amiji 2007 pp. 317-356) misel oluşturan kopolimer ile birlikte çözünür ve daha sonra suya karşı diyaliz edilir (Torchillin 2001).

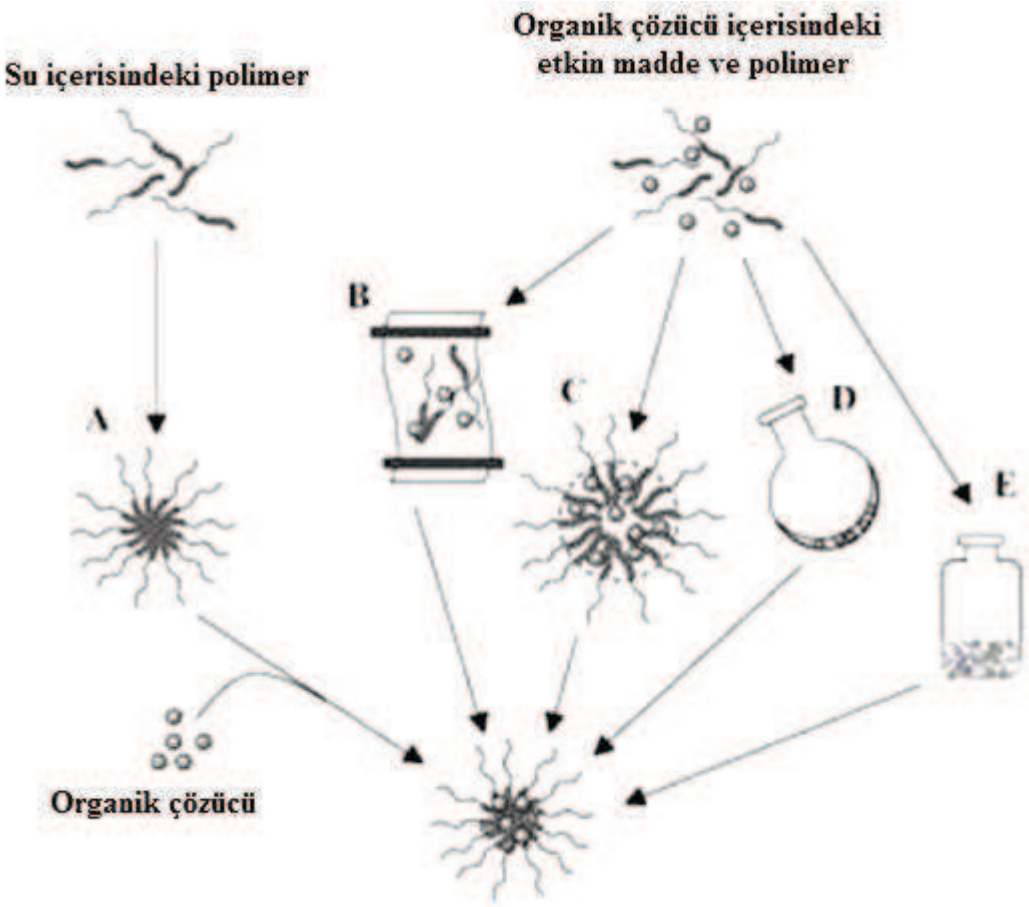
Misel oluşumunu meydana getiren mekanizma, çözücü çıkarma işlemine bağlıdır. Organik çözücü su ile yer değiştirdiğinde işlem sırasında polimerin hidrofobik kısmı etkin madde yüklü misel çekirdeğini oluşturmak için şekillenir. Yavaş şekilde su girişi ile, şişmiş çekirdekli miseller oluşur. Organik çözücüyü çıkarmak için suya karşı birkaç gün boyunca diyaliz yapılır. Organik çözücünün yüzdesi azaldığında sağlam, etkin madde yüklü miseller oluşturmak için misel çekirdeğindeki şişme derecesi azalır.

**C) Y/S Emülsiyonu Yöntemi:** Suyla karışmayan uçucu bir organik çözücünün (diklorometan, kloroform, etil asetat gibi) kullanımını içeren Y/S emülsiyonu yöntemi ile bir hidrofobik etkin maddenin fiziksel tutulması daha fazla meydana gelebilir.

**D) Film Yöntemi:** Etkin madde-polimer etkileşimleri tercih edildiğinde polimerik bir film sağlamak için organik fazın uçurulmasını gerektirir. Isıtılmış sulu bir çözücü ile filmin rehidrasyonu etkin madde yüklü miselleri meydana getirir.

Yukarıda anlatılan bütün teknikler yeterli raf ömrü olan enjektabl formülasyonları sağlamak için sterilizasyon ve dondurma-kurutma basamakları basamakları da gerektirmektedir.

**E) Dondurma-Kurutma Yöntemi:** Son zamanlarda çözücülerin liyofilizasyonun ardından Su/tert-butanol (TBA) karışımında hem etkin madde hem de polimerin çözünmesine dayanan yenilikçi bir tek basamak işlemi tarif edilmektedir. Etkin madde yüklü miseller enjeklabl bir taşıyıcıda (ortamda) dondurulmuş kurutulmuş etkin madde-polimer kekinin tekrar sulandırılması ile kendiliğinden oluşur (Jones ve Leroux 1999; Gaucher ve ark. 2005; Amiji 2007 pp. 317-356).




**Şekil 2-5: Polimerik misellere genel ilaç yükleme yöntemleri A) Doğrudan B) Diyaliz Yöntemi C) Y/S Emülsiyon Yöntemi, D) İnce Film Yöntemi, E) Dondurma-Kurutma Yöntemi (Gaucher ve ark. 2005)**

Çekirdeği oluşturan segmentin etkin maddeye olan afinitesinin yanı sıra organik fazın oranı ve yapısı gibi proses parametreleri etkin madde yüklü polimerik misellerin hazırlanmasını etkileyebilir ve son ürünün özelliklerini etkileyebilir. Ayrıca yükleme yöntemi, oluşturulan misellerin özelliklerini değiştirebilir (Gaucher ve ark. 2005).

### 2.3.4.2. İlaç Yükleme Etkinliğini Belirleyen Faktörler ve Yükleme Etkinliği

Bir blok kopolimer sistemin bütün ilaç tiplerini etkili bir şekilde salabilmesi yüksek bir olasılık değildir. Bu yüzden etkili bir misel salım sisteminin tasarımında ilgili ilaç için çekirdek bloğunun seçimi önemli bir faktördür (Amiji 2007 pp. 317-356).

Misellere ilaç yükleme etkinliğini belirleyen faktörler (Torchillin 2001; Amiji 2007 pp. 317-356);

**a) Çekirdeği Oluşturan Bloğun Boyu, Hidrofobisitesi ve Kabuğu Oluşturan Bloğun Boyu:** İlk durumda hidrofobik blok ne kadar büyürse çekirdek boyutu ve hidrofobik ilaçları tutabilme yeteneği o kadar büyür. İkinci durumda ise hidrofilik bloğun boyundaki artış CMC değerinin artışı ile sonuçlanır. İlaç molekülünün hidrofobik/hidrofilik dengesi ilacın farklı miseller kısımlarda yerleşmesine bağlı olduğu için bu denge de yükleme etkinliğini etkileyecektir. Sonuç olarak kabuğa veya ona yakın yerleşen moleküller misellerden oldukça hızlı salınabilir. Miselden ilaç salımını engelleyen bazı durumlarda ilaç çekirdeğin içinde ayrı bir faz olarak bulunur, çekirdekte çözünmez. Bu durumda ilacın faz durumu da yükleme için önemli olabilir.

**b) İlaç ve Çekirdek Arasındaki Belli Etkileşimler:** Yüklenen ilaç ve çekirdeği oluşturan kısımlar arasındaki geçimlilik ilaç yükleme etkinliğini belirler. Bu geçimlilik ilacın polaritesi, hidrofobisitesi ve yükü gibi özelliklere bağlıdır. Bununla birlikte çözünürlüğü iyi olmayan ilaç ile en iyi geçimliliği sağlayan hidrofobik bloğun yapısı seçilebilir. Polimer ve çözünen ilaç arasındaki geçimliliği değerlendirmek için Flory-Huggins etkileşim parametresi kullanılır.

**c) Misel Hazırlama Yöntemi:** Miselleri hazırlamak için seçilen metodun da ilaç yükleme derecesinde bir etkiye sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca misel hazırlama metodu seçimine ek olarak yönteme özgü parametrelerin de (organik çözücünün yapısı, çözücü oranı) misellere ilaç yüklenmesini etkilediği kanıtlanmıştır.

### 2.3.5. Polimerik Misellerin Karakterizasyonu

#### 2.3.5.1. Kritik Misel Konsantrasyonu

CMC değeri misellerin biyolojik performansı açısından büyük önem taşımaktadır. CMC değeri büyük miseller uygulamadan sonra kanda unimerlere ayrılabilirler ve ilaç kanda agregatlar oluşturabilir. Bu durumda embolizm meydana gelebilir veya ilaç agregatlarının istenmeyerek biriktiği alanlarda lokal toksisitenin oluşumu da söz konusu olabilir. CMC değeri düşük miseller ise geniş kan hacmi ile seyrelerek dolaşımda uzun süre sağlam kalırlar (Torchillin 2001).

CMC'nin kopolimerin toplam molekül ağırlığına, hidrofilik/hidrofobik oranına, hidrofilik bloğun boyu, hidrofobik bloğun boyu ve yapısına bağlı olduğu bulunmuştur

(Gaucher ve ark. 2005; Amiji 2007 pp. 385-408). Diblok kopolimerlerin CMC değerleri aynı molekül ağırlığına ve hidrofilik/hidrofobik orana sahip triblok kopolimerlerinkinden genelikle daha düşüktür (Amiji 2007 pp. 385-408).

Verilen bir blok kopolimerin kritik misel konsantrasyonunu belirlemek için birkaç metot vardır. Teorik olarak CMC nin belirlenmesinde CMC ye yakın veya CMC de birden sistem özelliklerinde değişimler kaydedilen herhangi bir fiziksel özellik (örneğin; arayüzey gerilimi, iletkenlik, osmotik basınç) kullanılabilir. Fakat hassasiyet nedenlerinden dolayı CMC değerlerini belirlemek için sadece belirli metotlar kullanılmaktadır. HPLC, küçük açılı ışık saçılımı (small angle light scattering) kullanılarak partikül boyutu ölçümü ve floresans spektroskopisi bu metotlar arasındadır (Torchillin 2001).

**2.3.5.2. Boyut ve Boyut Dağılımı**

Polimerik misellerin en ilgi çekici özelliklerinden biri (10-100 nm) boyutlarının küçük olmasıdır. Genelde misel boyutu nadiren 100 nm'ye ulaşır. Bu durum agregasyon sayısını, kopolimerin molekül ağırlığını, miseli hazırlama yöntemini, hidrofobik ve hidrofilik polimerlerin bağıl oranını içeren faktörlere bağlıdır (Jones ve Leroux 1999). Ayrıca Kim ve arkadaşlarının (1998) yaptığı çalışmada misel oluşturmak için kullanılan çözücünün de misellerin boyut ve boyut dağılımını etkilediği tespit edilmiştir.

Misellerin boyutu in vivo davranışlarda önemli bir etkiye sahiptir. Endotelden dışarı çıkış ve böbreklerde glomerüler filtrasyon boyuta bağımlı durumdadır (Kakizawa ve Kataoka 2002).

Miseller oldukça dar boyut dağılımına sahip olmaya meyillidirler fakat hidrofilik zincirler ile hidrofobik çekirdeğin kaplanması yetersiz olduğundan dolayı ikincil agregasyona meyillidirler. Bu sorunu çözmek için ise seyreltmenin, birincil misellerin ikincil agregatlarını ayırma da kullanıldığı rapor edilmektedir (Amiji 2007 pp. 317-356).

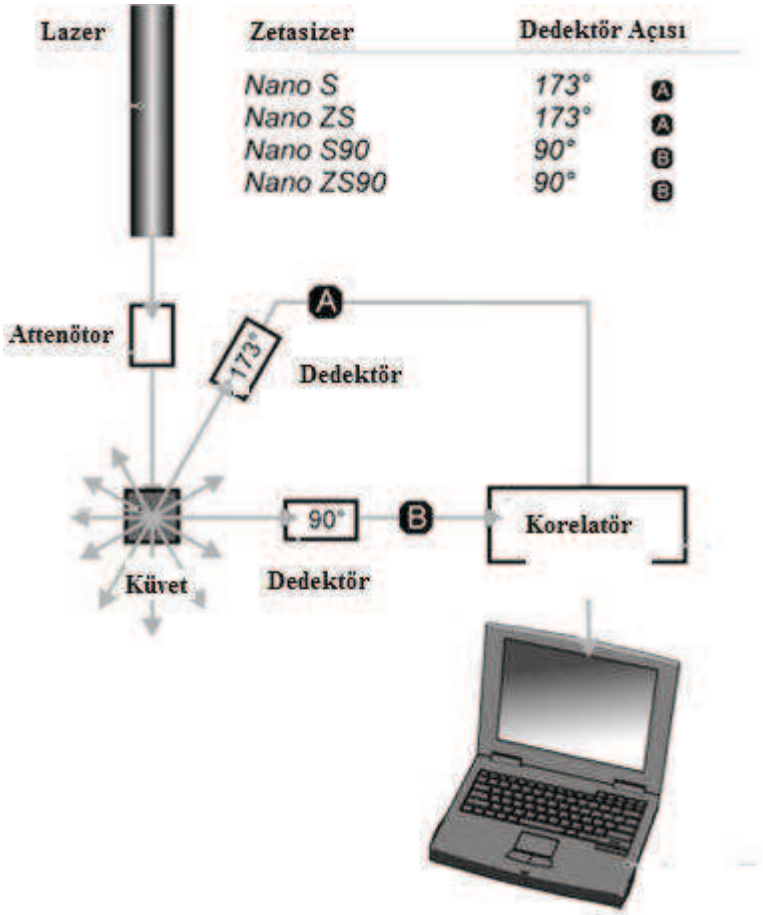
Misel çapı ve boyut polidispersitesi dinamik ışık saçılımı (DLS) (Shin ve ark. 1998) ile izotonik bir tamponda veya suda doğrudan ölçülebilir. DLS yöntemi, polimerik miselin küreselliği hakkında bazı bilgiler de sağlayabilir. Ayrıca misel boyutu atomik kuvvet mikroskobu (AFM), geçişli elektron mikroskobu (TEM), taramalı

elektron mikroskobu (SEM) ile de hesaplanabilir. Bu yöntemler boyut dağılımı ve misel şeklinin karakterizasyonlarına da izin vermektedir (Jones ve Leroux 1999).

Polimerik misellerin partikül büyüklüğü ve dağılımı genellikle 6-6000 nm boyutundaki partiküllerin boyutlarını ölçebilen Zetasizer Nano ZS cihazı ile yapılmaktadır. Bu cihazda boyut ölçümleri dinamik ışık saçılımı (DLS), kuasi-elektrik ışık saçılımı (QELS) veya foton korelasyon spektroskopisi olarak adlandırılan bir yöntem kullanılarak tespit edilmektedir. DLS ile bir sıvıda disperse edilen partiküllerin ölçümü yapılmaktadır.

Partiküllerin boyutları Brownian hareketlerinin hızıyla ilgilidir. Brownian hareketleri partikülü çevreleyen çözücü moleküllerinin bombardıman hareketi ile meydana gelen hareketlerdir. Partiküller büyükse Brownian hareketleri yavaş olmaktadır. Partiküllerin küçük olması halinde ise partiküllere çözücü molekülleri daha fazla çarpar ve partiküller daha hızlı hareket ederler. Partiküllerdeki bu hareketlilik farkından dolayı ışık kaynağından gönderilen ışık saçılımı farklı dalgalanmalar gösterir. Küçük partiküller daha hızlı hareket ettiği için saçtıkları ışığın sıklığındaki dalgalanma hızı büyük partiküllerdekinden daha hızlıdır. Bu esasa dayanarak DLS saçılan ışığın sıklığındaki dalgalanma hızını ölçmektedir ve bu ölçümleri partiküllerin hidrodinamik çaplarını hesaplamak için kullanmaktadır (http://www.malvern. com/common/ downloads/campaign/MRK656-01.pdf).

Cihazın çalışma şeması Şekil 2-6'da gösterilmiştir.




**Şekil 2-6: Foton korelasyon spektrofotometresinin çalışma esası**

(http://www.malvern.com/common/downloads/campaign/MRK656-01.pdf)

### 2.3.5.3. Misellerin Yükü

Misellerin ζ-potansiyeli partiküllerin kolloidal stabilitesini ilgilendiren temel parametredir. Ayrıca hücrelere alım ve partiküllerin farmakokinetiklerinin ayarlanmasını sağlayan hücre membranları ve proteinler gibi biyolojik elemanlar ile etkileşimi de etkiler (Kakizawa ve Kataoka 2002). Genel olarak zeta potansiyelin absolut değeri 20-50mV dur. Kolloid partiküller üzerindeki yük sistemin stabilitesi açısından çok önemlidir. Pek çok durumda daha yüksek zeta potansiyel değeri kolloid partikül yüzey üzerindeki yükün büyüklüğünü ve disperse haldeki partiküller arasında daha güçlü bir itme etkileşimini, daha yüksek stabiliteyi ve tekdüze çap oluşumunu gösterir (Sezgin 2004).

### 2.3.5.4. Misellerin Morfolojisi

Günümüzde amfifilik blok kopolimerlerden oluşabilen çok moleküllü agregatların morfolojisi yoğun bir araştırma konusudur. Genellikle miseller çekirdek ve kabuk kısımları arasında net ayrım olan küresel partiküller olduğu kabul edilmektedir. Fakat blok kopolimer agregatlar çubuklar, büyük birleşik çubuklar, dallanmış kısa çubuklar, kesik çubuklar, çeşitli veziküller, tübüller, dallanmış tübüller, altıgen şeklinde sıkıştırılmış içi boş çemberler, baroklinik borular, büyük birleşik miseller, lameller, çeşitli karışık ve kombine morfolojiler ve daha fazlası gibi çok farklı morfolojilerde bulunabilirler. Farklı yapılar denge durumunda, dengeye yakın ve dengede olmayan durumlarda oluşmaktadır. Genellikle küresel olmayan yapılar; hidrofobik çekirdeği oluşturan bloğun boyu, kabuğu oluşturan bloğun boyundan daha kısa olan asimetrik blok kopolimerlerden meydana gelir. Bu "crew-cut" agregatların oluşumu çekirdeği oluşturan blokların esneme derecesi ve kabuğu oluşturan hidrofilik zincirler arasındaki etkileşim arasında bir kuvvet denge etkisi ile açıklanmıştır. Kopolimer bileşimi, kopolimer agregasyonu ve misel hazırlamak için kullanılan organik çözücü başlıca morfojenik faktörler arasında listelenebilir (Torchillin, 2001).

Misellerin morfolojisi atomik kuvvet mikroskobu (AFM) (Karagöz 2009), taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Kim ve ark. 1998), geçişli elektron mikroskobu (TEM) (Zhang ve ark. 2007) ile incelenebilir.

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) olarak da bilinen taramalı prob mikroskobu (SPM), örneklerin üç boyutlu görüntüsünü ve boyutunu elde etmek için kullanılmaktadır. Konvensiyonel optik mikroskoplardan ve elektron mikroskoplarından farklı oldukça yeni bir mikroskop çeşididir. Vakumsuz olarak bir sıvıdaki veya gazdaki örnekler gözlenebilir. SPM ile 0,1 nm-100 μm arasındaki partiküller incelenebilir. SPM performansı örnek özelliklerinden, yüzey kaplamasından, örneğin yüzeye tutunma yönteminden, örnek çevresindeki ortamdan ve örneği tutan desteklerin tipinden oldukça fazla etkilenmektedir (http://www.shimadzu.com/an/surface/spm/faq.html).

### 2.3.5.5. Stabilite

Polimerik misellerin stabilitesi iki şekilde düşünülebilir:

1. Termodinamik stabilite
2. Kinetik stabilite

Misellerin tek tek zincirlere ayrılması yönündeki termodinamik eğilim kopolimerin kritik misel konsantrasyonunu (CMC) yansıtır (Amiji 2007 pp. 317-356). Sulu ortamdaki polimer konsantrasyonu kritik misel konsantrasyonunun üstünde olduğunda polimerik miseller termodinamik olarak stabildir. Kritik misel konsantrasyonunun altında ise sulu ortamdaki amfifilik blok kopolimerler yığın fazda ve hava-su arayüzeyinde tek zincirler halinde bulunurlar. Polimer konsantrasyonu kritik misel konsantrasyonunun üstüne çıkarıldığında hidrofobik bloklar arasındaki hidrofobik etkileşimlerin bir sonucu olarak amfifiller kendi kendine toplanarak sistemin Gibbs enerjisini ($\Delta G$) en az düzeye indirirler (Torchillin 2008 pp. 263-308). İntravenöz enjeksiyon uygulamasından sonra polimerik misellerin dolaşımda seyrelmesi sonucunda kopolimer zincirlerinin ayrılması ile kan akışına ilacın erken salımı ile hedef alanda ilaç yetersiz şekilde birikeceği için blok kopolimer misellerin termodinamik stabilitesi önemlidir (Gaucher ve ark. 2005; Amiji 2007 pp. 317-356). Buna bağlı olarak CMC seyreltme sırasında misellerin termodinamik stabilitesini belirlediği için önemli bir parametreyi temsil eder (Amiji 2007 pp. 317-356).

Bir miseller sistemin kinetik stabilitesi ise yığın ve miseller arasındaki tek polimer zincirlerinin değişim hızı ile ilgilidir. Miseller çekirdeği oluşturan blok yarı-kristalse miseller yapının camsı geçiş sıcaklığına (Tg) ve/veya Tm'ye bağlı olarak kritik misel konsantrasyonunun altındaki seyrelmelerde bile miseller sistem uzun süre kinetik olarak stabil olabilir. Misellerin ayrılma hızı çekirdeği oluşturan polimerin fiziksel durumuna (kristal veya amorf), misel çekirdeğinde çözücü varlığına (hazırlama işleminden dolayı organik çözücü kalıntıları), hidrofobik bloğun boyutu, kopolimerin hidrofilik ve hidrofobik blok arasındaki oranı ve hidrofobik bileşiklerin enkapsülasyonu gibi birçok faktöre bağlı olan misel çekirdeğindeki etkileşimlerin sağlamlığı (gücü) ile ilgilidir (Gaucher ve ark. 2005; Amiji 2007 pp. 317-356; Torchillin 2008 pp. 263-308).

Miseller sistemin kinetik stabilitesinde çekirdeği oluşturan bloğun camsı geçiş sıcaklığı (Tg) önemli rol oynamaktadır. Çekirdeği oluşturan bloğu daha düşük Tg'ye (37ºC nin altı) sahip olan miseller Tg'nin yukarısındaki sıcaklıklarda çekirdeği oluşturan polimer zincirlerinin serbest hareketleri sonucunda daha yüksek Tg'si olanlardan daha hızlı ayrışmaya meyilli olacaklardır (Gaucher ve ark. 2005; Amiji 2007 pp. 317-356). Yamamoto ve arkadaşları (2002) hidrofobik PDLLA nın camsı geçiş

sıcaklığının yukarısında, sistemin kinetik stabilitesinde bir azalma yapan bir sıcaklıkta PEG-b-PDLLA misellerinin CMC'sinde büyük bir artış bulmuşlardır.

Sonuç olarak; stabilite sorunlarının oluşmaması için polimerik miseller tercihen vücut sıcaklığında camsı veya kristal bir çekirdeğe sahip olmalıdır ve düşük kritik misel konsantrasyonlu kopolimerlerden oluşmalıdır (Torchillin 2008 pp. 263-308).

Bununla birlikte kan bileşenlerinin varlığı çoğunlukla ya misel destabilizasyonu ile ya da sağlam misellerden enkapsüle etkin maddenin ekstraksiyonu ile etkin maddenin erken salımına yol açar. Bu yüzden günümüzdeki çalışmaların çoğu etkin madde yüklü misellerin termodinamik ve kinetik stabilitesini artırmak amaçlıdır. Bunun için;

- CMC yi azaltmak amaçlı olarak misel oluşturan polimerlerin modifikasyonunu (Kang ve Leroux 2004),
- fiziksel etkileşimleri artırmayı / kovalent çapraz bağlamayı (Kang ve ark. 2005)
- etkin madde- polimer geçimliliğini artırmayı (Lee ve ark. 2004)

içeren çeşitli stratejiler araştırılmaktadır (Torchillin 2008 pp. 263-308).

Ayrıca iyonik kopolimerlerden oluşturulan misellerde iyonik gruplardan dolayı stabilite sorunları artmaktadır. Cha ve arkadaşları (2009) anyonik metoksi poli(etilen glikol)-b-oligo(L-aspartik asit)-b-poli(□-kaprolakton) kopolimerlerinden paklitaksel yüklü miseller oluşturmuşlar. Bu misellerin stabilitesini artırmak için kopolimerdeki aspartik asitin karboksil grupları ile divalent kalsiyum katyonları arasında elektrostatik etkileşimler oluşturulmuş ve anyonik blokların yapılarında stabil bir tabaka oluşumu sonucunda stabilite artırılmıştır. Ayrıca iyonik olarak stabil misellerin stabil olmayanlara göre salım özellikleri de iyileşmiş ve stabilize edilen paklitaksel yüklü misellerde stabilize edilmeyen paklitaksel yüklü misellere göre ciddi bir boyut artışı gözlenmemiştir.

İlaç yüklü misellerin fiziksel stabilitesini değerlendirmek içinse türbidite ölçümleri (Shin ve ark. 2009), GPC (Jones ve Leroux 1999) kullanılmaktadır. Bu ölçümler miktar tayini ve DLS ölçümleri ile de desteklenebilir (Shin ve ark. 2009).

### 2.3.6. Polimerik Misellerden Etkin Madde Salımı ve Etkin Madde Salımını Etkileyen Faktörler

Miseller sistemlerden ilaç salımı birçok araştırmacı grup tarafından geniş ölçüde çalışılmaktadır. Fakat yaygın salım çalışmalarına rağmen blok kopolimer misellerden ilaç salım mekanizması tamamı ile anlaşılamamıştır. Bununla birlikte çoğu grup araştırılan koşullar altında misellerin sabit kalması şartıyla difüzyonun ve kopolimer degradasyonunun iki temel salım mekanizması olduğuna inanmaktadır. Polimer ve ilaç arasındaki etkileşim güçlü ve biyodegradasyon hızı ise degradasyon hızı ilaç salım hızı ile yönetilir. Bununla birlikte *in vitro* çalışmalarda gözlendiği gibi misellerden ilaç salım hızı genellikle kopolimer degradasyonunun hızını geçer. Sonuç olarak polimer degradasyonu çoğu kez ilaç salımının ana mekanizmalarından biri olarak göz ardı edilebilmektedir. Bu yüzden ilaç difüzyonu misellerden ilaç salımının temel mekanizması olarak düşünülebilir (Amiji 2007 pp. 317-356).

**İlaç Salımını Etkileyen Temel Faktörler (**Amiji 2007 pp. 317-356**)**

- **İlacın Özellikleri:** (ilaç miktarı, ilacın molekül ağırlığı ve ilacın moleküler hacmi),

Genellikle ilaç konsantrasyonundaki artış ile ilaç salım hızı azalmaktadır (Amiji 2007 pp. 317-356).

Daha büyük ve daha ağır molekül ağırlıklı ilaçlar ise daha küçük molekül ağırlıklı etkin maddelere göre daha düşük difüzyon katsayısına sahiptirler (Amiji 2007 pp. 317-356).

- **Çekirdeği Oluşturan Bloğun Özellikleri**: (çekirdeğin molekül ağırlığı, çekirdeğin yapısı ve çekirdeğin fiziksel durumu),

Genelde hidrofilik blok sabit tutulmak şartıyla çekirdeği oluşturan bloğun molekül ağırlığını artırma çekirdeğin boyutunu artırmaktadır. Hidrofobik bloğun molekül ağırlığındaki ve çekirdeğin boyutundaki bu artış miselde hapsedilen ilacın salım hızının azaltmaktadır (Amiji 2007 pp. 317-356).

Çekirdeğin yapısı, özellikle çekirdeğin hidrofobisitesi/polaritesi sulu ortama karşı çekirdeğin permeabilitesini belirlediği için ilacın salım hızını etkiler. Daha hidrofobik çekirdekli miseller daha hidrofilik veya polar özelliğe sahip olanlara kıyasla çekirdekte daha az su bulundururlar. Bununla birlikte daha az hidrofobik çekirdekten

hazırlanan miseller hızlandırılmış ilaç salım hızına sahip olurlar (Amiji 2007 pp. 317-356).

Tg'si yüksek olan veya yapılarında büyük gruplar bulunduran polimerler yön değiştirme yetenekleri açısından sınırlandırılırlar. Bu nedenle polimerlerin sınırlı hareketinden dolayı yüklenen ilacın difüzyon katsayısı düşük olur (Amiji 2007 pp. 317-356).

- **İlaç Polimer Geçimliliğinin Derecesi**

İlaç ve polimer etkileşimindeki artış ilacın difüzyon katsayısında azalmaya dolayısı ile daha yavaş salıma neden olur (Amiji 2007 pp. 317-356).

Bu faktörlerin dışında misel yapısı, dış ortamın pH'sı, sıcaklığı ve misel içindeki ilacın lokalizasyonu da salım hızını etkileyebilmektedir (Torchillin, 2001; Amiji 2007 pp. 385-408).

### 2.3.7. Polimerik Misellerin Nazal Mukozadan Geçişine Ait bilgiler

Literatür kaynaklarında polimerik misellerin nazal yol ile uygulanması ile ilgili çalışma olmasına rağmen (Kichler ve ark. 2002) bahsedilen çalışmada hem misellerin PICM olmaları, DNA yüklü olmaları hem de nazal mukozadan geçişleri ile ilgili net bilgiler bulunmadığından dolayı bu bölümde sadece varsayımlar anlatılacaktır.

Vila ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (Vila ve ark. 2005) PLA-PEG partiküllerinin partikül boyutu (10 µm den 200 nm ye kadar) azaldıkça nazal mukozadan geçişin arttığı rapor edilmiştir. Fakat bununla birlikte mukozal yüzeylerden geçişi sadece partiküllerin boyutu değil aynı zamanda partiküllerin yüzey bileşimleri de etkileyebilir.

Partiküllerin yüzey yükünün negatif olması nazal absorpsiyonu olumsuz etkilemektedir (Yang ve ark. 2006). Tobio ve ark. (41)'nın yaptığı çalışmada işaretli proteinin tavşan nazal mukozasından geçişinin PLA-PEG nanopartiküllerinin yüzey özellikleri tarafından oldukça çok etkilendiği saptanmıştır. PLA-PEG nanopartiküllerinde negatif yüzey yükünün azalmasıyla tetanus toksoitinin çok daha fazla penetre olduğu görülmüştür. Zhang ve ark. (2008) yaptığı çalışmada ise pozitif yüklü PEG-g-kitozan kullanılarak insülinin nazal absorpsiyou artırılmıştır. Yaptıkları çalışmada polimerin yapısının nanopartiküllerin mukoadezif etkileyebileceğini öngörmüşlerdir.

# 3. GEREÇ VE YÖNTEM

## GEREÇ

### Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Polietilen Glikol Metil Eter (MA: 2,000 Da) (Aldrich)
- Polietilen Glikol Metil Eter (MA: 5,000 Da) (Fluka)
- L-Laktat (Aldrich)
- □-Kaprolakton (Aldrich)
- $SnOct_2$ (Tin(II) 2-ethylhexanoate) (Sigma)
- Dietil eter (Fluka)
- Kloroform (Sigma-Aldrich)
- Dioksan (Aldrich)
- Polietilenimin (Aldrich)
- 1,1'-Carbonildiimidazol (Aldrich)
- Diklorometan (Sigma-Aldrich)
- Kalsiyum klorür (Sigma-Aldrich)
- Borik asit (Sigma-Aldrich)
- Sodyum hidroksit (Sigma-Aldrich)
- Hidroklorik asit (Sigma-Aldrich)
- Karvedilol (Ali Raif İlaç Sanayi A.Ş.)
- Sodyum klorür (Fisher)
- D-glikoz (Sigma-Aldrich)
- Potasyum dihidrojen fosfat (Sigma-Aldrich)
- Metanol (Merck)
- Asetonitril (Sigma-Aldrich)
- Fosforik asit (Sigma-Aldrich)
- Aseton (Sigma-Aldrich)
- Potasyum klorür (Sigma-Aldrich)

**Kullanılan Araç ve Gereçler**

- Mikrodalga sentez ünitesi (Milestone)
- SPM9600 (Shimadzu)
- pH Metre (WTW, 315i), pH Metre (Inolab, pH Level 1)
- UV-VIS Spektrofotometre (Shimadzu, UV 1601)
- Terazi (Ohaus EP214C), Terazi (Denver Instrument, TB-Series)
- Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (IKA RT 15 Power)
- Orbital Karıştırıcı (Thermo Electron Corporation, Model 420)
- Etüv (MMM, Ecocell 111)
- Eppendorf Micropipet (0,5-10 µl, 20-200 µl,10-100µl, 100-1000 µl,)
- Soğutmalı Santrifüj (SIGMA, 2-16PK)
- Santrifüj (Heittich Microliter), Santrifüj (Nüve, NF-415)
- Franz Difüzyon Hücresi (Permegear)
- FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi) Sistemi (Perkim Elmer, 1600 FT-IR, 1615)
- Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) (Mettler Toledo, DSC 821)
- Vorteks (Kermanlar)
- Thermocouple (HEIDOLPH,EKT Hei-Con)
- Ultra Saf Su Cihazı (Purelab Ultra, ELGA)
- Ultrasonik Su Banyosu (Bersonic Ultrasonic Cleaner)
- HPLC (Shimadzu, SCL-10A VP)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern)
- Rotari Evaporatör ve Vakum Kontrol Sistemi (Buchi, V-850)
- Diyaliz Tübü (Spectrapor, Float-A-Lyzer G2 5ml, 3,5-5 kDa)
- Şırınga Ucu Rejenere Selüloz Filtre (Minisart RC 25 0,45µ), Şırınga Ucu Rejenere Selüloz Filtre (Minisart RC 25 0,2µ)
- Şırınga Ucu Filtre (Millipore LCR, 13 mm, 0,45µ)
- Membran Filtre (Milipore, Mixed Cellulose Ester, 0,22µ)

**Kullanılan Bilgisayar Programları**

Microsoft Office 2007

GraphPad Prism 5.04

# YÖNTEM

## 3.1. Karvedilol Üzerinde Yapılan Çalışmalar

### 3.1.1. Infrared Spektrumu

Karvedilolün potasyum bromür ile diskleri hazırlanarak Perkin Elmer 1600 FT-IR Model No. 1615 cihazı ile IR spektrumu alındı.

### 3.1.2. Karvedilolün Termal Analizi

Karvedilolün termal analizi için diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) kullanıldı. Karvedilol (~5 mg) 10 ºC / dakika ısıtma hızı ile azot gazı altında 94ºC'den 135ºC'ye kadar kademeli olarak ısıtılarak DSC ile termogramı alındı.

### 3.1.3. Karvedilolün Spektrofotometrik Yöntem ile Miktar Tayini

#### 3.1.3.1. Karvedilolün Spektrofotometrik Yöntem ile Miktar Tayini Validasyonu

Hazırlanan miseller formülasyonlarda karvedilol miktar tayini ve etkin madde enkapsülasyon etkinliği çalışmalarında etkin madde analizi için metanolde 4 µg/ml konsantrasyonda karvedilol çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin maksimum absorbans değeri 200-350 nm dalga boylarında UV spektrofotometresi kullanılarak belirlendi (Chaurasia ve ark. 2005).

Sonuçların değerlendirilmesinde ise etkin maddenin verdiği absorbanslar kullanıldı. Yöntemin güvenilirliğini belirlemek için de analitik yöntem validasyonu çalışması yapıldı.

Analitik yöntem validasyonu, bir test yönteminin kesin ve doğru olarak her zaman bekleneni gerçekleştirmesinin kanıtlanmasıdır (ICH Harmonised Tripartite Guideline 1995). Kullanılan analitik yöntemlerin validasyonu için, doğrusallık (linearity), doğruluk (accuracy), kesinlik (precision), seçicilik (specificity), teşhis limiti (detection limit), miktar tayini limiti (quantitation limit) ve stabilite (stability) parametreleri literatüre göre çalışıldı (ICH Harmonised Tripartite Guideline 1995).

**a) Doğrusallık:** Bir analitik yöntemin doğrusallığı, elde edilen bulguların örnek çözeltisi içindeki madde konsantrasyonu ile belli bir aralıkta olmasıdır (ICH Harmonised Tripartite Guideline 1995). Karvedilolün metanolde 10,0 mg/ml konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 0,1 ml alınarak metanol ile 10

ml'ye tamamlandı. Hazırlanan bu stok çözeltiden 0,1 ml, 0,2 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, 0,6 ml ve 0,7 ml alındı ve % 95'lik (h/h) metanol çözeltisi ile 10 ml'ye seyreltildi. Bu çözeltilerin absorbansları 243 nm dalga boyunda spektrofotometrede tayin edildi. Çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon doğrusu hazırlandı. Ayrıca doğru denklemi belirlendi ve determinasyon katsayısı ($r^2$), standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (%RSD) değerleri hesaplandı. Hesaplamalarda aynı şekilde çalışılan 6 deneyin absorbanslarının ortalaması kullanıldı.

**b) Doğruluk:** Karvedilol için spektrofometre ile analitik yöntemin doğruluğunu belirlemek için karvedilolün metanolde 10,0 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 0,1 ml alınarak metanol ile 10 ml ye tamamlandı. Hazırlanan bu çözeltiden 0,2 ml, 0,4 ml ve 0,6 ml alındı ve % 95 lik (h/h) metanol çözeltisi ile 10 ml'ye seyreltildi. Bu çözeltilerin absorbansları 243 nm dalga boyunda spektrofotometrede tayin edildi. Doğrusallık çalışmasında elde edilen doğru denklemi vasıtasıyla absorbans değerlerinden çözeltilerdeki karvedilol konsantrasyonu hesaplandı. Yöntemin doğruluğu ise % geri kazanma değerlerinin hesaplanması ile belirlendi.

**c) Kesinlik:** Bir analitik yöntemin kesinliği, belirli çalışma koşullarında hazırlanan aynı örnek çözeltisinden birden fazla seyreltme ile elde edilen bir serinin ölçümleri arasındaki uyumun yakınlığını belirtir (ICH Harmonised Tripartite Guideline 1995). SD veya % RSD değerleri ile ifade edilir. Yöntemin kesinliği için RSD değeri % 2'den küçük olmalıdır.

**Gün içi kesinlik:** Doğruluk çalışmasında anlatıldığı şekilde üç farklı konsantrasyonda (2, 4 ve 6 µg/ml) örnek hazırlandı. Her konsantrasyondaki örnek 6'şar defa çalışıldı. Doğru denklemi yardımıyla karvedilol miktarı hesaplandı ve sonuçların ortalamaları, SD ve % RSD değerleri hesaplandı. RSD değerinin % 2'den küçük olup olmadığı tespit edildi.

**Günler arası kesinlik:** Birinci gün içinde yapılan gün içi kesinlik çalışmaları aynı şekilde 2. ve 3. günlerde de tekrar yapıldı. Birinci, ikinci ve üçüncü gün sonuçlarının ortalamaları, SD ve % RSD değerleri hesaplandı. RSD değerinin % 2'den küçük olup olmadığı tespit edildi.

**d) Seçicilik:** Misel formülasyonunda kullanılan polimerler için miktar tayini yönteminin seçiciliğini belirlemek amacıyla polimer çözeltileri, karvedilol-polimer çözeltileri ve doğruluk çalışmasında anlatıldığı şekilde 4 µg/ml konsantrasyonda karvedilol çözeltisi hazırlandı. 243 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı ve polimerlerin bu dalga boyunda absorbans gösterip göstermediği tespit edildi.

**e) Teşhis Limiti ve Miktar Tayini Limiti:** Teşhis limiti (TL) tayini için, kalibrasyon doğrusunun eğimi veya keşişim noktasının (en az 3 doğruya ait) standart sapmaları ($\partial$) kullanılır (ICH Harmonised Tripartite Guideline 1995). Bu amaçla, 3 adet kalibrasyon doğrusunun eğimlerine ait $\partial$ değerleri aşağıdaki formüllere yerleştirildi (3-1, 3-2), teşhis limiti (TL) ve miktar tayini limiti (MTL) hesaplandı. Hem spektrofotometre hem de HPLC ile yapılan çalışmada da aynı yöntem uygulandı.

$$TL = \frac{3.3\partial}{S} \quad (3\text{-}1) \qquad\qquad MTL = \frac{10\partial}{S} \quad (3\text{-}2)$$

S = Ortalama kalibrasyon doğrusu eğimi

$\partial$ = Kalibrasyon doğrusunun eğimine ait SD değerleri

**f) Stabilite:** Etkin maddenin analiz esnasındaki bekletme sürecinde stabilitesini ispatlamak amacıyla stabilite çalışması yapıldı. Doğruluk çalışmasında anlatıldığı şekilde 4 µg/ml konsantrasyonda karvedilol çözeltisi hazırlandı. 1., 2., 3., 4., 5., 6., 24. ve 48. saatlerde absorbansı ölçüldü. Absorbans oranları kullanılarak karvedilol konsantrasyonunda herhangi değişiklik olup olmadığı tespit edildi.

### 3.1.4. Karvedilolün HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini

#### 3.1.4.1. Karvedilolün HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini Validasyonu

Polimerik misellerin nazal mukozadan geçişi ve *in vitro* salım özelliklerinin tayini çalışmasında polimerik misellerde yüklü etkin maddenin nazal mukozadan geçen miktarını ve *in vitro* salım miktarını belirlemek için literatürde kayıtlı (British Pharmacopeia 2006) HPLC yöntemi kullanıldı.

Literatürde kayıtlı (British Pharmacopeia 2006) olduğu gibi UV dedektör kullanıldı ve dalga boyu 240 nm olarak seçildi. Akış hızı 1,0 ml/dk, enjeksiyon hacmi

ise 20 µl olarak ayarlandı.. Sabit faz olarak da C8, 150 mm x 4,6 mm, 5µm kolon kullanıldı.

Mobil faz hazırlamak içinse 1,77 g potasyum dihidrojen fosfat 1000 ml saf suda çözüldü. Bu çözeltinin pH'sı fosforik asit ile pH=2,0'a ayarlandı. Potasyum dihidrojen fosfat çözeltisi: asetonitril (65:35 (h/h)) oranında karıştırıldı ve 0,22 µm'lik filtreden süzüldü. Ardından 30 dakika ultrasonik banyoda tutuldu.

HPLC kromatogramlarının değerlendirilmesinde ise etkin maddenin pik alanları kullanıldı. Yöntemin güvenilirliğini belirlemek için de analitik yöntem validasyonu çalışması yapıldı.

Analitik yöntem validasyonu için 3.1.3.1'de bahsedilen validasyon parametreleri çalışıldı.

**a) Doğrusallık:** Karvedilolün HPLC ile miktar tayini yönteminin doğrusallığı çalışması için 25,0 mg karvedilol hassas tartıldı, 15 ml mobil faz ilave edilerek 2 dk ultrasonik banyoda bırakıldıktan sonra aynı çözücü ile 25 ml'ye tamamlandı. Bu stok çözeltiden 1 ml alınıp mobil faz ile 10 ml'ye seyreltilerek ara stok çözeltisi hazırlandı. Bu ara stok çözeltisinden 5, 10, 20, 50, 100, 175 ve 250 µl alındı ve mobil faz ile 10 ml'ye seyreltildi.

0,05, 0,10, 0,20, 0,50, 1, 1,75 ve 2,5 µg/ml konsantrasyonlarına karşı pik alanlarından elde edilen değerler kullanılarak kalibrasyon doğrusu hazırlandı. Ayrıca doğru denklemi belirlendi ve determinasyon katsayısı ($r^2$), standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (%RSD) hesaplandı.

**b) Doğruluk:** Karvedilol için HPLC ile analitik yöntemin doğruluğunu belirlemek için 25,0 mg karvedilol hassas tartıldı, 15 ml mobil faz ilave edilerek 2 dk ultrasonik banyoda bırakıldıktan sonra aynı çözücü ile 25 ml ye tamamlandı. Bu stok çözeltiden 1 ml alınıp mobil faz ile 10 ml'ye seyreltilerek ara stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiden 50, 100 ve 250 µl alındı ve mobil faz ile 10 ml'ye seyreltildi. Pik alanlarından doğrusallık çalışmasından elde edilen doğru denklemi vasıtasıyla çözeltilerdeki karvedilol konsantrasyonu hesaplandı. Yöntemin doğruluğu ise % geri kazanma değerleri hesaplanması ile belirlendi.

**c) Kesinlik:**

**Gün içi kesinlik:** Doğruluk çalışmasında anlatıldığı şekilde üç farklı konsantrasyonda (0,5, 1 ve 2,5 µg/ml) örnek hazırlandı. Her konsantrasyondaki örneğe 3'er ölçüm uygulandı. Doğru denklemi yardımıyla karvedilol miktarı hesaplandı ve sonuçların ortalamaları, SD ve % RSD değerleri hesaplandı. RSD değerinin % 2'den küçük olup olmadığı tespit edildi.

**Günler arası kesinlik:** Birinci gün içinde yapılan gün içi kesinlik çalışmaları aynı şekilde 2. ve 3. günlerde de tekrar yapıldı. Birinci, ikinci ve üçüncü gün sonuçlarının ortalamaları, SD ve % RSD değerleri hesaplandı. RSD değerinin % 2'den küçük olup olmadığı tespit edildi.

**d) Seçicilik:** Misel formülasyonunda kullanılan polimerler için miktar tayini yönteminin seçiciliğini belirlemek amacıyla hem etkin madde içermeyen hem de etkin madde içeren misel formülasyonları ve doğruluk çalışmasında anlatıldığı şekilde 1 µg/ml konsantrasyonda karvedilol çözeltisi hazırlandı. HPLC kolonuna enjekte edildiler ve etkin maddenin pik verdiği retensiyon zamanında polinerlerin pik verip vermediği tespit edildi.

**e) Teşhis Limiti ve Miktar Tayini Limiti:** 3.1.3.1'de anlatıldığı gibi teşhis limiti (TL) ve miktar tayini limiti (MTL) tespit edilmiştir.

**f) Stabilite:** Doğruluk çalışmasında anlatıldığı şekilde 1 µg /ml konsantrasyonda karvedilol çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu çözelti 1., 2., 4., 6., 8., 12., 24. ve 48. saatlerde HPLC kolonuna enjekte edildi. Pik alanlarının oranları kullanılarak karvedilol konsantrasyonunda herhangi değişiklik olup olmadığı ve farklı bir pik oluşup oluşmadığı tespit edildi.

### 3.1.5. Karvedilolün 37°C de Stabilitesinin Tayini

*In vitro* salım çalışmaları 120 saat boyunca 37ºC ultra saf suda devam etmiştir. Bu nedenle bu süre içerinde 37ºC karvedilolde herhangi bir bozunma olup olmadığını tespit etmek amacı ile stabilite çalışması yapıldı. Ultra saf suda yapılan çözünürlük çalışmasında elde edilen doymuş karvedilol çözeltileri 120 saat boyunca 37ºC'lik etüvde bırakıldı. 1., 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlarde 0,25'şer ml örnek alındı ve 1 ml'ye mobil faz ile seyreltildi. Ardından HPLC kolonuna enjekte edildi. Doğru denklemi yardımıyla çözünen karvedilol miktarı hesaplandı. Deney 3 defa yapıldı, ortalama, standart sapma ve % RSD değerleri hesaplandı.

### 3.1.6. Karvedilolün Çözünürlük Tayini

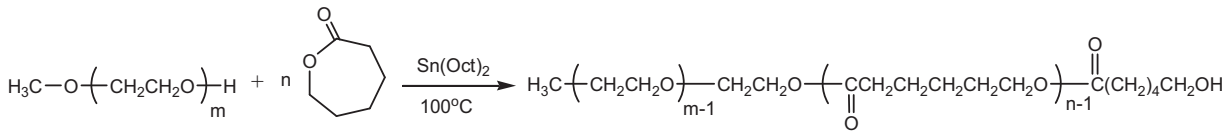
Karvedilol yüklü misel formülasyonlarında yapılan *in vitro* salım çalışmalarında salım ortamı olarak ultra saf su, *ex vivo* geçiş çalışmalarında ise reseptör faz olarak Ringer çözeltisi kullanılmaktadır. Bu nedenle etkin maddenin çözünürlük çalışması bu ortamlarda yapılmıştır. Ayrıca etkin maddenin ultra saf suda çözünürlüğünü tespit etmek için aşağıda anlatıldığı şekilde oda sıcaklığında da çalışılmıştır.

30,0 mg karvedilol hassas tartıldı. 100 ml'lik kapaklı bir erlene konuldu ve 10 ml ultra saf su veya Ringer çözeltisi eklendi. Ardından 37ºC'de 300 devir/dakikada 24 saat boyunca çalkalandı. 24 saatin sonunda örnek çalkalayıcıdan alındı ve mavi bantlı süzgeç kağıdından (S&S) süzüldü. Süzüntüden ise 1 ml alındı ve 10 ml'ye mobil faz ile seyreltildi. Ardından HPLC kolonuna enjekte edildi. Doğru denklemi yardımıyla çözünen karvedilol miktarı hesaplandı. Deney 3 defa yapıldı, ortalama ve standart sapma değerleri hesaplandı.

## 3.2. Polimerlerin Sentez Çalışmaları

### 3.2.1. PCL-b-mPEG ve PLL-b-mPEG Diblok Kopolimerlerin Sentezi

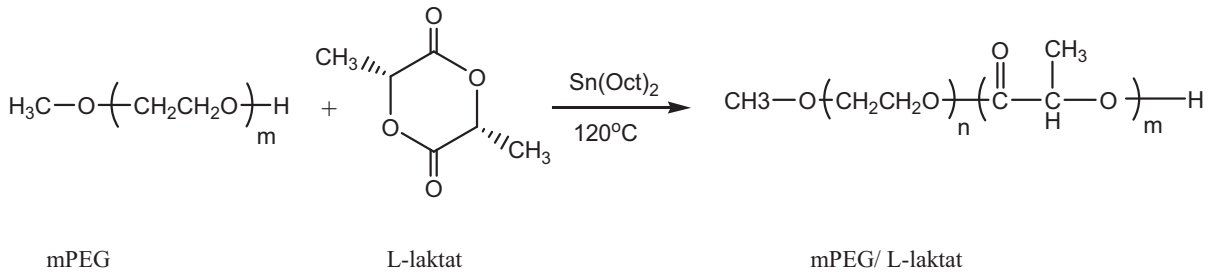
PCL-b-mPEG kopolimeri, kaprolakton monomeri, bir ucu metoksi grubu taşıyan PEG (mPEG) ve $SnOct_2$ (Stannous (II) 2-hexyl-hexanoate) katalizörü eşliğinde (%1.5 mol), 100$^{o}$C'de 30 dakika mikrodalga sentez ünitesi kullanılarak sentezlendi (Şekil 3-1). Diblok kopolimerlerin sentezinde, 4:1 oranında kaprolakton ve mPEG (MA:2000 veya 5000) kullanıldı. Reaksiyonda Milestone marka mikrodalga sentez cihazı ve cihaza ait kapalı reaktörler kullanıldı ve reaksiyon azot ortamında gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucunda elde edilen ürün kloroformda çözüldü ve dietileter ile çöktürülerek reaksiyona girmeyen maddeler ortamdan uzaklaştırıldı, yalnızca kopolimer elde edildi. Saflaştırma işlemi için 3 defa dietileter ile yıkandı.




**Şekil 3-1: PCL-b-PEG sentezi (Karagöz 2009)**

PLL-b-mPEG diblok kopolimerler de aynı yöntem ile 120$^{o}$C sıcaklıkta aynı katalizör ($SnOct_2$-%1.5mol), farklı molekül ağırlıklarında (2000 veya 5000) mPEG

kullanılarak sentezlendi (Şekil 3-2). Reaksiyon sonlandırıldığında, elde edilen ürün diklorometanda çözüldü, dietileter ile çöktürüldü ve saflaştırma işlemi için 3 defa dietileter ile yıkandı (Karagöz 2009).

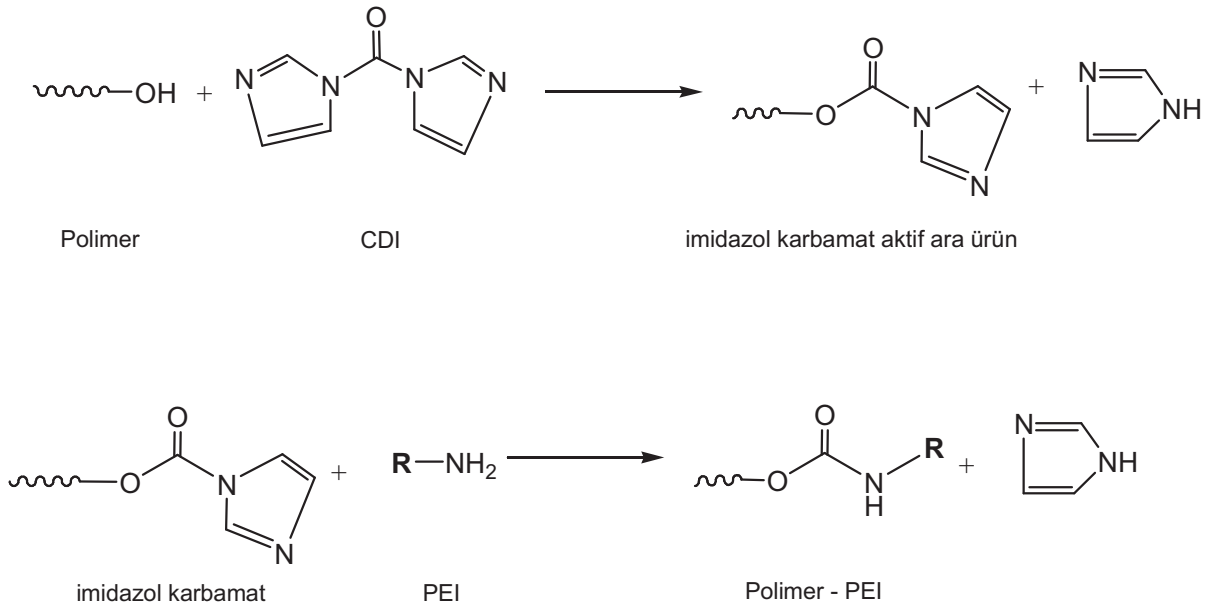



mPEG L-laktat mPEG/ L-laktat

**Şekil 3-2: PLL-b-mPEG sentezi (Karagöz 2009)**

### 3.2.2. Diblok Kopolimerlere Polietilenimin (PEI) Bağlanması

PEI bağlama reaksiyonu diblok kopolimerdeki laktat/kaprolakton ucundaki hidroksil grubu üzerinden karbonildiimidazol (CDI) aktivasyonu ile gerçekleştirildi. Sentezlenen diblok polimerlere PEI bağlamak amacıyla, her bir polimer örneği yaklaşık $8x10^{-3}$ M olacak şekilde dioksanda çözüldü, ardından CDI ortamda 0,08 M olacak şekilde eklendi ve karışım 37$^{o}$C'de su banyosunda 3 saat boyunca karıştırılarak reaksiyon gerçekleştirildi. Daha sonra reaksiyon karışımı dietil eter yardımıyla çöktürüldü, 3 defa dietil eter ile yıkandı ve elde edilen ürün kurutulmak üzere vakumda 1 gece bekletildi. Buraya kadar sentezlenen ürün CDI-aktive polimerdir. Ertesi gün, CDI-aktive polimer pH:8,5 sodyum borat tamponunda çözüldü, 1:1 oranda PEI ortama eklendi ve 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon Şekil 3-3'te görülmektedir. Son olarak karışım diyaliz edilerek yan ürünler, reaksiyona girmeyen maddeler uzaklaştırıldı ve PEI bağlı polimer liyofilize edilerek vakumda saklandı (Karagöz 2009).




**Şekil 3-3: CDI aktivasyonu ile PEI bağlanma reaksiyonu (Karagöz 2009)**

### 3.3. Polimerler Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Polimerlerin yapı ve fonksiyonel grup analizleri, molekül ağırlığı ve dağılım analizleri, PEI bağlı polimerlerde amin grubu miktarının tespiti ve sitotoksisite çalışmaları yardımcı danışmanımın bağlı bulunduğu Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı'ndaki, yüksek lisans tez çalışması kapsamında daha önce yapılmış, ancak çalışma ortak bir çalışma olduğundan veriler bu tezde de kullanılmıştır.

#### 3.3.1. Polimerlerin Yapı ve Fonksiyonel Grup Analizleri

Diblok polimerler üzerinde IR-spektroskopisi (FTIR) ve Nükleer Manyetik Rezonans ( $^{1}$H-NMR) kullanılarak yapı ve fonksiyonel grup analizleri yapılmıştır (Karagöz 2009).

#### 3.3.2. Molekül Ağırlığı ve Dağılımı Analizi

Diblok kopolimerlerin molekül ağırlığı ve dağılımı analizi jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ile çalışılarak (Shimpack kolon, kloroform: mobil faz, PCL veya PLL standartlar kullanılarak) yapılmıştır (Karagöz 2009).

### 3.3.3. PEI Bağlı Polimerlerde Amin Grubu MiktarınınTespiti

PEI molekülü, dallanmış bir molekül olup, yapısında bilinmeyen miktarda primer, sekonder ve tersiyer amin grupları bulunmaktadır. Analizi kimyasal olarak karmaşık olduğundan, polimer yapısına PEI'nin katılımı ve PEI bağlı polimerlerde bulunan amin grup miktarını tespit kantitatif yöntem olan TNBS (2,4,6-trinitrobenzensülfonik asit) yöntemi ile incelenmiştir (Karagöz 2009). Yöntemin esası amin gruplarının TNBS ile reaksiyonuna dayanmaktadır.

### 3.3.4. Sitotoksisite Çalışmaları

Literatürde kayıtlı verilerde (Kakizawa ve Kataoka 2002) PEI nin katyonik yapısından dolayı sitotoksik olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle PEI bağlı polimerlerde sitotoksisite çalışması yapılmasına karar verildi. Katyonik polimerler için sitotoksisite çalışmaları 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi ile yapıldı. MTT deneyleri için hücrelerin her kuyucukta $5x10^3$ hücre yoğunluğu olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklarda kültürü yapıldı ve hücreler 1 gece, $37^oC$'de, % 5 $CO_2$ içeren ortamda yetiştirildiler. Ardından hücre kültür ortamı uzaklaştırıldı ve yerine yenisi konuldu. Farklı miktarlardaki polimerler her bir kuyucuğu eklendi ve hücreler 72 saat inkübe edildi. Her bir kuyucuğa MTT belirteci (5 mg/ml) eklendi ve inkübasyona 4 saat daha devam edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 0, 01 N HCI içinde hazırlanan % 10'luk sodyum dodesil sülfat çözeltisinden 100 µl eklendi ve 1 gece boyunca inkübe edildiler. Hücrelerin canlı kalması halinde koyu mavi renkte formazan kristali oluşturması beklenmekteydi. Ardından plaklar 570 nm'de Mikroplat Reader ile okundu ve gerekli hesaplamalar yapıldı.

## 3.4. Polimerik Misel Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalar

### 3.4.1. Polimerik Misel Formülasyonlarının Hazırlanmasında Ön Formülasyon Çalışmaları

PEI bağlı polimerler suda iyi çözündüğü için doğrudan çözme yönteminin kullanılmasına karar verildi. Bu yöntemde etkin maddeyi çözecek ve etkin maddenin misele yüklenmesine yardımcı olacak uygun organik çözücüyü belirlemek için aseton ve asetonitrilin farklı miktarları (1 ml, 5 ml ve 10 ml) ile deneme yapıldı. Organik çözücü çeşidinin ve miktarının misel boyutuna etkisi olacağından dolayı (Shin ve ark.1998) oluşan misellerin boyutları ölçüldü.

Organik çözücünün uzaklaştırılması için gerekli süre optimize edildi.

Misel formülasyonu hazırlandıktan sonra etkin madde partiküllerini uzaklaştırmak için ayrı ayrı 2000 devir/dk'da 5 dk, 5000 devir/dk'da 5 dk, 5000 devir/dk'da 15 dk, 5000 devir/dk'da 30 dk ve 15000 devir/dk'da 30 dk santrifüj uygulandı. Ayrıca 0,2 μm ve 0,45 μm lik rejenere selüloz filtre kullanılarak filtrasyon uygulandı.

### 3.4.2. Etkin Madde İçermeyen Polimerik Misel Formülasyonlarının Hazırlanması

7,5 mg polimer hassas tartıldı ve 10 ml ultra saf suya eklendi. 20 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözüldü. Ardından 10 ml asetonitrile polimer çözeltisi damla damla eklendi ve asetonitrilin manyetik karıştırıcıda 400 devir/dk'da 18 saat uçması beklendi. Ardından 200 mbar basınç altında, 300 devir/dk'da, 57ºC'de 30 dk rotari evaporatorda asetonitril kalıntıları misel formülasyonundan uzaklaştırıldı. Eksilen miktar, ultra saf su ile 10 ml'ye tamamlandı ve 400 devir/dk'da 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 0,45 μm'lik rejenere selüloz filtreden süzüldü. Hazırlanan formülasyonlar Tablo 3-1'de verilen şekilde kodlandı.

**Tablo 3-1: Karvedilol yüklü olmayan polimerik misel formülasyonları ve polimer miktarları**

| Formülasyon | Kullanılan Polimer | Polimer Konsantrasyonu (mg/ml) |
|---|---|---|
| **F1** | mPEG2000-b-PCL | 0,75 |
| **F2** | mPEG5000-b-PCL | 0,75 |
| **F3** | mPEG2000-b-PLL | 0,75 |
| **F4** | mPEG5000-b-PLL | 0,75 |
| **F5** | mPEG2000-b-PCL-PEI | 0,75 |
| **F6** | mPEG5000-b-PCL-PEI | 0,75 |
| **F7** | mPEG2000-b-PLL-PEI | 0,75 |
| **F8** | mPEG5000-b-PLL-PEI | 0,75 |

### 3.4.3. Etkin Madde İçeren Polimerik Misel Formülasyonlarının Hazırlanması

7,5 mg polimer hassas tartıldı ve 10 ml ultra saf suya eklendi. 20 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözüldü. Ardından 7,5 mg karvedilol hassas tartıldı. 5 ml asetonitril eklenerek 2 dk ultrasonik su banyosunda çözüldü ve 10 ml'ye asetonitril ile tamamlanarak stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden çeşitli hacimlerde (0,5, 1, 2 veya 5 ml) alınarak 10 ml'ye asetonitril ile seyreltildi ve 15-20 dk manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra karvedilol çözeltisine polimer çözeltisi damla damla eklendi ve asetonitrilin manyetik karıştırıcıda 400 devir/dk'da 18 saat uçması beklendi. Ardından 200 mbar basınç altında, 300 devir/dk'da, 57ºC'de 30 dakika rotari evaporatorda asetonitril kalıntıları misel formülasyonundan uzaklaştırıldı. Eksilen miktar, ultra saf su ile 10 ml'ye tamamlandı ve 400 devir/dk'da 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Misellere yüklenmeyen karvedilol partiküllerini uzaklaştırmak için 0,45 μm'lik rejenere selüloz filtre ile filtrasyon uygulandı. Formülasyonlar Tablo 3-2'de verilen şekilde kodlandı.

**Tablo 3-2: Karvedilol yüklü polimerik misel formülasyonları ve polimer-etkin madde oranları (a/a)**

| Formülasyon | Kullanılan Polimer | Polimer:Etkin Madde Oranı |
|---|---|---|
| **F1C1** | mPEG2000-b-PCL | 1:0,05 |
| **F1C2** | mPEG2000-b-PCL | 1:0,1 |
| **F1C3** | mPEG2000-b-PCL | 1:0,2 |
| **F1C4** | mPEG2000-b-PCL | 1:0,5 |
| **F1C5** | mPEG2000-b-PCL | 1:1 |
| **F2C1** | mPEG5000-b-PCL | 1:0,05 |
| **F2C2** | mPEG5000-b-PCL | 1:0,1 |
| **F2C3** | mPEG5000-b-PCL | 1:0,2 |
| **F2C4** | mPEG5000-b-PCL | 1:0,5 |
| **F2C5** | mPEG5000-b-PCL | 1:1 |
| **F3C1** | mPEG2000-b-PLL | 1:0,05 |
| **F3C2** | mPEG2000-b-PLL | 1:0,1 |
| **F3C3** | mPEG2000-b-PLL | 1:0,2 |

| | | |
|---|---|---|
| **F3C4** | mPEG2000-b-PLL | 1:0,5 |
| **F3C5** | mPEG2000-b-PLL | 1:1 |
| **F4C1** | mPEG5000-b-PLL | 1:0,05 |
| **F4C2** | mPEG5000-b-PLL | 1:0,1 |
| **F4C3** | mPEG5000-b-PLL | 1:0,2 |
| **F4C4** | mPEG5000-b-PLL | 1:0,5 |
| **F4C5** | mPEG5000-b-PLL | 1:1 |
| **F5C1** | mPEG2000-b-PCL-PEI | 1:0,05 |
| **F5C2** | mPEG2000-b-PCL-PEI | 1:0,1 |
| **F5C3** | mPEG2000-b-PCL-PEI | 1:0,2 |
| **F5C4** | mPEG2000-b-PCL-PEI | 1:0,5 |
| **F5C5** | mPEG2000-b-PCL-PEI | 1:1 |
| **F6C1** | mPEG5000-b-PCL-PEI | 1:0,05 |
| **F6C2** | mPEG5000-b-PCL-PEI | 1:0,1 |
| **F6C3** | mPEG5000-b-PCL-PEI | 1:0,2 |
| **F6C4** | mPEG5000-b-PCL-PEI | 1:0,5 |
| **F6C5** | mPEG5000-b-PCL-PEI | 1:1 |
| **F7C1** | mPEG2000-b-PLL-PEI | 1:0,05 |
| **F7C2** | mPEG2000-b-PLL-PEI | 1:0,1 |
| **F7C3** | mPEG2000-b-PLL-PEI | 1:0,2 |
| **F7C4** | mPEG2000-b-PLL-PEI | 1:0,5 |
| **F7C5** | mPEG2000-b-PLL-PEI | 1:1 |
| **F8C1** | mPEG5000-b-PLL-PEI | 1:0,05 |
| **F8C2** | mPEG5000-b-PLL-PEI | 1:0,1 |
| **F8C3** | mPEG5000-b-PLL-PEI | 1:0,2 |
| **F8C4** | mPEG5000-b-PLL-PEI | 1:0,5 |
| **F8C5** | mPEG5000-b-PLL-PEI | 1:1 |

### 3.4.4. Polimerik Misellerin Karakterizasyonu

#### 3.4.4.1. Kritik Misel Konsantrasyonu Tayini

Polimerik misellerin oluşup oluşmadığını belirlemek için, hazırlanan formülasyonlar Zetasizer Nano ZS nin küvetine konuldu ve bütün ölçümler ± 0,1°C

hassaslığında 25ºC'de yapıldı. Her bir örnekten 6 ölçüm yapıldı ve bu cihazdan elde edilen veriler kullanılarak kritik misel konsantrasyonu hesaplandı.

### 3.4.4.2. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Tayini

Polimerik misellerin boyutunu belirlemek için, hazırlanan formülasyonlar dinamik ışık saçılımı (DLS) esasına göre çalışan Zetasizer Nano ZS nin küvetine konuldu ve bütün ölçümler ± 0,1°C hassaslığında 25ºC'de yapıldı. Ölçüm süreleri ve sayıları otomatik olarak ayarlandı. Polimerik misellerin partikül büyüklüğü ve dağılımı hem etkin madde içermeyen miseller hem de etkin madde içeren misellerde çalışıldı. Elde edilen boyut ölçümlerinde 3 ölçümün ortalaması hesaplandı.

### 3.4.4.3. Polimerik Misellerin Yük Tayini

Hem etkin madde içermeyen hem de yükleme kapasitesi (az ve çok olanlar) ve boyutuna göre seçilen etkin madde içeren misel formülasyonlarının zeta potansiyellerinin tayini için elektroforetik ışık saçılımı yöntemi kullanıldı. Zeta potansiyelinin elektroforetik tayini çoğu defa sulu ve elektrolit konsantrasyonunun az olduğu ortamda yapılmaktadır. Böyle bir ortamda ölçülen zeta potansiyelleri Smoluchowski eşitliğinden (Malvern kataloğu) yararlanarak cihaz tarafından hesaplanmaktadır. Ölçüm süreleri ve voltaj seçimi otomatik olarak ayarlandı. Polimerik miseller Zetasizer Nano ZS cihazı ile ± 0,1°C hassaslığında 25ºC de yapıldı. Çalışmada kıvrımlı kapiler küvet kullanıldı, 3 er ölçüm alındı ve zeta potansiyelleri Smoluchowski eşitliğinden yararlanarak cihaza hesaplattırıldı.

### 3.4.4.4. Taramalı Prob Mikroskobu (SPM) ile Polimerik Misellerin Morfolojilerinin Tayini

Etkin madde yüklü polimerik misellerin SPM de görüntülenmesi için SPM9600 (Shimadzu) cihazı kullanıldı. SPM'de polimerik misellerin morfolojik yapılarına bakmadan önce formülasyondan 1 ml alınıp 10 ml'ye ultra saf su ile seyreltildi ve 15 dk karıştırıldı. Mika yüzey öncelikle 20 µl ultra saf su ile yıkandı. Ardından formülasyon örnekleri negatif yüklü olduğu için adezyonu artırmak amacı ile mika yüzeye 20 µl 10 mM $MgCI_2$ çözeltisi damlatıldı. Hazırlanan örnekten 2 µl alındı ve mika yüzeye damlatıldı. 5 dakika bekletildi ve daha sonra ultra saf su ile 2 defa yıkandı. Ardından oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Rezonans frekansı 320 kHz, kuvvet sabiti ise

42 N/m olarak ayarlandı. Kuruduktan sonra ise "dinamik mod" ayarında tarama yapıldı.

### 3.4.5. Polimerik Misellerin Etkin Madde Yükleme Kapasitesi Tayini

Hazırlanan etkin madde yüklü misel formülasyonlarında karvedilol miktarının saptanması amacıyla, formülasyonlar 0,45 µm rejenere selüloz filtreden süzüldü. Daha sonra bu kolloidal sistemden 0,5 ml alınıp 10 ml'ye metanol ile seyreltildi. Spektrofotometrik yöntem ile 243 nm dalga boyunda verdiği absorbans tespit edildi. Bulgular 3.1.3.1'de verilen kalibrasyon doğrusu yardımı ile misellere yüklenen etkin madde miktarı hesaplandı.

Spektrofotometrik yöntem ile misellere yüklenen etkin madde miktarı hesaplandıktan sonra aşağıda verilen denklemler (Park ve ark. 2005) yardımı ile % enkapsülasyon etkinliği ve % yükleme kapasitesi hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Enkapsülasyon etkinliği} = \frac{A}{B} \times 100$$

$$\% \text{ Yükleme kapasitesi} = \frac{A}{B+C} \times 100$$

A: Misellere yüklenen etkin madde miktarı (g)

B: Misel hazırlama aşamasında kullanılan etkin madde miktarı (g)

C: Misel hazırlama aşamasında kullanılan polimer miktarı (g)

### 3.4.6. *İn vitro* Salım Çalışmaları

*İn vitro* salım çalışmaları için polimerik misellerin yükleme etkinliği çalışmalarının sonuçlarına dayanılarak yükleme kapasitesi yüksek olan formülasyonlar (F1C3, F4C3 ve F5C3) ve karşılaştırma yapmak amacı ile aynı polimer ile hazırlanan yükleme kapasitesi düşük olan formülasyonlar (F1C1, F4C1 ve F5C2) seçilmiştir. Bu çalışma çalışması için Letchford ve ark. larının (2005) kullandığı yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Deneyden önce salım ortamı olarak kullanılacak ultra saf suyun 37ºC'ye gelmesi için 30 dk beklendi. Ardından etkin madde yüklü polimerik misel

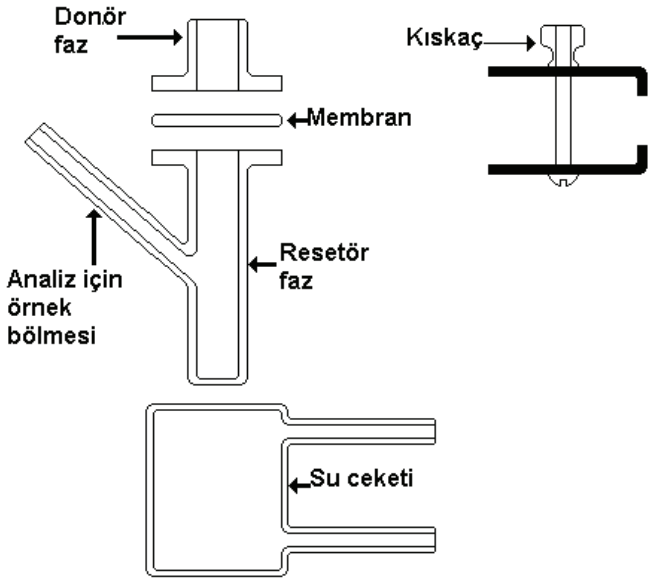
formülasyonlarının 5'er ml si 3,5-5 kDa MWCO'ya sahip diyaliz tüplerine konuldu. Diyaliz tüpleri içindeki bu formülasyonlar 37ºC'deki 200 ml salım ortamına yerleştirildi. Deney sırasında salım ortamından 1., 6., 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde 500 µl örnek alındı ve sink koşulu sağlamak amacı ile 24., 48., 72. ve 96. saatlerde salım ortamı yenisi ile değiştirildi. Alınan örnekler ise mobil faz ile 1 ml'ye tamamlandı ve 20 µl si HPLC'ye enjekte edildi. Elde edilen pik alanlarından kalibrasyon doğrusu yardımı ile örneklerdeki karvedilol miktarları hesaplandı. Deney, seçilen formülayonlar için 3 defa tekrarlandı, bu değerlerin ortalaması alındı ve SD değerleri hesaplandı.

Ayrıca % salım hesabında kullanılmak üzere miseller formülasyonda yüklü karvedilol miktarını tespit etmek için çalışmanın başlangıcında 250 µl miseller formülasyondan alınıp 10 ml'ye mobil faz ile tamamlandı. Daha sonra bu çözeltinin 20 µl si HPLC kolonuna enjekte edildi. Elde edile pik alanlarından kalibrasyon doğrusu yardımı ile çalışmada kullanılan miseller formülasyondaki karvedilol miktarı ve % salım oranları hesaplandı. Ayrıca zamana karşı % salım grafiği çizildi.

### 3.4.7. Sığır Nazal Mukozasından *Ex Vivo* Geçiş Çalışmaları

Bu çalışmalarda, İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi'nden temin edilen sığır nazal mukozalarının lateral kısımları kullanılmıştır. Nazal septum, lateral duvardan kırılarak el yardımı ile çıkartıldı ve canlılığını kaybetmemesi için hemen soğuk Ringer çözeltisine (NaCI 125 mM, KCI 5 mM, $CaCI_2$ 1,4 mM, $NaH_2PO_4$ 1,2 mM, $NaHCO_3$ 10 mM ve D-glikoz 11 mM) konuldu. Sonra nazal mukoza nazal septumdan çıkartıldı. Hemen 37ºC de Ringer çözeltisi içeren Franz difüzyon hücresine yerleştirildi (Yu ve ark. 2004).

*Ex vivo* geçiş çalışmalarında; reseptör faz hacmi 12 ml, difüzyonun gerçekleştiği yüzey alanı 1,77 $cm^2$ olan çift ceketli modifiye Franz difüzyon hücresi (Yenil 2008) kullanıldı. Modifiye Franz difüzyon hücresinin şematik görünüşü aşağıda verilmiştir (Şekil 3.4).




**Şekil 3-4: Modifiye Franz difüzyon hücre yapısı (Yenil 2008)**

Reseptör faz olarak nazal mukozadan geçiş çalışmalarında kullanılan Ringer çözeltisi kullanıldı (Yu ve ark. 2004). Reseptör faz modifiye Franz difüzyon hücresine konulmadan önce 30 dk ultrasonik banyoda degaze edildi ve sıcaklığı 37,0±0.5°C'ye ayarlandı. Hücrelerin yüzeyine nazal septumdan çıkartılan mukozalar hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Hazırlanan miseller formülasyonlardan 1'er ml donör kısmına yerleştirildi. Reseptör faz manyetik karıştırıcı kullanılarak 300 devir/dk hızda karıştırıldı. Belirlenen zaman aralıklarında (0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7. saat) reseptör fazdan 0,5'er ml örnek alındı. Ardından alınan hacimde ve sıcaklıkta reseptör faz Franz difüzyon hücresine eklendi.

Franz hücresinden alınan örnekler mobil faz ile 1 ml'ye tamamlandı. 2 dk vorteks karıştırıcıda karıştırıldı ve 0,45 µm por çaplı hidrofilik LCR (PTFE) filtreden süzüldü. Daha sonra bu çözeltinin 20 µl si HPLC kolonuna enjekte edildi. Elde edilen pik alanlarından kalibrasyon doğrusu yardımıyla konsantrasyon hesabı yapıldı. Seçilen formülasyonlar için 3'er deney yapılarak elde edilen değerlerin ortalaması alındı ve SD değerleri hesaplandı. Ayrıca 7 saat boyunca nazal mukozadan geçen karvedilol miktarlarının zamana karşı grafikleri çizildi ve determinasyon katsayısı ($r^2$) ve akısı (flux) hesaplandı.

### 3.4.8. İstatiksel Değerlendirmeler

Yapılan çalışmada elde edilen deney bulguları, GraphPad Prism 5.04 bilgisayar programı kullanımı ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara one-way anova ve student- t testi uygulandı.

# 4. BULGULAR

## 4.1. Karvedilol Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

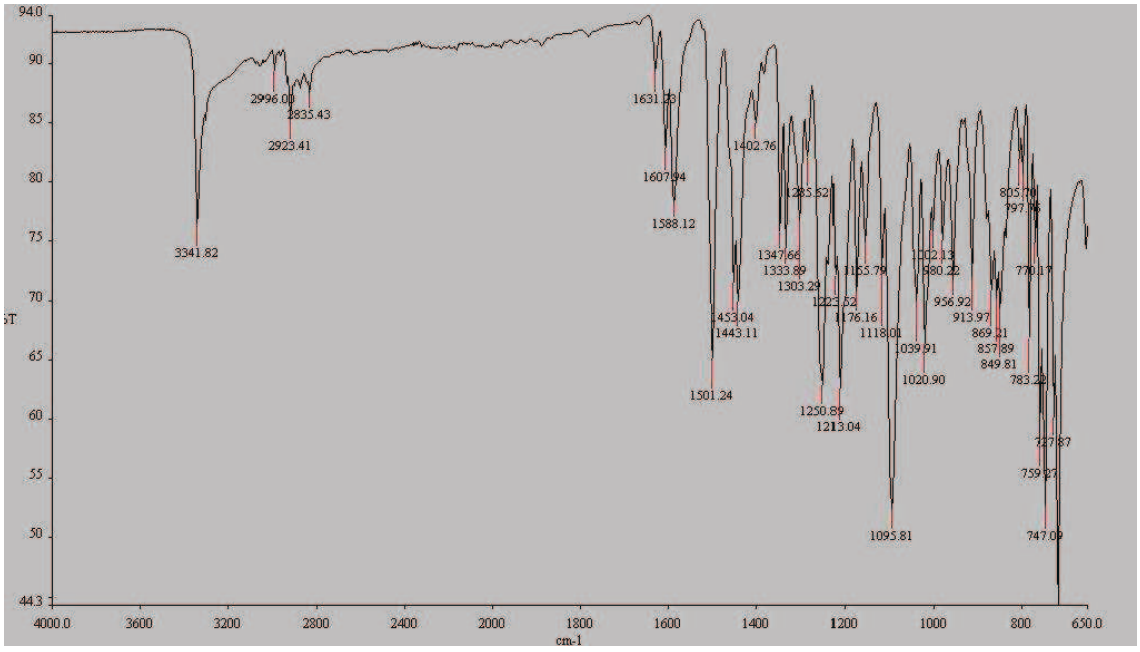
### 4.1.1. Infrared Spektrumu

Karvedilolün potasyum bromür ile diskleri hazırlanarak elde edilen IR spektrumu Şekil 4-1'de görülmektedir.

Bu IR spektrumunda:

- 3341 $cm^{-1}$ de : hidroksil grubu
- 3060 ile 2835 $cm^{-1}$ arası : C-H bağları
- 1631 $cm^{-1}$ de : C-O bağı
- 1607, 1588, ve 1501 $cm^{-1}$ de : benzen halkası
- 1443 ve 1453 $cm^{-1}$ de : C-N bağları
- 957 $cm^{-1}$ de : C-$CH_2$ bantları görülmektedir.

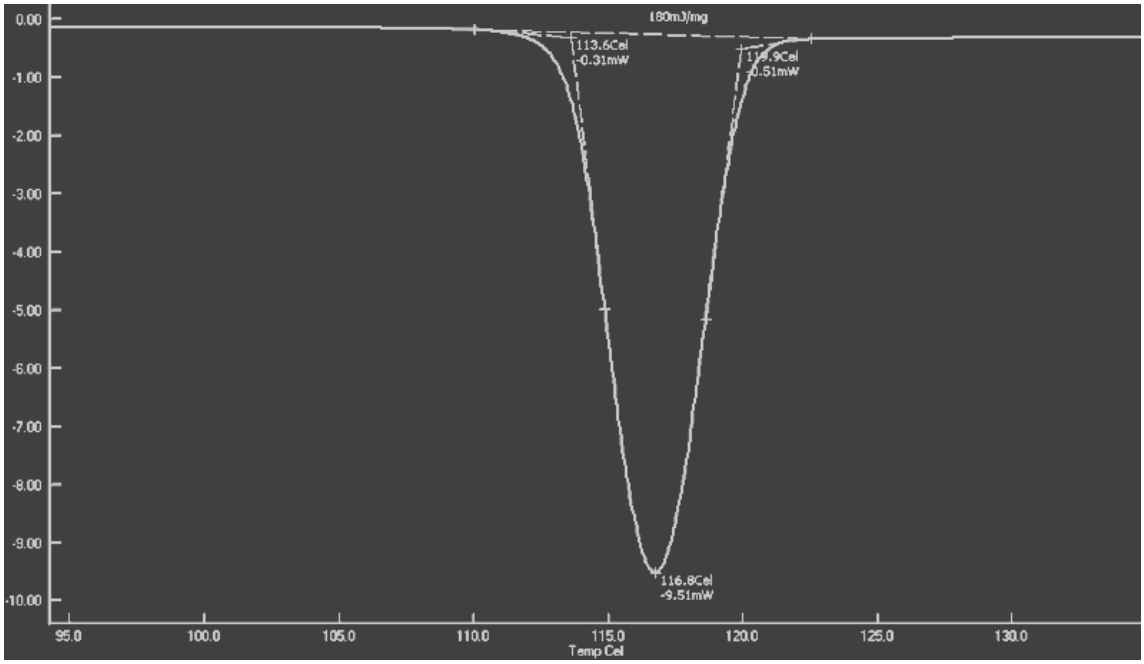
Elde edilen bu IR spektrumu ile literatürde (Jagannathana ve ark. 2010) kayıtlı spektrumun uyum gösterdiği saptanmıştır.




**Şekil 4-1: Karvedilolün IR spektrumu**

### 4.1.2. Karvedilolün Termal Analizi

Karvedilolün diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) ile yöntem 3.1.2. de belirtilen şartlarda yapılan termal analizinde erime noktası 116,8 ºC olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu termogram literatürde (Ubaidulla ve ark. 2007) kayıtlı termogram ile uyumludur.




**Şekil 4-2: Karvedilolün DSC termogramı**

### 4.1.3. Karvedilolün Spektrofotometrik Yöntem ile Miktar Tayinine Ait Bulgular

#### 4.1.3.1. Spektrofometrik Yöntem ile Miktar Tayini Validasyonuna Ait Bulgular

**a) Doğrusallık:** Karvedilolün Yöntem 3.1.3.1.a'da anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen kalibrasyon doğrusu grafiği Şekil 4-3'te, kalibrasyon doğrusunun çizilmesinde ortalama absorbanslar, standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (%RSD) sonuçları ise Tablo 4-1'de gösterilmiştir.

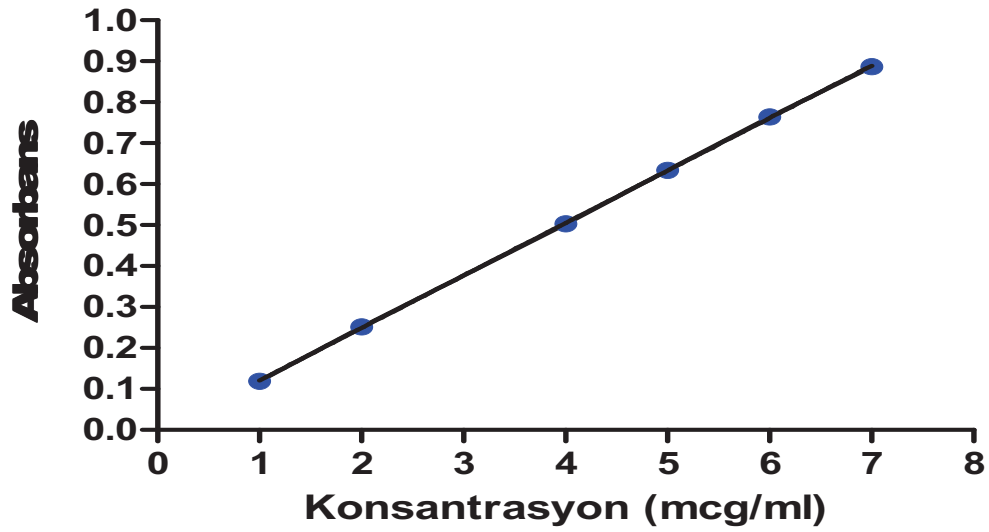
Doğru denklemi ve determinasyon katsayısı ise aşağıda verilmiştir:

**$y = 0{,}1281x - 0{,}0076$ ; $r^2$: 0,9999**

y : Absorbans

x : Konsantrasyon (mcg/ml)

$r^2$: Determinasyon katsayısı




**Şekil 4-3: Karvedilolün kalibrasyon doğrusu grafiği**

**Tablo 4-1: Karvedilolün spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin doğrusallığına ait bulgular (n=6)**

| Konsantrasyon (mcg/ml) | Ortalama Absorbans | SD (±) | RSD (%) |
|---|---|---|---|
| **1** | 0,119 | 0,002 | 1,825 |
| **2** | 0,251 | 0,005 | 1,902 |
| **4** | 0,503 | 0,010 | 1,924 |
| **5** | 0,634 | 0,010 | 1,604 |
| **6** | 0,764 | 0,011 | 1,446 |
| **7** | 0,886 | 0,017 | 1,929 |

**b) Doğruluk:** Üç farklı konsantrasyondaki karvedilolün miktar tayini için, yöntem 3.1.3.1.b'de anlatıldığı gibi çalışılarak yöntemin doğruluğu tespit edildi. Her

konsantrasyon için geri kazanma değeri (%), standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (%RSD) değerleri Tablo 4-2'de verilmiştir.

**Tablo 4-2: Karvedilolün spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin doğruluğuna ait bulgular (n=6)**

| Konsantrasyon | Geri Kazanma | Geri kazanma (%) | SD (±) | RSD (%) |
|---|---|---|---|---|
| **2 mcg/ml** | 2,017 mcg/ml | 100,87 | 0,029 | 1,456 |
| **4 mcg/ml** | 4,048 mcg/ml | 101,20 | 0,080 | 1,980 |
| **6 mcg/ml** | 6,114 mcg/ml | 101,91 | 0,019 | 0,318 |

**c) Kesinlik:** Karvedilol ün Yöntem 3.1.3.1.c'de anlatıldığı gibi yapılan miktar tayini yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları Tablo 4-3'te, günler arası kesinlik bulguları ise Tablo 4-4'te gösterilmiştir.

**Tablo 4-3: Karvedilolün spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin gün içi kesinliğine ait bulgular (n=6)**

| Konsantrasyon | Ortalama Absorbans | SD (±) | RSD (%) |
|---|---|---|---|
| **2 mcg/ml** | 0,256 | 0,003 | 1,296 |
| **4 mcg/ml** | 0,516 | 0,007 | 1,296 |
| **6 mcg/ml** | 0,778 | 0,004 | 0,460 |

**Tablo 4-4: Karvedilolün spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin günler arası kesinliğine ait bulgular (n=6)**

| Konsantrasyon | 1. gün | 2.gün | 3.gün | Ortalama Absorbans | SD (±) | RSD (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **2 mcg/ml** | 0,251 | 0,251 | 0,256 | 0,253 | 0,003 | 1,143 |
| **4 mcg/ml** | 0,520 | 0,515 | 0,516 | 0,517 | 0,003 | 0,512 |
| **6 mcg/ml** | 0,790 | 0,776 | 0,778 | 0,781 | 0,008 | 0,969 |

**d) Seçicilik:** Yöntem 3.1.3.1.d'de anlatıldığı gibi yapılan çalışmalar sonucunda kullanılan polimerlerin 243 nm dalga boyunda absorbans göstermediği tespit edildi.

**e) Teşhis Limiti ve Miktar Tayini Limiti:** Yöntem 3.1.3.1.e'de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen ölçüm sonuçları ve verilen formüller yardımı ile hesaplanan TL ve MTL değerleri aşağıda verilmiştir.

$\partial$ değeri: 0,0022 TL: 0,0576 mcg/ml MTL: 0,1745 mcg/ml

**f) Stabilite:** Yöntem 3.1.3.1.f'te anlatıldığı şekilde 48 saat boyunca % 95 (h/h) metanol içerisindeki etkin maddenin stabilitesi incelendi. Elde edilen sonuçların % RSD sinin % 2'nin altında olmasından dolayı karvedilolün 48 saat boyunca stabil olduğu tespit edildi. Stabilite bulguları Tablo 4-5'te gösterilmiştir.

**Tablo 4-5: Karvedilolün spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin stabilitesine ait bulgular (n=6)**

| Ölçüm Zamanı (saat) | Teorik Konsantrasyon (mcg/ml) | Hesaplanan Konsantrasyon (mcg/ml) |
|---|---|---|
| **1** | 4 | 4,071 |
| **2** | 4 | 4,048 |
| **3** | 4 | 4,056 |
| **4** | 4 | 4,071 |
| **5** | 4 | 4,071 |
| **6** | 4 | 4,095 |
| **24** | 4 | 4,126 |
| **48** | 4 | 4,134 |
| | **Ortalama** | 4,084 |
| | **SD (±)** | 0,031 |
| | **RSD (%)** | 0,771 |

### 4.1.4. Karvedilolün HPLC Yöntemi ile Miktar Tayinine Ait Bulgular

#### 4.1.4.1. HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini Validasyonuna Ait Bulgular

**a) Doğrusallık:** Karvedilolün Yöntem 3.1.3.2.a' da anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen kalibrasyon doğrusu grafiği Şekil 4-4'te, kalibrasyon doğrusunun çizilmesinde ortalama pik alanları, standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (%RSD) sonuçları ise Tablo 4-6 da gösterilmiştir.

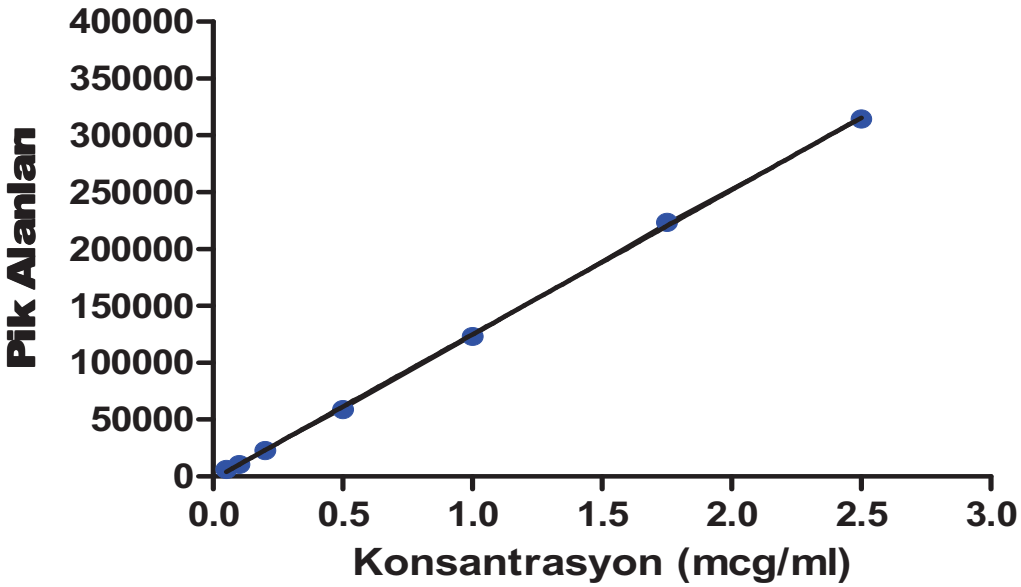
Doğru denklemi ve determinasyon katsayısı ise aşağıda verilmiştir:

**y = 127167,2x – 2317,95 ; $r^2$: 0,9997**

y : Pik alanı

x : Konsantrasyon (mcg/ml)

$r^2$: Determinasyon katsayısı




**Şekil 4-4: Karvedilolün kalibrasyon doğrusu grafiği**

**Tablo 4-6: Karvedilolün HPLC yöntemi ile miktar tayininin doğrusallığına ait bulgular (n=3)**

| Konsantrasyon (mcg/ml) | Ortalama Pik Alanları | SD (±) | RSD (%) |
|---|---|---|---|
| **0,05** | 6055 | 73 | 1,208 |
| **0,1** | 10402 | 158 | 1,514 |
| **0,2** | 22957 | 73 | 0,319 |
| **0,5** | 58904 | 60 | 0,102 |
| **1** | 123320 | 77 | 0,062 |
| **1,75** | 223487 | 308 | 0,138 |
| **2,5** | 314373 | 274 | 0,087 |

**b) Doğruluk:** Üç farklı konsantrasyondaki karvedilol ün miktar tayini için, yöntem 3.1.3.2.b'de anlatıldığı gibi çalışılarak yöntemin doğruluğu tespit edildi. Her konsantrasyon için geri kazanma değeri (%), standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (%RSD) değerleri Tablo 4-7'te gösterilmiştir.

**Tablo 4-7: Karvedilolün HPLC yöntemi ile miktar tayininin doğruluğuna ait bulgular (n=3)**

| Konsantrasyon | Geri Kazanma | Geri Kazanma (%) | SD (±) | RSD (%) |
|---|---|---|---|---|
| **0,5 mcg/ml** | 0,490 mcg/ml | 98,08 | 0,001 | 0,106 |
| **1,0 mcg/ml** | 0,985 mcg/ml | 98,45 | 0,002 | 0,245 |
| **2,5 mcg/ml** | 2,488 mcg/ml | 99,50 | 0,004 | 0,160 |

**c) Kesinlik:** Karvedilolün Yöntem 3.1.3.2.c'de anlatıldığı gibi yapılan miktar tayini yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları Tablo 4-8'de, günler arası kesinlik bulguları ise Tablo 4-9'da gösterilmiştir.

**Tablo 4-8: Karvedilolün HPLC yöntemi ile miktar tayininin gün içi kesinliğine ait bulgular (n=3)**

| Konsantrasyon | Ortalama Pik Alanları | SD (±) | RSD (%) |
|---|---|---|---|
| **0,5 mcg/ml** | 62122 | 115 | 0,185 |
| **1,0 mcg/ml** | 120099 | 322 | 0,268 |
| **2,5 mcg/ml** | 305351 | 1077 | 0,353 |

**Tablo 4-9: Karvedilolün HPLC yöntemi ile miktar tayininin günler arası kesinliğine ait bulgular (n=3)**

| Konsantrasyon | 1. gün | 2.gün | 3.gün | Ortalama Pik Alanları | SD (±) | RSD (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **0,5 mcg/ml** | 60327 | 60389 | 62122 | 60946 | 1019 | 1,672 |
| **1,0 mcg/ml** | 117068 | 121486 | 120099 | 119551 | 2259 | 1,890 |
| **2,5 mcg/ml** | 297037 | 300638 | 305351 | 301009 | 4169 | 1,385 |

**d) Seçicilik:** Yöntem 3.1.3.2.d'de anlatıldığı gibi yapılan çalışmalar sonucunda kullanılan polimerlerin etkin maddenin pik verdiği alıkonma zamanında pik vermediği tespit edildi.

**e) Teşhis Limiti ve Miktar Tayini Limiti:** Yöntem 3.1.3.2.e'de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen ölçüm sonuçları ve verilen formüller yardımı ile hesaplanan TL ve MTL değerleri aşağıda verilmiştir.

$\partial$ değeri: 155,1568 TL: 0,0040 mcg/ml MTL: 0,0122 mcg/ml

**f) Stabilite:** Yöntem 3.1.3.2.f ‘de anlatıldığı şekilde 48 saat boyunca mobil faz içerisindeki etkin maddenin stabilitesi incelendi. Elde edilen sonuçların % RSD’sinin % 2’nin altında olmasından dolayı karvedilolün 48 saat boyunca stabil olduğu tespit edildi. Stabilite bulguları Tablo 4-10’da gösterilmiştir.

**Tablo 4-10: Karvedilolün HPLC yöntemi ile miktar tayininin stabilitesine ait bulgular (n=3)**

| Ölçüm Zamanı (saat) | Teorik Konsantrasyon (mcg/ml) | Hesaplanan Konsantrasyon (mcg/ml) |
|---|---|---|
| **1** | 1 | 0,974 |
| **2** | 1 | 0,972 |
| **4** | 1 | 0,972 |
| **6** | 1 | 0,973 |
| **8** | 1 | 0,972 |
| **12** | 1 | 0,974 |
| **24** | 1 | 0,973 |
| **48** | 1 | 0,973 |
| | **Ortalama** | 0,973 |
| | **SD (±)** | 0,001 |
| | **RSD (%)** | 0,086 |

### 4.1.5. Karvedilolün 37°C’de Stabilitesine Ait Bulgular

Yöntem 3.1.4’de anlatıldığı şekilde 120 saat boyunca 37°C ultra saf su içerisindeki etkin maddenin stabilitesi incelendi. Elde edilen sonuçların % RSD’sinin % 3,744 olmasından dolayı karvedilolün 120 saat boyunca stabil olduğu tespit edildi. Stabilite bulguları Tablo 4-11’de gösterilmiştir.

**Tablo 4-11: Karvedilolün 37 °C ultra saf su içerisindeki stabilitesine ait bulgular (n=3)**

| Ölçüm Zamanı (saat) | Teorik Konsantrasyon (mcg/ml) | Hesaplanan Konsantrasyon (mcg/ml) |
|---|---|---|
| **0** | 1,950 | 1,950 |
| **24** | 1,950 | 1,829 |
| **48** | 1,950 | 1,822 |
| **72** | 1,950 | 1,796 |
| **96** | 1,950 | 1,760 |
| **120** | 1,950 | 1,774 |
| | **Ortalama** | 1,822 |
| | **SD (±)** | 0,068 |
| | **RSD (%)** | 3,744 |

### 4.1.6. Karvedilolün Çözünürlük Tayinine Ait Bulgular

Yöntem 3.1.5'te anlatıldığı gibi yapılan çözünürlük tayinine ait bulgular Tablo 4-12'de gösterilmiştir.

**Tablo 4-12: Karvedilolün çeşitli ortamlarda ve sıcaklıkta çözünürlüğü (n=3)**

| Çözünme Ortamı ve Sıcaklığı | 1 ml de Çözünen Karvedilol Miktarı |
|---|---|
| **Ultra Saf Su (oda şartları)** | 7,462 ± 0,541 µg/ml |
| **Ultra Saf Su (37°C)** | 10,320 ± 2,461 µg/ml |
| **Ringer Çözeltisi (37°C)** | 2,374 ± 0,145 µg/ml |

## 4.2. Polimerlerin Sentez Çalışmalarına Ait Bulgular

Çalışmamızda, Yöntem 3.2'de anlatıldığı gibi çalışılarak PCL-b-mPEG ve PLL-b-mPEG diblok kopolimerlerinden 4 farklı (mPEG2000-b-PCL, mPEG5000-b-PCL, mPEG2000-b-PLL, mPEG5000-b-PLL) ve ayrıca bu polimerler polietilenimin (PEI) bağlanması ile de 4 ayrı (mPEG2000-b-PCL-PEI, mPEG5000-b-PCL-PEI, mPEG2000-b-PLL-PEI, mPEG5000-b-PLL-PEI) toplam 8 polimer sentezlenmiştir.

## 4.3. Polimerler Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

### 4.3.1. Polimerik Yapı ve Fonksiyonel Grup Analizlerine Ait Bulgular

***FTIR Analizleri:*** Diblok kopolimerlerin hepsinde kaprolakton ve laktat için 1720 $cm^{-1}$'de karbonil grubuna ait güçlü bir pik gözlenirken, PEG blokları sırasıyla 1100 $cm^{-1}$'de C-O titreşimi, 3000 $cm^{-1}$'de ise alifatik metilen grupları olarak ortaya çıkmıştır. Kopolimerleşme bu piklerden doğrulanmaktadır (Karagöz 2009).

***NMR Analizleri:*** PCL-b-mPEG2000 için NMR analizinde belirleyici pikler, PEG'e ait metoksi protonları, kaprolaktona ait karbonil grubuna bağlı metilen grubu protonları için spektrumlarda elde edilmiştir. Bu durumda kopolimer mikrodalga ile başarılı bir şekilde sentezlenmiştir (Karagöz 2009). PLL-b-mPEG2000 için en belirleyici pikler, laktat grubuna ait –CH protonu, $-CH_3$ protonları ve PEG'e ait metoksi protonlarıdır. Bunlar diğer protonlarla birlikte spektrumlarda görülmüştür (Karagöz 2009).

### 4.3.2. Molekül Ağırlığı ve Dağılımı Analizine Ait Bulgular

Sentezlenen diblok kopolimelerin molekül ağırlıkları Tablo 4-13'te verilmiştir.

**Tablo 4-13: Sentezlenen polimerlerin molekül ağırlıkları**

| Polimer | Oran (mol) | Dönüşüm (%) | $Mn^a$ | $Mw^a$ | $Mn_{teorik}{}^b$ | $Mn_{NMR}{}^c$ | PDI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| mPEG2000-b-PCL | 4:1 | 80,18 | 5665 | 6572 | 2268 | 2397 | 1.16 |
| mPEG5000-b-PCL | 4:1 | 83,94 | 12869 | 14526 | 5268 | 5265 | 1.13 |
| mPEG2000-b-PLL | 4:1 | 65,71 | 5868 | 6763 | 2292 | 2146 | 1.15 |
| mPEG5000-b-PLL | 4:1 | 74,29 | 10674 | 11853 | 5292 | 5073 | 1.11 |

a: GPC analizinden elde edilmiştir

b: Kullanılan mol oranlarına göre hesaplanmıştır

c: $^1$H-NMR spektrumlarından hesaplama yapılmıştır

Ayrıca Dinçer ve arkadaşlarının yaptığı (2011) çalışmada diblok kopolimer yapısına PEI'nin bağlandığı GPC ile de kanıtlanmıştır. Bu nedenle PEI bağlı diblok kopolimerlerin molekül ağırlıkları diblok kopolimerlerine PEI (MA:2000 g/mol) homopolimerinin molekül ağırlıklarının eklenmesiyle hesaplanabilmektedir.

### 4.3.3. PEI Bağlı Polimerlerde Amin Grubu MiktarınınTespitine Ait Bulgular

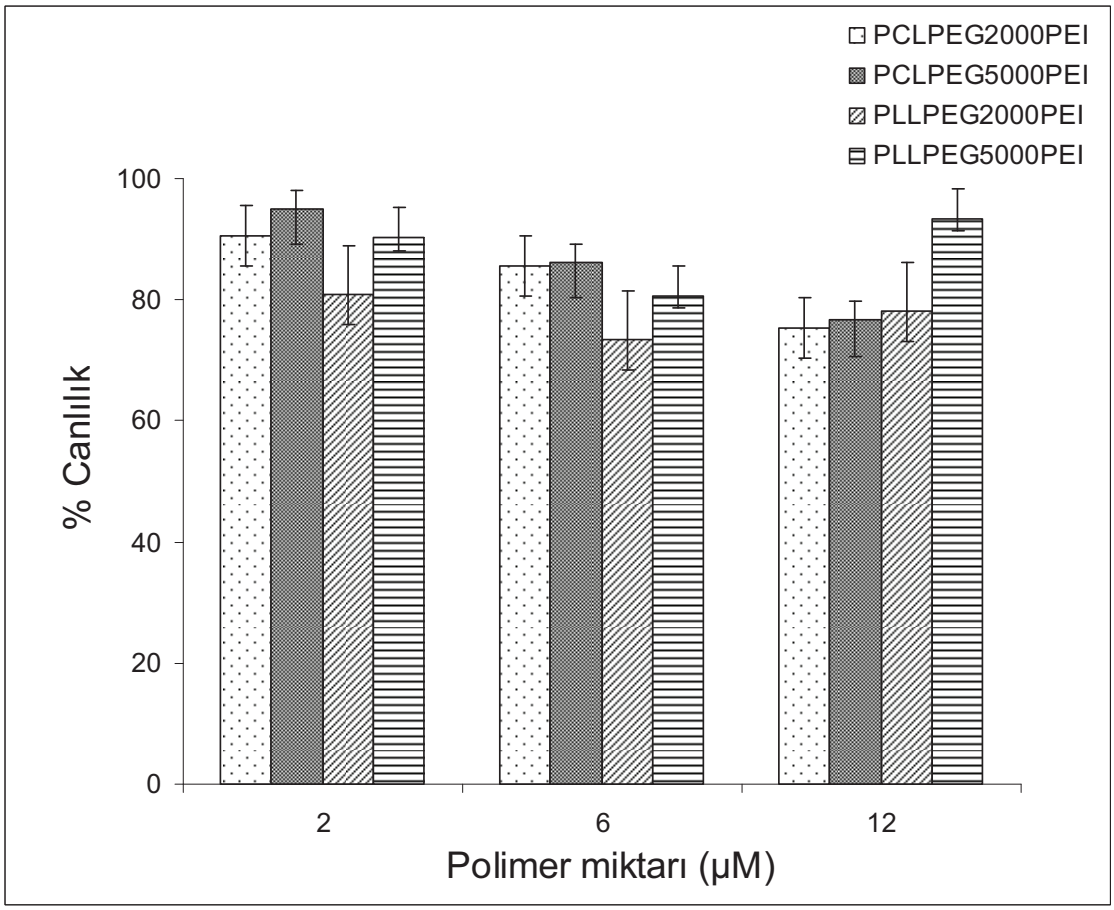
PEI bağlı polimerlerdeki amin grubu miktarları Tablo 4-14'te verilmiştir.

**Tablo 4-14: TNBS yöntemi ile belirlenen amin grup miktarları**

| Polimer | Amin Grup miktarı (mg/ml) |
|---|---|
| mPEG2000-b-PCL | 0,14 |
| mPEG5000-b-PCL | 0,06 |
| mPEG2000-b-PLL | 0,15 |
| mPEG5000-b-PLL | 0,15 |

### 4.3.4. Sitotoksisite Çalışmalarına Ait Bulgular

Katyonik polimerlerin Yöntem 3.2.3.5'te anlatıldığı gibi 24 saat süre boyunca sitotoksisite çalışması yapıldı ve canlı hücre yüzdeleri hesaplanarak grafik çizildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4-5'te gösterilmiştir.




**Şekil 4-5: Farklı miktarlarda, PEI bağlı polimerlerin fibroblast hücre canlılığına etkisi**

## 4.4. Polimerik Misel Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

### 4.4.1. Polimerik Misel Formülasyonlarının Hazırlanmasında Ön Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Yapılan ön formülasyon çalışmalarında 1 ml ve 5 ml organik çözücü kullanımının misele etkin madde yüklenmesi için yeterli olmadığı tespit edildi. Organik çözücü olarak asetonitril ile yapılan çalışmalarda ise aseton ile yapılanlara göre daha küçük misel boyutu ve polidispers indeks (PDI) görüldü.

Organik çözücünün rotari evaporatörde uzaklaştırılması için geçen sürenin optimizasyonu için rotari evaporatörde 5 dk, 30 dk, 1 saat ve 4 saat tutuldu. 1.saat ve 4. saatte asetonitril ile beraber ultra saf suyun da uçmasından dolayı agregatlar oluşmaya başladı. 5 dk ve 30 dk rotari evaporatör kullanımı ile herhangi bir agregat oluşumu gözlenmedi. Rotari evaporatörde 5 dk tutulması halinde ise 30 dk tutulmasına göre

misel çekirdeğinde organik çözücünün kalmasından dolayı misel boyutunun daha büyük olduğu görüldü. Sonuç olarak organik çözücünün uçurulması için 30 dk'nın uygun olduğu tespit edildi.

Misel formülasyonu hazırlandıktan sonra etkin madde partiküllerini uzaklaştırmak santrifüj uygulanması sonucu santrifüj ile etkin madde partiküllerinin çökmesine rağmen miseller formülasyonların uygun PDI'da olmadığı ve misel boyutlarının oldukça büyük olduğu görüldü. Etkin madde partiküllerini uzaklaştırmak için filtrasyon uygulandığında ise 0,2 μm por çapında olan filtreden, misellerin Zetasizer da boyutunu ölçmek için uygun yoğunlukta olmadığı ve membran filtreden geçemedikleri tespit edildi. Bu nedenle aynı deneme 0,45 μm por çapında membran filtre ile yapıldı ve sonuçların uygun olduğuna karar verildi.

### 4.4.2. Etkin Madde İçermeyen Polimerik Misel Formülasyonlarının Hazırlanmasına Ait Bulgular

Yöntem 3.3.2'de anlatıldığı gibi çalışmada karvedilol etkin maddesini içermeyen toplam 8 formülasyon hazırlanmıştır.

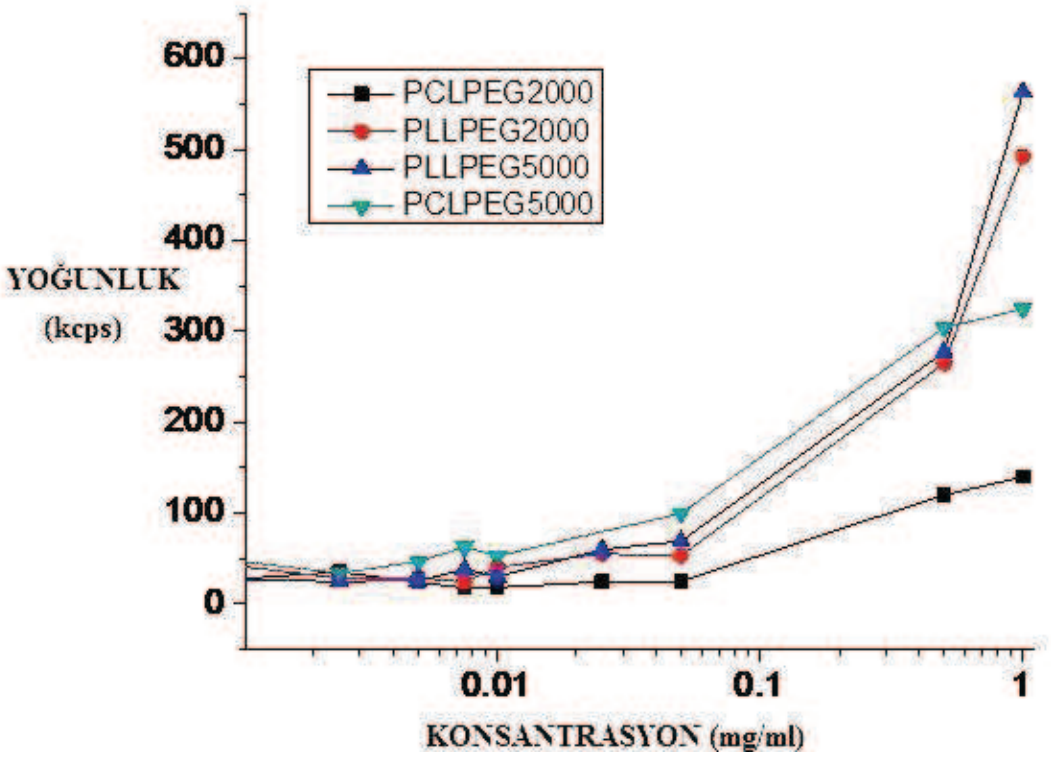
### 4.4.3. Etkin Madde İçeren Polimerik Misel Formülasyonlarına Ait Bulgular

Yöntem 3.3.3'te anlatıldığı şekilde çalışılarak karvedilol etkin maddesini içeren toplam 40 formülasyon hazırlanmıştır.

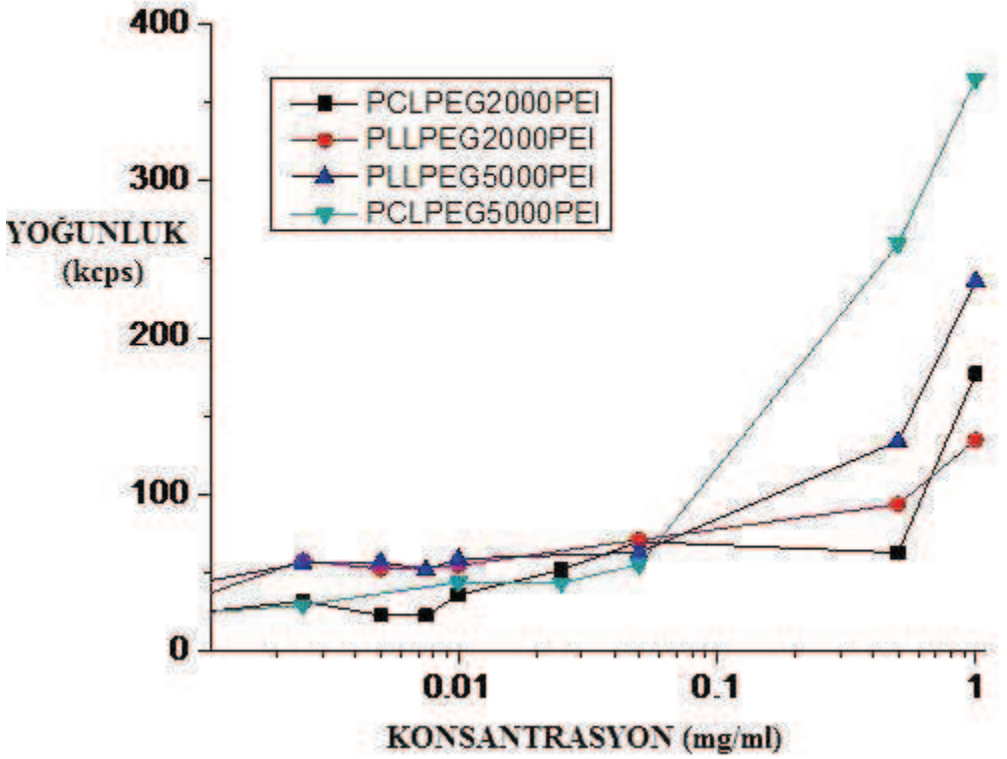
### 4.4.4. Polimerik Misellerin Karakterizasyonuna Ait Bulgular

#### 4.4.4.1. Kritik Misel Konsantrasyonuna Ait Bulgular

Bu polimelere ait DLS ile belirlenen CMC'ler Şekil 4-6 ve Şekil 4-7'de gösterilmiştir.




**Şekil 4-6: Diblok kopolimer konsantrasyonu ile yoğunluk değişimi**




**Şekil 4-7: PEI PEI bağlı diblok kopolimer konsantrasyonu ile yoğunluk değişimi**

Şekilleri yorumladığımızda genel olarak ufak değişimler olmasıyla beraber polimerlere ait CMC değerlerinin 0,5 mg/ml civarında olduğunu söylemek mümkündür.

### 4.4.4.2. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Tayinine Ait Bulgular

Hazırlanan misel formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve PDI değerleri Tablo 4-15'te gösterilmiştir. Ayrıca Şekil 4-8, Şekil 4-9, Şekil 4-10, Şekil 4-11, Şekil 4-12 ve Şekil 4-15'te bazı misel formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü dağılımı kromatogramları verilmiştir.

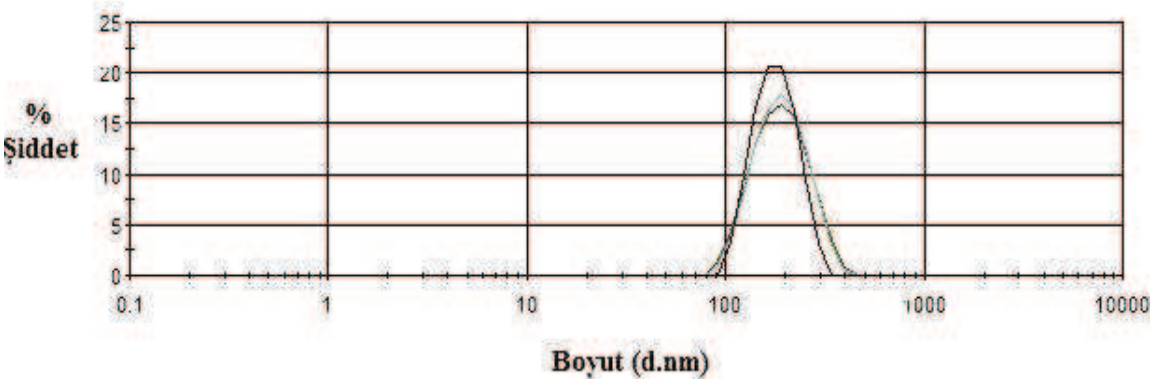
**Tablo 4-15: Misellerin partikül büyüklüğü ve dağılımı (n=3)**

| Formülasyon | Polimer: İlaç oranı (a/a) | Z.Avg (d.nm) (ortalama+SD) | PDI (ortalama+SD) |
|---|---|---|---|
| **F1** | boş | 204,9 ± 0,5508 | 0,268 ± 0,031 |
| **F1C1** | 1:0,05 | 197,5 ± 1,537 | 0,293 ± 0,017 |
| **F1C2** | 1:0,1 | 210,7 ± 2,718 | 0,242 ± 0,029 |
| **F1C3** | 1:0,2 | 279,9 ± 35,27 | 0,319 ± 0,043 |
| **F1C4** | 1:0,5 | 0* | 0* |
| **F1C5** | 1:1,0 | 0** | 0** |
| **F2** | boş | 177,3 ± 4,386 | 0,363 ± 0,046 |
| **F2C1** | 1:0,05 | 155,3 ± 0,8718 | 0,283 ± 0,019 |
| **F2C2** | 1:0,1 | 183,6 ± 2,207 | 0214 ± 0,006 |
| **F2C3** | 1:0,2 | 0* | 0* |
| **F2C4** | 1:0,5 | 0* | 0* |
| **F2C5** | 1:1,0 | 0* | 0* |
| **F3** | boş | 188,8 ± 0,4509 | 0,117 ± 0,015 |
| **F3C1** | 1:0,05 | 140,0 ± 1,097 | 0,195 ± 0,005 |
| **F3C2** | 1:0,1 | 207,6 ± 2,095 | 0,259 ± 0,011 |
| **F3C3** | 1:0,2 | 0* | 0* |
| **F3C4** | 1:0,5 | 0* | 0* |
| **F3C5** | 1:1,0 | 0* | 0* |

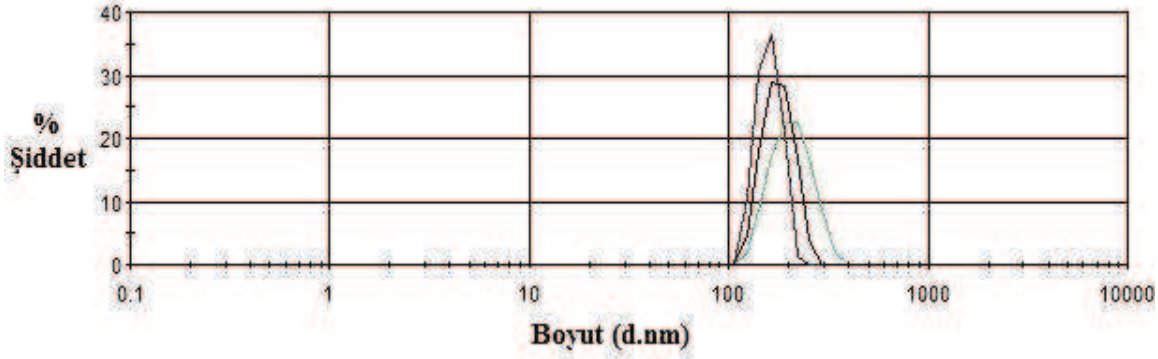
| | | | |
|---|---|---|---|
| **F4** | boş | 203,3 ± 19,47 | 0,390 ± 0,108 |
| **F4C1** | 1:0,05 | 235,1 ± 6,938 | 0,320 ± 0,016 |
| **F4C2** | 1:0,1 | 215,5 ± 2,551 | 0,389 ± 0,053 |
| **F4C3** | 1:0,2 | 272,8 ± 4,080 | 0,300 ± 0,010 |
| **F4C4** | 1:0,5 | 0* | 0* |
| **F4C5** | 1:1,0 | 0** | 0** |
| **F5** | boş | 0* | 0* |
| **F5C1** | 1:0,05 | 199,5 ± 20,13 | 0,341 ± 0,078 |
| **F5C2** | 1:0,1 | 166,8 ± 5,283 | 0,271 ± 0,032 |
| **F5C3** | 1:0,2 | 176,5 ± 2,914 | 0,287 ± 0,022 |
| **F5C4** | 1:0,5 | 199,5 ± 10,38 | 0,306 ± 0,042 |
| **F5C5** | 1:1,0 | 0* | 0* |
| **F6** | boş | 0* | 0* |
| **F6C1** | 1:0,05 | 0* | 0* |
| **F6C2** | 1:0,1 | 0* | 0* |
| **F6C3** | 1:0,2 | 165,2 ± 2,859 | 0,250 ± 0,018 |
| **F6C4** | 1:0,5 | 149,5 ± 0,7506 | 0,211 ± 0,020 |
| **F6C5** | 1:1,0 | 0** | 0** |
| **F7** | boş | 0* | 0* |
| **F7C1** | 1:0,05 | 0* | 0* |
| **F7C2** | 1:0,1 | 0* | 0* |
| **F7C3** | 1:0,2 | 0* | 0* |
| **F7C4** | 1:0,5 | 0* | 0* |
| **F7C5** | 1:1,0 | 0** | 0** |
| **F8** | boş | 0* | 0* |
| **F8C1** | 1:0,05 | 0* | 0* |
| **F8C2** | 1:0,1 | 0* | 0* |
| **F8C3** | 1:0,2 | 0* | 0* |
| **F8C4** | 1:0,5 | 0* | 0* |
| **F8C5** | 1:1,0 | 0* | 0* |

.* Zetasizer ile ölçüm sonrasında misel oluşumunun gerçekleşmediğine karar verildi.

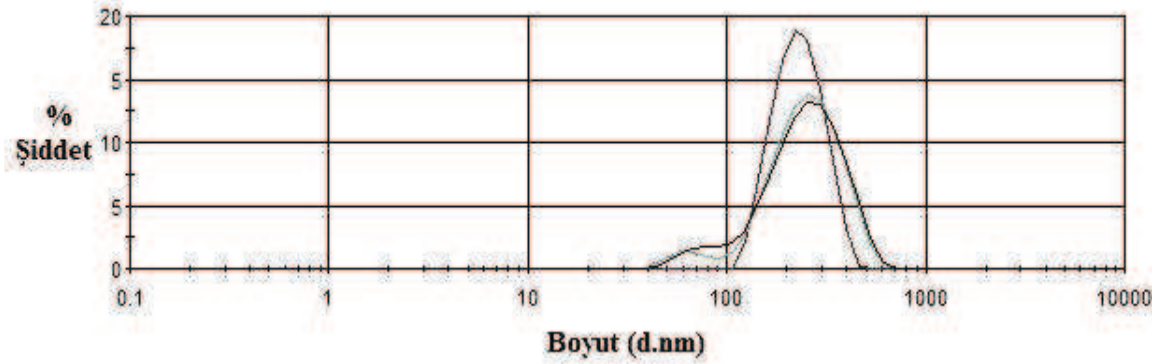
** Oda koşullarında 18 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılması sonucunda gözle görülür agregatlar oluştu.



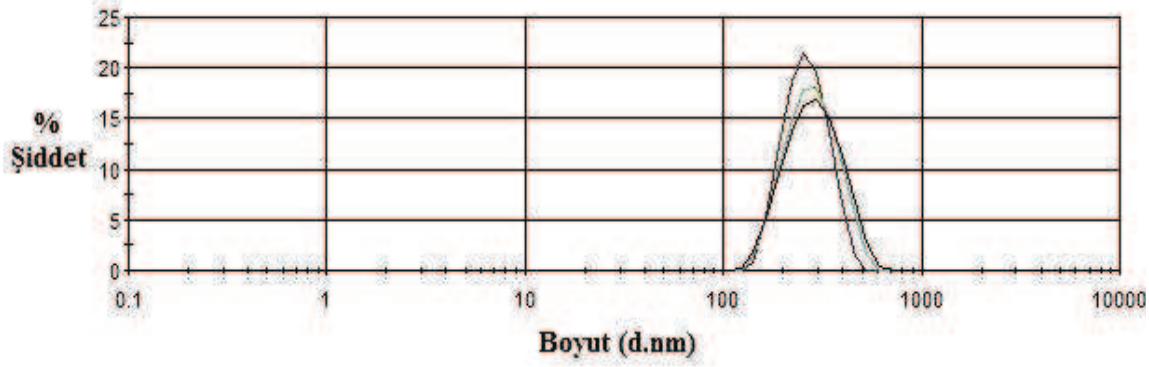

**Şekil 4-8: F1C1 misel formülasyonuna ait partikül büyüklüğü kromatogramı**



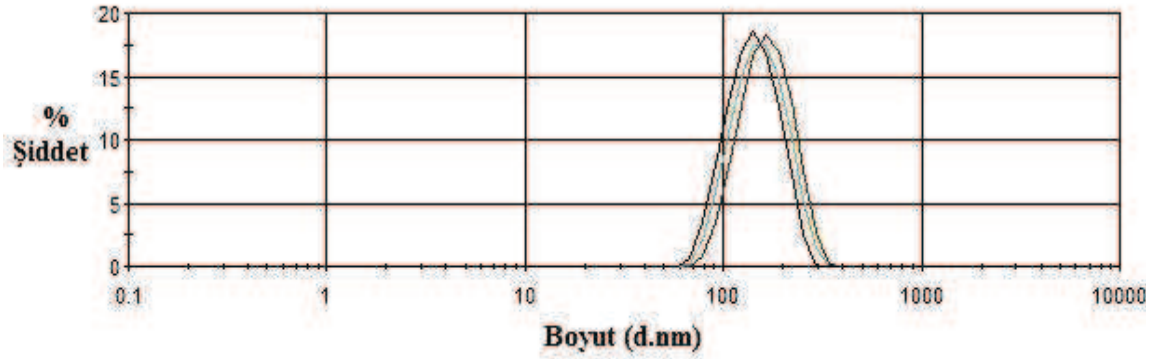

**Şekil 4-9: F1C3 misel formülasyonuna ait partikül büyüklüğü kromatogramı**



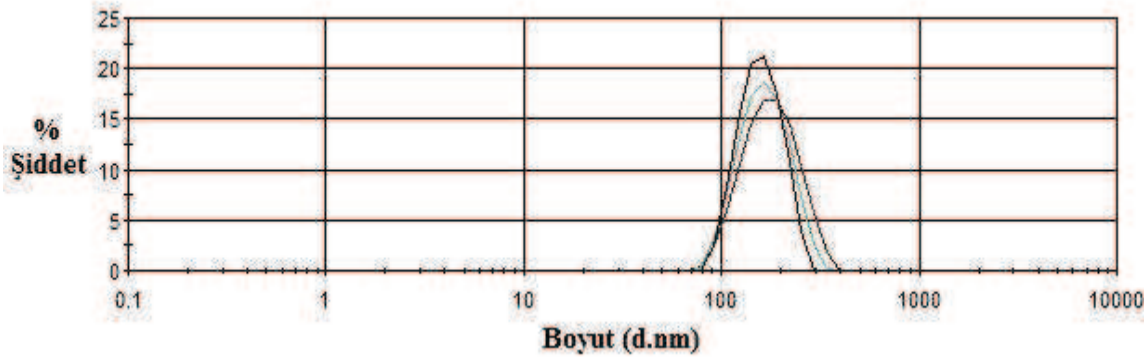

**Şekil 4-10: F4C1 misel formülasyonuna ait partikül büyüklüğü kromatogramı**




**Şekil 4-11: F4C3 misel formülasyonuna ait partikül büyüklüğü kromatogramı**




**Şekil 4-12: F5C2 misel formülasyonuna ait partikül büyüklüğü kromatogramı**




**Şekil 4-13: F5C3 misel formülasyonuna ait partikül büyüklüğü kromatogramı**

#### 4.4.4.3. Polimerik Misellerin Yük Tayinine Ait Bulgular

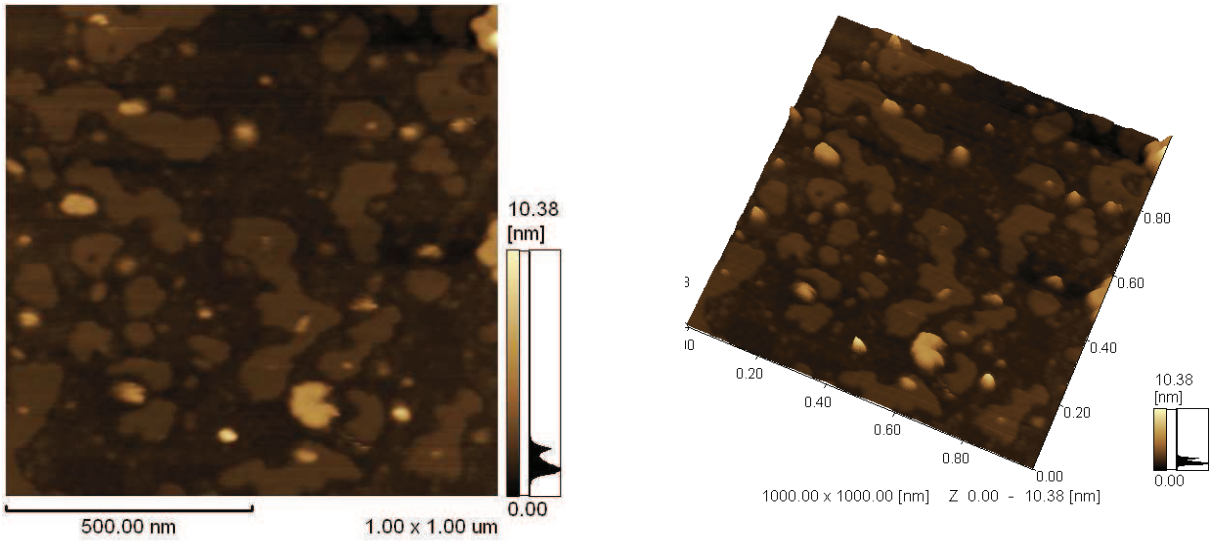
Boyutları, dağılımları ve yükleme etkinlikleri uygun olan etkin madde yüklü olan ve olmayan polimerik misellerin Zeta potansiyelleri Tablo 4-16'da gösterilmiştir.

**Tablo 4-16: Seçilen misellerin Zeta potansiyelleri (n=3)**

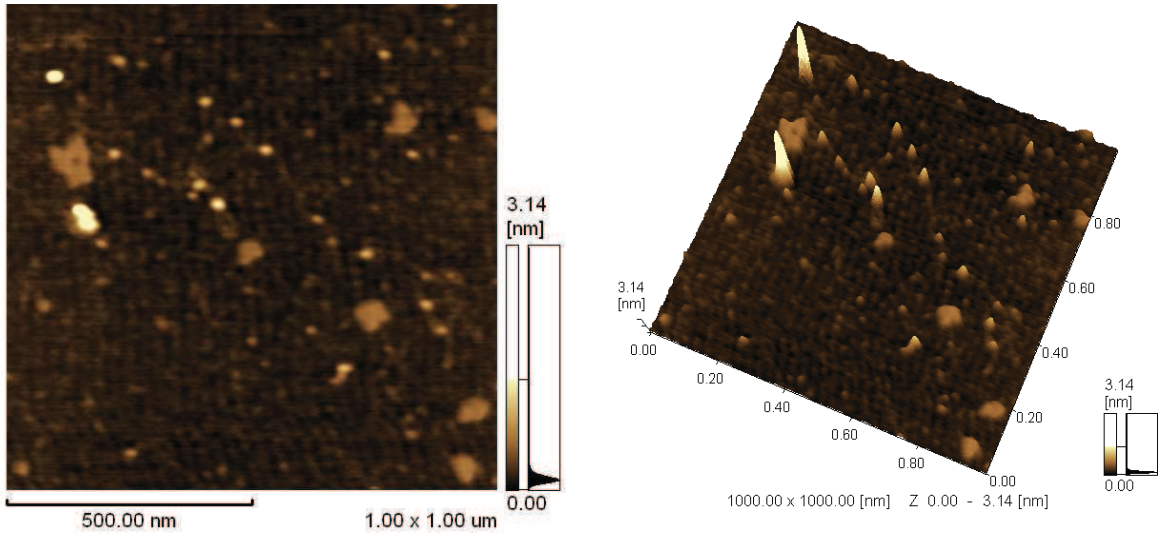
| Formülasyon | Polimer: İlaç oranı (a/a) | Zeta Potansiyeli (mV) ± SD |
|---|---|---|
| **F1** | boş | -44,8 ± 2,02 |
| **F1C1** | 1:0,05 | -40,6 ± 2,00 |
| **F1C3** | 1:0,2 | -24,6 ± 1,32 |
| **F4** | boş | -48,7 ± 1,41 |
| **F4C1** | 1:0,05 | -32,2 ± 0,97 |
| **F4C3** | 1:0,2 | -12,1 ± 1,89 |
| **F5** | boş | 28,9 ± 2,99 |
| **F5C2** | 1:0,1 | 25,9 ± 0,91 |
| **F5C3** | 1:0,2 | 25,5 ± 0,21 |

#### 4.4.4.4. Taramalı Prob Mikroskobu (SPM) ile Polimerik Misellerin Morfolojilerinin Tayini

*İn vitro* salım *ve ex vivo* geçiş özellikleri uygun olan formülasyonların (F4C1 ve F4C3) SPM görüntüleri Yöntem 3.3.4.4' de anlatıldığı şekilde çekilmiştir. Bu polimerik misellere ait görüntüler Şekil 4-6 ve Şekil 4-7'de gösterilmiştir. Ayrıca bu şekillerde verilen görüntülerdeki misellerin ortalama çapı her iki şekilde de yaklaşık olarak 20-25 nm arasında ölçülmüştür.




**Şekil 4-14: F4C1 formülasyonuna ait SPM görüntüsü (Tarama alanı 1,00 µm x 1,00 µm)**




**Şekil 4-15: F4C3 formülasyonuna ait SPM görüntüsü (Tarama alanı 1,00 µm x 1,00 µm)**

### 4.4.5. Polimerik Misellerin Etkin Madde Yükleme Kapasitelerine Ait Bulgular

Zetasizer ile boyut ölçümleri sonucunda misel oluşumu gözlenen ilaç yüklü misel formülasyonlarında Yöntem 3.3.5'te anlatıldığı şekilde miktar tayini yapıldı ve Yöntem 3.3.6'daki formüller ile misellerin % enkapsülasyon etkinliği ve % yükleme kapasitesi hesaplandı. İlgili hesaplamaların sonuçları Tablo 4-16'da gösterilmiştir.

**Tablo 4-17: Misellerin % enkapsülasyon etkinliği ve % yükleme kapasitesi (n=3)**

| Formülasyon | Polimer: Etkin Madde oranı (a/a) | 1 ml Misel Formülasyonunda Bulunan Etkin Madde Miktarı (mcg) (ortalama± SD) | Enkapsülasyon Etkinliği (%) (a/a) (ortalama± SD) | Yükleme Kapasitesi (%) (a/a) (ortalama± SD) |
|---|---|---|---|---|
| **F1C1** | 1:0,05 | 21,90 ± 2,11 | 58,41 ± 5,62 | 2,78 ± 0,27 |
| **F1C2** | 1:0,1 | 27,42 ± 2,67 | 36,56 ± 6,04 | 3,32 ± 0,35 |
| **F1C3** | 1:0,2 | 32,61 ± 9,73 | 21,74 ± 6,49 | 3,62 ± 1,08 |
| **F2C1** | 1:0,05 | 0* | 0* | 0* |
| **F2C2** | 1:0,1 | 31,79 ± 3,23 | 42,39 ± 4,98 | 3,85± 0,49 |
| **F3C1** | 1:0,05 | 16,49 ± 1,09 | 43,98 ± 2,45 | 2,09 ± 0,15 |
| **F3C2** | 1:0,1 | 57,86 ± 4,12 | 77,14 ± 2,91 | 7,01 ± 0,53 |
| **F4C1** | 1:0,05 | 22,68 ± 1,52 | 60,49 ± 4,04 | 2,88 ± 0,19 |
| **F4C2** | 1:0,1 | 54,89 ± 2,61 | 73,19 ± 0,78 | 6,65 ± 0,05 |
| **F4C3** | 1:0,2 | 75,03 ± 8,20 | 50,02 ± 5,47 | 8,34 ± 0,91 |
| **F5C1** | 1:0,05 | 0* | 0* | 0* |
| **F5C2** | 1:0,1 | 42,66 ± 4,61 | 56,88 ± 6,14 | 5,17 ± 0,56 |
| **F5C3** | 1:0,2 | 48,44 ± 2,48 | 32,29 ± 1,65 | 5,38 ± 0,28 |
| **F5C4** | 1:0,5 | 46,31 ± 4,02 | 12,35 ± 3,49 | 4,12 ± 0,68 |
| **F6C3** | 1:0,2 | 42,09 ± 3,59 | 28,06 ± 2,67 | 4,68 ± 0,42 |
| **F6C4** | 1:0,5 | 39,12 ± 1,18 | 10,43 ± 0,87 | 3,48 ± 0,28 |

* Spektrofotometrik yöntem ile yüklenen karvedilol miktarı tespit edilememiştir.

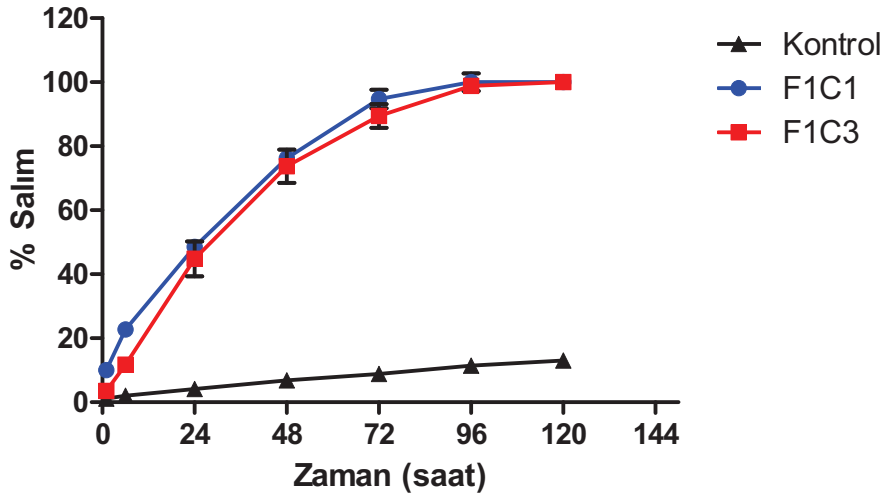
### 4.4.6. Polimerik Misellerin *İn vitro* Salım Çalışmalarına Ait Bulgular

Seçilen polimerik misellerin (F1C1, F1C3, F4C1, F4C3, F5C2 ve F5C3) in vitro salım çalışmalarına ait bulgular Tablo 4-18, Tablo 4-19 ve Tablo 4-20'de, zamana karşı % salım grafikleri ise Şekil 4-16, Şekil 4-17 ve Şekil 4-18'de verilmiştir.

**Tablo 4-18: F1C1 ve F1C3 misel formülasyonlarından karvedilolün salımına ait bulgular (n=3)**

| Zaman (saat) | Karvedilol Salımı (%) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Kontrol Grubu | | F1C1 | | F1C3 | |
| | X | SD (±) | X | SD (±) | X | SD (±) |
| **1** | 1,187 | 0,137 | 10,050 | 0,216 | 3,506 | 1,064 |
| **6** | 2,086 | 0,148 | 22,771 | 2,160 | 11,791 | 0,298 |
| **24** | 4,142 | 0,389 | 48,567 | 1,456 | 44,826 | 5,428 |
| **48** | 6,818 | 0,360 | 76,226 | 1,193 | 73,769 | 5,218 |
| **72** | 8,876 | 0,294 | 94,703 | 2,901 | 89,464 | 3,697 |
| **96** | 11,426 | 1,578 | 99,981 | 2,752 | 98,808 | 1,484 |
| **120** | 13,081 | 1,900 | 100,051 | 0,106 | 99,765 | 0,424 |

X=Ortalama, SD=Standart sapma

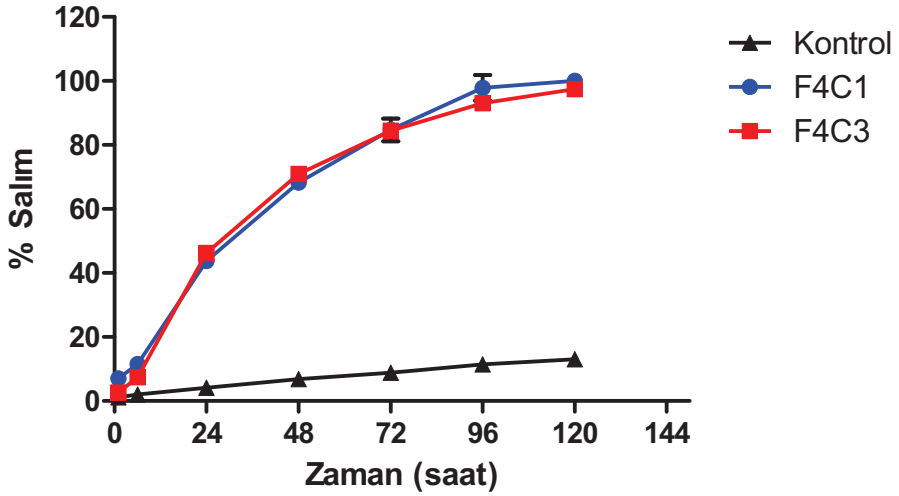



**Şekil 4-16: F1C1 ve F1C3 misel formülasyonlarına ait *in vitro* salım grafiği (n=3)**

**Tablo 4-19: F4C1 ve F4C3 misel formülasyonlarından karvedilolün salımına ait bulgular (n=3)**

| Zaman (saat) | Karvedilol Salımı (%) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Kontrol Grubu | | F4C1 | | F4C3 | |
| | X | SD (±) | X | SD (±) | X | SD (±) |
| **1** | 1,187 | 0,137 | 7,068 | 0,009 | 2,669 | 0,311 |
| **6** | 2,086 | 0,148 | 11,5578 | 1,593 | 7,434 | 2,308 |
| **24** | 4,142 | 0,389 | 43,792 | 2,001 | 46,243 | 1,424 |
| **48** | 6,818 | 0,360 | 68,276 | 1,734 | 70,926 | 0,277 |
| **72** | 8,876 | 0,294 | 84,707 | 3,560 | 84,402 | 0,223 |
| **96** | 11,426 | 1,578 | 97,867 | 3,997 | 93,030 | 0,937 |
| **120** | 13,081 | 1,900 | 100,085 | 0,069 | 97,452 | 1,203 |

X=Ortalama, SD=Standart sapma

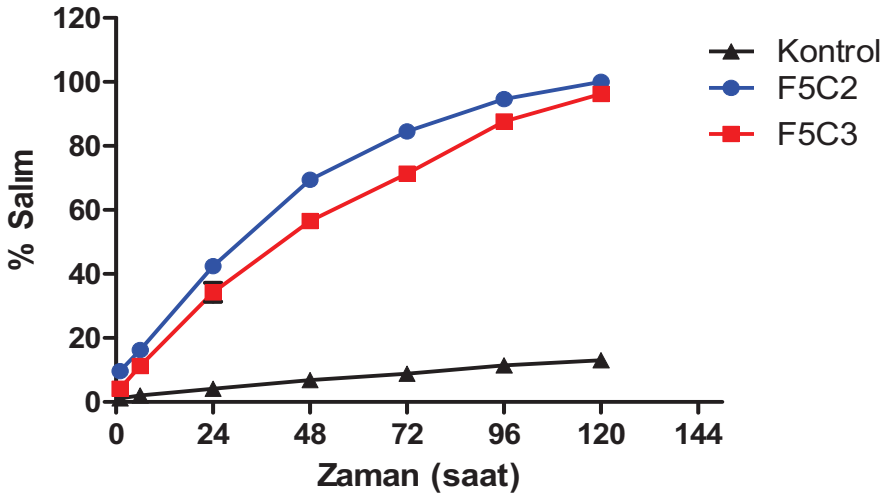



**Şekil 4-17: F4C1 ve F4C3 misel formülasyonlarına ait *in vitro* salım grafiği (n=3)**

**Tablo 4-20: F5C2 ve F5C3 misel formülasyonlarından karvedilolün salımına ait bulgular (n=3)**

| Zaman (saat) | Karvedilol Salımı (%) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Kontrol Grubu | | F5C2 | | F5C3 | |
| | X | SD (±) | X | SD (±) | X | SD (±) |
| 1 | 1,187 | 0,137 | 9,628 | 0,293 | 4,172 | 0,157 |
| 6 | 2,086 | 0,148 | 16,219 | 0,251 | 11,262 | 0,113 |
| 24 | 4,142 | 0,389 | 42,417 | 2,169 | 34,292 | 2,914 |
| 48 | 6,818 | 0,360 | 69,445 | 2,109 | 56,585 | 0,800 |
| 72 | 8,876 | 0,294 | 84,569 | 1,648 | 71,390 | 0,090 |
| 96 | 11,426 | 1,578 | 94,689 | 0,951 | 87,661 | 0,572 |
| 120 | 13,081 | 1,900 | 100,403 | 0,599 | 96,246 | 0,468 |

X=Ortalama, SD=Standart sapma




**Şekil 4-18: F5C2 ve F5C3 misel formülasyonlarına ait *in vitro* salım grafiği (n=3)**

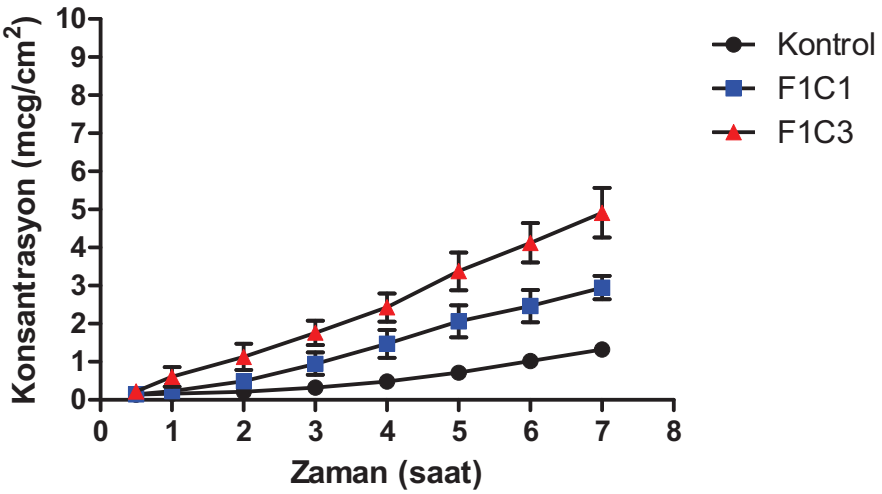
### 4.4.7. Polimerik Misellerin *Ex vivo* Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

Yöntem 3.3.8'de anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen *ex vivo* geçiş çalışmalarına ait bulgular Tablo 4-21, Tablo 4-22 ve Tablo 4-23'te, zamana karşı nazal sığır mukozasından geçen misel formülasyonlarındaki karvedilol konsantrasyonuna ait grafikler ise Şekil 4-19, Şekil 4-20 ve Şekil 4-21'de verilmiştir. Ayrıca çalışmanın 2. saatine kadar olan süre "gecikme zamanı" olarak tespit edilmiş ve 2. saat de dahil olmak üzere 7.saate kadar olan değerler alınarak bu formülasyonların determinasyon katsayısı ($r^2$), akısı (flux) ve permeasyon katsayısı hesaplanmıştır. Bu sonuçlara ait bulgular Tablo 4-24'te verilmiştir.

**Tablo 4-21: F1C1 ve F1C3 misel formülasyonlarınıdaki karvedilolün nazal sığır mukozasından geçişine ait bulgular (n=3)**

| Zaman (saat) | Nazal Sığır Mukozasından Geçen Karvedilol Miktarı (mcg/cm$^2$) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Kontrol Grubu | | F1C1 | | F1C3 | |
| | X | SD (±) | X | SD (±) | X | SD (±) |
| **0,5** | 0,134 | 0,002 | 0,149 | 0,007 | 0,221 | 0,051 |
| **1** | 0,166 | 0,002 | 0,233 | 0,038 | 0,605 | 0,255 |
| **2** | 0,210 | 0,017 | 0,485 | 0,149 | 1,129 | 0,342 |
| **3** | 0,318 | 0,027 | 0,948 | 0,296 | 1,762 | 0,321 |
| **4** | 0,477 | 0,057 | 1,470 | 0,365 | 2,426 | 0,372 |
| **5** | 0,716 | 0,043 | 2,060 | 0,422 | 3,377 | 0,496 |
| **6** | 1,021 | 0,013 | 2,463 | 0,424 | 4,123 | 0,517 |
| **7** | 1,325 | 0,102 | 2,943 | 0,309 | 4,909 | 0,650 |

X=Ortalama, SD=Standart sapma

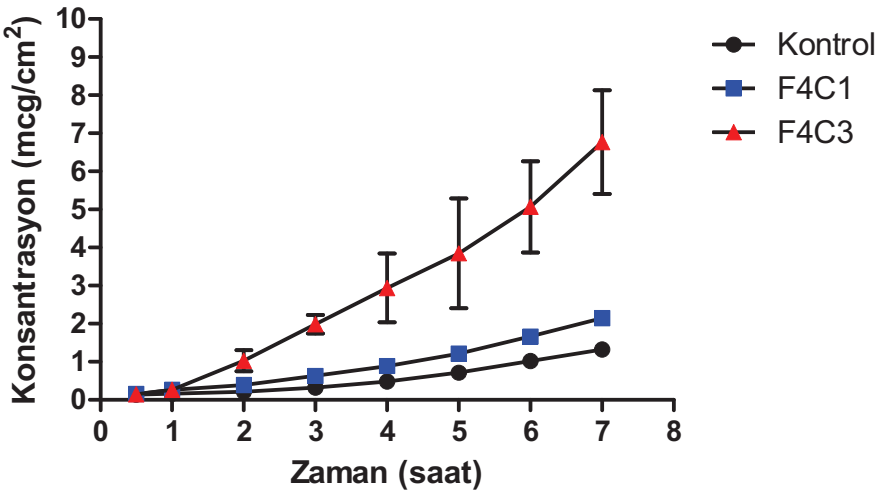



**Şekil 4-19**: **F1C1 ve F1C3 misel formülasyonlarındaki karvedilolün sığır nazal mukozasından geçişine ait grafik (n=3)**

**Tablo 4-22: F4C1 ve F4C3 misel formülasyonlarınıdaki karvedilolün nazal sığır mukozasından geçişine ait bulgular (n=3)**

| Zaman (saat) | Nazal Sığır Mukozasından Geçen Karvedilol Miktarı (mcg/cm$^2$) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Kontrol Grubu | | F4C1 | | F4C3 | |
| | X | SD (±) | X | SD (±) | X | SD (±) |
| **0,5** | 0,134 | 0,002 | 0,152 | 0,011 | 0,149 | 0,009 |
| **1** | 0,166 | 0,002 | 0,262 | 0,058 | 0,262 | 0,0244 |
| **2** | 0,210 | 0,017 | 0,388 | 0,126 | 1,028 | 0,279 |
| **3** | 0,318 | 0,027 | 0,631 | 0,157 | 1,991 | 0,242 |
| **4** | 0,477 | 0,057 | 0,889 | 0,041 | 2,941 | 0,905 |
| **5** | 0,716 | 0,043 | 1,211 | 0,106 | 3,845 | 1,444 |
| **6** | 1,021 | 0,013 | 1,663 | 0,103 | 5,069 | 1,197 |
| **7** | 1,325 | 0,102 | 2,149 | 0,140 | 6,768 | 1,361 |

X=Ortalama, SD=Standart sapma

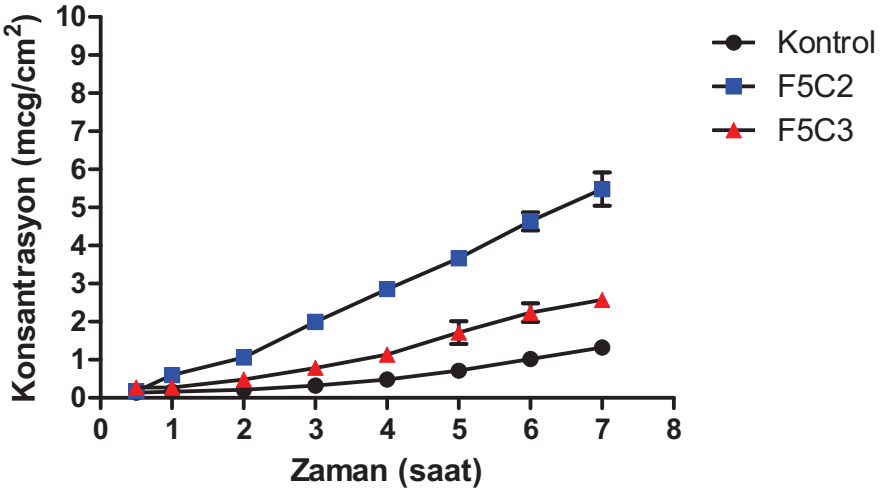



**Şekil 4-20 : F4C1 ve F4C3 misel formülasyonlarındaki karvedilolün sığır nazal mukozasındangeçişine ait grafik (n=3)**

**Tablo 4-23: F5C2 ve F5C3 misel formülasyonlarınıdaki karvedilolün sığır nazal mukozasından geçişine ait bulgular (n=3)**

| Zaman (saat) | Nazal Sığır Mukozasından Geçen Karvedilol Miktarı (mcg/cm$^2$) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Kontrol Grubu | | F5C2 | | F5C3 | |
| | X | SD (±) | X | SD (±) | X | SD (±) |
| **0,5** | 0,134 | 0,002 | 0,175 | 0,030 | 0,272 | 0,006 |
| **1** | 0,166 | 0,002 | 0,592 | 0,003 | 0,267 | 0,011 |
| **2** | 0,210 | 0,017 | 1,062 | 0,016 | 0,478 | 0,133 |
| **3** | 0,318 | 0,027 | 1,992 | 0,018 | 0,790 | 0,188 |
| **4** | 0,477 | 0,057 | 2,850 | 0,105 | 1,136 | 0,174 |
| **5** | 0,716 | 0,043 | 3,663 | 0,130 | 1,710 | 0,301 |
| **6** | 1,021 | 0,013 | 4,635 | 0,239 | 2,237 | 0,241 |
| **7** | 1,325 | 0,102 | 5,481 | 0,436 | 2,571 | 0,071 |

X=Ortalama, SD=Standart sapma




**Şekil 4-21**: **F5C2 ve F5C3 misel formülasyonlarındaki karvedilolün sığır nazal mukozasından geçişine ait grafik (n=3)**

**Tablo 4-24: Sığır nazal mukozasından geçen karvedilol miktarına ait hesaplamalar (n=3)**

| | Kontrol Grubu | F1C1 | F1C3 | F4C1 | F4C3 | F5C2 | F5C3 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Determinasyon Katsayısı ($r^2$)** | 0,968 | 0,998 | 0,997 | 0,977 | 0,989 | 0,999 | 0,996 |
| **OrtalamaFlux (mcg/cm²/sa) ± SD** | 0,401 ±0,025 | 0,881 ±0,083 | 1,362 ±0,114 | 0,617 ±0,035 | 2,401 ±0,446 | 1,558 ±0,136 | 0,770 ±0,053 |

SD= Standart Sapma

# 5. TARTIŞMA

Karvedilol hipertansiyon, anjina pektoris, kronik kalp yetmezliği ve koroner kalp hastalığı tedavisinde kullanılan hem alfa ($\alpha_1$-) hem de selektif olmayan (β)-blokörü etkileri olan bir adrenerjik reseptör blokörüdür (Üstünes 2011).

Karvedilol, gastrointestinal kanaldan absorbe olur, fakat karaciğerde ilk geçiş metabolizmasına uğradığından biyoyararlanımı % 25-35 civarındadır. (Sweetman 2002 pp. 855-856; Üstünes 2011). Karvedilolün piyasada ticari olarak sadece tabletleri bulunmaktadır (Üstünes 2011).

Nazal yol, oldukça geniş bir absorpsiyon alanına sahip olması, poröz ve ince endotelinin olması, damarlanmanın fazla ve kan akış hızının hızlı olması ve karaciğer ilk geçiş etkisinin olmamasına bağlı olarak ilaçların absorpsiyonun fazla olması, doz aşımı riskinin düşük olması ve iyi hasta uyuncu gibi avantajları nedeniyle pek çok ilacın alternatif veriliş yolu haline gelmiştir (Myging ve Dahl 1998; Güngör ve Özsoy 2009). İlaçların nazal mukozadan geçişini arttımak için absorpsiyon artırıcı maddelerin (şelat oluşturucu maddeler, yüzey etkin maddeler, yağ asitleri, siklodekstrinler) formülasyona ilavesi ile farklı stratejiler (nazal enzim inhibitörleri, ön ilaç (prodrug) yaklaşımı ve nano- ve mikropartiküler sistemlerin kullanımı) kullanılmaktadır (Güngör ve Özsoy 2009).

Son zamanlarda ise sulu bir ortamda amfifilik blok kopolimerlerden oluşan polimerik miseller, suda çözünürlüğü iyi olmayan etkin maddelerin çözünürlüğünü artırmak için gelecek vaad eden formülasyonlar olarak ilgi çekmektedirler. Blok kopolimer miseller tipik çekirdek-kabuk yapısında nano boyutlu partiküllerdir. Sulu bir ortamda kabuk misel süspansiyonunu sağlarken çekirdek de hidrofobik etkin maddeyi hapseder (Amiji 2007 pp.385-408). Literatürde polimerik misellerin nazal mukozadan geçişi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sistemler ile nazal yolla hidrofobik etkin maddelerin uygulanması ile ilgili olarak sadece teorik olarak uygunlukları belirtilmiştir, fakat pratikte sadece bu sistemler ile nazal gen salımına ait bir çalışma (Zhang ve ark. 2008) yer almaktadır.

Yapılan tez çalışmasında; karvedilolün çözünürlüğünün artırılması, buna bağlı olarak da nazal mukozadan geçişinin artırılmasını sağlamak amacıyla, sulu ortamda

misel oluşturabilen sentetik diblok kopolimerler sentezlenmiştir. Sentezlenen bu kopolimerlere PEI bağlanarak katyonik yapı kazandırılmıştır. Böylece nazal mukozadaki glikoproteinlerin negatif yüklü sialik asit parçaları arasında bir etkileşimin söz konusu olacağı ve buna bağlı olarak da nazal mukozadaki mukosiliyer klirensin azalacağı ve dolayısıyla ilacın absorpsiyonun artacağı düşünülmüştür. Sentezlenen polimerlerle hazırlanan misellere karvedilol yüklenmiştir. Misellerin karakterizasyonları ve yükleme etkinlikleri değerlendirilerek uygun bulunan formülasyonlar üzerinde *in vitro* salım ve sığır nazal mukozasından *ex vivo* geçiş çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Yapılan çalışmada öncelikle karvedilolün IR spektrumu alınmıştır. Elde edilen bu IR spektrumu ile literatürde (Jagannathana ve ark. 2010) kayıtlı spektrumun uyum gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.1).

Karvedilolün diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) ile yapılan termal analizinde erime noktası 116,8ºC olarak tespit edilmiştir (Şekil 4-2). Elde edilen bu termogram literatürde (Ubaidulla ve ark. 2007) kayıtlı termogram ile uyumludur.

Karvedilolün miktar tayini analizleri için spektroforometrik ve HPLC yöntemi kullanılmıştır. Her iki metot için yapılan analitik validasyon çalışmaları ile bu yöntemlerin doğrusallıkları, doğrulukları, kesinlikleri, seçicililikleri, teşhis limitileri, miktar tayini limitileri ve stabiliteleri kanıtlanmıştır. Doğrusallık çalışmalarında spektrofotometrik ve HPLC yöntemleri için oluşturulan kalibrasyon doğrularının (sırasıyla Şekil 4-3 ve Şekil 4-4) determinasyon katsayılarının yüksek olması (sırasıyla $r^2$>0,9999 ve $r^2$>0,9997) ve her konsantrasyondaki absorbanslara ve pik alanlarına ait % RSD değerlerinin (sırasıyla Tablo 4-1 ve Tablo 4-6) % 2'nin altında olması ile bu yöntemlerin karvedilolün miktar tayininde kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Yöntemlerin doğruluğu için elde edilen sonuçlar spektrofotometrede ve HPLC yöntemleri için elde edilen geri kazanım değerlerinin (sırasıyla %100,87-101,91 ve %98,08-99,50) istenen sınırlar (%100±2) içerisinde olduğu saptanmıştır (sırasıyla Tablo 4-2 ve Tablo 4-7). Her iki yöntemde de gün içi kesinlik (sırasıyla Tablo 4-3 ve Tablo 4-8) ve günler arası kesinlik (sırasıyla Tablo 4-4 ve Tablo 4-9) çalışmalarının sonucunda elde edilen % RSD değerleri % 2'den küçük bulunmuş ve yöntemlerin kesinliği kanıtlanmıştır.

Seçicilik çalışmalarının sonucunda spektrofotometrede polimerlerin karvedilolün absorbans verdiği dalga boyunda (243 nm) absorbans vermediği, dolayısıyla yöntemin, misel formülasyonlarındaki karvedilol analizi için seçici olduğu kanıtlanmıştır. HPLC'de yapılan seçicilik çalışmasında ise kullanılan polimerlerin etkin maddenin pik verdiği alıkonma zamanında pik vermediği tespit edilmiştir. Bu çalışmalar ile HPLC yönteminin de, misel formülasyonlarındaki karvedilol analizi için seçici olduğu kanıtlanmıştır.

Spektrofotometrik miktar tayini yöntem için teşhis ve miktar tayini limitleri sırasıyla 0,0576 mcg/ml ve 0,1745 mcg/ml, HPLC miktar tayini yöntemi için ise teşhis ve miktar tayini limitileri sırasıyla 0,0040 mcg/ml ve 0,0122 mcg/ml olarak bulunmuştur. Karvedilolün miktar tayini çözeltilerindeki stabilite çalışmalarında, her iki yöntemde de etkin maddenin stabil kaldığı ve RSD değerleri % 2'den küçük olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4-5 ve Tablo 4-10).

*İn vitro* salım çalışmaları sırasında misel formülasyonlarının 120 saat boyunca 37°C sıcaklıkta ultra saf suda stabil kaldığının kanıtlanması amacıyla yapılan çalışmalarda, karvedilolün stabilitesi kanıtlanmıştır (Tablo 4-11).

Karvedilolün *in vitro* çalışmalarda salım ortamı olarak kullanılan ultra saf suda ve *ex vivo* geçiş çalışmalarında kullanılan Ringer çözeltisindeki çözünürlüğünün sırası ile 10,320±2,461 µg/ml ve 2,374±0,145 µg/ml olduğu hesaplanmıştır (Tablo 4-12).

Sentezlenen polimerlerin FTIR analizlerinde; diblok kopolimerlerin hepsinde kaprolakton ve laktat için 1720 $cm^{-1}$'de karbonil grubuna ait güçlü bir pik gözlenirken, PEG blokları sırasıyla 1100 $cm^{-1}$'de C-O titreşimi, 3000 $cm^{-1}$'de ise alifatik metilen grupları olarak ortaya çıkmıştır. Kopolimerleşmenin mevcudiyeti bu piklerden doğrulanmaktadır (Karagöz, 2009). NMR Analizlerinde ise; PLL-b-mPEG2000 için en belirleyici pikler, laktat grubuna ait –CH protonu, $-CH_3$ protonları ve PEG'e ait metoksi protonlarıdır. Bunlar diğer protonlarla birlikte NMR spektrumlarında görülmüştür (Karagöz, 2009). Sentezlenen polimerlerin molekül ağırlıklarının 5665 ile 12869 arasında olduğu (Tablo 4-13) ve çalışmada kullanılan aynı yöntem ile diblok kopolimer yapısına PEI'nın bağlandığı GPC ile de daha önce kanıtlanmıştır (Dinçer ve ark. 2011). Bu nedenle PEI bağlı diblok kopolimerlerin molekül ağırlıkları diblok kopolimerlerine PEI (MA:2000 g/mol) homopolimerinin molekül ağırlıklarının eklenmesiyle hesaplanabilmektedir. PEI bağlı polimerlerdeki amin grubuplarının miktarının

mPEG2000-b-PCL, mPEG5000-b-PCL, mPEG2000-b-PLL ve mPEG5000-b-PLL polimerleri için sırasıyla 0,14, 0,06, 0,15 ve 0,14 olduğu saptanmıştır (Tablo 4-14).

Sentezlenen polimerlerin sitotoksite çalışmasının sonucunda artan polimer miktarlarının toksisiteye sebep olduğu görülmüştür. Ayrıca, PEG zincir uzunluğunun artmasıyla birlikte canlı hücre miktarı da artış göstermiştir (Şekil 4-5). Bunun sebebi, PEG zincirlerinin olası toksisite sebebi olan pozitif yükün maskelenmesini sağlaması olabilir. PEG'in yüksek biyouyumluluğu ve hidrofilisitesi sebebiyle ilaç veya DNA taşıyıcı sentetik moleküllerin kanda kalış süresini arttırdığı bilinmektedir (Dinçer ve ark. 2011).

Sentezlenen polimerlerle misellerin oluşturulması ve ilaç yüklenmesi üzerine yapılan ön formülasyon çalışmalarında; karvedilolü çözündürmek için kullanılacak organik fazın cinsi ve miktarı çalışması gerçekleştirilmiştir. Çekirdeği oluşturan segmentin etkin maddeye olan afinitesinin yanı sıra organik fazın oranı ve yapısı gibi proses parametreleri etkin madde yüklü polimerik misellerin hazırlanmasını ve misel boyutu ile yükleme etkinliğini etkileyebileceği literatürde kayıtlıdır (Gaucher ve ark. 2005). Shin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (1998) ise, çözücü olarak tetrahidrofuran (THF) ve dimetilformamidin (DMF) misel boyutu ve yükleme etkinliği üzerine etkileri incelenmiş ve DMF ile hazırlanan misellerin THF ile hazırlananlara göre daha küçük boyuta sahip olmalarına rağmen, daha yüksek yükleme etkinliğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar karvedilol yüklü mPEG-b-PCL, mPEG- b-PLL ve karvedilol yüklü PEI bağlı mPEG-b-PCL, mPEG- b-PLL miselleri hazırlamak için farklı çözücülerin denenmesi gerektiğini göstermektedir. Bu amaçla ön formülasyon aşamasında organik çözücü olarak çeşitli miktarlarda (1 ml, 5ml ve 10 ml) aseton ve asetonitril çözücüleri kullanılmıştır. 10 ml asetonitril kullanımı ile en küçük misel boyutu tespit edilmiştir. Diğer oranlarda asetonitril ve aseton kullanımı ile oluşturulan ilaç yüklü miseller ise olması gereken misel boyutundan (<200 nm) (Kim ve ark. 1998) çok daha büyük olduğu için yükleme etkinliklerine bakılmamıştır.

Sentezlenen polimerlerle hazırlanan misellerin CMC çalışmalarında; belirli bir konsantrasyon değerine kadar (0,5 mg/ml) DLS ile yapılan ölçümlerde yoğunlukta önemli bir değişim meydana gelmemiştir. Bununla birlikte bu değerden sonra polimerlerin hepsinde keskin bir artış gözlenmiştir. Bu konsantrasyon CMC olarak kabul edilebilir. Bu konsantrasyon değeri ile birlikte boyutta kayda değer bir azalma da

gözlenmiştir. Bu durum misel yapıları oluşumundan dolayı meydana gelmiş olabilir. Bu artış laktatlı diblok kopolimerlerde gözlenmiştir. Bu durum bu polimer ile daha kolay misel oluştuğu anlamına gelmektedir. Diblok kopolimer yapıya PEI eklenmesi misel oluşumunu çok fazla etkilememiştir. Sadece bir hidrofilik blok, bir de hidrofobik bloğu olduğu için misel oluşumunun diblok kopolimer için daha kolay olacağı düşünülmektedir. PEI bağlı olan polimerlerde ise toplam polimer zinciri sonlarda iki hidrofilik, ortada bir hidrofobik kısım oluşturmaktadır. Diblok kopolimerlerin ve PEI bağlı kopolimerlerin hepsi hidrofilik-hidrofobik denge açısından çok farklı yapılara sahip olmadıkları için yakın CMC değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).

Sentezlenen polimerlerle hazırlanan ilaç yüklenmiş ve yüklenmemiş misellerin partikül boyutu analizlerinde; etkin madde yüklü misellerin boyutlarının 140,0 nm ile 279,9 nm arasında değiştiği ve polidispersite indeksine bakıldığında ise boyut dağılımının dar olduğu saptanmıştır (Tablo 4-15). Bu sonuçlar blok kopolimer zincirlerinin büyük bir agregasyon olmaksızın tek düze miseller oluşturduğunu göstermektedir. Ancak, misel formülasyonlarında etkin madde artışı ile beraber misel oluşumunun da durduğu gözlenmektedir. Bunun nedeni yüklü etkin madde artışıyla birlikte stabilitenin azalmasına bağlanabilir. Oluşan misellerin kolloidal stabilitesi, normalde etkin madde yüklenmesinden sonra hidrofobisitenin artması ile azalmakta, bu durum misellerin agregasyonuna yol açmaktadır (Amiji 2007 pp. 385-408). Dolayısıyla misel oluşmuş olsa bile stabilitenin iyi olmamasından dolayı, partikül boyutu ölçümlerinde misel oluşumu gözlenememiş olabilmekte, bu durum çalışmamızda da görülmektedir (Tablo 4-15). PEI bağlı olmayan diblok kopolimerler ile oluşturulan misel formülasyonlarında ise etkin madde yüklü olmayan formülasyonlarda (F1, F2, F3 ve F4) partikül boyutu etkin madde yüklü olanlara göre daha büyük olarak saptanmıştır. Bu durum etkin maddenin çekirdekteki hidrofobisiteyi artırması ve daha sıkı misel oluşumuna neden olması ile açıklanabilir.

PEI bağlı olan diblok kopolimer ile oluşturulan misel formülasyonlarında etkin madde olmadan misel oluşumunun gerçekleşmediği gözlenmektedir (Tablo 4-15). Bu durum PEI bağlı olmayan diblok kopolimer ile karşılaştırıldığında PEI'nin hidrofilik özellikte olmasından dolayı hidrofilik/hidrofobik dengenin bozulmuş olması ile açıklanabilir. Nitekim PEI bağlı diblok kopolimerlerin bulunduğu ortama etkin madde çözeltisi eklendiğinde çekirdekteki hidrofobisiteninin artırılarak hidrofilik/hidrofobik

dengenin düzeldiğini ve misel oluşumlarının gözlenmeye başlandığını söylemek mümkün olabilir. Ayrıca PEI bağlı mPEG2000-b-PLL ve PEI bağlı mPEG5000-b-PLL kopolimerler ile hiç misel oluşmaması PLL'nin hidrofobisitesinin ve kristalinitesinin PCL'ye göre düşük olması da söz konusu hidrofilik /hidrofobik dengenin misel oluşumunda önemli olduğunu kanıtlamaktadır.

Hazırlanan etkin maddde yüklü polimerik misellerin enkapsülasyon etkinliği % 10 ,43 ile % 77,14 arasında değişkenlik göstermiştir (Tablo 4-17). Yükleme kapasitesi ise %2.09-8.34 arasında değişmiştir (Tablo 4-17). En yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip olan formülasyonlar mPEG5000-b-PLL polimeri ile hazırlananların olduğu görülmüştür. İlaç yükleme kapasitesi verilerine bakıldığında PEI bağlı olmayan formülasyonlarda etkin madde miktarı artışı ile yükleme kapasitesinin arttığı tespit edilmiştir.

İlaç yükleme kapasitesi ile partikül boyutu arasındaki ilişki incelendiğinde, çalışmamızda misel içindeki % etkin madde miktarı artışı ile partikül boyutunun arttığı görülmüştür. Literatürde, çözünen ilacın çekirdeğin büyümesine yol açtığı ve buna bağlı olarak da misel boyutunun artışı gösterilmiştir (Torchilin 2005). PEI bağlı olan formülasyonların enkapsülasyon etkinliği incelendiğinde; etkin madde konsantrasyonunun artışı ile enkapsülasyon etkinliğin azaldığı saptanmıştır (Tablo 4-17). Artan etkin madde konsantrasyonu sonucu etkin maddenin agregat oluşturmasına bağlı olarak yükleme etkinliğini düşebilmektedir (Shin ve ark. 1998).

Misellerdeki ilaç çözünürlüğü ilacın sudaki intrinsik çözünürlüğüne kıyasla yüksek bulunmuştur. Karvedilolün sudaki çözünürlüğü 7,46 μg/ml iken (Tablo 4-12) misellere yüklendiğindeki çözünürlüğü 16,49 μg/ml ile 75,03 μg/ml arasında (Tablo 4-17) saptanmıştır.

Boyutları, dağılımları ve yükleme kapasiteleri uygun olan etkin madde yüklü olan ve olmayan polimerik misellerin Zeta potansiyelleri ZetaSizer (Malvern, UK) ile saptanmıştır. PEI bağlı olmayan diblok kopolimerler ile oluşturulan etkin madde yüklü olan ve olmayan miseller negatif yüklü, PEI bağlı olan diblok kopolimerler ile oluşturulan etkin madde yüklü olan ve olmayan miseller ise pozitif yüklü olarak saptanmıştır (Tablo 4-16). Negatif yük, ilaç misel içindeki % etkin madde miktarı artıkça azalmıştır. Bunun nedeni pKa'sı 7,8 (British Pharmacopeia 2006) olan

karvedilolün zayıf bazik özelliğinden kaynaklanmaktadır. Pozitif yük ise, misel içindeki % etkin madde miktarı artışı ile sabit kalmıştır (Tablo 4-16).

mPEG-b-PLL ve mPEG-b-PCL amfifilik blok kopolimerleri sulu ortamda küresel miseller oluştururlar (Torchilin 2001; Amiji 2007 pp. 385-408). Oluşan etkin madde yüklü misel formülasyonlarında (F4C1 ve F4C3) misellerin küresel (sferik) bir morfolojiye sahip olduğu SPM analizleri ile kanıtlanmıştır (Şekil 4-14, Şekil 4-15). SPM analizleri sonucunda tespit edilen her iki formülasyondaki misellerin ortalama çapının 20-25 nm arasında olduğu görülmüştür. Normalde etkin madde miktarı az olan formülasyonda (F4C1) daha küçük misellerin gözlenmesi gerekmekteydi. Bu iki formülasyondaki misellerin de birbirlerine hemen hemen yakın boyutlarda olmasının nedeni SPM analizi için numune hazırlama aşamasında $MgCI_2$ kullanımına bağlanabilir. $Mg+^2$ iyonları polimerin negatif yüklü grupları ile elektrostatik olarak etkileşebilecektir. Ayrıca etkin madde yüklü misel çekirdeğinde de hidrofobik etkileşimler bulunmaktadır. Bu hidrofobik etkileşimler daha fazla etkin madde yüklü formülasyonda (F4C3) daha büyüktür. Dolayısıyla hidrofobik etkileşim kuvvetlerinin fazla olması elektrostatik çekim kuvvetleri nedeni ile miseller yapının çok fazla gevşemesine izin vermemiş olabilir. Fakat daha az etkin madde yüklü yani daha az hidrofobik etkileşime sahip formülasyonda (F4C1) elektrostatik çekim kuvvetleri daha küçük olması gereken misel yapıların gevşemesini sağlayarak daha büyük görüntülenmesine sebep olabileceği düşünülmüştür.

SPM'de elde edilen misel boyutları (ortalama 20-25 nm) ZetaSizer'da elde edilenlere (140,0-279,9 nm arasında, Tablo 4-15) oranla oldukça küçüktür. Hazırlanan misellerin boyut ve boyut dağılımı için aslında ZetaSizer kullanılmıştır. Fakat SPM cihazı ile elde edilen değerlerin daha gerçekçi olduğunu söylemek mümkünkür. Çünkü ZetaSizer ölçümlerinde sulu fazda partikülün etrafında suyun içinde bulunan serbest iyonların toplanmasıyla bir difüzyon tabakası oluşmaktadır. ZetaSizer cihazındaki ölçümler sırasında oluşan bu difüzyon tabakası da hesaba katılarak partikül boyutu hesaplanmaktadır. Dolayısıyla hesaplanan partikül boyutu gerçekte olandan daha fazla olabileceği literatürde kayıtlıdır (Karagöz 2009).

Partikül boyutu ve etkin madde yükleme kapasitelerine göre seçilmiş misel formülasyonlarının (F1C1, F1C3, F4C1, F4C3, F5C2 ve F5C3) diyaliz tüpünden 120 saat takip edilen *in vitro* salım sonuçlarına göre; kontrol grubu ile aralarında anlamı bir

fark ($p<0,05$) oluşmamıştır. Etkin madde miktarı fazla olan formülasyonların genelde daha düşük salım profili gösterdiği ancak aralarında anlamlı bir fark ($p>0,05$) olmadığı görülmüştür. Bütün formülasyonlarda 120 saat sonunda serbestleşen karvedilol miktarı %100'e ulaşmıştır (Tablo 4-18, Tablo 4-19 ve Tablo 4-20) (Şekil 4-16, Şekil 4-17 ve Şekil 4-18). Benzer şekilde Geldanamisin ön ilacı da mPEG-PCL misellerinden 2,2-9,6 gün yarılanma ömrü göstererek salım yapmıştır (Forrest 2006). Ayrıca PEG-b-PLA misellerinden Amfoterisin B'nin salımı 80 saatte % 80'e ulaşmıştır (Yang ve ark. 2008). Kim ve arkadaşlarının (1998) çalışmasında da ilaç yükleme içeriği artıkça salım hızı azalmıştır. İlaç salım seviyesinin misel içinde tutulan ilacın miktarına bağlı olduğu görülmekle birlikte çalışmamızda, kullanılan polimerlerin (mPEG2000-b-PCL, mPEG5000-b-PLL ve mPEG2000-b-PCL-PEI) üçünün de birbirine çok yakın CMC değerlerine (0,5 mg/ml civarında) sahip olmasından dolayı salım profillerinde anlamlı bir fark görülmemiştir.

Yu ve arkadaşlarının (2004) çalışması modifiye edilerek seçilen formülasyonlar (F1C1, F1C3, F4C1, F4C3, F5C2 ve F5C3) için sığır nazal mukozasının lateral kısmından Franz difüzyon hücreleri kullanılarak karvedilol yüklü polimerik misellerin geçişleri araştırılmıştır. Hazırlanan formülasyonlardan misellerin geçiş çalışmaları sonuçları incelendiğinde; bütün formülasyonların 2 saat'lik bir gecikme zamanına (lag time) sahip oldukları ve kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$) etkin madde geçişi sağladıkları görülmüştür. F1C1 ve F1C3, F5C2 ve F5C3 formülasyonların *ex vivo* verileri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde aralarında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). Ancak F4C1 ve F4C3 formülasyonları da kendi aralarında kıyaslandığında reseptör faza geçen etkin madde miktarları arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu formülasyonlarda küçük boyuta sahip olan F4C1'deki misellerin nazal mukozadan daha fazla geçmesi beklenirken tersi olmuştur. Bunun nedeni, F4C1'in negatif yükünün F4C3'den fazla olması, dolayısıyla negatif yüklü mukoza tarafından itilmesidir.

Seçilen formülasyonların akı (flux) değerleri mukayese edildiğinde; en yüksek değerin F4C3, F5C2 ve F1C3 formülasyonları ile elde edildiği (sırasıyla 2,401 $mcg/cm^2/sa$, 1,558 $mcg/cm^2/sa$ ve 1,362 $mcg/cm^2/sa$) görülmektedir (Tablo 4-24). mPEG5000-b-PLL diblok kopolimeri ile hazırlanan ve polimer-ilaç oranı 1:0,2 olan F4C3 formülasyonunun yükleme kapasitesinin yüksek ve negatif yükünün F1C3

(mPEG2000-b-PCL; polimer-ilaç oranı 1:0,2)'e nazaran düşük olması nedeniyle en yüksek akıyı sağlamıştır.

Sonuç olarak; çalışmada anyonik ve katyonik yapılı polimerler ile karvedilol yüklü misellerin hazırlanabileceği ve nazal olarak uygulanabileceği gösterilmiştir. İleride misel formülasyonlarının stabilitelerinin saptanması ve *in vivo* değerlendirilmesi hedeflenmektedir.

# KAYNAKLAR

Access BCS Classification System**.** Erişim Tarihi: 15.04.2010, http://www.tsrlinc.com/resources/services/

Allen, C., , Han, J., Yu, Y., Maysinger, D. ve Eisenberg, A. (2000). Polycaprolactone-b-pol(ethylene glycol) micelles as a delivery vehicle for dihydrotestosterone. *J. Contr. Rel.* **63,** 275-286.

Andersson, M.M. ve Hatti-Kaul, R. (1999). Protein stabilising effect of polyethyleneimine. *Journal of Biotechnology*, **72**, 21-31.

Arora, P., Sharma, S. ve Garg, S. (2002). Permeability issues in nasal drug delivery. *Drug Discov. Today*, **7**, 967-975.

Bae, Y., Nishiyama, N., Fukushima, S., Koyama, H., Yasuhiro, M. Ve Kataoka, K.. (2005). Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular ph-triggered drug release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution and enhanced ın vivo antitumor efficiancy. *Bioconjugate Chemistry*, **16**, 122-130.

Batrakova, E.V., Bronich, T.K., Vetro, J.A. ve Kabanov, A.V. (2006). Polymer micelles as drug carriers. İçinde V.P. Torchilin (Ed.). *Nanoparticulates as drug carriers.* London: Imperial College Press; 57-94.

Behl, C.R., Pimplaskar ,H.K., Sileno, A.P., Meireles, J. ve Romeo, V.D. ( 1998). Effect of physicochemical properties and other factors on systemics nasal drug delivery. *Adv Drug Deliver Rev.*, **29**, 89-116.

Behl, C.R., Pimplaskar, H.K., Sileno, A.P. (1998). Optimization of systemic nasal drug delivery with pharmaceutical excipients. *Adv Drug Deliv Rev*, **29**,117-133.

Bertram, U. ve Bodmeier, R. (2006). In situ gelling, bioadhesive nasal inserts for extended drug delivery: In vitro characterization of a new nasal dosage form. *Eur J Pharm Sci*., **27**, 62-71.

Bhise, S.B. ve Yadav, A.V. (2008). Bioavailability of intranasal drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutics,* **2**, 201-215.

Bjork, E. ve Edman, P. (1988). Degradable starch microspheres as a nasal delivery system for insulin. *Int J Pharm*., **47**, 233-238.

Blanco, E., Bey, E.A., Dong, Y., Weinberg, B.D., Sutton, D., Boothman, D.A. ve Gao, J. (2007). β-Lapachone-containing PEG-PLA polymer micelles as a novel nanotherapeutics against NQO1 –overexprsing tumor cells. *Journal of Controlled Release,* **122**, 365-374.

British Pharmacopeia (2006). Version 6.2. Index System Simulation Ltd.; Data Crown Copyright.

Burt, H., Zhang, X., Toleikis, P., Embree, L. ve Hunter, W.L. (1999). Development of copolymers of poly(d,l-lactide) and methoxy poly(ethylene glycol) as micellar carriers of paclitaxel. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* **16,** 161-171.

Calbicor, Erişim:15.05.2011, http://www.santafarma.com.tr/pdf-files/Calbicor-6.25mg-Tablet.pdf

Callens, C., Ceulemans, J., Ludwig, A. (2003). Rheological study on mucoadhesivity of some nasal powder formulations. *Eur J Pharm Biopharm*, **55**, 323-328.

Callens, C., Pringels, E. ve Remon, J.P. (2003). Influence of multiple nasal administrations of bioadhesive powders on the insulin bioavailability. *Int J Pharm*, **250**, 415-422.

Cappello, B., Rosa, G.D., Giannini, L., Immacolata La Rotonda, M., Mensitieri, G., Miro, A. ve ark. (2006). Cyclodextrin containing poly(ethyleneoxide) tablets for the delivery of poorly soluble drugs: Potential as buccal delivery system. *International Journal of Pharmaceutics,* **319,** 63–70.

Carstens, M.G., Rijcken, C.J.F., Nostrum, C.F. ve Hennink, W.E. (2008). Pharmeceutical miselles : Combining longevity, stability and stimuli sensitivity. İçinde V. Torchillin (Ed.), *Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers*. USA:Springer Science+Business Media;263-308.

Cha, E.J., Kim, J.E. ve Ahn, C.H. (2009). Stabilized polymeric micelles by electrostatic interactions for drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **38(4)**, 341-346.

Chatterjee, B. ve Pal, T.K. (2010). Development and in vitro evaluation of micronized sustained release matrix tablet of carvedilol. *IJPSR*, **1(10),** 96-102.

Chaurasia, G., Bhadra, D., Bhadra, S. ve Jain, N.K. (2005). UV Spectrophotometric determination of carvedilol. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **6**, 606-608.

Chien, Y.W., Su, K.S.E. ve Chang, S. (1989). *Nasal Systemic Drug Delivery; Marcel Dekker*: New York

Cho, K.C., Choi, S.H. ve Park, T.G. (2006). Low molecular weight PEI conjugated pluronic copolymer: useful additive for enhancing gene transfection efficiency. *Macromolecular Research*, **14(3),** 348-353.

Clohs, L. ve McErlane, K.M. (2001). Development of a capillary electrophoresis assay for the determination of carvedilol enantiomers in serum using cyclodextrins. *J. Pharm. Biomed. Anal.*. **24**, 545-554.

Corbo, D.C., Liu, J.C. ve Chien, Y.W. (1989). Drug absorption through mucosal membranes: Effect of mucosal route and penetrant hydrophilicity. *Pharm. Res.*, **6**, 848-852.

Cornaz, A.L. ve Buri, P. (1994). Nasal mucosa as an absorption barrier. *Eur J Pharm Biopharm.*, **40**, 261-270.

Craparoa, E.F., Teresi, G., Bondi, M., Licciardi, M. ve Cavallaro, G. (2011). Phospholipid–polyaspartamide micelles for pulmonary delivery of Corticosteroids. *International Journal of Pharmaceutics*, **406**, 135–144.

Croy, S.R. ve Kwon, G.S. (2004). The effects of pluronic block copolymers on the aggregation state of nystatin. *J. Control. Rel.* **95**, 161-171.

Davis, S.S. ve Illum L**. (**2003). Absorption enhancers for nasal drug delivery. ***Clin Pharmacokinet*****ic, 42**, 1107–1128.

Dinçer, S., Türk, M., Karagöz, A. ve Uzunalan, G. (2011). Potential c-myc antisense oligonucleotide carriers: PCL/PEG/PEI and PLL/PEG/PEI. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, **39**, 143-154.

Domb A.J. (1994). Implantable biodegradable polymers for site-specific drug delivery. İçinde A.J.Domb (Ed.)., *Polymeric Site-Spesific Pharmacotherapy*, England:John Wiley &Sons Ltd.; 1-26.

Donovan, M.D. ve Huang, Y. L. (1998). Large molecule and particulate uptake in the nasal cavity: The effect of size on nasal absorption. *Adv Drug Deliv Rev*, **29**, 147-155.

Forrest, M.L., Zhao, A., Won, C.Y., Malick, A.W. ve Kwon, G.S. (2006). Lipophilic prodrugs of Hsp90 inhibitor geldanamycin for nanoencapsulation in poly(ethylene glycol)-b-poly(ε-caprolactone) micelles. *Journal of Controlled Release*, **116**, 139–149.

Gannu, R., Yamsani, V.V. ve Rao, Y.M. (2007). New RP-HPLC method with UV detection for the determination of carvedilol in human serum. *J. Liquid Chromatogr.,* **30**, 1677-1685.

Gaucher, G., Dufresne, M.H., Sant, V.P., Kang, N., Mayssinger, D. ve Leroux, J.C. (2005). Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery, *Journal of Controlled Release* **109**, 169-188.

Güngör, S. ve Özsoy, Y. (2009). Sistemik etki için nazal yol. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilim Dergisi,* **2**, 7-14.

Gürcan, D., Okyar, A., Özbek., B. (2010). Nasal Administration of ciprofloxacin HCl loaded chitosan microspheres: in vitro and in vivo Evaluation. *Acta Pharmaceutica Sciencia*, **52**, 5-18.

Gungor, S., Okyar, A., Ertürk Toker, S. (2010). Ondansetron- loaded chitosan microspheres for nasal antiemetic drug delivery: An alternative approach to oral and parenteral routes. *Drug Dev Ind Pharm*, **36**, 806-813.

Gungor, S., Okyar, A., Ertürk Toker, S. (2010). Ondansetron-loaded biodegradable microspheres as a nasal sustained delivery system: In vitro/in vivo studies. *Pharm Dev Technol*,**15**, 258-565.

Gupta, A.K., Madan, S., Majumdar, D.K. ve Maitra, A. (2000). Ketorolac etrapped in polymeric micelles: preparation, chararacterisation and ocular anti-ınflammatory studies. *International Journal of Pharmaceutics*, **209**, 1-14.

Hasçiçek, C., Gönül, N. ve Erk, N. (2003). Mucoadhesive microspheres containing gentamicin sulphate for nasal administration: preparation and in vitro characterization. *IL Farmaco*, **58**, 11-16.

Hokama, N., Hobara, N., Kameya, H., Ohshiro, S. ve Sakanashı M. (1999). Rapid and simple micro-determination of carvedilol in rat plasma by highperformance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, **732**, 233-238.

Hussain, A.A. (1998). Intranasal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **29(1)**, 39-49.

ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: Methodology (CPMP/ICH/281/95), 1995

Illum, L. (2003). Nasal drug delivery-possibilities, problems and solutions. *Journal of Controlled Release,* **87(1),** 187-198.

İmran, M., Singh, R.S.P. ve Chandran, S. (2006). Stability indicating ultraviolet spectroscopic method fort he estimation of ezetimibe and carvedilol. *Pharmazie*, **61**, 766-769.

Ingemann, M., Frokjaer, S., Hovgaard, L. ve Brøndsted, H. (2000). Peptide and protein drug delivery systems for non-parenteral routes of administration. İçinde F.S. Hovgaard (Ed.), *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*. Philadelphia: Taylor&Francis; 189-205.

Jadhav, K.R., Gambhire, M.N., Shaikh, I.M., Kadam, V.J. ve Pisal, S.S. (2007). Nasal drug delivery system-factors affecting and applications. *Curr Drug Therapy*, 2, 27-38.

Jagannathana, L., Meenakshia, R. , Gunasekaranb, S. ve Srinivasanc, S. (2010). FT-IR, FT-Raman and UV–vis spectra and quantum chemical investigation of carvedilol. *Molecular Simulation,* **36**, 283–290.

Jawahar, N., Venkatesh, D.N., Sureshkumar, R., Senthil, V., Ganesh, G.N.K.., Vinoth, P. ve ark. (2009). Development and charecterization of PLGA-nanoparticles containing carvedilol. *J. Pharm. Sci. & Res.,* **1(3)**, 123-128.

Jeong, Y.I., Cheon, J.B., Kim, S.H., Nah, J.W., Lee, Y.M., Sung, Y.K.. ve ark. (1998). Clonazepam release from from core-shell type nanoparticles in vitro. *J. Control. Release*, **51,** 169-178.

Jones, M.C. ve Leroux, J.C. (1999). Polymeric micelles-A new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **48**, 101-111.

Kakizawa, Y. ve Kataoka, K. (2002). Block copolymer micelles for delivery of gene and releated compounds. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **54**, 203-222.

Kalimuthu, S. ve Yadav, A.V. (2009). Formulation and evaluation of carvedilol loaded Eudragit E 100 nanoparticles. *International Journal of PharmTech Research*, **1**, 179-183.

Kang, N. ve Leroux, J.C. (2004). Triblock and star-block copolymer of N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide or N-vinyl-2-pyrolidene and D,L-lactide: synthesis and self –assembling properties in water, *Polymer,* **45**, 8967-8980.

Kang, N. ve Leroux, J.C. (2004). Triblock and star-block copolymer of N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide or N-vinyl-2-pyrolidene and D,L-lactide: synthesis and self –assembling properties in water. *Polymer*, **45**, 8967-8980.

Kang, N., Perron, M.E., Prud'homme, R.E., Zhang, Y., Gaucher, G. ve Leroux, J.C. (2005). Stereocomplex block copolymer micelles: core-shell nanostructures with enhanced stability. *Nano Lett.* **5**, 315-319.

Karagöz, A. (2009). Misel oluşturabilen, biyouyumlu, biyobozunur, pozitif yüklü polimerik malzemelerin sentezi ve karakterizasyonu, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyobühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Kaur, A. ve Kaur, G. (2011). Mucoadhesive buccal patches based on interpolymer complexes of chitosan-pectin for delivery of carvedilol. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **xxx**, xxx-xxx.

Khanal, A. ve Nakashima, K. (2005). Incorporation and release of cloxacillin sodium in micelles of poly(styrene-b-2-vinyl pyridine-b-ethylene oxide). *Journal of Controlled Release*, **108,** 150– 160.

Kichler, A., Chillon, M., Leborgne, C., Danos, O. ve Frisch, B. (2002). Intranasal gene delivery with a polyethyleneimine-PEG conjugate. *Journal of Controlled Release*, **81**, 379-388.

Kim, S.Y. ve Lee, Y.M. (2001). Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and poly(□-caprolactone) as novel anticancer drug carriers. *Biomaterials*, **22**, 1697-1704.

Kim, S.Y., Shin, I.G., Lee, Y. M., Cho, C.S. ve Sung, Y.K. (1998). Methoxy poly (ethylene glycol) / □-caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing ındomethacin ıı. micelle formation and drug release behaviours. *Journal of Controlled Release*, **51**, 13-22.

Kublik, H. ve Vidgren, M.T. (1998). Nasal delivery systems and their effect on deposition and absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews,* **29(1),** 157-177.

Lee, H., Soo, P.L., Liu, J., Butler, M. ve Allen, C. (2007). Polymeric micelles for formulation of anti-cancer drugs. İçinde M.M. Amiji (Ed.), *Nanotechnology For Cancer Therapy,* USA: CRC Pres Taylor & Francis Group; 317-356.

Lee, J., Cho, E.C. ve Cho, K.. (2004). ıncorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(D,L-Lactide)-block-Poly(ethylene oxide) micelles. *J.Control. Release* **94**, 323-335.

Lee, S.C., Huh, K.M., Ooya, T. ve Park, K. (2007). Hydrotropic polymer micelles for cancer therapeutics. İçinde M. Amiji, (Ed.) *Nanotechnology for Cancer Therapeutics*. USA: CRC Press; 385-408.

Liggins, R.T. ve Burt, H.M. (2002). polyether-polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formulations, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **54**, 191-202.

Lukyanov, A.V., Hartner, W.C. ve Torchillin, V.P. (2004). Increased accumulation of PEG-PE micelles in the area of experimental myocardial infarction in rabbits. *Journal of Controlled Release*, **94**, 187-193.

Machida, M., Watanabe, M., Takechi ,S., Kakinoki, S. ve Nomura A. (2003). Measurement of carvedilol in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B. Analyt. Biomed. Life Sci*., **798**, 187-191.

Mahmoud, E.A., Bendas, E.R. ve Mohamed, M.I. (2009). Preparation and evaluation of self-nanoemulsifying tablets of carvedilol. *AAPS PharmSciTech*, **10**, 183-196.

McInnes, F.J., Thapa, P., Baillie, A.J., Welling, P.G., Watson, D.G., Gibson I. Ve ark. (2005). İn vivo evulation of nicotine lyophilised nasal insert in sheep. *Int J Pharm*., **304**, 72-82.

McMartin, C., Hutchinson, L.E., Hyde, R. ve Peters, G.E. (1987). Analysis of structural requirements for the absorption of drugs and macromolecules from the nasal cavity. *J. Pharm. Sci,.* **76**, 535 -540.

Merkus, F.W.H.M., Verhoef, J.C., Marttin, E. (1999). Cyclodextrins in nasal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, **36,** 41-57.

Middleton, J. ve Arthur, J. (2000). Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Polymers*, **21**, 2335-2346.

Myging, N. ve Dahl, R. (1998). Anatomy, physiology and function of the nasal cavity. *Adv Drug Deliver Rev.*, **29**, 3-12.

Myung, S.W. ve Jo, C.H. (2005). Gas Chromatograph-Mass Spectrometric Method for the Determination of Carvedilol and its Metabolites in Human Urine, *Journal of Chromatography B*, **822**, 70-77.

Nishiyama, N. ve Kataoka, K. (2006). Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacology & Therapeutics*, **112**, 630-648.

Ould-Ouali, L., Noppe, M., Langlois, X., Willems, B., Te Riele, P., Timmerman, P., ve ark. (2005). Self- Assembling Peg-p-(cl-co-tmc) copolymers for oral delivery of poorly water-soluble drugs: a case study with risperidone. *J. Control. Release*, **102**, 657-668.

Ozer Y. (2007). Alternative applications for drug delivery: Nasal and pulmonary routes. İçinde M.R. Mozafari (Ed.), *Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications*. Dordrecht: Springer; 99-112.

Ozsoy Y. (2008). Particulate carriers for nasal administration. İçinde M.N.V.R. Kumar (Ed.), *Handbook of Particulate Drug Delivery;* CA, USA: American Scientific Publisher; 143- 192.

Ozsoy, Y., Gungor, S. ve Cevher, E. (2009). Nasal delivery of high molecular weight drugs. ***Molecules,* 14,** 3754-3779.

Ozsoy, Y., Tunçel, T., Can, A. (2000). In vivo studies on the nasal preparations of ciprofloxacin hydrochloride. *Pharmazie*, **55**, 607-609.

Park, E.K., Lee, S.B. ve Lee, Y. M. (2005). Preparation and characterization of methoxy poly (ethylene glycol) /poly (□-kaprolactone) amphiphilic block copolymeric

nanospheres for tumor-specific folate-mediated targeting of anticancer drugs. *Biomaterials*, **26**, 1053-1061.

Patil, S.B. ve Sawant, K.K.. (2009). Development, optimization and in vitro evaluation of alginate mucoadhesive microspheres of carvedilol for nasal delivery. *Journal of Microencapsulation,* **26(5)**, 432-443.

Pires, A., Fortuna, A., Alver, G. (2009). Intranasal drug delivery: How, why and what for? *J Pharm Pharmaceut Sci*, **12**, 288-311.

Pires, C.K., Marques, K.L., Santos, J.L.M., Lapa, R.A.S., Lima, J.L.F.C. ve Zagatto, E.A.G. (2005). Chemiluminometric determination of carvedilol in a multi-pumping flow system *Talanta*, **68**, 239-244.

Pokharkar, V., Khanna, A., Venkatpurwar, V., Dhar, S. ve Mandpe, L. (2009). Ternary complexation of carvedilol, β-cyclodextrin and citric acid for mouth-dissolving tablet formulation, *Acta Pharm.,* **59**, 121–132.

Ptacek, P., Macek, J. ve Klima J. (2003). Liquid chromatographic determination of carvedilol in human plasma. *J. Chromatogr. B*, **787**, 405-410.

Putz, R. ve Pabst, R. (1997). *Sobotta Atlas of Human Anatomy*. (12nd ed.) USA: 1. Williams and Wilkins a Waverly Company.

Quraishi, M.S., Jones, N.S. ve Mason, J.D.T. (1997). The nasal delivery of drugs. *Clin Otolaryngol,* **22**, 289-301.

Radi, A. ve Elmogy, T. (2005). Differential pulse voltametric determination of carvedilol in tablets dosage form using glassy carbon electrode. *Il Farmaco*, **60**, 43-46.

Rafie, F., Javadzadeh, Y., Javadzadeh, A.R., Ghavidel, L.A., Jafari, B., Moogooee, M. ve Davaran, S. (2010). *In Vivo* evaluation of novel nanoparticles containing dexamethasone for ocular drug delivery on rabbit eye. *Current Eye Research*, Early Online, 1–9.

Rapoport, N. (2004). combined cancer therapy by micellar-encapsulated drug and ultrasound, *Int. J. Pharm.*, **277**, 155-162.

Rathod, R., Prasad, L.P.C., Rani ,S., Nivsarkar M. ve Padh H. (2007). Estimation of carvedilol in human plasma by using HPLC-fluorescence detector and its application to pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B*, **857**, 219-223.

Riley, T., Govender, T., Stolnik, S., Xiong, C.D., Garnett, M.C., Illum, L. ve Davis, S.S. (1999). Colloidal stability and drug ıncorporation aspects of micellar-like PLA-PEG Nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* **16**, 147-159.

Sambhaji, S., Pisal, A.R., Paradkar, K.R. (2004). Pluronic gels for nasal delivery of Vitamin $B_{12}$ Part I: Preformulation study. *Int J Pharm*, **270**, 37-45.

Sant, V.P. , Smith, D. ve Leroux, J.C. (2005). Enhancement of oral bioavailability of poorly water-solubledrugs by poly(ethylene glycol)-block-poly(alkylacrylate-co-methacrylic acid) self-assemblies. *Journal of Controlled Release,* **104**, 289–300.

Sant, V.P., Smith, D. ve Leroux, J.C. (2004). Novel pH-sensetive supramolecular assemblies for oral delivery of poorly water soluble drugs: preparation and characterization. J. Contr. Release, **97(2),** 301-312.

Satturwar, P., Eddine, M.N., Ravenelle, F. ve Leroux, J.C. (2007). pH-responsive polymeric micelles of poly(ethylene glycol)-b-poly(alkyl(meth)acrylate-co-methacrylic acid):Influence of the copolymer composition on self-assembling properties and release of candesartan cilexetil, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **65**, 379–387.

Sezgin, Z. (2004). Polimerik misellerin hazırlanması, karakterizasyonları oral yolla uygulamada davranışlarının in vitro ve ex vivo olarak incelenmesi. Ankara üniversitesi**,** Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

Sharma, A. ve Jain, C.P. (2010). Preparation and characterization of solid dispersions of carvedilol with PVP K30. *Research in Pharmaceutical Sciences*, **5(1),** 45-52.

Shin, H.C., Alani, A.W.G., Rao, D.A., Rockich, N.C. ve Kwon, G.S. (2009). Multi-drug loaded polymeric micelles for simultaneous delivery of poorly soluble anticancer drugs. *Journal of Controlled Release*, **xxx**, xxx-xxx.

Shin, I.G., Kim, S.Y., Lee, Y.M., Cho, C.S. ve Sung, Y.K. (1998). Methoxy Poly (ethylene glycol) / □-caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing ındomethacin ı. preparation and characterization. *Journal of Controlled Release,* **51**, 1-11.

Shuai, X., Merdan, T., Kissel, T., Schaper, A.K. ve Xi, F. (2004). Core-cross linked polymeric micelles as paclitaxel carriers. *Bioconjugate Chem*., 1**5**, 441-448.

Singh, S.K., Verma, P.R.P. ve Razdan, B. (2009). Development and characterization of a carvedilol loaded self-microemulsifying delivery system. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, **26(3)**, 50–64.

SPM. Erişim Tarihi: 26.06.2011, http://www.shimadzu.com/an/surface/spm/faq.html.

Stojanovic, J., Marinkovic, V., Vladimirov, S., Velickovic, D., ve Sibinovic P. (2005). Determination of carvedilol and its metabolits in pharmaceuticals. *Chromatographia,* **62**, 9-10.

Swamy, P.V., Farhana, L., Shirsand, S.B., Ali, M.D.Y. ve Patil, A. (2009). Design and evaluation of rectal suppositories of carvedilol. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, **2**, 654-663.

Sweetman, S.C. (Ed.). (2002). *Martindale: The Complete Drug Reference*. (33th ed.). London, UK: Pharmaceutical Press.

Tanwar, Y.S., Chauhan, C.S. ve Sharma, A. (2007). Development and evaluation of carvedilol transdermal patches, *Acta Pharm,* **57**, 151–159.

Tas, C., Kose Ozkan, C., Savaser, A. (2006). Nasal absorption of metoclopramide from different Carbopol 981 based formulations: In vitro, ex vivo and in vivo evaluation. *Eur J Pharm Biopharm,* **64**, 246-254.

Tay, B.Y., Zhang, S.X., Myint, M.H., Nu, F.L., Chandrasekaran, M. ve Tan, L.K.A. (2007). Processing of polycaprolactone porous structure for scaffold development. *Journal of Materials Processing Technology*, **182**, 117–121.

Tenero, D.M., Henderson, L.S., Baidoo, C.A., Harter, A.H., Campanile, A.M., Danoff, T.M. ve ark.(2006). Pharmacokinetic properties of a new controlled-release formulation of carvedilol, *Am J Cardiol*, **98**, 5-16.

The Merck Index. (2001). *An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*. (13th ed.). New Jersey,USA; Merck & Co., Inc. Whitehouse Station.

Thimmasetty, J. , Pandey, G.S. ve Babu, P.R.S. (2008). Design and evaluation of carvedilol buccal mucoadhesive patches. *Pak. J. Pharm. Sci.,* **21**, 241-248.

Tobio, M., Gerf, R., Sanchez, A., Langer, R. ve Alonso, M. J. (1998). Stealth PLA-PEG nanopartiles as protein carriers for nasal administration. *Pharmaceutical Research*, **15**, 270-275.

Torchilin, V.P. (2005) Block copolymer micelles as a solution for drug delivery problems. *Expert Opin. Ther. Patents*, **15**, 63-75.

Torchillin, V.P. (2001). Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, **73** 137-172.

Trubetskoy, V.S., Frank-Kamenetsky, M.D., Whiteman, K.R., Wolf, G.L. ve Torchilin, V.P. (1996).Stabil polymeric micelles: lymphangiographic contrast media for gamma scintigraphy and magnetic resonance imagining. *Acad. Radiol*. **3**, 232-238.

Tu, J., Pang, H., Yan, Z. ve Li, P. (2007). Ocular permeability of pirenzepine hydrochloride enhanced by methoxy poly(ethylene glycol)-poly (d,l-lactide) block copolymer. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **33**, 1142-1150.

Türkiye İlaç Kılavuzu, 2001 Formüleri, Ed:S.Oğuz Kayaalp, İlaç Endüstrisi İşverenler Sendikası, Golden Medya, İstanbul, 74-75.

Tuma, P.L. ve Hubbard, L. (2003). Transcytosis: Crossing cellular barriers. *Physiol. Rev.*, **83**, 871-932.

Turker, S.**,** Onur, E. ve Ozer, Y. (2004). Nasal route and drug delivery systems. *Pharmacy World **and** Science***,* **26,** 137**-**142.

Ubaidulla, U., Reddy, M.V.S., Ruckmani, K., Ahmad, F.J. ve Khar, R.K. (2007). Transdermal therapeutic system of carvedilol: Effect of hydrophilic and hydrophobic matrix on in vitro and in vivo characteristics. *AAPS PharmSciTech*, **8(1),** 1-8.

Üstünes, L. (2011). RxMediaPharma, İnteraktif Bilgi Kaynağı. Erişim:11.05.2011, hptt//rxmediapharma.com

Ugwoke, M.I., Sam, E., Van Den Mooter, G. (1999). Nasal mucoadhesive delivery systems of the anti-parkinsonian drug, apomorphine: Influence of drug-loading on in vitro and in vivo release in rabbits. *Int J Pharm*, **181**, 125-138.

Ugwoke, M.I., Verbeke, N. ve Kinget, R. (2001). The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug deliver**y.** *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 3-21.

Ungell, A.L., Andreasson, A., Lundin, K. ve Utter, (1992). L. Effects of enzymatic inhibition and increased paracellular shunting on transport of vasopressin analogues in the rat. *J. Pharm. Sci.*, **81**, 640-645.

Vademecum Modern İlaç Rehberi+ATC İndeks, Dr.Ecz. Rıza Ommaty, Matsa Basımevi, Ankara, 528-529.

Veltkamp, S. A., Alderden-Los, C., Sharma, A., Rosing , H., Beijnen, J. H. ve Schellens, M. (2007). A pharmacokinetic and safety study of a novel polymeric paclitaxel formulation for oral application. *Cancer Chemother Pharmacol*, **59**, 43–50.

Vila, A., Sánchez, A., Ėvora, C., Soriano, I., McCallion, O. ve Alonso, M.J. (2005). PLA-PEG particles as nasal protein carriers: the ınfluence of the particle size. *International Journal of Pharmaceutics*, **292**, 43-52.

Washington, N., Washington, C. ve Wilson, C.G. (1989). Nasal drug delivery. İçinde N. Washington, C. Washington, C.G. Wilson (Ed*.), Physiological pharmaceutics barriers to drug absorption.* (2nd Ed.). London, Taylor&Francis; 199-220.

Watanabe, M., Kawano, Yokoyama, K.M., Opanasopit, P., Okano, T. ve Maitani, Y. (2006). Preparation of camptothecin-loaded polymeric micelles and evaluation of their ıncorporation and circulation stability. *International Journal of Pharmaceutics*, **308**, 183-189.

Wermeling, D.P. ve Miller, J.L. (2002). Intranasal drug delivery. İçinde M.J. Rathbone, J. Hadgraft, M.S. Roberts (Ed.), *Modified Release Drug Delivery Technology*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 727-748.

Wu, T.C., Chen, Y.H., Leu, H.B, Chen, Y.L., Lin, F.Y., Lin, S.J. ve ark. (2007). Carvedilol, a pharmacological antioxidant, inhibits neointimal matrix metalloproteinase-2 and -9 in experimental atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine,* **43**, 1508–1522.

Xiao, Y., Wang, H.Y. ve Han Jiuan. (2005). Simultaneous determination of carvedilol and ampicillin sodium by synchronous fluorimetry. *Spectrochim.Acta Part A*, **61(4)**, 567-573.

Xu, B., Yuan, J., Ding, T. ve Gao, Q. (2010). Amphiphilic biodegradable poly(e-caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(e-caprolactone) triblock copolymers:

synthesis, characterization and their use as drug carriers for folic acid. *Polym. Bull,.* **64**, 537–551.

Xu, L.X., Hui, N., Ma, L.Y.ve Wang H.Y. (2005). Study on fluorescence property of carvedilol and determination of carvedilol by fluorimetry. *Spectrochim. Acta Part A*, **61(5)**, 855-859.

Yamamoto, A., Morita, T., Hashida, M. ve Sezaki, H. (1993). Effect of absorption promoters on the nasal absorption of drugs with various molecular weights. *Int J Pharm*, **93**, 91-99.

Yamamoto, Y., Yasugi, K., Harada, A., Nagasaki, Y. ve Kataoka, K. (2002). Temperature-related change in the properties relevant to drug delivery of Poly(ethylene glycol)-Poly(D,L-Lactide) block copolymer micelles in aqueous milieu. *J. Control. Release,* **82**, 359-371.

Yang, T., Hussain, A., Bai, S., Khalil, I.A., Harashima, H. ve Ahsan F. (2006). Positively charged poyethyleneimine enhance nasal absorption of the negatively charged drug, low molecular weight heparin. *Journal of Controlled Release,* **115**, 289-297.

Yang, X., Zhang, Q., Wang, Y., Chen, H., Zhang, H., Gao, F. ve Liu, L. (2008). Self-aggregated nanoparticles form methoxy poly(ethylene glycol)-modified chitosan: synthesis; characterization; aggregation and methotrexate release in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* **61**, 125-131.

Yang, Z.L., Li, X.R., Yang, K.E.W. ve Liu, Y. (2008). Amphotericin B-loaded Poly(ethylene glycol)-Poly(Lactide) micelles: Preparation, freeze-drying, and *in vitro* release. *Journal of Biomedical Materials Research Part A,* **85**, 539-546.

Yenil, Ö. (2008). Verapamil Hcl' in nazal dozaj formları üzerine çalışmalar. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Yıldız, A., Okyar, A., Baktır, G., Araman, A. ve Özsoy, Y. (2005). Nasal administration of heparin-loaded microspheres based on poly (lactic acid). *IL Farmaco*, **60**, 919-924.

Yin, H. ve Bae, Y.H. (2009). Physicochemical aspect of doxorubicin-loaded ph-sensitive polymeric micelle formulations from a mixture of poly(l-histidine)-b-poly(l-

lactide)-b-poly(ethylene glycol). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*,**71**, 223-230.

Yu, S., Zhao, Y., Wu, F., Zhang, X., Lü, W., Zhang, H. ve Zhang, Q. (2004). Nasal ınsulin delivery in the chitosan solution: in vitro and in vivo studies. *International Journal of Pharmaceutics,* **281**, 11-23.

ZetaSizer Nano ZS. Erişim Tarihi: 16.05.2010, http://www.malvern.com/common/downloads/campaign/MRK656-01.pdf.

Zhang, J., Jiang, W., Zhao, X. ve Wang, Y. (2007). Preparation and characteization of polymeric micelles from Poly(D,L-Lactide) and methoxypolyethylene glycol block copolymers as potantial drug carriers. *Tsinghua Science and Technology*, **12(4),** 493-496.

Zhang, X., Zhang, H., Wu, Z., Wang, Z., Niu, H., Li, C. (2008). Nasal absorpton enhancement of ınsulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **68,** 526-534.

# HAM VERİLER

# FORMLAR

# ETİK KURUL KARARI

# PATENT HAKKI İZNİ

# TELİF HAKKI İZNİ

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Adı** | Emine | **Soyadı** | Kahraman |
| **Doğ.Yeri** | Siliven | **Doğ.Tar.** | 02.03.1985 |
| **Uyruğu** | T.C. | **TC Kim No** | 49378257500 |
| **Email** | emnkah85@gmail.com | **Tel** | (0537) 590 85 25 |

## Eğitim Düzeyi

| | **Mezun Olduğu Kurumun Adı** | **Mez. Yılı** |
|---|---|---|
| **Doktora** | | |
| **Yük.Lis.** | | |
| **Lisans** | İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi | 2007 |
| **Lise** | Bahçelievler Dede Korkut Anadolu Lisesi | 2003 |

## İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

| | **Görevi** | **Kurum** | **Süre (Yıl - Yıl)** |
|---|---|---|---|
| **1.** | Araştıma Görevlisi | İ.Ü. Eczacılık Fakültesi | 2010-Halen |
| **2.** | Ar-Ge Elemanı | Ali Raif İlaç Sanayi | 2007-2008 |
| **3.** | | | - |

| **Yabancı Dilleri** | **Okuduğunu Anlama*** | **Konuşma*** | **Yazma*** | **KPDS/ÜDS Puanı** | **(Diğer) Puanı** |
|---|---|---|---|---|---|
| **İngilizce** | İyi | İyi | İyi | 75,000 | |
| | | | | | |

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

| | **Sayısal** | **Eşit Ağırlık** | **Sözel** |
|---|---|---|---|
| **ALES Puanı** | 91,567 | 88,660 | 84,531 |
| **(Diğer) Puanı** | | | |

## Bilgisayar Bilgisi

| **Program** | **Kullanma becerisi** |
|---|---|
| MS Office | İyi |
| | |
| | |

## Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Kahraman, E., Karagoz, A., Dincer, S., Ozsoy, Y. **"**A Novel Drug Delivery System for Poorly Soluble Drugs: Polymeric Micelles" "38th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society" 30 Temmuz-3 Ağustos 2011, Maryland, USA.

Kahraman, E., Karagoz, A., Dincer, S., Ozsoy, Y. “Preparation of positively charged polymeric micelles for nasal drug delivery” “3rd PharmSciFair” 13-17 Haziran 2011, Prag, Çek Cumhuriyeti.

Ozsoy, Y., Kahraman, E., A., Karagoz, A., Dincer, S. “Preparation of positively charged polymers for nasal delivery” “Particles 2010, Medical/Biochemical Diagnostic, Pharmaceutical and Drug Delivery Applications of Particle Techonology” 22-25 Mayıs 2010, Regal Sun Resort, Lake Buena Vista (Orlando), Florida, USA.

Kahraman, E. ve Özsoy, Y. (2010). Nazal Yol ve Büyük Moleküllü İlaçlar, *Eczacı Dergisi*, Eylül, 22-24.