

**DONEPEZİL HİDROKLORÜR YÜKLÜ PLGA BAZLI NANOSİSTEMLERİN
HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE ANTI-ALZHEIMER
ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Merve KÖMÜR

Eskişehir 2023

**DONEPEZİL HİDROKLORÜR YÜKLÜ PLGA BAZLI NANOSİSTEMLERİN
HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE ANTI-ALZHEIMER
ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Merve KÖMÜR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Temmuz 2023**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Merve KÖMÜR'ün "Donepezil Hidroklorür Yüklü PLGA Bazlı Nanosistemlerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Anti-Alzheimer Etkinliklerinin Belirlenmesi" başlıklı tezi 07.07.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK	
Üye	: Doç. Dr. Evrim AKYIL	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi U. Merve GÜVEN	

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ÖZET

DONEPEZİL HİDROKLORÜR YÜKLÜ PLGA BAZLI NANOSİSTEMLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE ANTI-ALZHEIMER ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Merve KÖMÜR

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2023

Danışman: Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK

Alzheimer hastalığı; beyin hücrelerinin zamanla ölümü sebebiyle hafıza kaybı, bunama (demans) ve bilişsel fonksiyonların azalmasıyla gelişen tıbbi durumdur. Kan Beyin bariyeri Alzheimer tedavisindeki en önemli engellerden birini oluşturmaktadır. Donepezil, Alzheimer hastalığı tedavisinde şimdiye kadar FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış dört adet kolinesteraz inhibitörleri arasında yer almaktadır.

Bu tez çalışmasında donepezil HCl, santral sinir sistemi asetilkolinesterazlarına yüksek oranda seçiciliğinin olması ve yan etkisinin az olması sebebiyle Alzheimer tedavisindeki nanopartikül yaklaşımımız için uygun ajan olarak seçilmiştir. Donepezil HCl yüklü PLGA nanopartikülleri çözücü buharlaştırma tekniği ile hazırlanmıştır. Nanopartikül hazırlanması için birden fazla metot denenmiş ve bu metotların nanopartikülleri hazırlamadaki etkinlikleri gözlemlenmiştir. Uygun olarak I-DNP formülasyonu seçilmiş olup partikül boyutunu etkileyen parametreler incelenmiştir. DSC, FT-IR ve ¹H-NMR analizleri ile enkapsülasyon kanıtlanmıştır.

Sonuç olarak in vivo CAM deneyleri ile I-DNP kodlu formülasyonun anjiyogenezi zayıflattığını (azalttığı/inhibe ettiği) belirlenmiş ve hazırlanan nanopartikül sistemin kolinerjik sistemin uyarılmasıyla yeni bir anti-anjiyojenik tedavi olabileceği kararına varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Alzheimer, Donepezil HCl, Enkapsülasyon, PLGA, Nanopartikül

ABSTRACT

PREPARATION, PREPARATION, CHARACTERIZATION AND DETERMINATION OF ANTI-ALZHEIMER EFFECTS OF DONEPEZIL HYDROCHLORIDE LOADED PLGA BASED NANOSYSTEM

Merve KÖMÜR

Department of Pharmaceutical Technology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, July 2023

Supervisor: Assot. Prof. Dr. A. Alper ÖZTÜRK

Alzheimer's disease; It is a medical condition that develops with memory loss, dementia (dementia) and decreased cognitive functions due to the death of brain cells over time. The blood-brain barrier is one of the most important obstacles in Alzheimer's treatment. Donepezil is among the four cholinesterase inhibitors approved by the FDA (Food and Drug Administration) in the treatment of Alzheimer's disease so far.

In this thesis study, donepezil HCl was chosen as a suitable agent for our nanoparticle approach in Alzheimer's treatment due to its high selectivity to central nervous system acetylcholinesterases and low side effects. Donepezil HCl loaded PLGA nanoparticles were prepared by solvent evaporation technique. More than one method has been tried for nanoparticle preparation and the effectiveness of these methods in preparing nanoparticles has been observed. Appropriately, the I-DNP formulation was selected and the parameters affecting the particle size were examined. Encapsulation has been proven by DSC, FT-IR and ¹H-NMR analyses.

As a result, it was determined by in vivo CAM experiments that the I-DNP coded formulation weakens (reduces/inhibits) angiogenesis, and it was decided that the prepared nanoparticle system could be a new anti-angiogenic treatment by stimulating the cholinergic system.

Keywords: Alzheimer, Donepezil HCl, Encapsulation, PLGA, Nanoparticle.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlamasından sonuçlandırılmasına kadar bütün aşamalarda bana desteğini esirgemeyen, yüksek lisans eğitimim boyunca bana değerli katkıları olan saygıdeğer danışmanım Sayın Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve elemanlarına, eksik kaldığım yerlerde bilgileri ile beni destekleyen ve çalışmalarımdayardımlarını esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Biyolojik aktivite çalışmalarım ve CAM deneylerimde bana büyük yardımları dokunan değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hülya Tuba KIYAN'a teşekkür ederim.

Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Araş. Gör. Zeynep GÜLCAN arkadaşşıma her zaman varlığıyla yanımda durduğu için teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde emeği büyük olan hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Merve KÖMÜR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLOLAR DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
GÖRSELLER DİZİNİ	xxiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	2
2.1. Nanopartiküllerin Tanımı ve Çeşitleri.....	2
2.1.1. Polimerik nanopartiküller	3
2.1.2. Polimerik nanopartikül hazırlamada kullanılan polimerler	4
2.1.3. Polimerik nanopartikül hazırlanmasında kullanılan yöntemler	5
2.1.3.1. Diyaliz yöntemi.....	6

2.1.3.2. Süper kritik sıvı teknolojisi.....	7
2.1.3.3. Çözücü buharlaştırma yöntemi.....	8
2.1.3.3.1. Tekli emülsiyon ve buharlaştırma yöntemi.....	10
2.1.3.3.2. Çift emülsiyon ve buharlaştırma yöntemi.....	11
2.1.3.4. Tuzla çöktürme.....	12
2.1.3.5. Püskürtme kurutma yöntemi.....	13
2.1.3.6. Nanoçöktürme yöntemi.....	14
2.2. PLGA.....	15
2.2.1. PLGA formülasyon yöntemleri.....	17
2.2.2. Fizikokimyasal özellikleri.....	17
2.3. Resomer® RG 502 H.....	18
2.4. Nörodejeneratif Hastalıklar.....	19
2.5. Alzheimer.....	21
2.5.1. Alzheimer’da nanopartikül taşıyıcı sistemler.....	23
2.6. Asetilkolin- Bütilkolin Esteraz.....	24
2.7. Donepezil HCl.....	25
2.7.1. Alzheimer hastalığında asetilkolinesteraz ve donepezil etkisi.....	26
2.7.2. Donepezil HCl içeren preparatlar.....	27
3. GEREÇLER.....	30

3.1. Kullanılan Maddeler	30
3.2. Kullanılan Cihazlar	30
4. YÖNTEM	32
4.1. UV Spektrofotometre Validasyon Çalışmaları.....	32
4.1.1. Donepezil HCl için aseton: su (1:1, <i>h/h</i>) ortamında yapılan çalışmalar .32	
4.1.1.1. Absorbans belirleme çalışmaları	32
4.1.1.2. Doğrusallık	33
4.1.1.3. Kesinlik	33
4.1.1.4. Doğruluk	33
4.1.1.5. Duyarlılık.....	33
4.1.1.6. Seçicilik	34
4.1.2. Donepezil HCl için PBS pH 6.8 ortamında validasyon çalışması	34
4.1.2.1. Absorbans belirleme çalışmaları	34
4.1.2.2. Doğrusallık	35
4.1.2.3. Kesinlik	35
4.1.2.4. Doğruluk	35
4.1.2.5. Duyarlılık.....	36
4.1.2.6. Seçicilik	36
4.2. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	36

4.2.1. A-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması.....	39
4.2.2. A-DNP kodlu formülasyonun hazırlanması.....	39
4.2.3. B-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması.....	40
4.2.4. B-DNP kodlu formülasyonun hazırlanması.....	40
4.2.5. C-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması.....	41
4.2.6. C-DNP kodlu formülasyonun hazırlanması.....	41
4.2.7. D-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması.....	42
4.2.8. D-DNP kodlu formülasyonun hazırlanması.....	42
4.2.9. E-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması.....	43
4.2.10. E-DNP kodlu formülasyonun hazırlanması.....	44
4.2.11. F-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması.....	44
4.2.12. F-DNP kodlu formülasyonun hazırlanması.....	45
4.2.13. G-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması.....	45
4.2.14. G-DNP kodlu formülasyonun hazırlanması.....	46
4.2.15. H-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması.....	46
4.2.16. H-DNP kodlu formülasyonun hazırlanması.....	47
4.2.17. I-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması.....	48
4.2.18. I-DNP kodlu formülasyonun hazırlanması.....	48
4.3. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu.....	49

4.3.1. Parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı (PDI) ve zeta potansiyel.....	49
4.3.2. Kriyoprotektan etki ve saklama koşullarının belirlenmesi	49
4.3.3. Gastrointestinal stabilite değerlendirme	50
4.3.4. Enkapsülasyon etkinliği	51
4.3.5. <i>In vitro</i> dissolüsyon	52
4.3.6. Salım kinetiği	53
4.4. Katı Hal Karakterizasyonları	53
4.4.1. Termal analiz	53
4.4.2. FT-IR	53
4.4.3. ¹ H-NMR.....	54
4.5. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	54
4.5.1. <i>In vitro</i> AChE ve BChE inhibitör aktivite yöntemi ile anti-Alzheimer etki analizleri	54
4.5.2. Anjiyogenez üzerinde etki çalışmaları.....	56
4.5.2.1. <i>In vivo</i> CAM (The chorioallantoic membrane assay) yöntemi.....	56
4.5.2.2. Pellet hazırlanışı.....	56
4.5.2.3. CAM deneyinin yapılışı	56
5. BULGULAR.....	57
5.1. Analitik Miktar Tayini için Validasyon Çalışmaları	57

5.1.1. Donepezil HCl için aseton: su (1:1 h/h) ortamında validasyon çalışması	
.....	57
5.1.1.1. Absorbans belirleme	57
5.1.1.2. Doğrusallık	57
5.1.1.3. Kesinlik	58
5.1.1.4. Doğruluk	61
5.1.1.5. Duyarlılık	62
5.1.1.6. Seçicilik	62
5.1.2. Donepezil HCl için PBS pH:6.8 ortamında validasyon çalışması	64
5.1.2.1. Absorbans belirleme	64
5.1.2.2. Doğrusallık	65
5.1.2.3. Kesinlik	67
5.1.2.4. Doğruluk	69
5.1.2.5. Duyarlılık	70
5.1.2.6. Seçicilik	70
5.2. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu	72
5.2.1. Parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı	72
5.2.2. Zeta potansiyel	84
5.3. Kriyoprotektan Etki ve Saklama Koşullarının Belirlenmesi	95
5.3.1. Parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı	95

5.4. Gastrointestinal Stabilite Değerlendirme	98
5.5. Enkapsülasyon Etkinliği.....	101
5.6. <i>In Vitro</i> Dissolüsyon	101
5.7. Salım Kinetiği	103
5.8. Katı Hal Karakterizasyonları	120
5.8.1. Termal analiz	120
5.8.2. FT-IR analizleri	122
5.8.3. ¹H-NMR analizleri.....	125
5.9. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	131
5.9.1. In vitro AChE ve BChE inhibitör aktivite yöntemi ile anti-Alzheimer etki analizleri	131
5.9.1.1. AChE inhibitör aktivite sonuçları.....	131
5.9.1.2. BChE inhibitör aktivite sonuçları	131
5.9.2. CAM (The chorioallantoic membrane assay) yöntemi ile in vivo anjiyogenik etkinlik sonuçları.....	132
6. TARTIŞMA.....	137
6.1. Analitik Miktar Tayini için Validasyon Çalışmaları	137
6.1.1. Donepezil HCl için aseton: su (1:1 h/h) ortamında validasyon çalışması	138
6.1.2. Donepezil HCl için PBS pH:6.8 ortamında validasyon çalışması.....	139

6.2. Nanopartikül Formülasyonların Hazırlanması.....	141
6.3. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu.....	142
6.3.1. Parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı ve zeta potansiyel	142
6.3.2. Kriyoprotektan etki ve saklama koşullarının belirlenmesi	145
6.3.3. Gastrointestinal stabilite değerlendirme	146
6.3.4. Enkapsülasyon etkinliği	147
6.3.5. <i>In vitro</i> dissolüsyon	147
6.3.6. Salım kinetiği	148
6.4. Katı Hal Karakterizasyonları	149
6.4.1. Termal analiz	149
6.4.2. FT-IR analizleri	150
6.4.3. ¹ H-NMR analizleri.....	150
6.5. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	151
7. SONUÇ	154
KAYNAKÇA.....	155
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan bazı polimer örnekleri	4
Tablo 2.2. Nanopartiküllerin hazırlanması için çeşitli tekniklerin şematik gösterimi	6
Tablo 2.3. Resomer 502 H özellikleri	18
Tablo 2.4. Rx Donepezil HCl İçeren Preparatlar	27
Tablo 4.1. Hazırlanan blank ve DNP yüklü nanopartikül formülasyonlarının hazırlama koşulları ve içerikleri.....	37
Tablo 5.1. Doğrusallık çalışması sonuçları.....	58
Tablo 5.2. 15.0 µg. mL ⁻¹ derişim için kesinlik sonuçları	59
Tablo 5.3. 25.0 µg. mL ⁻¹ derişim için kesinlik sonuçları	60
Tablo 5.4. 35.0 µg.mL ⁻¹ derişim için kesinlik sonuçları	61
Tablo 5.5. DNP için doğruluk çalışması sonuçları	62
Tablo 5.6. Doğrusallık çalışması sonuçları	66
Tablo 5.7. 15.0 µg.mL ⁻¹ derişim için kesinlik sonuçları	67
Tablo 5.8. 25.0 µg.mL ⁻¹ derişim için kesinlik sonuçları	68
Tablo 5.9. 35.0 µg.mL ⁻¹ derişim için kesinlik sonuçları	69
Tablo 5.10. DNP için elde edilen doğruluk değerleri	70
Tablo 5.11. Formülasyonların parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı (PDI) değerleri.....	73
Tablo 5.12. Zeta potansiyel sonuçları	85

Tablo 5.13. Farklı trehaloz konsantrasyonlarının parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı (PDI) üzerindeki etkisi	96
Tablo 5.14. Farklı trehaloz konsantrasyonlarının zeta potansiyel üzerindeki etkisi	98
Tablo 5.15. I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonu için gastrointestinal stabilite sonuçları.....	99
Tablo 5.16. Donepezil HCl ve I-DNP kodlu formülasyon için % kümülatif salım/dissolüsyon verileri.....	101
Tablo 5.17. I-DNP kodlu formülasyon için 24 saatlik salım kinetiği sonuçları	103
Tablo 5.18. DNP, I-DNP ve I-Blank kodlu formülasyonun AChE inhibitör aktivite sonuçları.....	131
Tablo 5.19. DNP, I-DNP ve I-Blank kodlu formülasyonun AChE inhibitör aktivite sonuçları.....	131
Tablo 5.20. In vivo anjiyogenik etki sonuçları	132

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Nanoküre ve nanokapsül yapısının şematik gösterimi	2
Şekil 2.2. Diyaliz yöntemi	7
Şekil 2.3. Emülsifikasyon çözücü buharlaştırma yöntemi	9
Şekil 2.4. Tekli emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yöntemi	10
Şekil 2.5. Çift emülsiyon ve çözücü uçurma yöntemi	12
Şekil 2.6. Emülsifikasyon-ters tuzlama-out yöntemi.....	13
Şekil 2.7. Nanoçöktürme yöntemi	14
Şekil 2.8. PLGA'nın moleküler yapısı	15
Şekil 2.9. AD tedavisi için temsili terapötikler	22
Şekil 5.1. DNP'e ait 200-800 nm arasında elde edilen spektrum ($\lambda_{max} = 325.0$ nm)....	57
Şekil 5.2. DNP'nin aseton: su (1:1 h/h) ortamında standart eğrisi	58
Şekil 5.3. DNP'e ait spektrum	63
Şekil 5.4. Aseton: su (1:1 h/h) karışımına ait spektrum	63
Şekil 5.5. I-Blank kodlu formülasyona ait spektrum.....	64
Şekil 5.6. DNP'e ait 200-800 nm arasında elde edilen spektrum ($\lambda_{max} = 315.0$ nm)...	65
Şekil 5.7. DNP'nin PBS pH 6.8 ortamında standart eğrisi.....	66
Şekil 5.8. DNP'e ait spektrum	71
Şekil 5.9. PBS pH 6.8'e ait spektrum	71

Şekil 5.10. I-Blank kodlu formülasyona ait spektrum.....	72
Şekil 5.11. Formülasyonların parçacık boyut değerleri grafiği	74
Şekil 5.12. Formülasyonların parçacık boyutu dağılımı (PDI) değerleri grafiği.....	74
Şekil 5.13. A-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu.....	75
Şekil 5.14. A-DNP için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu	75
Şekil 5.15. B-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu	76
Şekil 5.16. B-DNP için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu.....	76
Şekil 5.17. C-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu	77
Şekil 5.18. C-DNP için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu.....	77
Şekil 5.19. D-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu	78
Şekil 5.20. D-DNP için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu	78
Şekil 5.21. E-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu	79
Şekil 5.22. E-DNP için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu.....	79
Şekil 5.23. F-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu.....	80
Şekil 5.24. F-DNP için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu	80
Şekil 5.25. G-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu.....	81
Şekil 5.26. G-DNP için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu	81
Şekil 5.27. H-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu.....	82
Şekil 5.28. H-DNP için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu	82

Şekil 5.29. I-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu	83
Şekil 5.30. I-DNP için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu	83
Şekil 5.31. Formülasyonların zeta potansiyel değerleri grafiği.....	86
Şekil 5.32. A-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu.....	86
Şekil 5.33. A-DNP için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu	87
Şekil 5.34. B-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu	87
Şekil 5.35. B-DNP için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu.....	88
Şekil 5.36. C-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu	88
Şekil 5.37. C-DNP için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu.....	89
Şekil 5.38. D-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu	89
Şekil 5.39. D-DNP için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu	90
Şekil 5.40. E-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu	90
Şekil 5.41. E-DNP için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu.....	91
Şekil 5.42. F-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu.....	91
Şekil 5.43. F-DNP için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu	92
Şekil 5.44. G-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu.....	92
Şekil 5.45. G-DNP için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu	93
Şekil 5.46. H-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu.....	93
Şekil 5.47. H-DNP için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu	94

Şekil 5.48. I-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu	94
Şekil 5.49. I-DNP için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu	95
Şekil 5.50. Farklı trehaloz konsantrasyonlarının parçacık boyut üzerine etki grafiği	96
Şekil 5.51. Farklı trehaloz konsantrasyonlarının parçacık boyut dağılım (PDI) üzerine etki grafiği.....	97
Şekil 5.52. Farklı trehaloz konsantrasyonlarının zeta potansiyel üzerindeki etki grafiği	98
Şekil 5.53. I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonun gastrointestinal stabilite sonuç grafiği.....	100
Şekil 5.54. Donepezil HCl ve I-DNP kodlu formülasyon için kümülatif salım grafiği	102
Şekil 5.55. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Sıfırıncı Derece Kinetik)	107
Şekil 5.56. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Sıfırıncı Derece Kinetik, T_{lag})	107
Şekil 5.57. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Sıfırıncı Derece Kinetik, F_0).....	108
Şekil 5.58. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik)	108
Şekil 5.59. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik, T_{lag})	109
Şekil 5.60. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik, F_{max})	109

Şekil 5.61. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik, F_{max} ve T_{lag})	110
Şekil 5.62. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Higuchi Modeli)	110
Şekil 5.63. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Higuchi modeli, T_{lag})	111
Şekil 5.64. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Higuchi modeli, F_0)	111
Şekil 5.65. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Korsmeyer-Peppas Modeli).....	112
Şekil 5.66. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Korsmeyer-Peppas Modeli, T_{lag})	112
Şekil 5.67. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Korsmeyer-Peppas modeli, F_0).....	113
Şekil 5.68. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Hixson-Crowell modeli)	113
Şekil 5.69. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Hixson-Crowell modeli, T_{lag})	114
Şekil 5.70. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Hopfenberg modeli)	114
Şekil 5.71. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Hopfenberg modeli, T_{lag})	115
Şekil 5.72. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Baker-Lonsdale modeli)	115

Şekil 5.73. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Baker-Lonsdale modeli, T_{lag})	116
Şekil 5.74. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 1 modeli)	116
Şekil 5.75. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 1 modeli, T_{lag})	117
Şekil 5.76. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 2 modeli)	117
Şekil 5.77. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 2 modeli, T_{lag})	118
Şekil 5.78. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Weibull 1 modeli) .	118
Şekil 5.79. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Weibull 2 modeli) .	119
Şekil 5.80. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Weibull 3 modeli) .	119
Şekil 5.81. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Weibull 4 modeli) .	120
Şekil 5.82. DNP'e ait DSC eğrisi	120
Şekil 5.83. PLGA polimerine ait DSC eğrisi.....	121
Şekil 5.84. I-Blank kodlu formülasyona ait DSC eğrisi	121
Şekil 5.85. I-DNP kodlu formülasyona ait DSC eğrisi.....	122
Şekil 5.86. Fiziksel karışıma ait DSC eğrisi	122
Şekil 5.87. DNP'e ait FT-IR spektrumu	123
Şekil 5.88. PLGA polimerine ait FT-IR spektrumu	123

Şekil 5.89. I-Blank kodlu formülasyona ait FT-IR spektrumu.....	124
Şekil 5.90. I-DNP kodlu formülasyona ait FT-IR spektrumu	124
Şekil 5.91. Fiziksel karışıma ait FT-IR spektrumu.....	125
Şekil 5.92. DNP'e ait ¹ H-NMR spektrumu	126
Şekil 5.93. PLGA polimerine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	127
Şekil 5.94. I-Blank kodlu formülasyona ait ¹ H-NMR spektrumu	128
Şekil 5.95. I-DNP kodlu formülasyona ait ¹ H-NMR spektrumu	129
Şekil 5.96. Fiziksel karışıma ait ¹ H-NMR spektrumu	130
Şekil 5.97. DNP'nin anti-anjiyogenik etkisi (10 µg.pellet ⁻¹).....	133
Şekil 5.98. I-DNP kodlu formülasyonun anti-anjiyogenik etkisi (10 µg.pellet ⁻¹)	134
Şekil 5.99. I-Blank kodlu formülasyonun etkisi (10 µg.embriyo ⁻¹)	135
Şekil 5.100. Agaroz ile normal embriyo gelişimi (% 2.5, a/h).....	136

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 4.1. Gastrointestinal stabilite çalışması.	51
Görsel 4.2. DNP ve I-DNP için in vitro dissolüsyon çalışması	52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

% EE	: Enkapsülasyon etkinliği
(S/Y)S	: Su içinde yağ -su içinde
scCO ₂	: Süper kritik karbon dioksit
°C	: Derece santigrat
ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz
AD	: Alzheimer hastalığı
ADDL	: A'dan Türetilmiş Dağılabilir Ligandlar
AIC	: Akaike Bilgi Kriteri
ALS	: Amiyotrofik Lateral Skleroz
AMD	: Yaşa bağlı makula dejenerasyonu
API	: Aktif farmasötik bileşenler
ATC	: Asetilkolin İyodür
BBB	: Kan-Beyin Bariyerini
BTC	: Bütirilkolin İyodür
BuChE	: Butirilkolinesteraz
CAM	: Koryoallantoik Membran
CDCL ₃	: Dötero Kloroform
ChAT	: Kolin asetiltransferaz

ChEI	: Kolinesteraz inhibitörleri
CNS	: Sinir Sistemi
DCM	: Diklorometan
DE	: Diyabetle ilişkili ensefalopati
DMSO	: Jelatin, Dimetilsülfoksit
DNP	: Donepezil HCl
DS	: Down sendromu
EEEMM	: Enkapsüle Edilen Etkin Madde Miktarı
EMA	: Avrupa İlaç ajansı
FDA	: ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FEMTM	: Formülasyondaki Etkin Maddenin Teorik Miktarı
GİS	: Gastointestinal
HD	: Huntington hastalığı
I-Blank	: Blank Formülasyon
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Konseyi
LOD	: Saptama sınırı
LOQ	: Miktar tayini sınırı
m	: Korelasyon Eşitliğinin Eğimi
MS	: Multipl Skleroz
MSC	: Model Seçme Kriteri

MSS	: Merkezi sinir sistemi
NP	: Nanopartikül
NTF	: Nörofibriler yumaklar
OS	: Oksidatif stres
PBS	: Fosfat Tamponu
Pc	: Kritik basıncının
PD	: Parkinson hastalığı
PDI	: Parçacık Boyutu Dağılımı
PEG	: Polietilen glikol
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
PGA	: Poliglikolik asit
PH	: Potansiyel Hidrojen
PLA	: Polilaktik asit
PLG	: Poliglikolit
PLGA	: Poli d,l-laktik-ko-glikolik asit
PNP	: Polimerik nanopartikül
PVA	: Polivinil Alkol
R ²	: Korelasyon katsayısı
RSD	: %, Varyasyon Katsayısı
Rsqr	: Korelasyon katsayısı (r ²)

Rsqr_adj : Düzeltilmiş korelasyon katsayısı (r^2_{adjusted})

S : Su

SCF : Süperkritik akışkanlar

SOD-1 : Süperoksit dismutaz mutasyonu

SS : y eksenini kesim noktasının standart sapması

Tc : Kritik sıcaklık

Tg : Camı geçiş sıcaklığı

UV : Ultraviyole

Y : Yağ

Y/S : Su içinde yağ

ZP : Zeta Potansiyel

λ_{maks} : Maksimum Dalga boyu

1. GİRİŞ

Nörodejeneratif hastalıklar arasında bulunan Alzheimer hastalığı (AD)'nın tedavisinde rivastigmin, donepezil, galantamin ve memantin FDA tarafından klinik kullanım için onaylanan ilaçlardır. Alzheimer hastalığında semptomlar hafif, orta ve şiddetli olmak üzere üç aşamadan oluşur. FDA tarafından 1986 yılında onaylanan bir piperidin türevi olan Donepezil, AD'nin tüm evrelerinin tedavisinde kullanılan tek ilaçtır. Piyasada bulunan donepezil preparatları, donepezil hidroklorür (DNP) tabletleri şeklindedir. Alzheimer hastalarının ilacı her gün zamanında almaları çok zordur. DNP tabletlerin oral uygulaması ishal, kas krampları, yorgunluk, mide bulantısı, kusma ve uykusuzluk gibi pek çok yan etkiye neden olabilir; bu nedenle, uzun süreli ve parenteral uygulama için yapılan çalışmalar anlam kazanmaktadır.

Bu tezde amaçlanan AD tedavisi için şimdiye kadar geliştirilmiş yöntemlerin yanı sıra kan beyin bariyerini de göz önünde bulundurarak anti-alzheimer etkili nano sistemleri hazırlayıp karakterizasyonunu araştırmaktır. DNP'nin taşıdığı özellikleri dolayısıyla polimerik nanopartikül hazırlanmasında polimer olarak PLGA (Resomer 502 H) uygun görülmüştür. Bu tez çalışmasında DNP yüklü PLGA bazlı nanopartiküller 'Çift Emülsifikasyon Çözücü Buharlaştırma' yöntemi ile hazırlanmış ve sulu faz içeriğinde bulunan PVA konsantrasyonun ve prob sonikasyon süresinin nanopartikül özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. İncelenen sonuçlardan sonra uygun formülasyon seçilmiştir. Uygun formülasyonun üzerine trehaloz etkisi değerlendirilmiş ve saklama koşulları ortaya çıkmıştır. Gastrointestinal sıvılarda 24 saatlik stabilite testi gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda dissolüsyon, salım kinetiği ve katı hal karakterizasyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

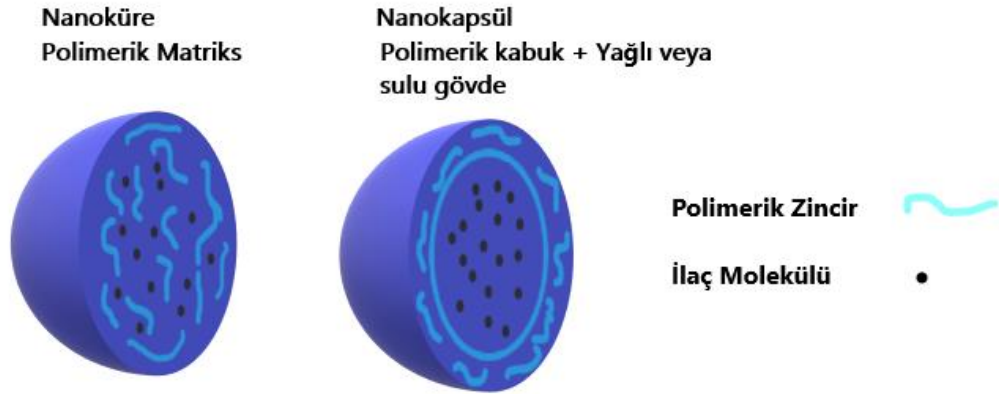
In vivo CAM deneyleri ile I-DNP kodlu formülasyonun anjiyogenezi zayıflattığını (azalttığı/inhibe ettiği) belirlenmiş ve hazırlanan nanopartikül sistemin kolinerjik sistemin uyarılmasıyla yeni bir anti-anjiyojenik tedavi olabileceği sonucuna varılmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Nanopartiküllerin Tanımı ve Çeşitleri

Nanoteknolojinin ortaya çıkışından bu yana, aktif farmasötik bileşenler (API'ler) için taşıyıcı olarak nanoparçacıkların kullanılması ilaç salımı alanında önemli bir araştırma ilgisi oluşmuştur. Bu taşıyıcılar, hastalıkların tedavisi, önlenmesi ve teşhisi için en umut verici dozaj formlarından biri haline gelmiştir. Bir nanoparçacık içine bir API yüklemek, onu vücudun doğal savunmaları tarafından metabolize edilmekten koruyabilir ve kan dolaşımındaki biyoyararlanımını artırabilir (Crucho ve Barros, 2015).

Farmasötik nanopartiküller, biyolojik olarak parçalanabilen veya parçalanamayan katı, mikron altı boyutlu ilaç taşıyıcısı olarak tanımlanır (Pinto Reis vd., 2006). Nanopartikül terimi hem nanoküreler hem de nanokapsüller için birleşik bir isimdir. Nanoküreler, ilacın düzgün bir şekilde dağıldığı matris sistemidir, nanokapsüller ise ilacın benzersiz bir polimerik zar ile çevrelendiği sistemdir (Pal vd., 2011). Nanoküre ve nanokapsül yapısı Şekil 2.1.'de şematik olarak sunulmuştur.



2.1.1. Polimerik nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, farmasötik uygulamalar için dünya çapında ilaç salım sistemleri olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Değiştirilmiş ilaç salımı sağlamaları en önemli özelliklerindedir (Öztürk vd., 2019).

Nanopartiküller uzun yıllar önce kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların taşınması ve aşilar için araştırılmıştır. Nanopartiküller, mikron altı boyut/ nano boyutlu özellikleri ile mikropartiküler sistemlere göre hücre içi alımları daha fazla ve iyi olmaktadır (Derman, Kızılbey ve Akdeste, 2013).

Polimerik nanopartiküller, ilacın çözündüğü, hapsedildiği, kapsüllendiği ya da bir matris haline hazırlanan, 1000 nm'den düşük (10-1000 nm) boyuttaki biyoyumlu ve biyoparçalanabilir polimerlerden hazırlanır (Nagavarma vd., 2012).

Bir ilaç verme sistemi olarak nanopartikülleri kullanmanın avantajları şunlardır:

1. Nanopartiküller boyutları ve benzersiz yüzey özellikleri sayesinde aktif ve pasif ilaç hedeflemesine uygundur (Mohanraj ve Chen, 2007).
2. Nanopartiküllerin hazırlanmasında biyoparçalanabilir materyallerin kullanılmasıdır. Biyoparçalanabilir materyaller, modifiye salım sağlamaya olanak sağlar. Ayrıca nanopartiküller; peptid ve proteinlerin, ilaç etkin maddelerinin stabilitesi artırma potansiyeline sahiptir (Derman, Kızılbey ve Akdeste, 2013).
3. Enkapsülasyon etkinlikleri yüksektir ve bu özellikleri ile etkin maddenin intrasellüler dağılımı artar (Şengel-Türk ve Haşçıçek, 2009).
4. Sistem, oküler, nazal, rektal, oral, parenteral vb. çeşitli uygulama yolları ile kullanılabilir (Mohanraj ve Chen, 2007). Geleneksel oral ve intravenöz uygulama yöntemlerine göre etkinlik açısından önemli bir gelişme sunarlar (Nagavarma vd., 2012).
5. Düşük partikül boyutları nanopartiküllerin tümör hücreleri içine alımını sağlar ve hücreler tarafından tutulmaları artmaktadır (Şengel-Türk ve Haşçıçek, 2009).
6. Sterilizasyonları oldukça kolaydır, fizyolojik ortamda biyoparçalanabilir ve parçalanabilir ara ürünleri toksik özellik göstermez (Derman, Kızılbey ve Akdeste, 2013).

2.1.2. Polimerik nanopartikül hazırlamada kullanılan polimerler

Nanopartiküllerin hazırlanmasında doğal (proteinler, polisakkaritler) ve sentetik olarak üretilen polimerler kullanılmaktadır. Literatür incelendiğinde ilk hazırlanan nanopartiküllerin albumin gibi doğal polimerlerden veya poli (metil metakrilat), poli (akrilamid) gibi biyoparçalanabilir olmayan sentetik polimerlerden üretildiği görülmektedir (Derman, Kızılbey ve Akdeste, 2013). Tablo 2.1’de ilaç taşıyıcı olarak tasarlanan nanopartikülleri oluşturan en yaygın kullanılan polimerler sunulmuştur.

Tablo 2.1. Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan bazı polimer örnekleri (Vauthier ve Bouchemal, 2009)

Tip	İsim	Kısaltma veya Ticari İsimler*
Sentetik homopolimerler	poli(laktit)	PLA
	Poli(laktit-ko-glikolit)	PLGA
	Poli(epsilon-kaprolakton)	PCL
	Poli(izobütilsiyanoakrilat)	PICBA
	Poli(izoheksilsiyanoakrilat)	PIHCA
	Poli(n-bütilsiyanoakrilat)	PBCA
	Poli(akrilat) ve poli(metakrilat)	Eudragit*
Doğal polimerler	Aljinat	
	Kitosan	
	Jelatin	
	Albümin	
Kopolimerler	Poli(laktit)-poli(etilen glikol)	PLAN-PEG
	Poli(laktit-ko-glikolid)-poli(etilen glikol)	PLGA-PEG
	Poli(epsilon-kaprolakton)-poli(etilen glikol)	PCL-PEG
	Poli(hekzadesilsiyanoakrilat-ko-poli(etilen glikol) siyanoakrilat)	Poli(HDCA-PEGCA)

Kolloidal stabilizatörleri	Dekstran	
	Pluronik F68	F68
	Polivinil alkol)	PVA
	Kopolimerler (yukarıya bakın	
	Tween® 20 veya Tween® 80	

[**Tablo 2.1.** (Devam) *Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan bazı polimer örnekleri (Vauthier ve Bouchemal, 2009)*]

Polimerler toksik olmaması ve antijenite oluşturmaması açısından vücutla uyumlu olmalı ve biyolojik olarak parçalanabilir olmalıdır. Doğal polimerler, polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında en sık kullanılan polimerlerdir (Nagavarma vd., 2012).

Biyobozunur ve biyouyumlu polimerler, poli laktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) veya bunların kopolimerlerinden (PLGA) üretilen nanopartiküller, ilaç salım sistemleri için en yoğun şekilde araştırılan polimerlerdir (Cohen-Sela vd., 2009).

Sentetik polimerler, doğal polimerlere göre yüksek saflık ve tekrar üretilebilirlik avantajına sahiptir. Özellikle, poli(laktid-ko-glikolit) (PLGA) insanlarda kullanılan tedavi, teşhis gibi ilaç taşıyıcı sistemlerde FDA (ABD Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanmıştır (Astete ve Sabliov, 2006).

2.1.3. Polimerik nanopartikül hazırlanmasında kullanılan yöntemler

Polimerik nanopartiküller, kullanılma amacına ve ilacın fiziko-kimyasal özelliklerine bağlı olarak farklı yöntemler ile hazırlanabilmektedir. Belirli bir uygulama için istenen özelliklere sahip nanopartikülleri elde etmek için en uygun yöntemin seçimi hayati bir rol oynar (Crucho ve Barros, 2017).

Nanopartiküllerin hazırlanmasına yönelik birçok yöntem iki ana adım içerir. Emülsifiye edilmiş bir sistemin hazırlanması birinci adıma karşılık gelirken, sürecin ikinci adımında nanopartiküller oluşturulur. Bu ikinci adım, bir polimerin çökmesi veya jelleşmesi veya monomerlerin polimerizasyonu ile elde edilir. Genelde bu ikinci adımın

prensibi yöntemine adını verir. Metodun adı, organik çözücünün çökeltilmesi veya buharlaştırılmasıyla oluşabilen ikinci adımın ilkelerinden gelmektedir (Pulingam vd., 2022).

Birkaç durumda, nanopartiküller başlangıçtaki emülsifiye edilmiş sistemle aynı zamanda oluşur. Uygun emülsifiye edilmiş sistemler emülsiyonlar, mini emülsiyonlar, nano emülsiyonlar ve mikro emülsiyonlar olabilir (Vauthier ve Bouchemal, 2009). Tablo 2.2’de nanopartiküllerin hazırlanması için kullanılan teknikler gösterilmiştir.

Tablo 2.2. *Nanopartiküllerin hazırlanması için çeşitli tekniklerin şematik gösterimi (Crucho ve Barros, 2017)*

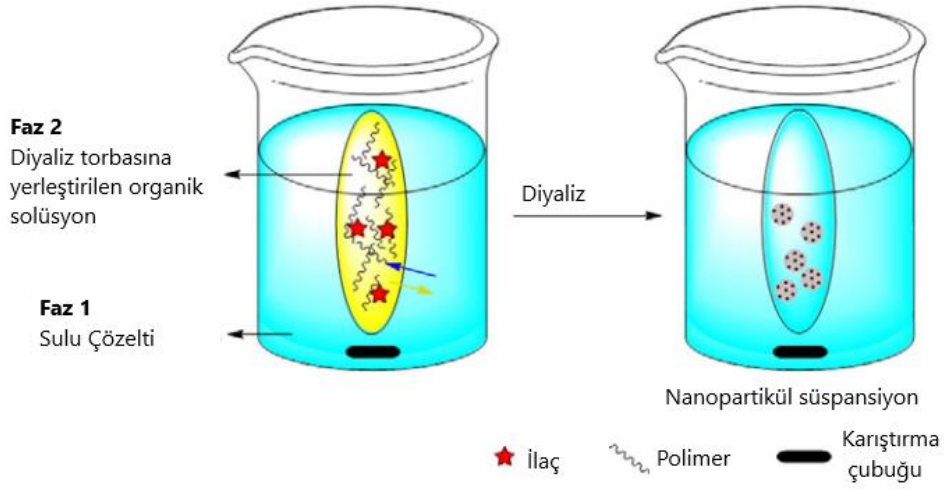
Monomerlerden Elde Yöntemleri	Polimerlerden Elde Yöntemleri
Emülsiyon Polimerizasyonu	Çözücü Buharlaştırma
Mini Emülsiyon Polimerizasyonu	Tuzla Çöktürme
Mikro Emülsiyon Polimerizasyonu	Nano Çöktürme
Yüzeyler Arası Polimerizasyonu	Diyaliz
Kontrollü Radikal Polimerizasyonu	Süperkritik Sıvı Teknolojisi

Önceden oluşturulmuş polimerlerden nanopartiküllerin hazırlanması için, süperkritik bir çözeltinin hızlı bir şekilde genişmesini veya süperkritik bir çözeltinin sıvı çözücüye hızlı bir şekilde genişmesini içeren çözücü buharlaştırma, tuzlama, diyaliz ve süperkritik sıvı teknolojisi gibi yöntemler kullanılabilir (Rao ve Geckeler, 2011).

2.1.3.1. Diyaliz yöntemi

Diyaliz yöntemi düşük boyutlu ve monodispers nanopartiküllerin hazırlanması için basit ve etkili bir yöntemdir. Polimer ilk olarak organik bir çözücü içinde çözündürülür ardından uygun moleküler ağırlığa sahip bir diyaliz tüpü içine yerleştirilir (Nagavarma vd., 2012).

Diyaliz yöntemi, önceki karışabilir madde ve karışabilen solvent olmayan bir maddeye karşı gerçekleştirilir. Çözücünün zar içinde yer değiştirmesini, çözünürlük kaybı ve homojen nanoparçacık süspansiyonlarının oluşumu nedeniyle polimerin ilerleyen agregasyonu izler (Rao ve Geckeler, 2011). Şekil 2.2’de diyaliz yöntemi ile nanopartiküllerin hazırlanması gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Diyaliz yöntemi (Crucho ve Barros, 2017)

Temel ön koşullar, çözücülerin karışabilirliği ve seyreltik polimer çözeltilerinin varlığıdır. Ek olarak, arayüzey gerilimindeki bir artış, polimer agregasyonu ile sonuçlanır ve nanopartiküllerin koloidal bir süspansiyonunun oluşumuna yol açar. Diyaliz basit ve yaygın bir yöntem olmasına rağmen, karşı diyaliz ortamının büyük hacmi, işlemin uzun sürmesi nedeniyle nanopartiküle yüklenen etkin maddenin erken salınmasına neden olabilir (Crucho ve Barros, 2017).

2.1.3.2. Süper kritik sıvı teknolojisi

Nanopartikül üretimi için çevre açısından daha güvenli yöntemler geliştirme ihtiyacı, süperkritik akışkanların daha çevre dostu çözücüler olarak kullanılmasına,

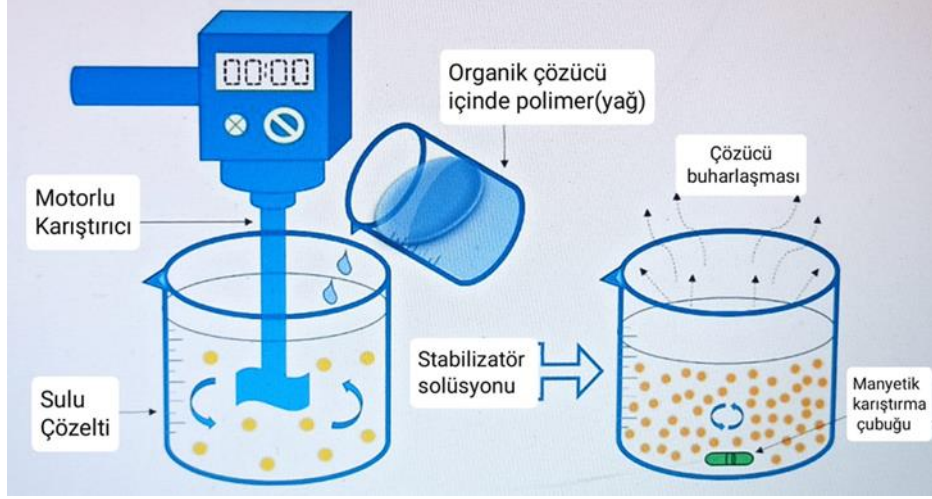
yüksek saflıkta ve herhangi bir organik çözücü izi olmadan nanopartikül üretim potansiyeline yönelik araştırmaları motive etmiştir (Nagavarma vd., 2012).

Süperkritik akışkanlar (SCF), kritik sıcaklığının (T_c) ve kritik basıncının (P_c) üzerinde sıkıştırılmış ve ısıtılmış bir sıvıdır. Bu tür koşullarda, fizikokimyasal özellikleri bir gaz ve bir sıvı arasında orta düzeydedir. Bu, sıvının bir gaz gibi davrandığı ve ayrıca bir sıvının tipik yoğunluğuna ve dolayısıyla çözme özelliklerine sahip olduğu maddenin yeni bir halidir. Süper kritik karbon dioksit ($scCO_2$), hafif kritik koşullara sahip olması, bol olması, ucuz olması, yanıcı olmaması, toksik olmaması ve çevreye zararsız olması nedeniyle en yaygın kullanılan SCF'dir. Süper kritik akışkan teknolojisinin uygulanması, yüksek basınçlı ekipman için yüksek yatırım gerektirir (Crucho ve Barros, 2017).

Ek olarak, çok sayıda süperkritik sıvının mevcudiyetine rağmen, çoğu polimer, süperkritik sıvılarda zayıf çözünürlük veya hatta çözünmezlik sergiler ve bu, bu teknolojinin ana dezavantajıdır (Crucho ve Barros, 2017).

2.1.3.3. Çözücü buharlaştırma yöntemi

Bu yöntemde uçucu çözücüler içinde polimer çözeltileri hazırlanır ve emülsiyonlar formüle edilmektedir (Nagavarma vd., 2012). Diklorometan ve kloroform geçmişte yaygın olarak kullanılmasına rağmen günümüzde yerini daha iyi bir toksikolojik profil gösteren etil asetat yer almaktadır. Hazırlanan emülsiyonun nanopartikül süspansiyonuna dönüşmesi, emülsiyonun sürekli fazı boyunca yayılmasına izin verilen polimerin çözücüsünün buharlaştırılmasıyla gerçekleşmektedir. İşlem oda ısısında ya da vakum altında gerçekleştirilen yavaş bir işlemdir (Vauthier ve Bouchemal, 2009). Şekil 2.3'te ilgili yöntem şematik olarak gösterilmiştir.



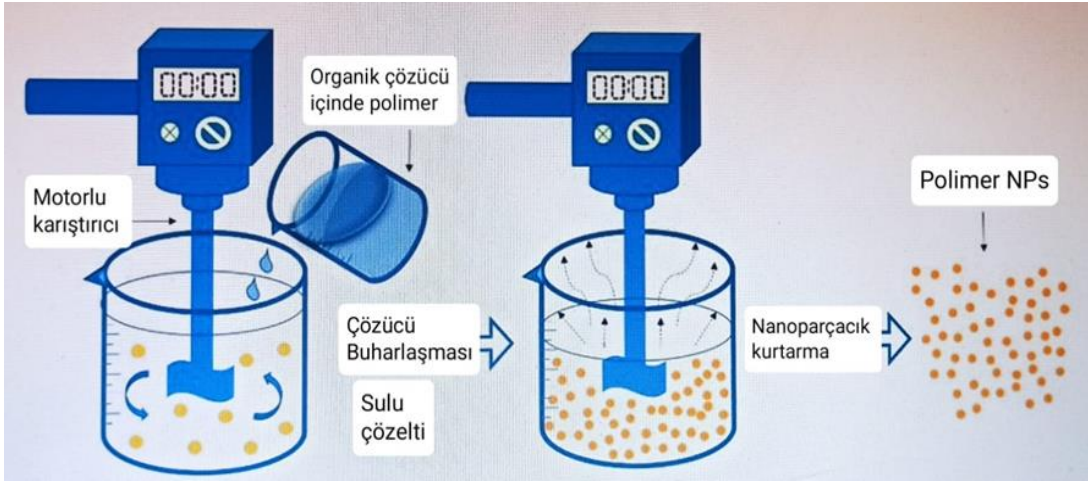
Şekil 2.3. Emülsifikasyon çözücü buharlaştırma yöntemi (Pulingam vd., 2022)

Emülsiyonların hazırlanması için iki ana strateji kullanılmaktadır; tek emülsiyonların hazırlanmasına örnek olarak su (S) içinde yağ (Y) (Y/S) veya çift emülsiyonların hazırlanmasına örnek olarak (S/Y)/S verilebilir. Bu yöntemler, düşük basınç altında veya oda sıcaklığında sürekli manyetik karıştırma ile yüksek hızlı homojenizasyon veya ultrasonikasyon, ardından çözücünün oda ısısında ya da vakum altında buharlaştırılmasını içerir. Ardından oluşan nanopartiküller, ultrasantrifüjleme ile toplanabilir ve yüzey etkin maddeler gibi katkı maddelerini uzaklaştırmak için distile su ile yıkanabilir. En son aşamada katı ürün elde etmek için formülasyon liyofilize edilir (Nagavarma vd., 2012).

Çözücü buharlaştırma tekniği, polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Kısaca, polimer, ilacın içinde çözüldüğü / dağıldığı bir organik çözücü içinde çözülür. Nihai çözelti daha sonra, bir emülsiyon oluşturmak için yüksek homojenleştirme altında poli vinil alkol (PVA), polisorbitat 80, poloksamer 188 vb. gibi sürfaktan / emülsifiye edici madde içeren sulu faza eklenir. Kararlı emülsiyonun oluşumundan sonra, organik çözücü ya sıcaklığı düşürülmüş basınç altında arttırarak ya da sürekli karıştırarak buharlaştırılır / çıkarılır. Üretilen nanosüspansiyon, ince bir nanopartikül tozu elde etmek için dondurularak kurutulur (Mahalingam ve Krishnamoorthy, 2015).

2.1.3.3.1. Tekli emülsiyon ve buharlaştırma yöntemi

Suda yağ emülsifikasyon prosesleri, tekli emülsiyon proseslerinin örnekleridir. Uygun miktardaki polimer, tek fazlı bir çözelti hazırlamak için önce suyla karışmaz, uçucu bir organik çözücü (örn. diklorometan (DCM)) içinde çözülür. Çözeltide bir dispersiyon oluşturmak için çözeltiye yaklaşık 20-30 µm partikül büyüklüğündeki ilaç eklenir. Bu polimer çözülmüş ilaç disperse solüsyon daha sonra büyük hacimde su içinde emülgatör (polivinil alkol (PVA) vb.) varlığında uygun sıcaklıkta karıştırılarak emülsifiye edilir. Daha sonra organik çözücünün buharlaşmasına izin verilir veya uygulanabilir koşullar altında yağ damlacıklarını sertleştirmek için özü çıkarılır (Makadia ve Siegel, 2011). Şekil 2.4'te tekli emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yöntemi şematik olarak gösterilmiştir.



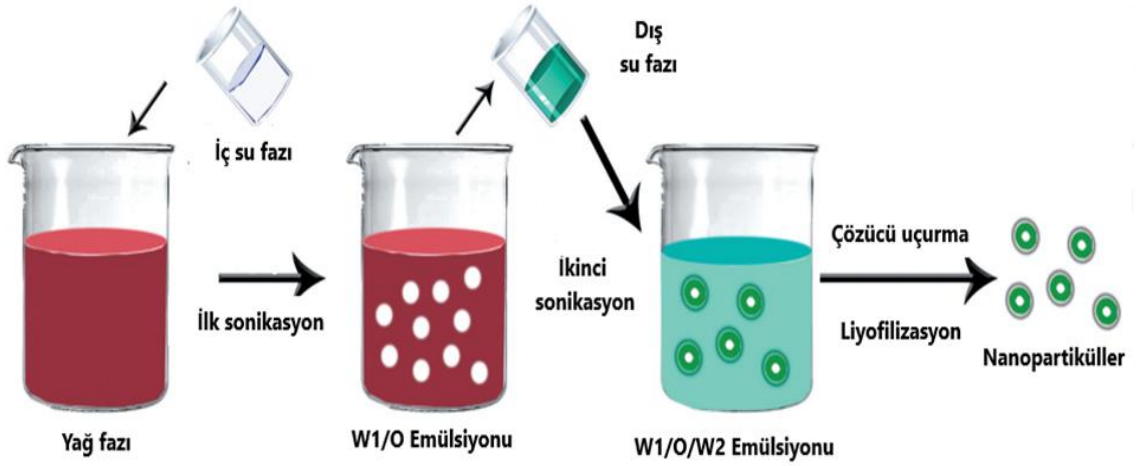
Şekil 2.4. Tekli emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yöntemi (Pulingam vd., 2022)

Önceki durumda, emülsiyon, solvent buharlaştıkça karıştırma hızının kontrol edilmesiyle düşük veya atmosferik basınçta tutulur. İkinci durumda, emülsiyon, yağ damlacıkları ile ilişkili çözücüye dağıtmak için büyük miktarda suya (sürfaktanlı veya yüzey aktif maddesiz) veya başka söndürme ortamına aktarılır. Nihai katı mikroküreler daha sonra yıkanır ve uygun koşullar altında kurularak nihai bir enjektörde edilebilir mikroküre formülasyonu elde edilir (Makadia ve Siegel, 2011).

2.1.3.3.2. Çift emülsiyon ve buharlaştırma yöntemi

Çift emülsiyon kavramına ilk olarak 1925 yılında William Seifriz tarafından erişilmiş ve yağ fazının yoğunluğunun nihai emülsiyonun özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çift emülsiyonun stabilitesi esas olarak adımların çözünen konsantrasyonuna veya ozmotik basıncına bağlıdır. Dış fazdaki artan ozmotik basınç emülsiyonun iç damlacıklarının genişlemesini sağlarken, azalan ozmotik basınç iç damlacıkların büzülmesinde önem taşır. Ozmotik basınç dışında (her iki sulu fazdaki çözünen konsantrasyonundaki farklılıktan dolayı), Laplace basıncı da (damlacıkların boyutu ve yüzey geriliminden dolayı) dahili damlacıklar içinde aynı yüksek basınca ilham verir ve erken birleşme ve çift parçalanma ile sonuçlanabilir (Panigrahi vd., 2021).

Su içinde yağ emülsiyon yöntemleri, steroidler gibi suda çözünmeyen ilaçlar için ideal olan tekli emülsiyon yöntemlerinin aksine suda çözünen ilaçları kapsüllemek için en uygun olanlardır. İlk olarak, uygun miktarda ilaç sulu fazda (deiyonize su) çözündürülür ve daha sonra bu ilaç çözeltisi, bir yağ içinde su emülsiyonu elde etmek üzere kuvvetli karıştırma ile DCM veya kloroform içindeki PLGA ve/veya PLA çözeltisinden oluşan organik faza eklenir. Daha sonra, yağ içinde su birincil emülsiyonu PVA sulu solüsyonuna eklenir ve uygun gerilimli karıştırma koşullarında yaklaşık bir dakika daha emülsifiye edilir. Daha sonra organik solventin buharlaşmasına izin verilir veya suda yağ emülsiyon teknikleriyle aynı şekilde ekstrakte edilir. Çift emülsiyon proseslerinde, solvent seçimi ve karıştırma hızı ağırlıklı olarak kapsülleme verimini ve nihai partikül boyutunu etkiler (Makadia ve Siegel, 2011). Şekil 2.5'te çift emülsiyon ve çözücü uçurma yöntemi gösterilmiştir.

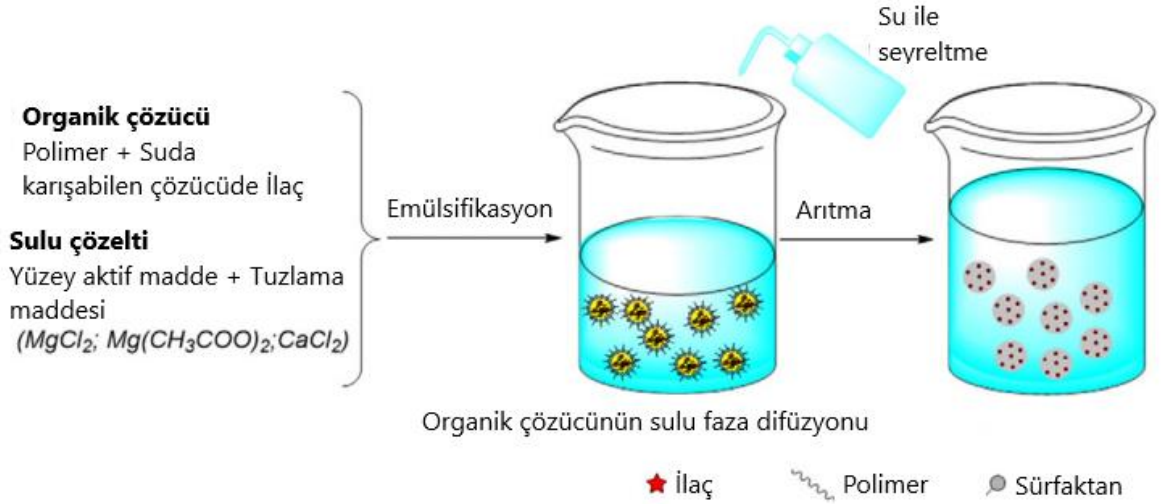


Şekil 2.5. Çift emülsiyon ve çözücü uçurma yöntemi Chaofan vd., 2014)

Çift emülsiyon, uygun adsorbent üzerine adsorbe edilebilir veya nanopartiküller, yüksek hızda santrifüjleme/ultrasantrifüjleme ve uygun yıkama ile izole edilebilir (Panigrahi vd., 2021).

2.1.3.4. Tuzla çöktürme

Tuzla çöktürme tekniği, çevre ve fizyolojik sistem için tehlikeli olan yüzey aktif maddeler ve klorlu çözücüler gibi organik çözücülerin kullanımının üstesinden gelmek için emülsiyon işleminin değiştirilmiş bir versiyonudur. Kısaca ilaç ve polimer, suda karışabilen organik çözücü içinde çözülür ve elde edilen çözelti, sürekli karıştırma altında tuz giderme maddesi ve dengeleyici içeren sulu çözeltiye ilave edilir. Magnezyum klorür, kalsiyum klorür ve magnezyum asetat yaygın olarak kullanılan tuzlama maddeleridir. Bu tuzlama maddeleri, organik çözücünün sulu fazda karışmasını önleyerek emülsiyon oluşumuna neden olur. Emülsiyonun fazla miktarda suyla seyreltilmesiyle elde edilen ters tuzlama etkisi, polimerin çökmesine yol açar, bu da ilacı polimer matrisi içinde kapsüller ve nanopartiküllerin oluşumuyla sonuçlanır. Çapraz akışlı filtrasyon tekniği, kalıntı solventi ve tuzlama maddelerini uzaklaştırmak için kullanılır (Mahalingam ve Krishnamoorthy, 2015). Şekil 2.6.'da ters tuzlama yöntemi şematik olarak gösterilmiştir.



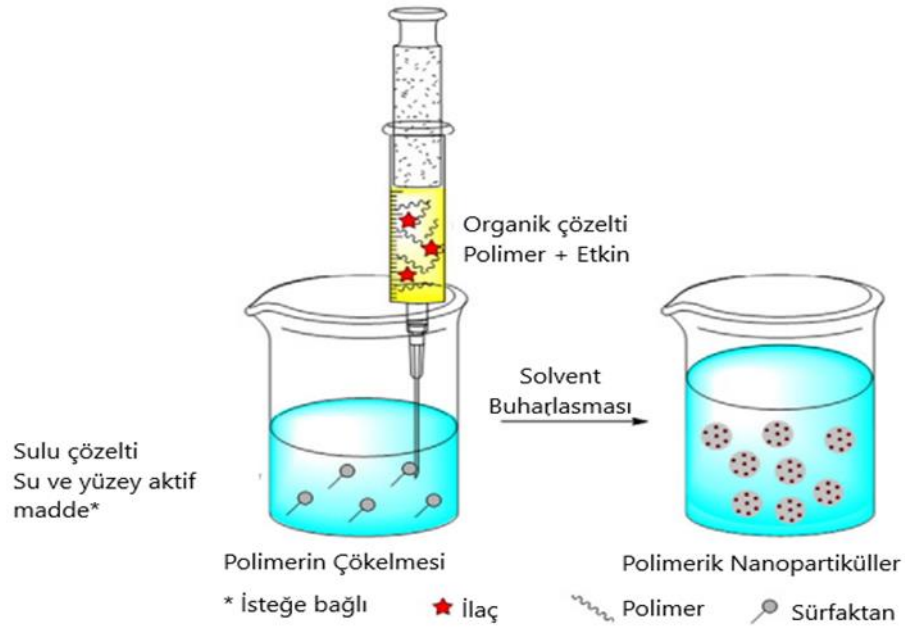
Şekil 2.6. Emülsifikasyon-ters tuzlama-out yöntemi (Crucho ve Barros, 2017)

2.1.3.5. Püskürtme kurutma yöntemi

Püskürterek kurutma tekniği, sıvıları sürekli bir işlem altında kurutulmuş parçacıklara dönüştürür. Düşük fiyat, hızlı işlem ve üretilen tozların fizikokimyasal özelliklerini değişen işlem parametreleriyle modüle etme imkânı gibi avantajlar sayesinde dondurarak kurutmaya ilginç bir alternatif olabilir. Proteinler gibi ısıya duyarlı molekülleri önemli ölçüde bozulmadan koruyan bir tedavidir. Püskürterek kurutmaya tabi tutulan karışım genellikle sulu süspansiyondur ve kurutma yardımcısı olarak eklenen bir çözücü bileşik içerir. Kurutma yardımcı maddelerine örnek olarak koloidal silikon dioksit, laktoz, manitol ve PVP (204) verilebilir. Püskürterek kurutma işlemi dört önemli adımı içerir; (1) beslemenin, yani nanopartikül süspansiyonunun bir sprey halinde atomizasyonu, (2) sprey-hava teması, (3) spreyin kurutulması ve (4) kurutulmuş ürünün kurutma gazından ayrılmasıdır. Dondurarak kurutma tekniklerine benzer şekilde, nanopartikül süspansiyonu kuru bir formülasyona dönüştürülür. Toz form, nano partikülleri oluşturan polimerin camsı geçiş sıcaklığının altındaki bir sıcaklıkta saklanmalıdır. Ana sorun, agregaların ayrışmasının zor olabileceği tozun yeniden dağıtılması sırasında bulunabilir (Vauthier ve Bouchemal, 2009).

2.1.3.6. Nanoçöktürme yöntemi

Nanoçöktürme yöntemi, polimer(ler), aktif molekül(ler) ve yüzey aktif madde(ler) içeren bir çözücü veya suyla karışabilen çözücülerin karışımını içeren homojen bir organik fazın, çözücü olmayan bir sulu faza eklenmesinden oluşur veya solvent olmayan polimer(ler) ve sürfaktan (lar)ın bir karışımıdır. Temel olarak, bu teknik, belirli bir polimerin iyi çözücünden zayıf ortama aktarılması yoluyla çökmesi olarak tanımlanabilir (Minost vd., 2012). Şekil 2.7’de nanoçöktürme yöntemi şematik olarak gösterilmiştir.



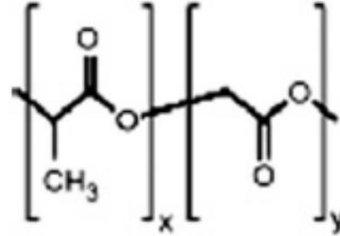
Şekil 2.7. Nanoçöktürme yöntemi (Crucho ve Barros, 2017)

Nanoçöktürme yöntemi başlıca üç ana bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; sentetik, yarı sentetik veya doğal polimer, polimer solventi ve polimer için çözücü olmayan solvent. Polimer çözücü olarak suyla karışabilen ve buharlaştırılarak uzaklaştırılması kolay olan etanol, aseton, heksan, metilen klorür veya dioksan gibi organik çözücü seçilir. Aseton bu yöntemde sıklıkla kullanılan bir polimer çözücüsüdür. Farklı durumlarda çözücü karışımlarından, az miktarda su içeren aseton, etanol ile aseton karışımlarından ve metanolden oluşur (Rao ve Geckeler, 2011).

Çözücünün sulu faza hızlı difüzyonu, iki faz arasındaki arayüzey geriliminde bir azalmaya neden olur, bu da yüzey alanını artırır ve herhangi bir mekanik karıştırma olmadan bile küçük organik çözücü damlacıklarının oluşmasına yol açar. Bununla birlikte, suda çözünen ilaçlar için zayıf tutma verimliliği sağlar. Modifiye Nanoçöktürme yöntemi, sulu faz pH'sinin etkisi ve ilaç tuz formundaki değişiklik gibi çeşitli yaklaşımları içeren poli (D, L-laktid-ko-glikolid) (PLGA) polimeri kullanılarak geliştirilmiştir (B. Mishra, Patel ve Tiwari, 2010).

2.2. PLGA

Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), glikolik ve laktik asidin iki siklik dimerinin rastgele halka açma kopolimerizasyonu ile elde edilen sentetik bir kopolimerdir. Laktik ve glikolik asit, alifatik bir lineer poliester oluşturan kopolimerizasyon sırasında rastgele bir sırayla ester bağlantısıyla birbirine bağlanır (Locatelli ve Franchini, 2012). Şekil 2.8'de PLGA'nın moleküler yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.8. PLGA'nın moleküler yapısı (Danhier vd., 2012)

Polimerik nanopartikülleri formüle etmek için geliştirilen farklı polimerler arasında PLGA, çekici özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmüştür. Bu özellikler; (i) biyolojik olarak parçalanabilirlik ve biyouyumluluk, (ii) parenteral uygulama için ilaç dağıtım sistemlerinde FDA ve Avrupa İlaç Ajansı onayı, (iii) iyi hidrofilik veya hidrofobik küçük moleküller veya makromoleküller gibi çeşitli ilaç türlerine uyarlanmış formülasyonları

ve üretim yöntemlerini, (iv) ilacın bozunmaya karşı korunmasını, (v) sürekli / uzatılmış / modifiye salım sağlaması, (vi) fizyolojik koşullardan koruma sağlamak için yüzey özelliklerini değiştirme olasılığı ve/veya biyolojik malzemelerle daha iyi etkileşim (vii) nanopartikülleri belirli organlara veya hücrelere hedefleme olasılığı bunlara örnektir. Tüm bunlar, PLGA'nın kanser, inflamasyon, aşılama ve farklı hastalıkların tedavisi gibi çeşitli tıp uygulamalarında ilaç salım sistemleri olarak nanopartiküllerini tasarlamak için neden seçildiğinin en önemli kanıtlarıdır (Danhier vd., 2012).

Mikroküreler, nanopartiküller ve implantlar gibi PLGA tabanlı kontrollü ilaç salım sistemleri, farklı klinik talepleri karşılamak için birkaç günden aylara kadar uzun vadeli sürekli ilaç salınımı sağlayabilir. Halihazırda, kapsüllenmiş küçük moleküllü ilaçların, proteinlerin veya peptitlerin sürekli salımı için ticari olarak temin edilebilen birkaç PLGA bazlı ürün halihazırda mevcuttur (Guo vd., 2015).

PLGA, insanlarda çeşitli ilaç salım sistemlerinde ABD, FDA'nın yanı sıra Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından da onaylanmıştır. Polimerler, farklı molekül ağırlıkları ve kopolimer bileşimleri ile ticari olarak temin edilebilir. Bozunma süresi, moleküler ağırlık ve kopolimer oranına bağlı olarak aylardan yıllara kadar değişebilir (Danhier vd., 2012).

Polimerizasyon reaksiyonu sırasında laktitin glikolide oranı değiştirilerek farklı PLGA biçimleri elde edilebilir. PLGA 50:50 (%50 laktik asit ve %50 glikolik asitten oluşan bir kopolimeri ifade eder), PLGA 75:25, PLGA 80:20, vb. (Sharma vd., 2016).

PLGA kullanmanın en büyük avantajı, bu kopolimerin sulu bir ortamda tamamen biyolojik bozunmaya uğramasıdır. Bu işlem, polimer zincirinde bulunan ester bağlarının hidrolitik bozunması yoluyla gerçekleşir ve tüm polimerik matriste tek tip bir orana sahiptir. Bu şekilde, zincirde bulunan karboksilik asitlerin sayısı artar ve bu, biyolojik bozunma sürecini katalize ediyor gibi görünür. PLGA kopolimerinin ilk biyobozunma ürünleri, vücutta karbondioksit ve su olarak metabolize edilerek atılabilen veya böbrekte değişmeden atılabilen iki orijinal monomer olan laktik ve glikolik asitlerdir (Locatelli ve Franchini, 2012).

PLGA hemen hemen her türlü konfigürasyonda işlenebilir ve çeşitli molekülleri enkapsüllemek için kullanılabilir. PLGA polimerleri, tetrahidrofur, aseton,

diklorometan, kloroform ve etil asetat gibi çeşitli uçucu organik çözücüler içinde çözünebilmektedir (Sharma vd., 2016).

PLA ve PGA, iki monomer endojen olduğundan ve vücut tarafından Krebs döngüsü yoluyla kolayca metabolize edildiğinden, ilaç iletimi veya biyomateryal uygulamaları için PLGA kullanımı ile minimal bir sistemik toksisite ilişkilidir (Danhier vd., 2012).

2.2.1. PLGA formülasyon yöntemleri

PLGA nanopartikülleri, ilaçlar, peptidler, proteinler, aşular ve nükleotidler için taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Nanopartiküller, ilaç etkin maddelerini bozunmaya karşı koruyabilir ve modifiye ilaç salımı sağlayabilir (Sah vd., 2013).

PLGA nanopartiküllerinin hazırlama yöntemleri ve özellikleri daha önce gözden geçirilmiştir. PLGA nanopartiküllerinin oluşumu için en yaygın kullanılan yöntem, tek veya çift emülsiyon-çözücü buharlaştırmadır (Lü vd., 2009). Nanopartiküller ayrıca arayüzey biriktirme yöntemi olarak da adlandırılan nanoçöktürme yöntemiyle de oluşturulabilir (Danhier vd., 2012).

2.2.2. Fizikokimyasal özellikleri

PLGA hemen hemen farklı morfolojide ve boyutta işlenebilir ayrıca farklı boyutlardaki molekülleri kapsülleyebilir. Aseton, klorlu çözücüler, etil asetat veya tetrahidofuran dahil olmak üzere çok çeşitli yaygın çözücülerde çözünür. PLGA su ortamında ester bağlantılarının hidrolizi ile biyolojik olarak parçalanır. PLGA kopolimerleri daha az hidrofildir, daha az su emer ve ardından daha yavaş bozunur. PLGA'nın hidrolizi nedeniyle, tipik olarak katı bir formülasyonun değişmez tanımları olarak kabul edilen camsı geçiş sıcaklığı (T_g), nem içeriği ve moleküler ağırlık gibi parametreler zamanla değişebilir (Makadia ve Siegel, 2011).

Yüzey modifikasyonunun etkinliği, yüzey yükü ölçülerek tahmin edilebilir. Yöntemlerden biri, bir elektrik potansiyeli tarafından izlenen yüklü parçacıkların

hareketliliği yoluyla nanoparçacıkların zeta potansiyelinin (ζ) belirlenmesinden oluşur. Polimere ve yüzey modifikasyonuna bağlı olarak zeta potansiyel değerleri pozitif, nötr veya negatif olabilir. Ortalama parçacık boyutu ve çoklu dağılma indeksi, foton korelasyon spektroskopisi (dinamik ışık saçılması olarak da adlandırılır) ile ölçülebilir. Bu teknik, parçacıkların Brown hareketinin neden olduğu ışığın dağılmasına dayanmaktadır. Tipik olarak, nanoparçacıkların boyutu 100 ila 250 nm aralığındadır (Danhier vd., 2012).

PLGA'nın mekanik gücü, moleküler ağırlık (M_w) ve polidispersite indeksi (PDI) gibi fiziksel özelliklerden etkilenir. Aynı zamanda bu özellikler ilaç salım sistemi olarak formüle edilme kabiliyetini de etkiler, ilaç salım sisteminin bozunma hızını ve hidrolizi kontrol edebilir. Bununla birlikte, son çalışmalar, ilaç tipinin de salım hızının belirlenmesinde rol oynadığını bulmuştur (Makadia ve Siegel, 2011).

2.3. Resomer® RG 502 H

Günümüzde birçok PLGA çeşidi bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak; Resomer® RG 503, Resomer® RG 502, Resomer® RG 502 H, Resomer® RG 504 H, Resomer® RG 503 H vb. verilebilir. PLGA çeşitliliğinin sebebi laktik asit ve glikolik asit oranları uç başlığının ester asit yapısından kaynaklanmasıdır (<http-1>). Tablo 2.3.'te özel bir PLGA türeviden olan Resomer® RG 502 H'nin özellikleri sunulmuştur.

Tablo 2.3. Resomer 502 H özellikleri (<http-2>)

Kalite düzeyi	200
Biçim	Amorf
Monomer oranı	Laktid: glikolid 50:50
Moleküler ağırlık	7.000-17.000

Viskozite	0.16-0.24 dL/g, kloroformda (25 °C, Ubbelohde) %0,1 (w/v) (boyut 0c cam kapiler viskozimetre)
Camsı geçiş sıcaklığı	T _g 42-46 °C
Saklama koşulu	2-8°C

[**Tablo 2.3.** (Devam) *Resomer 502 H özellikleri (http-2)*]

Genel olarak, farklı formülasyonlardaki hidrofilik polimerler, nispeten yüksek glikolid içeriğine (50:50) sahip PLGA kullanıldığında, yüksek bir ilaç salım patlaması ile sonuçlanır. Daha yüksek glikolit içeriği, polimeri daha hidrofilik hale getirir ve salım ortamından su alımını kolaylaştırır. Uç başlıklı polimere kıyasla daha yüksek bir hidrasyonun yanı sıra daha yüksek bir birleştirme verimliliği sağlayan serbest karboksilik uç grupları taşıyan bir PLGA olan Resomer RG 502 H'ye karşılık gelir (Machado vd., 2013).

2.4. Nörodejeneratif Hastalıklar

Beyin hastalıkları; nörodejeneratif hastalıklar, nöroinflamatuvar hastalıklar ve neoplastik hastalıklar olmak üzere üç ana sınıfa ayrılabilir. Nörodejeneratif bozukluklar, sporadik veya ailesel veya her ikisi birden olan farklı tipteki durumları içerir ve bunların ortak nedeni sürekli beyin hasarıdır. Nörodejeneratif hastalıklara neden olan kesin faktörler hala bilinmemektedir. Ailede nörodejeneratif hastalık öyküsü olması, nörodejenerasyonun başlamasında genetik bir bileşen olduğunu gösteren hastalığın gelişme riskini artırır (Poovaiah vd., 2018).

Dünya çapında birkaç milyon insan, merkezi sinir sisteminin belirli alanlarını etkileyen ve seçici beyin hücrelerinin türüne bağlı olarak kademeli ve ilerleyici bilişsel veya hareket bozukluklarına yol açan heterojen bir hastalık grubu olan nörodejeneratif

hastalıktan etkilenmektedir. Bu patolojik durumların çoğu yaşla ilişkilidir (Foglio ve Luigi Fabrizio, 2010).

Çoğu zaman, sadece hastalığın başlama mekanizması hakkında spekülasyonlar vardır. Nörodejeneratif hastalıkta ölüm çok şiddetlidir. Bu hastalık, hastaların günlük aktivitelerini engeller ve ayrıca yaşam beklentisini azaltır (R. Singh ve Geetanjali, 2017).

Nörodejenerasyon, nöronların ölümü de dahil olmak üzere merkezi sinir sisteminin farklı bölümlerini etkileyen nöronların yapısının ve/veya işlevinin ilerleyici bozulması için genel bir terminolojidir. Nörodejeneratif hastalıklar arasında Parkinson hastalığı (PD), Alzheimer hastalığı (AD), amiyotrofik lateral skleroz (ALS), Huntington hastalığı (HD) ve Down sendromu (DS), multipl skleroz (MS), Glokom, yaşa bağlı makula dejenerasyonu (AMD) ve diyabetle ilişkili ensefalopati (DE) bulunmaktadır. Nörodejeneratif hastalığın nedenleri arasında -amiloid (A) ve -sinüklein (-S) birikimi, oksidatif stres (OS), süperoksit dismutaz mutasyonu (SOD-1), mitokondriyal işlev bozukluğu, COX-2 iltihabı ve travmatik beyin hasarı yer alır. Bu bozuklukları tetikleyen ilk olaylar birbirinden farklı olsa da meydana gelen bazı benzer biyokimyasal reaksiyonlar, bu hastalıkların birçoğunu iyileştirebilecek terapötik gelişmelerin geliştirilmesi için umut vermektedir (Kim, Kim ve Han, 2012).

Nörodejeneratif hastalıklar için mevcut tedaviler, çoğunlukla ilaçların merkezi sinir sistemine penetrasyonunu sınırlayan kan-beyin bariyerinin (BBB) varlığından dolayı etkinlikten yoksundur (Fornaguera vd., 2015). Nanopartiküller küçültülmüş boyutları nedeniyle, çeşitli yollardan insan vücuduna nüfuz etme ve sonunda kan-beyin bariyerini (BBB) geçebilmektedir (Mushtaq vd., 2015).

Sinir sistemi vücudun düzenlenmesini ve koordinasyonunu yönetir. Merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi olmak üzere ikiye bölünmüştür. Merkezi sinir sistemi beyin ve omurilikten oluşur. Bu sistemle ilişkili bozukluklar arasında vasküler, yapısal ve fonksiyonel bozukluklar, dejenerasyonlar ve enfeksiyonlar yer alır. Nöron ilaçları, bu bozuklukların tanısında, önlenmesinde ve tedavisinde potansiyel bir rol oynamaktadır (R. Singh ve Geetanjali, 2017).

2.5. Alzheimer

Alzheimer hastalığı (AD), serebral korteks ve belirli subkortikal bölgelerdeki sinapsların ve nöronların kaybından kaynaklanan küresel ilerleyici hafıza kaybı, bilişsel bozulma ve davranış bozuklukları ile karakterize edilen en yaygın ve yıkıcı nörodejeneratif hastalıktır. AD, ölüm sonrası analizde nörofibriler yumakların (NTF'ler), senil plakların ve nöronal kaybın varlığıyla teşhis edilir. Nöronal kayıp, temporal lob ve parietal lobda ve frontal korteks ve singulat girusun bazı kısımlarında dejenerasyon dahil olmak üzere etkilenen bölgelerde büyük atrofi ile sonuçlanır (Kim, Kim ve Han, 2012).

Bugüne kadar, AD patogenezi açıklayabilecek amiloid kaskadı hipotezi, tau hipotezi, kolinerjik hipotez, metal iyonu hipotezi, oksidatif stres hipotezi vb. dahil olmak üzere bir dizi hipotez önerilmiştir (Qian vd., 2020). Bunlardan kolinerjik hipotez, klinik olarak geçerli bir hedef olarak doğrulanmıştır (Brewster vd., 2019).

AD'de, nöron büyümesi, hayatta kalması ve yaralanma sonrası onarımı için önemli olan ve nöronun zarından nüfuz eden bir transmembran proteini olan amiloid öncü proteini (APP), daha küçük peptit fragmanlarına bölünür. Bu parçalardan biri, A fibrillerine neden olur ve bunların bazıları, senil plaklar olarak bilinen yoğun oluşumlarda nöronların dışında biriken yığınlar oluşturur. Senil plaklar, sinaptik kayıp ve anormal nöritik morfoloji ile ilişkilendirilmiştir; kortikal sinaptik entegrasyon. Yaşlanma ile plak sayısının arttığı ve birikiminin nörotoksosite ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Senil plaklarla birlikte, A agregalarının çözünür oligomerler, A'dan türetilmiş dağılabilir ligandlar (ADDL'ler) olarak birikmesinin de AD'nin patogeneziinde önemli bir rol oynadığı bulunmuştur (Kim, Kim ve Han, 2012).

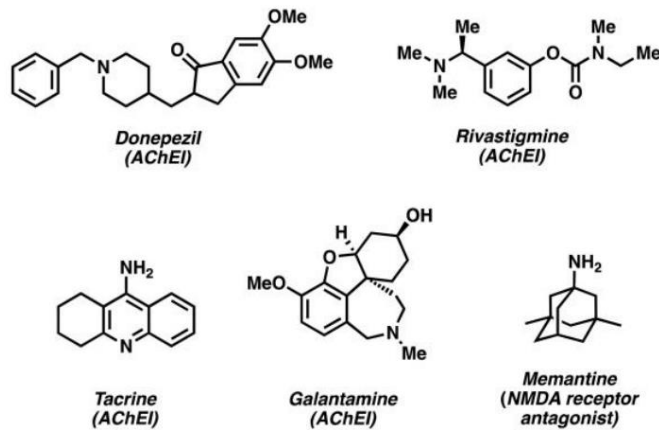
Nanoilaçlar AD'nin tedavisi ve teşhisi için büyük potansiyel göstermiş çok iyi terapötik ajanlardır (R. Singh ve Geetanjali 2017). Nanopartiküller, ilaç yükleme için yüksek kapasite, düşük veya hiç sistematik toksisite, fiziksel ve kimyasal kararlılık, ilaç özelliklerinin farmasötik olarak iyileştirilmesi ve ilaç gibi özellikleri nedeniyle geniş ilgi kazanmıştır (Poovaiah vd., 2018).

AD'deki nöronal dejenerasyonun ve kognitif bozukluğun kesin patogenezi belirsizliğini korusada, AD ile ilişkili farmakolojik ve nörokimyasal kanıtlardan biri,

merkezi kolinerjik nörotransmisyonunda bir eksiklidir. Asetilkolin (ACh) sentezleyen kolin asetiltransferaz (ChAT) aktivitesinin AD beyindeki korteks ve hipokampusta belirgin şekilde azaldığı ve ChAT'nin tükenmesinin bilişsel bozukluğun ciddiyeti ile korele olduğu bilinmektedir. Kolinesteraz inhibitörleri (ChEI) hidrolizi önleyebilir sinaptik yarıktaki ACh konsantrasyonunu yükseltir ve bu da kolinerjik iletimin artmasına neden olur (P. Zhang vd., 2007).

AD beyin dokusunun ölüm sonrası analizi tipik olarak bazal ve rostral kolinerjik sistemlerdeki hasarı ve anormallikleri ortaya çıkarır. Kolinerjik beyin nöronlarının kaybı ile farkındalık, dikkat, öğrenme, uyku ve çalışma belleğindeki azalma arasındaki ilişki, kolinerjik yolla terapötik müdahale ile şekillenmektedir. Bu çabaların doğrudan bir sonucu, asetilkolinesteraz inhibitörlerinin (AChEI'ler) keşfidir. Birçoğunun klinik olarak etkili kolinerjik ikameler olarak hizmet ettiği ve AD ile ilişkili bilişsel işlev bozukluğunun tedavisinde yaygın olarak kullanıldığı görülmüştür (Brewster vd., 2019).

AD tedavisi acil bir ihtiyaç olmasına rağmen, bugüne kadar etkili bir ilaç mevcut değildir. Sadece rivastigmin, donepezil, galantamin ve memantin FDA tarafından klinik kullanım için onaylanmıştır. Bununla birlikte, AD'nin karmaşık patolojik özellikleri nedeniyle, bu ilaçlar yalnızca semptomları hafifletebilir (Z. Liu vd., 2021). Şekil 2.9.'da AD tedavisi için temsili terapötikler sunulmuştur.



Şekil 2.9. AD tedavisi için temsili terapötikler (Brewster vd., 2019)

Modern çağda AD dünyaya yayılacaktır. 'BBB'nin nasıl geçileceğine' odaklanan çok sayıda ilaç modifikasyonu tasarlanmıştır. AD'de semptomlar hafif, orta ve şiddetli olmak üzere üç aşamadan oluşur. FDA tarafından 1986 yılında onaylanan bir piperidin türevi olan Donepezil, AD'nin tüm evrelerinin tedavisinde kullanılan tek ilaçtır (Tripathi vd., 2021).

2.5.1. Alzheimer'da nanopartikül taşıyıcı sistemler

Kan-beyin bariyeri (BBB), AD tedavisi için en önemli engellerden birini temsil eder. Bu engelin üstesinden gelmek için pro ilaçlar/ yardımcı ilaç salım sistemlerinin formülasyonu, antikorlar, lipozomlar veya nanopartikül taşıyıcı sistemler gibi birçok strateji geliştirilmiştir. Nanopartiküllerin kullanımı yoluyla BBB engelinin üstesinden gelme yaklaşımı, AD'in tedavisini iyileştirmeye adanmış modern farmasötik araştırmalarda büyük ilgi alanlarından birini temsil eder (Bhavna vd., 2014).

Terapiler günümüzde AD tedavisi için kullanılmış olmasına rağmen, beyni hedeflemek için daha yüksek donepezil konsantrasyonu reçete edildiğinden, etkinlik hala yetersizdir. Bu, gastrointestinal değişikliklerde çeşitli yan etkilere yol açar. Sürekli artan AD hasta sayısı ile Anti-Alzheimer tedavi araştırmaları da aynı hızla gelişmektedir. İlaç salımı için kullanılan nanopartiküller, AD'nin tedavisi için sistematik uygulama yolu ile alternatif bir yol sağlamakta ve ilacın herhangi bir enzimatik bozunması olmadan herhangi bir insan organına ulaşmaktadır. Daha küçük boyutlu nanopartiküller, BBB'yi kolayca geçebilir ve ilacın merkezi sinir sisteminde farmakolojik aktivitesini artırabilir. PLGA biyoyararlanımı ve biyouyumluluğu nedeniyle terapötik cihazlar için AD tedavisinde kullanılacak ilaç salım sistemlerinin hazırlanabileceği FDA onaylı bir polimerdir (Tripathi vd., 2021).

Şu anda piyasada bulunan ve günlük alınması gereken DNP (Donepezil HCl) tabletleri bulunmaktadır. Ancak alzheimer hastalarının ilacı her gün zamanında almaları çok zordur. DNP tabletlerin oral uygulaması ishal, kas krampları, yorgunluk, mide bulantısı, kusma ve uykusuzluk gibi pek çok olumsuz reaksiyona neden olabilir; bu nedenle, uzun süreli ve parenteral uygulama için bir reçete geliştirmek çok anlamlıdır (Fang vd., 2019).

In vivo ilaçların uzun süre etkili salımını sağlamak için, parçalanmayan implantların kullanımına ek olarak, en sık kullanılan formülasyon, poli (laktik-koglikolik asit) (PLGA) gibi parçalanabilir biyomalzemeler kullanılarak hazırlanan sistemlerdir. PLGA bazlı bu sistemler, (i) ilacın uzun etki süresi, (ii) *in vivo* olarak tamamen bozunma kabiliyeti, (iii) iyi biyouyumluluk ve (iv) yetenek gibi geleneksel farmasötik dozaj formlarıyla karşılaştırıldığında birçok avantaja sahiptir. Bu nedenle, PLGA tabanlı sistemler yaygın olarak kullanılmakta ve araştırılmaktadır (Fang vd., 2019).

2.6. Asetilkolin- Bütirkolin Esteraz

Beyin kolinesteraz fonksiyonunun önemli bir yönü, enzimatik farklılıklarla ilgilidir. Memelilerin beyni iki ana kolinesteraz formu içerir; asetilkolinesteraz (AChE) ve butirkolinesteraz (BuChE). İki form genetik, yapısal ve kinetikleri açısından farklılık gösterir. İnsan beyinde BuChE, AD hastalarında nöronlarda ve glial hücrelerde ve ayrıca nöritik plaklarda ve yumaklarda bulunur. AD hastalarının beyinde AChE aktivitesi progresif olarak azalırken, BuChE aktivitesi bir miktar artış gösterir (Giacobini, 2004).

Kolinesteraz inhibitörlerinin (ChE) Alzheimer hastalığı (AH) tedavisindeki en önemli terapötik etkisi, hastaların yaklaşık %50'sinde bilişsel işlevi en az 1 yıllık bir süre boyunca sabit bir düzeyde stabilize etmesidir. Yeni bulgular, hem asetilkolinesterazın (AChE) hem de butirkolinesterazın (BuChE) beyinde asetilkolinin parçalanmasında rol oynadığını ve bu enzimlerin ikili inhibisyonunun tedavinin etkinliğini artırabileceğini ve endikasyonları genişletebileceğini göstermektedir. Butirkolin, insan beyinde fizyolojik bir substrat değil, iki tip kolinesteraz arasında ayırım yapmak için bir substrat olarak kullanılan sentetik bir bileşiktir. Bu, BuChE'nin işlevini yorumlamayı zorlaştırır (Giacobini, 2004).

Bilişsel işlev, AD'de ciddi şekilde bozulur. En ciddi şekilde etkilenen modaliteler arasında, her ikisi de kolinerjik nörotransmisyon tarafından modüle edilen hafıza ve dikkat yer alır. Kolin asetiltransferaz (ChAT) ve asetilkolin esteraz (AChE) kolinerjik nöronlar için işaretleyici enzimlerdir ancak yalnızca ikincisi için, pozitron emisyon tomografisi (PET) ile insan *in vivo* görüntüleme için bir izleyici mevcuttur. Orta ila

şiddetli demansı olan hastaların serebral korteksinde ölümden sonra hem ChAT hem de AChE'de azalma gözlemlenmiştir. AChE arasında bir etkileşim olduğuna dair göstergeler de vardır. AChE, senil plak bileşenleri ile kararlı bir kompleks oluşturur ve hatta A peptitlerinin agregasyonunu ve amiloid oluşumunu destekleyebilir. Amiloid bileşenlerinin nörotoksitesisi, AChE'nin varlığıyla artabilir. AD beyinlerindeki genel AChE düşüşünün aksine, en azından sonraki aşamalarında, AChE'nin plakların etrafındaki lokal konsantrasyonu, bu lezyonlar geliştikçe fiilen artar. AChE, asetilkolini hidrolize etmenin yanı sıra, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve stres ve amiloid oluşumu dahil olmak üzere çeşitli hasar verici faktörlere yanıtlar gibi başka işlevlerde de yer alabilir (Eggers vd., 2006).

Asetilkolinesterazlar (AChE'ler), kolinerjik sinapslarda ağırlıklı olarak beyinde bulunan α/β serin hidrolazlardır. Bu enzim ayrıca merkezi ve periferik sinir sisteminde de bulunmuştur; sinir ve kas hücrelerinde, kırmızı kan hücrelerinin zarında ve motor, duyuşal, kolinerjik ve kolinerjik olmayan liflerde. AChE, asetilkolinin hidrolizi yoluyla bir sinir uyarısının sonlandırılmasından ve hücrenin dinlenme durumuna geri döndürülmesinden sorumludur (Brewster vd., 2019).

AD hastalarında BuChE inhibisyonunun klinik önemi; BuChE, nöritik plaklarda AChE ile bulunduğundan, BuChE'yi inhibe eden bir ilaç, teoride, iki bağlanma yerinin bir şekilde çakıştığı varsayılarak, AD hastasında beta-amiloid oluşumunu azaltabilir. Seçici BuChEI etopropazin ile ilk klinik girişim, yeni bir terapötik yaklaşımı destekliyor gibi görünmektedir. BuChE için yüksek seçiciliğe sahip inhibitörlerin yakın zamanda geliştirilmesi (simserin: 15 kat, bisnorsimserin: 110 kat, fenetilsimerin: 5000), in vivo-mikrodiyalizle ölçülen sıçanlarda ACh beyin seviyeleri üzerindeki artırıcı etkiyi doğrulamıştır (Giacobini, 2004).

2.7. Donepezil HCl

Geri dönüşümlü, yarışmalı olmayan bir asetilkolinesteraz inhibitörü (AChEI) olan DNP, Şubat 1997'de onaylanmış ve hafif ila orta dereceli AD'li hastalarda kullanıma sunulmuştur (S. Doody, L. Cummings ve R. Farlow, 2012). Sınırlı rekabetçi eylemle

rekabetçi olmayan aktivite sergileyen piperidin bazlı geri dönüşümlü bir inhibitördür (Brewster vd., 2019).

AD hastalarının beyinlerindeki nöronal hücre kaybının bir sonucu olarak, nöronlar arasındaki ilerleyici kolinerjik sinyal kaybını telafi etmek için semptomatik bir tedavi olarak geliştirilmiştir (S. Doody, L. Cummings ve R. Farlow, 2012).

İlginç bir şekilde, DNP asetilkolinesteraz üzerinde etkilidir ve bütirikolinesteraz üzerinde sadece mütevazı bir etkiye sahiptir; bu, diğer ajanlar (örn., rivastigmin ve takrin) için görülen ikili aktivitenin tersidir (Brewster vd., 2019). Periferik dokularda kolinesteraz üzerinde belirgin etkiler olmaksızın bariz ve uzun süreli beyin kolinesteraz inhibisyonu üretir ve in vivo beyin asetilkolin içeriğini artırır (P. Zhang vd., 2007). DNP, uygun terapötik profili nedeniyle genellikle hafif ila orta şiddette AD'si olan hastalarda birinci basamak tedavi olarak kabul edilir (Brewster vd., 2019).

DNP, ligandlar tarafından aktivasyonu nöroprotektif bir etki üreten endoplazmik retikulum mitokondri arayüzünde bulunan bir şaperon proteini olan sigma-1 reseptörüne bağlanır (Espinoza vd., 2018).

Şu anda, DNP ticari olarak sadece tablet ve kapsüllerin oral uygulama dozaj formunda mevcuttur. Bununla birlikte, genellikle yaşlı kişilerde görülen yutma güçlüğü ve DNP'nin gastrointestinal yan etkileri, hastaların uyumsuzluğuna ve hatta tedavinin kesilmesine veya başarısız olmasına neden olabilir. Bu nedenle, hasta uyumunu iyileştirmek amacıyla, AD hastaları için ağızdan olmayan yolla uygulanan uzun süreli sürekli salım yapan bir dozaj formu oldukça arzu edilir (Guo vd., 2015). Bazı uzmanlara göre; donepezil, DNP olarak tercih edilir, çünkü azaltılmış yan etkilerle uzun süreli olarak uygulanabilir (Espinoza vd., 2018).

2.7.1. Alzheimer hastalığında asetilkolinesteraz ve donepezil etkisi

AD gelişimi, AD'nin kolinerjik hipotezine yol açan, azalan asetilkolin seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir. Asetilkolin (ACh), kolinerjik nöronların içindeki kolin asetiltransferaz enzimi tarafından katalize edilen bir reaksiyon olan asetil-CoA ve

kolinden sentezlenen bir nörotransmitterdir. ACh, muskarinik ve nikotinik reseptörleri aktive etmek için sinir impulslarının iletimi sırasında sinaptik yarığa salınır ve asetilkolinesteraz (AChE) etkisiyle hidrolize edilir. Kolinerjik hipotez, merkezi kolinerjik disfonksiyonun olduğunu belirtir. Sinir sistemi (CNS), AD'nin özelliği olan bilişsel bozulmaya katkıda bulunur. Bu nedenle, mevcut asetilkolin düzeylerini artırmak için kolinesteraz inhibitörleri (ChEI'ler) gibi farmakolojik tedaviler geliştirilmiştir (Espinoza vd., 2018).

Kolinerjik sistemin insan hafızası ve öğrenmesindeki merkezi rolü ve Alzheimer hastalığındaki etkisi, onu nörofarmakoloji ve tıbbi kimya topluluklarında bir odak noktası haline getirmiştir (Brewster vd., 2019).

2.7.2. Donepezil HCl içeren preparatlar

Rx’de bulunan Donepezil HCl içeren preparatlar Tablo 2.4’te sunulmuştur.

Tablo 2.4. Rx Donepezil HCl İçeren Preparatlar (<http-3>)

ALZAMED FILM KAPLI TABLET 5 mg 14 tablet	ARICEPT EVESS AGIZDA DAGILAN TABLET 10 mg 84 tablet	DEZIRA FILM TABLET 10 mg 28 tablet
ALZAMED FILM KAPLI TABLET 5 mg 28 tablet	ARICEPT FILM TABLET 5 mg 14 tablet	DIVARE FILM TABLET 5 mg 14 tablet
ALZAMED FILM KAPLI TABLET 10 mg 28 tablet	ARICEPT FILM TABLET 5 mg 28 tablet	DIVARE FILM TABLET 10 mg 28 tablet
ALZANCER EASYTAB AGIZDA DAGILAN TABLET 5 mg 28 tablet	ARICEPT FILM TABLET 10 mg 28 tablet	DOENZA FILM TABLET 5 mg 14 tablet
ALZANCER EASYTAB AGIZDA DAGILAN TABLET 10 mg 28 tablet	ARYPEZ FILM TABLET 5 mg 14 tablet	DOENZA FILM TABLET 5 mg 28 tablet
ALZANCER FILM TABLET 5 mg 14 tablet	ARYPEZ FILM TABLET 5 mg 28 tablet	DOENZA FILM TABLET 10 mg 28 tablet

ALZANCER FILM TABLET 5 mg 28 tablet	ARYPEZ FILM TABLET 10 mg 28 tablet	DOENZA FILM TABLET 10 mg 90 tablet
ALZANCER FILM TABLET 10 mg 28 tablet	DEMENT FILM TABLET 5 mg 14 tablet	DOENZA ODT AGIZDA DAGILAN TABLET 5 mg 28 tablet
ALZEPIL FILM KAPLI TABLET 5 mg 14 tablet	DEMENT FILM TABLET 5 mg 28 tablet	DOENZA ODT AGIZDA DAGILAN TABLET 10 mg 28 tablet
ALZIL FILM TABLET 5 mg 14 tablet	DEMENT FILM TABLET 10 mg 28 tablet	DONCEP FILM TABLET 5 mg 14 tablet
ALZIL FILM TABLET 5 mg 28 tablet	DEMENT FILM TABLET 10 mg 84 tablet	DONCEP FILM TABLET 10 mg 28 tablet
ALZIL FILM TABLET 10 mg 28 tablet	DEZIRA COMBI UZATILMIS SALIMLI SERT KAPSUL 10 mg/7 mg 28 kapsül	DONEFIX FILM TABLET 5 mg 14 tablet
ARICEPT EVESS AGIZDA DAGILAN TABLET 5 mg 28 tablet	DEZIRA FILM TABLET 5 mg 14 tablet	DONEFIX FILM TABLET 5 mg 28 tablet
ARICEPT EVESS AGIZDA DAGILAN TABLET 10 mg 28 tablet	DEZIRA FILM TABLET 5 mg 28 tablet	DONEFIX FILM TABLET 10 mg 28 tablet
DONEFIX FILM TABLET 10 mg 84 tablet	DOZYL EASY AGIZDA DAGILAN TABLET 5 mg 28 tablet	DOZYL EASY AGIZDA DAGILAN TABLET 10 mg 28 tablet
DOZYL FILM TABLET 5 mg 14 tablet	DOZYL FILM TABLET 5 mg 28 tablet	MEMKAR FILM TABLET 5 mg 14 tablet
MEMKAR FILM TABLET 5 mg 28 tablet	MEMKAR FILM TABLET 10 mg 28 tablet	MEMOBOOST FILM TABLET 5 mg 28 tablet
MEMOBOOST FILM TABLET 10 mg 28 tablet	NEUREM FILM TABLET 5 mg 14 tablet	NEUREM FILM TABLET 5 mg 28 tablet
NEUREM FILM TABLET 10 mg 28 tablet	NEUREM FILM TABLET 10 mg 84 tablet	NOPEZ FILM TABLET 5 mg 14 tablet
NOPEZ FILM TABLET 10 mg 28 tablet	REWIND EFERVESAN TABLET 5 mg 14 tablet	REWIND EFERVESAN TABLET 5 mg 28 tablet

REWIND EFERVESAN TABLET 10 mg 28 tablet	REWIND EFERVESAN TABLET 10 mg 84 tablet	SALPEZIL FILM TABLET 90 mg/10 mg 28 tablet
SECCA FILM TABLET 5 mg 14 tablet	SECCA FILM TABLET 10 mg 28 tablet	ZHEDON FILM KAPLI TABLET 5 mg 14 tablet
ZHEDON FILM KAPLI TABLET 10 mg 28 tablet	ZHEDON FILM KAPLI TABLET 10 mg 56 tablet	ZHEDON FILM KAPLI TABLET 10 mg 84 tablet

[**Tablo 2.4.** (Devam) *Rx Donepezil HCl İçeren Preparatlar (http-3)*]

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

<u>Madde adı</u>	<u>Firma adı</u>
Aseton	: Merck, Almanya
Donepezil Hidroklorür	: Deva, Türkiye
Dötero kloroform	: Merck, Almanya
Hidroklorik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Etil asetat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum fosfat monobazik	: Sigma-Aldrich, Almanya
PVA	: Sigma-Aldrich, Almanya
Resomer RG 502 H (PLGA)	: Sigma-Aldrich, Amerika
Sodyum hidroksit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Trehaloz dihidrat	: Sigma-Aldrich, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

<u>Cihaz adı</u>	<u>Firma Adı</u>
Buz Dolabı	Arçelik, Türkiye
Cytation 3 Multi-mode	Reader Biotek, ABD
Derin Dondurucu	Liebherr LGEX 3410 Medline, İsviçre
Distile su cihazı	MiliQ Milipore, Fransa

Hassas terazi	Ohaus E1 2140, ABD
Liyofilizatör	Scanvac-Coolsafe Pro, Danimarka
Manyetik karıştırıcı	Jeitech MS-53M, Güney Kore
Mikropipet seti	Eppendorf, Almanya
Oris™ Cell Seeding Stoppers	Platypus Technologies, CMA5.101
Oris™ Stopper Tool	Platypus Technologies, CMA5.101
pH metre	WTW Profi Lab pH 597, Almanya
Prob sonikatör	Sonics, Amerika
Su banyosu	GFL, Tissue float bath 1052, Almanya
The Oris™ Cell Migration Assay	Platypus Technologies, CMA5.101
Ultrasonik banyo	Wisd Laboratory Instruments, Kore
UV-Spektrofotometre	Shimadzu, Japonya
Vorteks	Jeo Tech, Kore
Zetasizer	Malvern Nano ZS, İngiltere

4. YÖNTEM

4.1. UV Spektrofotometre Validasyon Çalışmaları

In vitro çalışmalarda Donepezil HCl (DNP) için miktar tayini UV spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla enkapsülasyon etkinliği çalışmaları ve *in vitro* dissolüsyon çalışmaları için iki farklı validasyon çalışması yapılmıştır.

4.1.1. Donepezil HCl için aseton: su (1:1, *h/h*) ortamında yapılan çalışmalar

Yöntemin uygunluğunun araştırılması ve bu amaç doğrultusunda yeterli, güvenilir aynı zamanda tekrarlanabilir sonuçların alınması analitik yöntem validasyonunun ana amacıdır. DNP için aseton: su (1:1, *h/h*) ortamında miktar tayini validasyonunda doğrusalık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık ve seçicilik parametreleri inceleme parametresi olarak seçilmiş ve istatistiksel olarak incelenmiştir. Bu çalışmanın değerlendirilme Uluslararası Harmonizasyon Birliği'nin (ICH) kriterlerine göre yapılmıştır (Dagron, 2014).

4.1.1.1. Absorbans belirleme çalışmaları

Enkapsülasyon etkinliği çalışmalarında kullanmak üzere DNP için aseton: su (1:1 *h/h*) ortamında miktar tayini UV spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Maksimum absorbans (λ_{max}) değerinin bulunması için ilk olarak 25 mg DNP tam olarak tartılmış ardından aseton: su (1:1 *h/h*) ile yıkanarak balon jöjeye alınıp 25 mL'e aseton: su (1:1 *h/h*) karışımı ile tamamlanmıştır. Bu çözelti on dakika ultrasonik banyoda tutulmuş ve sonuç olarak stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltinin konsantrasyonun $1000.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olmasından hareketle farklı seyreltmeler ile daha düşük konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler UV spektrofotometrede maksimum absorbans'ın bulunabilmesi için 200-800 nm arasında taranmıştır (Jain vd., 2011).

4.1.1.2. Doğrusallık

Validasyon çalışmasında doğrusallığın değerlendirilmesi için üç farklı stok çözeltilerden 5.0 ile 50.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ arasında 6 farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Her çözeltiler için analizler 3 kez olacak şekilde tekrarlanmıştır. Çözeltilerin 325 nm’de absorbans değerleri kaydedilmiştir. Bulunan absorbans değerleri ile regresyon analizi yapıp DNP’e ait kalibrasyon eğrisi, eğriye ait olan doğru denklemi ve korelasyon katsayısı değeri (R^2) elde edilmiştir (da Silva Luna vd., 2022).

4.1.1.3. Kesinlik

Yöntemin kesinlik doğrulamasını yapmak için doğrusallık çalışmasında kullanılan konsantrasyonlar dikkate alınarak kalibrasyon aralığında bulunan 3 farklı konsantrasyonda 3 farklı günde (15.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 25.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 35.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) DNP içeren çözeltiler hazırlanmıştır ve hazırlanan bu çözeltilerin her bir konsantrasyon için 3 farklı gün analizler gerçekleştirilmiştir (A. Alper Öztürk, Yenilmez ve Yazan, 2017).

4.1.1.4. Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, kullanılan analitik yöntemle elde edilen sonuçlarla gerçek değerlerin birbirine yakınlığıdır. Bu analizlerde elde edilen sonuçlar % verim ve her seri için bağıl standart sapma olarak verilmektedir. Analitik metodun doğruluğunu tespit etmek için 3 farklı konsantrasyonda (15.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 25.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 35.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) 3’er kez tekrarlanmıştır (Araújo vd., 2013).

4.1.1.5. Duyarluluk

Tespit sınırı (LOD), numunede tespit edilebilecek en düşük analit miktarıdır. Ölçüm sınırı (LOQ) uygun kesinlik ve doğrulukla kantitatif olarak belirlenebilen numune içindeki analit miktarlarının en düşük olmasıdır (Kumari ve Khansili, 2020).

Analitik yöntem validasyon çalışması için LOD ve LOQ değerleri standart sapma yöntemi kullanılarak Denklem 4.1. ve Denklem 4.2. yardımıyla ICH yönergelerine göre

hesaplanmıştır. Denklem 4.1 ve Denklem 4.2’de yer alan σ = yanıtın standart sapması; S= regresyon çizgisinin eğimidir (Yasir vd., 2020).

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{S} \quad (4.1.)$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{S} \quad (4.2.)$$

4.1.1.6. Seçicilik

Yöntemin özgüllüğü/seçiciliği için UV-Spektrofotometre’den elde edilen spektrumlar DNP, aseton: su (1:1 h/h) karışımı ve I-Blank (Blank formülasyon) için 200-800 nm aralığında elde edilen numunelerin spektrumlarındaki örtüşmelerine bakılarak belirlenmiştir (Araújo vd., 2013).

4.1.2. Donepezil HCl için PBS pH 6.8 ortamında validasyon çalışması

4.1.2.1. Absorbans belirleme çalışmaları

In vitro dissolüsyon çalışmalarından önce DNP için fosfat tamponu (PBS pH 6.8) ortamında validasyon çalışmaları UV spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Maksimum absorbans (λ_{max}) değerinin bulunması için öncelikle PBS pH 6.8 ile yıkanarak balon jöjeye tam olarak tartılmış 25 mg DNP alınmış 25 mL’e PBS pH 6.8 karışımı ile tamamlanmıştır. Oluşan çözelti on dakika ultrasonik banyoda tutulmuş ve sonuç stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltinin konsantrasyonunun 1000.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olmasından hareketle, seyreltmeler ile daha düşük konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır.

Hazırlanan çözeltiler UV spektrofotometride maksimum absorbans'ın bulunabilmesi için 200-800 nm arasında taranmıştır (Jain vd., 2011).

4.1.2.2. Doğrusallık

Validasyon çalışmasında doğrusallığın değerlendirilmesi için üç farklı stok çözeltiden 5.0 ile 40.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ arasında 6 farklı derişimde çözeltiler hazırlanmıştır. Her çözeltiler için analizler 3 kez olacak şekilde kez tekrarlanmıştır. Çözeltilerin 315 nm'de absorbans değerleri kaydedilmiştir. Bulunan absorbans değerleri ile regresyon analizi yapıp DNP'e ait kalibrasyon eğrisi, eğriye ait olan doğru denklemi ve korelasyon katsayısı değeri (R^2) elde edilmiştir (da Silva Luna vd., 2022).

4.1.2.3. Kesinlik

Yöntemin kesinlik doğrulamasını yapmak için doğrusallık çalışmasında kullanılan konsantrasyonlar dikkate alınarak kalibrasyon aralığında bulunan 3 farklı konsantrasyonda 3 farklı günde ($15.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $25.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $35.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) DNP içeren çözeltiler hazırlanmıştır ve hazırlanan bu çözeltilerim her bir konsantrasyon için 3 farklı gün analizler gerçekleştirilmiştir (A. Alper Öztürk, Yenilmez ve Yazan, 2017).

4.1.2.4. Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, kullanılan analitik yöntemle elde edilen sonuçlarla gerçek değerlerin birbirine yakınlığıdır. Bu analizlerde elde edilen sonuçlar % verim ve her seri için bağıl standart sapma olarak verilmektedir. Analitik metodun doğruluğunu tespit etmek için 3 farklı konsantrasyonda ($15.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $25.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $35.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) 3'er kez tekrarlanmıştır (Araújo vd., 2013).

4.1.2.5. Duyarluluk

PBS pH 6.8 ortamında yapılan validasyon çalışması için LOD ve LOQ analizleri '4.1.1.5. Duyarluluk' bölümünde yer verilen Denklem 4.1. ve 1 ve Denklem 4.2. yardımı ile hesaplanmıştır (Kumari ve Khansili, 2020; Yasir vd., 2020).

4.1.2.6. Seçicilik

Yöntemin özgüllüğü/seçiciliği, UV-Spektrofotometre'den elde edilen spektrumlar DNP, PBS pH 6.8 ve I-Blank (Blank formülasyon) için 200-800 nm aralığında elde edilen numunelerin spektrumlarındaki örtüşmelerine bakılarak belirlenmiştir (Araújo vd., 2013).

4.2. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

DNP suda çözünür bir etkin maddedir (Alshetaili vd., 2021). Bu sebeple literatür araştırması sonucunda bu tez çalışması kapsamında hazırlanan PLGA nanopartikülleri 'Çift Emülsifikasyon Çözücü Buharlaştırma' yöntemi kullanılarak hazırlanmasına karar verilmiştir (A Alper Öztürk vd., 2020; A Alper Öztürk ve Kırmınoğlu, 2019; A Alper Öztürk ve Merve Güven, 2019). Formülasyon ön deneme çalışmalarında sulu fazda kullanılan polivinil alkol (PVA) konsantrasyonu ve sonikasyon süreleri değiştirilerek deneme çalışmaları yapılmış ve uygun sonuçlara göre optimum formülasyon seçilmiştir. İlgili çalışmada özel bir PLGA türevi olan Resomer RG 502 H isimli polimer ile çalışılmıştır. Bu çalışmada hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonlarının hazırlama koşulları ve içerikleri Tablo 4.1.'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. Hazırlanan blank ve DNP yüklü nanopartikül formülasyonlarının hazırlama koşulları ve içerikleri

Kod	Organik faz çözelti içeriği			Sulu faz çözelti içeriği	Prob sonikasyon gücü (Amplitüd)	Prob sonikasyon süresi (Saniye)
	PLGA	DNP	Etil asetat			
A-Blank	60 mg	-	3 mL	%0.5 (a/h) PVA çözeltisi (10 mL)	%60	60
A-DNP	60 mg	6 mg	3 mL	%0.5 (a/h) PVA çözeltisi (10 mL)	%60	60
B-Blank	60 mg	-	3 mL	%0.5 (a/h) PVA çözeltisi (10 mL)	%60	90
B-DNP	60 mg	6 mg	3 mL	%0.5 (a/h) PVA çözeltisi (10 mL)	%60	90
C-Blank	60 mg	-	3 mL	%0.5 (a/h) PVA çözeltisi (10 mL)	%60	120
C-DNP	60 mg	6 mg	3 mL	%0.5 (a/h) PVA çözeltisi (10 mL)	%60	120
D-Blank	60 mg	-	3 mL	%0.75 (a/h) PVA çözeltisi (10 mL)	%60	60
D-DNP	60 mg	6 mg	3 mL	%0.75 (a/h) PVA çözeltisi (10 mL)	%60	60
E-Blank	60 mg	-	3 mL	%0.75 (a/h) PVA çözeltisi (10 mL)	%60	90
E-DNP	60 mg	6 mg	3 mL	%0.75 (a/h) PVA çözeltisi (10 mL)	%60	90
F-Blank	60 mg	-	3 mL	%0.75 (a/h) PVA çözeltisi (10 mL)	% 60	120

F-DNP	60 mg	6 mg	3 mL	%0.75 (<i>a/h</i>) PVA çözeltisi (10 mL)	%60	120
G-Blank	60 mg	-	3 mL	%1.0 (<i>a/h</i>) PVA çözeltisi (10 mL)	%60	60
G-DNP	60 mg	6 mg	3 mL	%1.0 (<i>a/h</i>) PVA çözeltisi (10 mL)	%60	60
H-Blank	60 mg	-	3 mL	%1.0 (<i>a/h</i>) PVA çözeltisi (10 mL)	%60	90
H-DNP	60 mg	6 mg	3 mL	%1.0 (<i>a/h</i>) PVA çözeltisi (10 mL)	%60	90
I-Blank	60 mg	-	3 mL	%1.0 (<i>a/h</i>) PVA çözeltisi (10 mL)	%60	120
I-DNP	60 mg	6 mg	3 mL	%1.0 (<i>a/h</i>) PVA çözeltisi (10 mL)	%60	120

[**Tablo 4.1.** (Devam) Hazırlanan blank ve DNP yüklü nanopartikül formülasyonlarının hazırlama koşulları ve içerikleri]

4.2.1. A-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması

A-Blank kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL⁻¹ (3 mL etil asetat, 60 mg PLGA) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan PLGA, etil asetat içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca 3 mL PLGA çözeltisine 200 µL Polivinilalkol (PVA) çözeltisi (%0.5 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, PVA çözeltisi (%0.5 *a/h*, 10 mL) içine %60 amplitüd prob sonikasyon altında 60 saniye boyunca damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y/S₂ emülsiyonu).

S₁/Y/S₂ emülsiyonu oluştuktan sonra etil asetat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.2. A-DNP kodlu formülasyonun hazırlanması

DNP içeren etkin maddeli A-DNP kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması için ilk olarak 6 mg DNP içeren 200 µL'lik PVA çözeltisi (%0.5 *a/h*) hazırlanmıştır. A-Blank kodlu formülasyonda olduğu gibi 20 mg.mL⁻¹ (3 mL etil asetat, 60 mg PLGA) konsantrasyonunda PLGA çözeltisi hazırlanmış ardından ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca 3 mL PLGA çözeltisine 200 µL DNP içeren PVA çözeltisi (%0.5 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir. Oluşan bu emülsiyon PVA çözeltisi (%0.5 *a/h*, 10 mL) içine %60 amplitüd prob sonikasyon altında 60 saniye boyunca damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y/S₂ emülsiyonu). S₁/Y/S₂ emülsiyonu oluştuktan sonra etil asetat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde

dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.3. B-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması

B-Blank kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL⁻¹ (3 mL etil asetat, 60 mg PLGA) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan PLGA, etil asetat içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca 3 mL PLGA çözeltisine 200 µL Polivinilalkol (PVA) çözeltisi (%0.5 a/h) damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, PVA çözeltisi (%0.5 a/h, 10 mL) içine %60 amplitüd prob sonikasyon altında 90 saniye boyunca damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y/S₂ emülsiyonu). S₁/Y/S₂ emülsiyonu oluştuktan sonra etil asetat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.4. B-DNP kodlu formülasyonun hazırlanması

DNP içeren etkin maddeli B-DNP kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması için ilk olarak 6 mg DNP içeren 200 µL'lik PVA çözeltisi (%0.5 a/h) hazırlanmıştır. B-Blank kodlu formülasyonda olduğu gibi 20 mg.mL⁻¹ (3 mL etil asetat, 60 mg PLGA) konsantrasyonunda PLGA çözeltisi hazırlanmış ardından ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca 3 mL PLGA çözeltisine 200 µL DNP içeren PVA çözeltisi (%0.5 a/h) damla damla ilave edilmiştir. Oluşan bu emülsiyon PVA çözeltisi (%0.5 a/h, 10 mL) içine %60 amplitüd prob sonikasyon altında 90 saniye boyunca damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y/S₂ emülsiyonu).

S₁/Y/S₂ emülsiyonu oluştuktan sonra etil asetat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması

için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.5. C-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması

C-Blank kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL⁻¹ (3 mL etil asetat, 60 mg PLGA) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan PLGA etil asetat içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca 3 mL PLGA çözeltisine 200 µL Polivinilalkol (PVA) çözeltisi (%0.5 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, PVA çözeltisi (%0.5 *a/h*, 10 mL) içine %60 amplitüd prob sonikasyon altında 120 saniye boyunca damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y/S₂ emülsiyonu).

S₁/Y/S₂ emülsiyonu oluştuktan sonra etil asetat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.6. C-DNP kodlu formülasyonun hazırlanması

DNP içeren etkin maddeli C-DNP kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması için ilk olarak 6 mg DNP içeren 200 µL'lik PVA çözeltisi (%0.5 *a/h*) hazırlanmıştır. C-Blank kodlu formülasyonda olduğu gibi 20 mg.mL⁻¹ (3 mL etil asetat, 60 mg PLGA) konsantrasyonunda PLGA çözeltisi hazırlanmış ardından ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca 3 mL PLGA çözeltisine 200 µL DNP içeren PVA çözeltisi (%0.5 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir. Oluşan bu emülsiyon PVA çözeltisi (%0.5 *a/h*, 10 mL) içine %60 amplitüd prob sonikasyon altında 120 saniye boyunca damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y/S₂ emülsiyonu).

S₁/Y/S₂ emülsiyonu oluştuktan sonra etil asetat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.7. D-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması

D-Blank kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL⁻¹ (3 mL etil asetat, 60 mg PLGA) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan PLGA etil asetat içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca 3 mL PLGA çözeltisine 200 µL Polivinilalkol (PVA) çözeltisi (%0.75 a/h) damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, PVA çözeltisi (%0.75 a/h, 10 mL) içine %60 amplitüd prob sonikasyon altında 60 saniye boyunca damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y/S₂ emülsiyonu).

S₁/Y/S₂ emülsiyonu oluştuktan sonra etil asetat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.8. D-DNP kodlu formülasyonun hazırlanması

DNP içeren etkin maddeli D-DNP kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması için ilk olarak 6 mg DNP içeren 200 µL'lik PVA çözeltisi (%0.75 a/h) hazırlanmıştır. D-Blank kodlu formülasyonda olduğu gibi 20 mg.mL⁻¹ (3 mL etil asetat, 60 mg PLGA) konsantrasyonunda PLGA çözeltisi hazırlanmış ardından ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca 3 mL PLGA çözeltisine 200 µL DNP içeren PVA çözeltisi (%0.75 a/h) damla

damla ilave edilmiştir. Oluşan bu emülsiyon PVA çözeltisi (%0.75 *a/h*, 10 mL) içine %60 amplitüd prob sonikasyon altında 60 saniye boyunca damla damla ilave edilmiştir ($S_1/Y/S_2$ emülsiyonu).

$S_1/Y/S_2$ emülsiyonu oluştuktan sonra etil asetat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.9. E-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması

E-Blank kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL⁻¹ (3 mL etil asetat, 60 mg PLGA) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan PLGA, etil asetat içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca 3 mL PLGA çözeltisine 200 µL Polivinilalkol (PVA) çözeltisi (%0.75 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S_1/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, PVA çözeltisi (%0.75 *a/h*, 10 mL) içine %60 amplitüd prob sonikasyon altında 90 saniye boyunca damla damla ilave edilmiştir ($S_1/Y/S_2$ emülsiyonu).

$S_1/Y/S_2$ emülsiyonu oluştuktan sonra etil asetat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.10. E-DNP kodlu formülasyonun hazırlanması

DNP içeren etkin maddeli E-DNP kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması için ilk olarak 6 mg DNP içeren 200 µL'lik PVA çözeltisi (%0.75 *a/h*) hazırlanmıştır. E-Blank kodlu formülasyonda olduğu gibi 20 mg.mL⁻¹ (3 mL etil asetat, 60 mg PLGA) konsantrasyonunda PLGA çözeltisi hazırlanmış ardından ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca 3 mL PLGA çözeltisine 200 µL DNP içeren PVA çözeltisi (%0.75 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir. Oluşan bu emülsiyon PVA çözeltisi (%0.75 *a/h*, 10 mL) içine %60 amplitüd prob sonikasyon altında 90 saniye boyunca damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y/S₂ emülsiyonu).

S₁/Y/S₂ emülsiyonu oluştuktan sonra etil asetat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.11. F-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması

F-Blank kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL⁻¹ (3 mL etil asetat, 60 mg PLGA) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan PLGA etil asetat içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca 3 mL PLGA çözeltisine 200 µL Polivinilalkol (PVA) çözeltisi (%0.75 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, PVA çözeltisi (%0.75 *a/h*, 10 mL) içine %60 amplitüd prob sonikasyon altında 120 saniye boyunca damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y/S₂ emülsiyonu).

S₁/Y/S₂ emülsiyonu oluştuktan sonra etil asetat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar

santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.12. F-DNP kodlu formülasyonun hazırlanması

DNP içeren etkin maddeli F-DNP kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması için ilk olarak 6 mg DNP içeren 200 µL'lik PVA çözeltisi (%0.75 *a/h*) hazırlanmıştır. F-Blank kodlu formülasyonda olduğu gibi 20 mg.mL⁻¹ (3 mL etil asetat, 60 mg PLGA) konsantrasyonunda PLGA çözeltisi hazırlanmış ardından ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca 3 mL PLGA çözeltisine 200 µL DNP içeren PVA çözeltisi (%0.75 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir. Oluşan bu emülsiyon PVA çözeltisi (%0.75 *a/h*, 10 mL) içine %60 amplitüd prob sonikasyon altında 120 saniye boyunca damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y/S₂ emülsiyonu).

S₁/Y/S₂ emülsiyonu oluştuktan sonra etil asetat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.13. G-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması

G-Blank kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL⁻¹ (3 mL etil asetat, 60 mg PLGA) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan PLGA etil asetat içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca 3 mL PLGA çözeltisine 200 µL Polivinilalkol (PVA) çözeltisi (%1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, PVA çözeltisi (%1.0 *a/h*, 10 mL) içine %60 amplitüd prob sonikasyon altında 60 saniye boyunca damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y/S₂ emülsiyonu).

S₁/Y/S₂ emülsiyonu oluştuktan sonra etil asetat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.14. G-DNP kodlu formülasyonun hazırlanması

DNP içeren etkin maddeli G-DNP kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması için ilk olarak 6 mg DNP içeren 200 µL'lik PVA çözeltisi (%1.0 *a/h*) hazırlanmıştır. G-Blank kodlu formülasyonda olduğu gibi 20 mg.mL⁻¹ (3 mL etil asetat, 60 mg PLGA) konsantrasyonunda PLGA çözeltisi hazırlanmış ardından ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca 3 mL PLGA çözeltisine 200 µL DNP içeren PVA çözeltisi (%1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir. Oluşan bu emülsiyon PVA çözeltisi (%1.0 *a/h*, 10 mL) içine %60 amplitüd prob sonikasyon altında 60 saniye boyunca damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y/S₂ emülsiyonu).

S₁/Y/S₂ emülsiyonu oluştuktan sonra etil asetat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.15. H-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması

H-Blank kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL⁻¹ (3 mL etil asetat, 60 mg PLGA) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan PLGA, etil asetat içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca 3 mL PLGA çözeltisine 200 µL Polivinilalkol (PVA) çözeltisi (%1.0 *a/h*) damla

damla ilave edilmiştir (S₁/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, PVA çözeltisi (%1.0 *a/h*, 10 mL) içine %60 amplitüd prob sonikasyon altında 90 saniye boyunca damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y/S₂ emülsiyonu).

S₁/Y/S₂ emülsiyonu oluştuktan sonra etil asetat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.16. H-DNP kodlu formülasyonun hazırlanması

DNP içeren etkin maddeli H-DNP kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması için ilk olarak 6 mg DNP içeren 200 µL'lik PVA çözeltisi (%1.0 *a/h*) hazırlanmıştır. G-Blank kodlu formülasyonda olduğu gibi 20 mg.mL⁻¹ (3 mL etil asetat, 60 mg PLGA) konsantrasyonunda PLGA çözeltisi hazırlanmış ardından ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca 3 mL PLGA çözeltisine 200 µL DNP içeren PVA çözeltisi (%1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir. Oluşan bu emülsiyon PVA çözeltisi (%1.0 *a/h*, 10 mL) içine %60 amplitüd prob sonikasyon altında 90 saniye boyunca damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y/S₂ emülsiyonu).

S₁/Y/S₂ emülsiyonu oluştuktan sonra etil asetat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.17. I-Blank kodlu formülasyonun hazırlanması

I-Blank kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, 20 mg.mL⁻¹ (3 mL etil asetat, 60 mg PLGA) konsantrasyonu elde etmek için tam olarak tartılan PLGA etil asetat içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra, ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca 3 mL PLGA çözeltisine 200 µL Polivinilalkol (PVA) çözeltisi (%1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y emülsiyonu). Oluşan bu emülsiyon, PVA çözeltisi (%1.0 *a/h*, 10 mL) içine %60 amplitüd prob sonikasyon altında 120 saniye boyunca damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y/S₂ emülsiyonu).

S₁/Y/S₂ emülsiyonu oluştuktan sonra etil asetat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.2.18. I-DNP kodlu formülasyonun hazırlanması

DNP içeren etkin maddeli I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonunun hazırlanması için ilk olarak 6 mg DNP içeren 200 µL'lik PVA çözeltisi (%1.0 *a/h*) hazırlanmıştır. G-Blank kodlu formülasyonda olduğu gibi 20 mg.mL⁻¹ (3 mL etil asetat, 60 mg PLGA) konsantrasyonunda PLGA çözeltisi hazırlanmış ardından ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca 3 mL PLGA çözeltisine 200 µL DNP içeren PVA çözeltisi (%1.0 *a/h*) damla damla ilave edilmiştir. Oluşan bu emülsiyon PVA çözeltisi (%1.0 *a/h*, 10 mL) içine %60 amplitüd prob sonikasyon altında 120 saniye boyunca damla damla ilave edilmiştir (S₁/Y/S₂ emülsiyonu).

S₁/Y/S₂ emülsiyonu oluştuktan sonra etil asetat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) oda ısısında buharlaştırılmış ve elde edilen sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) uygulanmıştır. Nanopartiküllerin toplanması için uygulanan santrifüj prosesinin tamamlanmasının ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve tekrar

santrifüje edilmiştir. Nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez uygulanmıştır.

4.3. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu

4.3.1. Parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı (PDI) ve zeta potansiyel

Nanopartiküllerin parçacık boyutu ve parçacık boyut dağılım / polidispersite indeksi (PDI), Zetasizer Nano (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, İngiltere) cihazı ile dinamik ışık saçılımı tekniği kullanılarak ölçülmüştür. Hazırlanan nanopartiküllerin parçacık boyut ve PDI değerleri, taze hazırlanmış formülasyonların distile suda dağıtılmasıyla analiz edilmiştir. Nanopartiküllerin Zeta (ζ) potansiyel değerleri, 25 °C oda sıcaklığında tek kullanımlık katlanmış bir kılcal zeta hücrede aynı cihaz kullanılarak belirlenmiştir. Tüm formülasyon numuneleri üç kopya halinde ölçülmüş ve ölçümlerin ortalama değerleri ve standart sapması hesaplanmıştır (Baghirova, Kaya Tilki ve Öztürk, 2023).

4.3.2. Kriyoprotektan etki ve saklama koşullarının belirlenmesi

Kriyoprotektan etki ve saklama koşullarının belirlenmesi için 1 set optimum olarak seçilen formülasyon I-DNP kodlu formülasyon hazırlanmıştır. Hazırlanan taze formülasyonun parçacık boyutu, PDI ve zeta potansiyeli ölçülmüştür. Ardından hazırlanan I-DNP kodlu formülasyon üzerine santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) işlemi uygulanmıştır. Bu aşamada trehaloz çözeltisi (%5.0, *a/h*) hazırlanmış ve 0.22 µm membran filtreden süzölmüştür. Santrifüje edilen partiküllerin yıkama proseslerinin ardından üzerine %5.0 (*a/h*) konsantrasyonunda hazırlanan trehaloz çözeltisinden 1 mL eklenip vortekslenmiştir. Trehaloz çözeltisi eklenen formülasyon eppendorf tüplerinde 5 eşit kısma ayrılmış (5 tüp) ve bu tüplere sırasıyla %5.0 *a/h* konsantrasyondaki trehaloz çözeltisinden 1. tüpe 200 µL, 2. tüpe 300 µL, 3. tüpe 500 µL, 4. tüpe 600 µL, 5. tüpe 800 µL eklenmiştir. Tüm tüpler -20°C'de buzdolabında dondurulmasının ardından liyofilizatörde liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon sonucu, liyofilize toz nanopartikül formülasyonlarının üzerine 1 mL distile su eklenip vortekslenerek dağıtılmıştır. Her tüp için parçacık boyutu, PDI ve zeta potansiyeli ölçülmüştür. Tüm bu çalışma boyunca elde

edilen sonuçlar karşılaştırılarak optimum formülasyonun saklanmasıdaki en iyi trehaloz oranı dolayısıyla en iyi saklama koşulu belirlenmiştir (Ekinçi vd., 2022; A. Alper Öztürk vd., 2019; A. Alper Öztürk, Yenilmez ve Özarda, 2019).

4.3.3. Gastrointestinal stabilite değerlendirme

Polimerik nanopartiküllerin kararlılıklarında PLGA gibi hidrolitik bozunur polimerlerden yapılmış nanopartiküllerin zamanla bozunduğu bilinmektedir. Uzun vadeli kararlılıkta pH ve sıcaklık önemli etkiye sahiptir. Bu tez kapsamında hazırlanan I-DNP kodlu PLGA nanopartikül formülasyonunun kısa süreli kararlılıklarını incelemek için bir çalışma planlanmıştır. Bu çalışmaya başlamadan önce gastrointestinal (GİS) sıvıları taklit eden çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler sırasıyla; pH 1.2 HCl tamponu (Çözelti 1), pH 6.8 fosfat tamponu (Çözelti 2) ve pH 7.4 fosfat tamponu (Çözelti 3). Bu üç çözelti ve distile su (toplam 4 adet falkon tüpü); gastrointestinal ortamı taklit edecek $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 50 rpm karıştırma hızında çalkalamalı su banyosuna yerleştirilmiştir. 1 set optimum formülasyon hazırlanmış ve yıkama işlemleri sonrası 4 mL'e tamamlanmıştır. $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe olan üç çözelti ve distile su içine hazırlanan nanopartikül dispersiyonundan 1 mL eklenmiş ve eklendiği andan itibaren 1. saat, 2. saat, 3. saat, 4. saat, 5. saat, 6. saat, 7. saat, 24. saat her bir tüpten örnek alınarak parçacık boyutu ve PDI ölçümleri yapılmıştır. Ölçüm sonuçları doğrultusunda PLGA nanopartiküllerinin hangi gastrointestinal ortamda daha kararlı oldukları belirlenmiştir (Martín-Banderas vd., 2012). Görsel 4.1.'de 4 tüp üzerinden yapılan çalışmanın bir görseli sunulmuştur.



Görsel 4.1. *Gastrointestinal stabilite çalışması*

4.3.4. Enkapsülasyon etkinliği

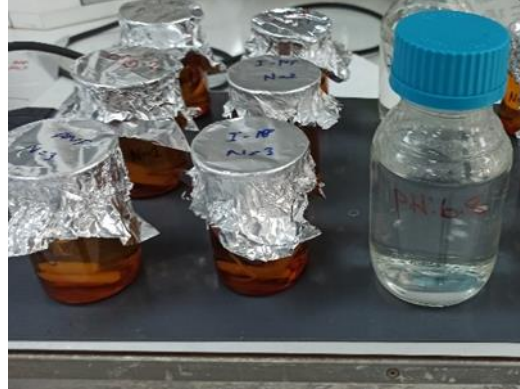
PLGA bazlı I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonuna DNP yüklemesi, 4.1.1. Donepezil HCl için aseton: su (1:1, h/h) ortamında validasyon çalışması' bölümünde açıklanan UV spektrofotometre yöntemi ile belirlenmiştir. I-DNP yüklü PLGA bazlı nanopartikül formülasyonun DNP içeriği doğrudan ilacın nanopartikül formülasyonundan ekstrakte edilmesi ile değerlendirilmiştir. Liyofilize nanopartikül 5 mg olacak şekilde hassa terazi ile tartılmıştır. Ardından üzerine 1 mL aseton: su (1:1, h/h) ilave edilmiş ve partikülleri çözmek için 5 dakika vortekslenmiştir. Vorteksleme işlemi sonrası hazırlanan çözelti 0.22 µm membran filtre ile süzülmüş, gerekli seyreltmeler ardından DNP miktar tayini için UV spektrofotometrede 325 nm'de analiz edilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği (% EE) olarak ifade edilmiş ve Denklem 4.3. ile hesaplanmıştır. Bu çalışma 3 set formülasyon üzerinden gerçekleştirilmiştir (Martín-Banderas vd., 2012).

$$\% EE = \frac{\text{Enkapsüle edilen DNP miktarı}}{\text{Formülasyonda bulunan teorik DNP miktarı}} \times 100$$

(4.3.)

4.3.5. *In vitro* dissolüsyon

DNP yüklü I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonlarının *in vitro* dissolüsyon profillerini belirlemek için 24 saatlik bir dissolüsyon çalışması yapılmıştır. I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonundan DNP dissolüsyonu diyaliz membran yöntemi kullanılarak test edilmiştir. DNP (5 mg) ve I-DNP (5 mg'a eşdeğer miktarda DNP içeren miktarda) kodlu nanopartikül formülasyonu selüloz asetat diyaliz membranı (molekül ağırlığı:12-14 kDa) içerisine konulmuş ardından üzerlerine 2 mL çözündürme ortamı (PBS pH 6.8) eklendikten sonra diyaliz membranının her iki özel aparatlar ile kapatılmıştır. Hazırlanan diyaliz membranları, 100 rpm'de devamlı olarak karışan $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'de 80 mL hacimdeki çözünme ortamı içine atılmıştır. Dissolüsyon ortamı olarak fosfat tamponu (PBS) pH 6.8 kullanılmıştır. Analizlerde hata olmaması ve çözünme ortamının buharlaşmasını önlemek için reseptör kompartman alimünyum folyo ile sıkıca kapatılmıştır. Görsel 4.2.'de yapılan çalışmanın bir görseli sunulmuştur.



Görsel 4.2. DNP ve I-DNP için *in vitro* dissolüsyon çalışması

1. saat, 2. saat, 3. saat, 4. saat, 5. saat, 6. saat, 7. saat, 9. saat, 12. saat ve 24. Saatler sonrası 3 mL numune alınmış ve aynı hacim yerine taze çözünme ortamı (PBS pH 6.8) reseptör kompartımına ilave edilmiştir. Ardından numuneler gerekli seyreltmelerin ardından 'PBS pH 6.8 ortamında validasyon çalışması' bölümünde açıklanan UV spektrofotometre yöntemi ile 315 nm'de analiz edilmiştir. Sonuçlar % kümülatif çözünen

miktar-zaman grafiğine dönüştürülmüştür. Bu çalışma 3 seri saf DNP ve 3 seri DNP yüklü I-DNP formülasyonu için gerçekleştirilmiştir.

4.3.6. Salım kinetiği

In vitro dissolüsyon çalışmalarında elde edilen veriler ile DDSolver yazılım programı kullanılarak salım kinetikleri araştırılmıştır. Hesaplama süresini kısaltmak, hesaplama hatalarını ortadan kaldırmak ve uygun salım profili/kinetiklerin belirlemek için excel eklentisi olan DDSolver isimli bilgisayar programı kullanılmıştır. Dissolüsyon profilleri elde edildikten sonra, en önemli ve popüler dört kriteri belirlemek için veriler DDSolver programına aktarılmıştır. Bu kriterler korelasyon katsayısı (R_{sqr} , R^2 veya COD), düzeltilmiş korelasyon katsayısı (R_{sqr_adj} veya $R^2_{adjusted}$), Akaike Bilgi Kriteri (AIC) ve Model Seçim Kriteri (MSC)'dir. En yüksek R^2 , $R^2_{adjusted}$ ve MSC değerleri ve en düşük AIC değerleri kinetik modelleri değerlendirmek için seçim kriteri olarak kullanılmıştır (A Alper Öztürk ve Merve Güven, 2019; Yenilmez, Öztürk ve Başaran, 2023).

4.4. Katı Hal Karakterizasyonları

4.4.1. Termal analiz

Termal özellikler, diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC, DSC-60, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MI) kullanılarak belirlenmiştir. Yaklaşık 5 mg numune, alüminyum kroze içinde tartılmış, 50 mL.dk⁻¹ hızdaki hava akımı ve 10°C.dk⁻¹ ısıtma hızı altında 30°C ile 300°C sıcaklık aralığında analiz edilmiştir. I-DNP kodlu DNP yüklü nanopartikül formülasyonunun analizine ek olarak, referans ve karşılaştırma açısından saf DNP, PLGA, I-Blank kodlu formülasyon ve fiziksel karışım analiz edilmiştir (Alper Öztürk, Namlı ve Aygül, 2021).

4.4.2. FT-IR

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometri (FT-IR) analizleri FT-IR cihazı (Shimadzu IR Prestige-21, Japonya) ile 4000-500 cm⁻¹ dalga boyu aralığında saf DNP, PLGA, I-Blank kodlu formülasyon, DNP yüklü I-DNP kodlu formülasyon ve fiziksel

karışım için gerçekleştirilmiştir. Kullanılan FT-IR cihazının sıcaklık kontrol mekanizmalı DLATGS dedektörü, dinamik hizalama sistemi ile donatılmış otomatik kurutuculu sızdırmaz Michelson interferometresi (30° geliş açısı) özellikleri bulunmaktadır. Analizlerde kullanılan çözünürlük 0.5 cm^{-1} 'dir (A. Alper Öztürk vd., 2023).

4.4.3. $^1\text{H-NMR}$

Dötero kloroform (CDCl_3) içinde çözündürülerek hazırlanan saf DNP, PLGA, I-Blank kodlu formülasyon, DNP yüklü I-DNP kodlu formülasyon ve fiziksel karışımın $^1\text{H-NMR}$ analizleri, NMR (Bruker 500 MHz UltraShield NMR, Almanya) cihazı kullanılarak yapılmıştır (Başaran vd., 2022).

4.5. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

4.5.1. In vitro AChE ve BChE inhibitör aktivite yöntemi ile anti-Alzheimer etki analizleri

Test maddelerinin ve test maddelerini içeren DNP içeren nanopartikül (I-DNP) ve blank (I-Blank) formülasyonun asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BuChE) enzim inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesi için Ellman Testi kullanılmıştır. Kolorimetrik belirginlik sağlanması için metot modifikasyonları yapılmış olup, modifiye metot kullanılmıştır. Çalışmada, BuChE (E.C.3.1.1.8., at serumundan izole), AChE (E.C.3.1.1.7., tip VIS *Electrophorus electricus* (electric eel) organizmasından izole) Ellman belirteci, tampon çözeltileri (potasyum dihidrojen fosfat, potasyum hidroksit), 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), sodyum hidrojen karbonat, asetilkolin iyodür (ATC), bütirilkolin iyodür (BTC), jelatin, dimetilsülfoksit (DMSO), donepezil hidroklorür kullanılmıştır. Spektrofotometrik ölçümler 412 nm'de mikropłaka okuyucuda (BioTek-Synergy H1 Microplate Reader) gerçekleştirilmiştir.

Çalışma süresince kullanılan distile su Millipore, Milli-Q Synthesis A10 cihazından elde edilmiştir. Kullanılan bütün çözeltiler taze hazırlanmış olup, stabilitelerinde değişim olmaması açısından 1-2 hafta içerisinde kullanılmalara dikkat edilmiştir. Test maddelerinin AChE ve BuChE enzim inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesi deneyleri 96

kuyucuklu plakalarda gerçekleştirilmiştir. Deneylerde kullanılmak üzere 2.5 U.mL^{-1} konsantrasyonda AChE ve BuChE enzim çözeltileri, 0.075 M ATC ve BTC çözeltileri, 0.01 M DTNB çözeltisi, 0.1 M pH 8.0 PBS ve $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, $200 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $400 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ 'lik üç farklı konsantrasyonda test çözeltisi hazırlanmıştır.

Bu çözeltiler iki farklı test çözeltisi oluşturacak şekilde karıştırılmıştır. Birinci test çözeltisi, her bir kuyucuk için $70 \text{ } \mu\text{L}$ fosfat tamponu çözeltisi, $20 \text{ } \mu\text{L}$ DTNB çözeltisi ve $20 \text{ } \mu\text{L}$ enzim çözeltisi (AChE ve BuChE'nin her biri için ayrı test çözeltisi hazırlanmıştır) karıştırılarak elde edilmiştir. İkinci test çözeltisi için ise, her bir kuyucuk için $70 \text{ } \mu\text{L}$ fosfat tamponu çözeltisi ve $10 \text{ } \mu\text{L}$ ATC veya BTC çözeltisi (ATC ve BTC'nin her biri için ayrı test çözeltisi hazırlanmıştır) karıştırılarak elde edilmiştir. Test çözeltileri 96 kuyucuğun tamamına yeterli olacak miktarlarda hazırlanmıştır.

Öncelikle $20 \text{ } \mu\text{L}$ test çözeltisi ve $110 \text{ } \mu\text{L}$ birinci test çözeltisi 96 kuyucuklu plakaya her bir konsantrasyon için 4 tekrar oluşturacak şekilde eklenerek 5 dakika karıştırılmış ve $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa $80 \text{ } \mu\text{L}$ ikinci test çözeltisi eklenerek, 30 saniye hızlı bir karıştırma işlemi yapılmıştır. Karıştırma işlemi ardından mikropkala okuyucuda 412 nm 'de birinci spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir (BioTek-Synergy H1 Microplate Reader). Reaksiyonun sürmesi için 5 dk beklenerek, süre sonunda ikinci spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir. İki ölçüm arasındaki absorbans değerleri farkı alınarak aşağıdaki formüle göre % inhibisyon oranları Denklem 4.4.'e göre hesaplanmıştır. Denklemede kullanılan kısaltmalar şu şekildedir: B: Blank (test çözeltisinin ve substratın eklenmediği kuyucuk), K: Kontrol (sadece test çözeltisinin eklenmediği kuyucuk), A(B): Blank kuyucuğuna ait absorbans okuma farkı, A(K): Kontrol kuyucuğuna ait absorbans okuma farkı, A(İ): Test çözeltisine ait absorbans okuma farkı.

$$\% \text{ Inhibisyon} = \frac{[(A(K) - A(B)) - (A(\text{İ}) - (B))]}{(A(K) - A(B))} \cdot 100$$

(4.4.)

4.5.2. Anjiyogenez üzerinde etki çalışmaları

4.5.2.1. *In vivo* CAM (The chorioallantoic membrane assay) yöntemi

CAM (koryoallantoik membran) deneyi protokolü için Kıyan ve arkadaşları tarafından rapor edilen deney protokolü modifiye edilerek uygulanmıştır. *In vivo* CAM yönteminde kullanılan kuluçkalık civciv yumurtaları Bursa HAS Tavuk A.Ş. (Sivrihisar)'dan alınmıştır (Kıyan vd., 2014).

4.5.2.2. Pellet hazırlanışı

DNP yüklü I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonu, blank formülasyon (I-Blank) ve test maddeleri 1mg.mL^{-1} konsantrasyon olacak şekilde agaroz (%2.5, *a/h*) içinde süspansiyon haline getirilerek hazırlanmıştır. Ardından bu preparattan 10 μL alınıp 5 mm çapındaki paslanmaz çelik silindir desteklere uygulanmış ve oda ısısında donarak pellet şekline gelmeleri sağlanmıştır. Hazırlanan pelletler CAM yüzeyine uygulanmıştır. CAM deneyinde kör olarak %2.5 (*a/h*) agaroz kullanılmıştır.

4.5.2.3. CAM deneyinin yapılışı

Analizlerde kullanılan kuluçkalık civciv yumurtaları deneye başlamadan önce 36.5°C sıcaklıkta ve %80 rölatif neme sahip iklimlendirme kabininde yatay pozisyonda 72 saat inkübe edilmiştir. Bu süre zarfında civciv yumurtaları zaman zaman dikkatlice çevrilmiştir. İnkübasyon süresi sona erdiğinde öncelikle steril enjektörler yardımıyla civciv yumurtalarının alt kısımlarından yavaş bir şekilde 10-15 mL albumin (yumurta akı) alınmış ardından yumurtaların üst kısmındaki kabuk ve zar pens yardımıyla özenle uzaklaştırılmıştır. Gelişmekte olan canlı embriyo CAM'ı hemen bir streç film ile koruma altına alınıp yine 36.5°C sıcaklık ve %80 rölatif neme sahip inkübatörde 72 saat daha inkübe edilmiştir. CAM çapı yaklaşık 2 cm'i bulduğu tespit edildiğinde taze olarak hazırlanmış numune pelleti her yumurtaya bir adet olmak üzere CAM'ın üzerindeki kapillerlere yerleştirilmiştir. Tüm maddelerden 10-15 adet pellet eşit sayıda yumurtalardaki CAM üzerine uygulanmış ardından streç film ile kapatılmıştır. Değerlendirmelere geçilmeden önce belirtilen koşullarda pellet yerleştirilmiş halde yumurtalar 24 saat daha inkübe edilmiştir. Her test maddesi için 15 adet yumurta kullanılmıştır.

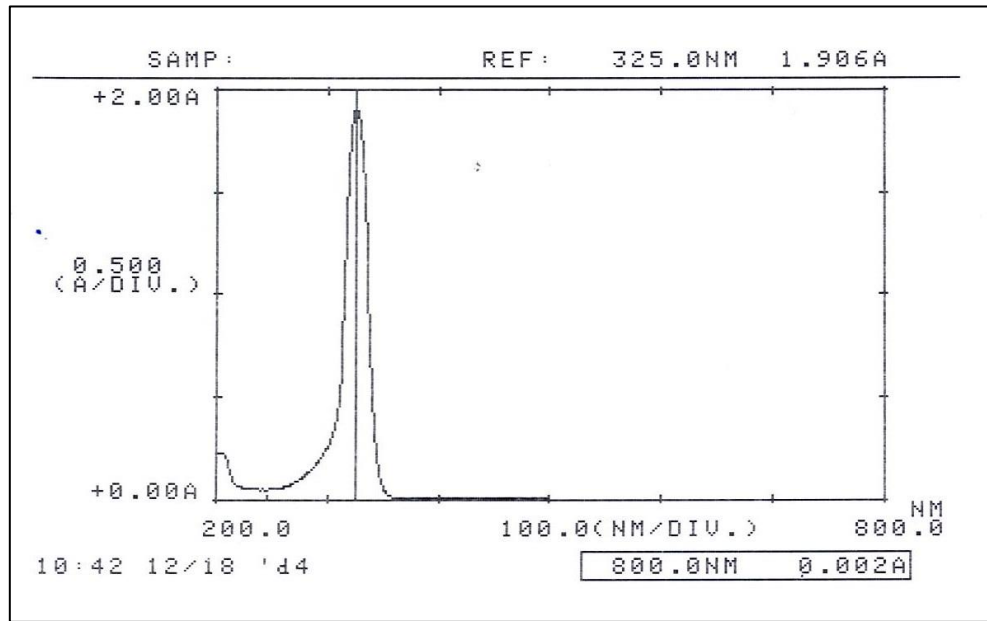
5. BULGULAR

5.1. Analitik Miktar Tayini için Validasyon Çalışmaları

5.1.1. Donepezil HCl için aseton: su (1:1 h/h) ortamında validasyon çalışması

5.1.1.1. Absorbans belirleme

Aseton: Su (1:1 h/h) karışımı içinde $50.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda hazırlanmış olan DNP çözeltisinin 325.0 nm 'de maksimum absorbans (λ_{max}) göstermiş olduğu Şekil 5.1.'de sunulmuştur.



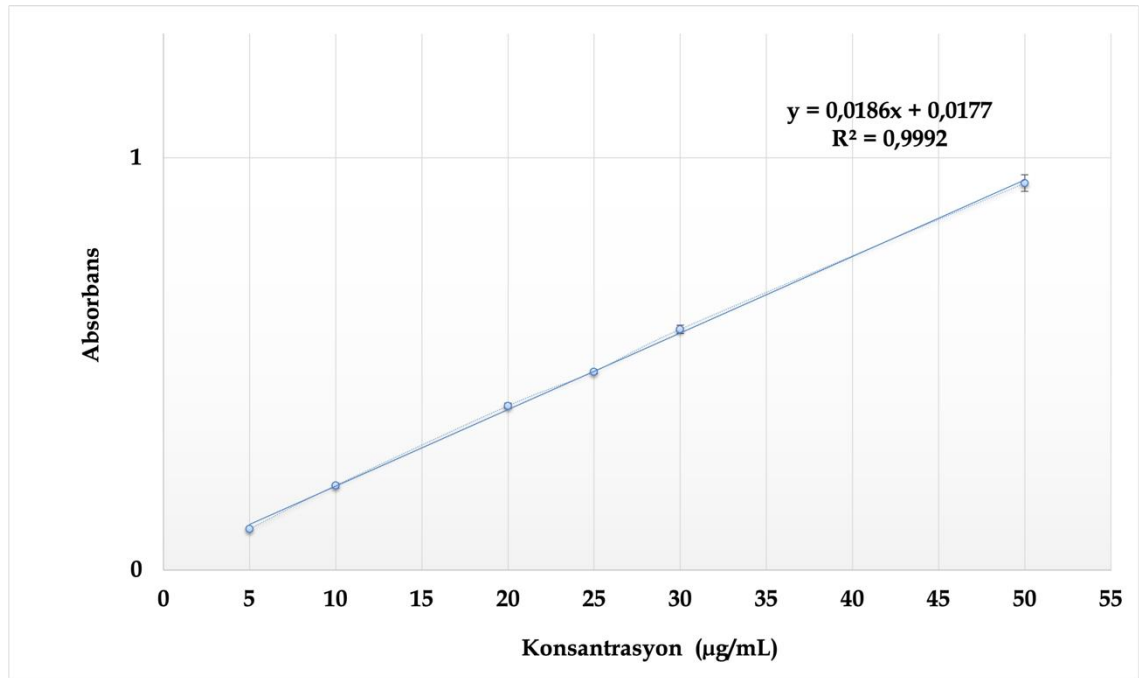
Şekil 5.1. DNP'e ait 200-800 nm arasında elde edilen spektrum ($\lambda_{\text{max}} = 325.0 \text{ nm}$)

5.1.1.2. Doğrusallık

DNP'nin aseton: su (1:1 h/h) içinde $5.0-50.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonları aralığında altı farklı konsantrasyonda farklı stok çözeltilerden üç kalibrasyon seti hazırlanmış ve ardından UV-spektrofotometre ile 325.0 nm 'de analiz edilmiştir. Konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri her kalibrasyon seti için Tablo 5.1.'de sunulmuştur. Elde edilen absorbans değerleriyle çizilen kalibrasyon eğrisi, eğriye ait olan doğru denklemi ve korelasyon katsayısı değeri (R^2) Şekil 5.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.1. Doğrusallık çalışması sonuçları

DNP (µg/mL)	Absorbans Değerleri					
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama	Standart sapma	Standart hata
5.0	0.099	0.092	0.108	0.100	0.01	0.00
10.0	0.192	0.203	0.220	0.205	0.01	0.01
20.0	0.379	0.409	0.407	0.398	0.02	0.01
25.0	0.467	0.487	0.489	0.481	0.01	0.00
30.0	0.556	0.601	0.595	0.584	0.02	0.01
50.0	0.883	0.972	0.961	0.939	0.05	0.02



Şekil 5.2. DNP'nin aseton: su (1:1 h/h) ortamında standart eğrisi

5.1.1.3. Kesinlik

DNP için 15.0 µg.mL⁻¹, 25.0 µg.mL⁻¹ ve 35.0 µg.mL⁻¹ konsantrasyonda 3 farklı çözelti hazırlanmıştır. Tüm konsantrasyonlar için 3 tekrar analizi, 3 gün artarda

yapılmıştır. Sonuçlar doğrusallık çalışmasında elde edilen regresyon denklemi yardımıyla hesaplanmış ve tam konsantrasyonlar ile karşılaştırılarak yöntemin kesinliği analiz edilmiştir. Kesinlik çalışması sonuçları 15.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 25.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ve 35.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonlar için sırasıyla Tablo 5.2., Tablo 5.3. ve Tablo 5.4.'te gösterilmiştir.

Tablo 5.2. 15.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ derişim için kesinlik sonuçları

15.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$			
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Absorbans)	(Absorbans)	(Absorbans)
	0.296	0.295	0.298
	0.296	0.296	0.297
	0.294	0.299	0.295
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Derişim)	(Derişim)	(Derişim)
	14.983	14.929	15.090
	14.983	14.983	15.037
	14.875	15.144	14.929
Ortalama	14.947	15.929	15.019
Standart sapma (SS)	0.062	0.112	0.082
Varyasyon Katsayısı (%RSD)	0.416	0.746	0.548
%95 Güven Aralığı	0.154	0.278	0.204

Tablo 5.3. 25.0 µg.mL⁻¹ derişim için kesinlik sonuçları

25.0 µg.mL⁻¹			
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Absorbans)	(Absorbans)	(Absorbans)
	0.484	0.480	0.484
	0.483	0.485	0.483
	0.481	0.484	0.479
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Derişim)	(Derişim)	(Derişim)
	25.104	24.889	25.104
	25.050	25.158	25.050
	24.942	25.104	24.835
Ortalama	25.032	25.050	24.996
Standart sapma (SS)	0.082	0.142	0.142
Varyasyon Katsayısı (% RSD)	0.329	0.569	0.570
%95 Güven Aralığı	0.204	0.354	0.354

Tablo 5.4. 35.0 µg.mL⁻¹ derişim için kesinlik sonuçları

35.0 µg.mL⁻¹			
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Absorbans)	(Absorbans)	(Absorbans)
	0.665	0.669	0.673
	0.667	0.668	0.671
	0.669	0.668	0.668
	Gün 2	Gün 2	Gün 2
	(Derişim)	(Derişim)	(Derişim)
	34.848	35.064	35.279
	34.956	35.010	35.171
	35.064	35.010	35.010
Ortalama	34.956	35.028	35.153
Standart sapma (SS)	0.108	0.031	0.135
Varyasyon Katsayısı (%RSD)	0.308	0.089	0.385
%95 Güven Aralığı	0.267	0.077	0.337

5.1.1.4. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğun kanıtlanması amacıyla üç farklı konsantrasyona (15.0 µg.mL⁻¹, 25.0 µg.mL⁻¹, 35.0 µg.mL⁻¹) DNP içeren çözeltiler hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 3 analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrusallık çalışmasında ‘y=0.0186x + 0.0177’ olarak elde edilen regresyon denklemi kullanılarak hesaplanmış ve stok çözelti konsantrasyonları ile karşılaştırılmış, ardından yöntemin doğruluğu ‘% geri kazanım’ olarak hesaplanmıştır. DNP için doğruluk çalışması sonuçları Tablo 5.5.’te sunulmuştur.

Tablo 5.5. DNP için doğruluk çalışması sonuçları

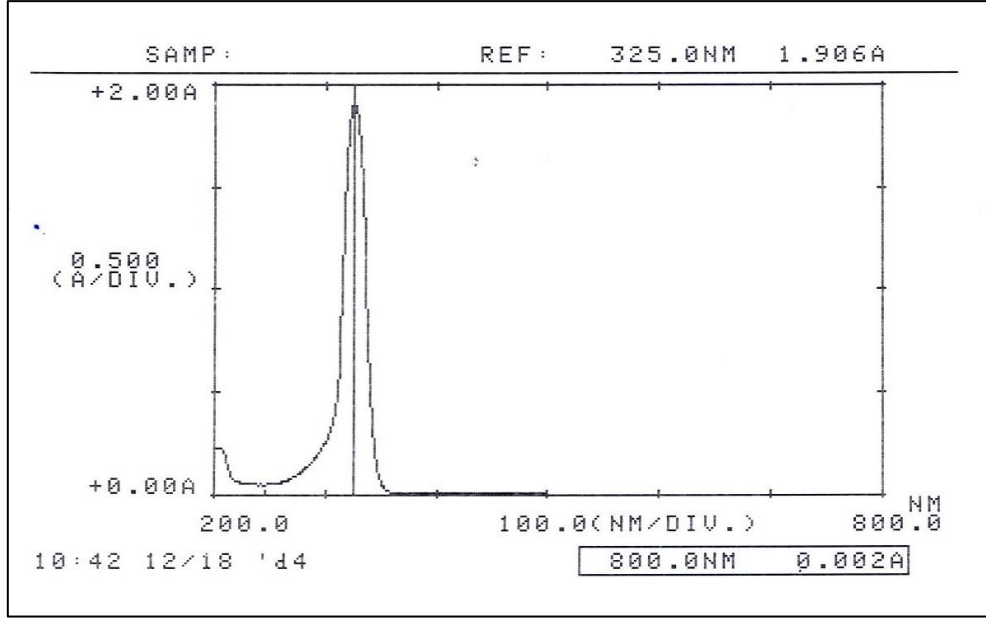
	Derişim		
	15.0 µg.mL ⁻¹	25.0 µg.mL ⁻¹	35.0 µg.mL ⁻¹
Elde edilen absorbanslar	0.296	0.479	0.665
	0.297	0.481	0.670
	0.297	0.483	0.667
Bulunan Derişimler	14.983	24.835	34.848
	15.037	24.942	35.117
	15.037	25.050	34.956
% Geri Kazanım	99.885	99.339	99.567
	100.244	99.770	100.336
	100.244	100.200	99.874
Ortalama % Geri Kazanım	100.124	99.770	99.925
Standart sapma (SS)	0.207	0.431	0.387
Varyasyon Katsayısı (%RSD)	0.207	0.432	0.387
%95 Güven Aralığı	0.515	1.070	0.962

5.1.1.5. Duyarluluk

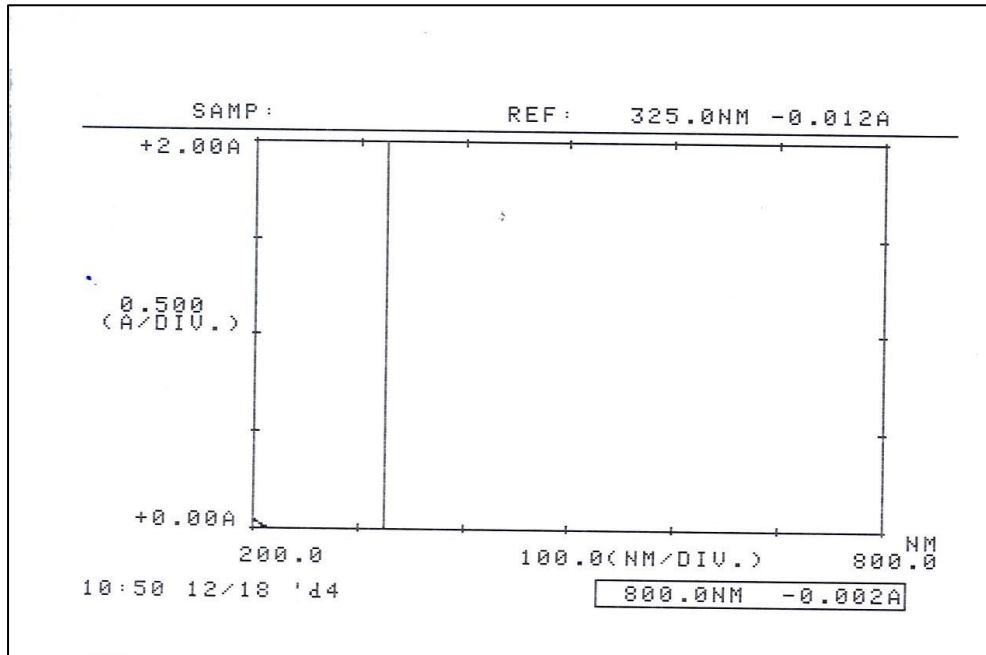
LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1.275 µg.mL⁻¹ ve 3.863 µg.mL⁻¹ olarak elde edilmiştir.

5.1.1.6. Seçicilik

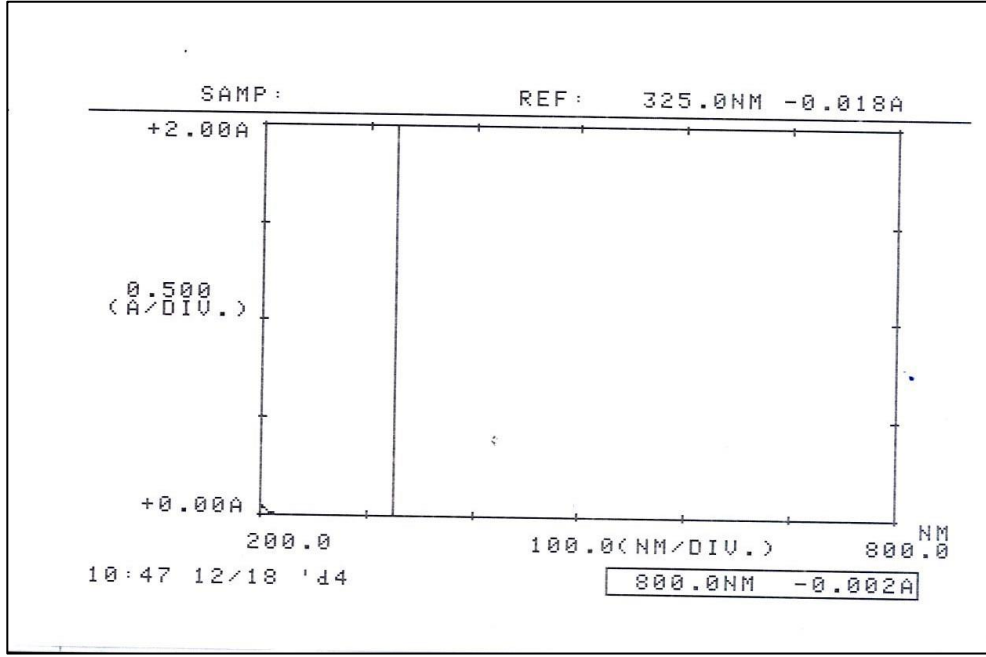
Seçicilik çalışması için UV-Spektrofotometre'den elde edilen spektrumlar DNP, aseton: su (1:1 h/h) karışımı ve I-Blank (Blank formülasyon) için sırasıyla Şekil 5.3., Şekil 5.4. ve Şekil 5.5.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.3. DNP'e ait spektrum



Şekil 5.4. Aseton: su (1:1 h/h) karışımına ait spektrum

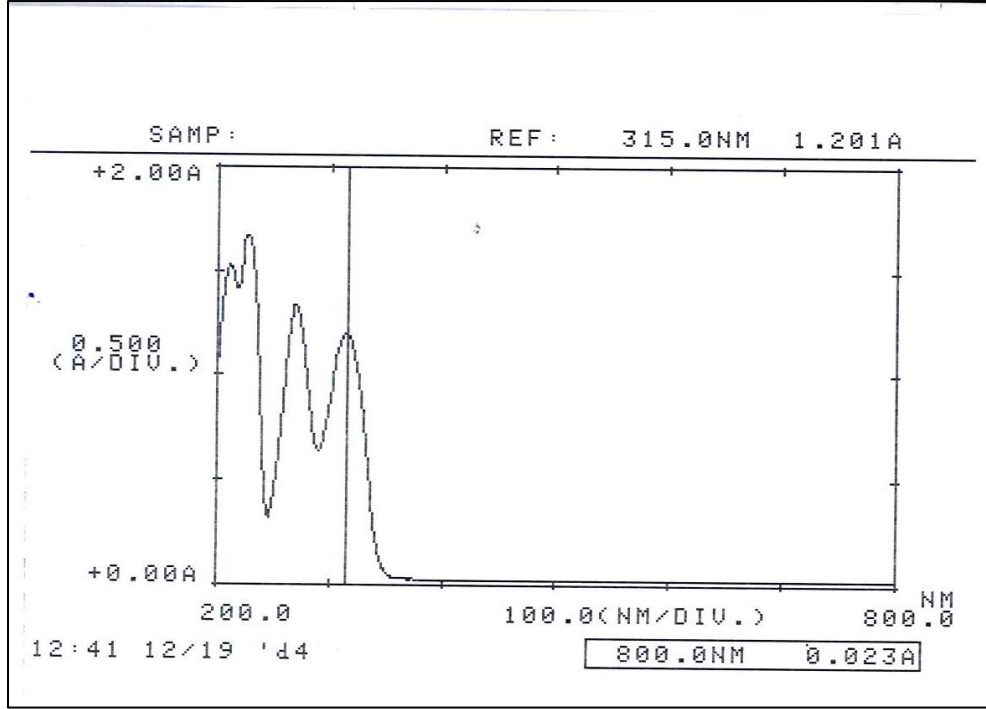


Şekil 5.5. I-Blank kodlu formülasyona ait spektrum

5.1.2. Donepezil HCl için PBS pH:6.8 ortamında validasyon çalışması

5.1.2.1. Absorbans belirleme

PBS pH 6.8 ortamı içinde $50.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda hazırlanmış olan DNP çözeltisinin 315.0 nm'de maksimum absorbans (λ_{max}) göstermiş olduğu Şekil. 5.6.'da sunulmuştur.



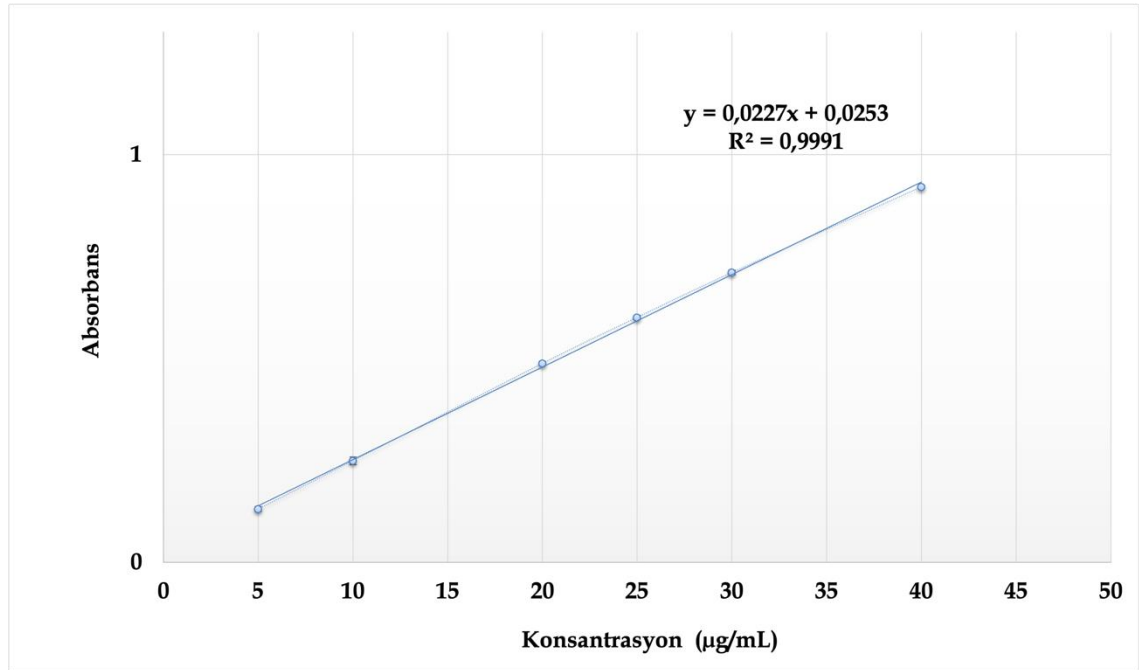
Şekil 5.6. DNP'e ait 200-800 nm arasında elde edilen spektrum ($\lambda_{max} = 315.0$ nm)

5.1.2.2. Doğrusallık

DNP'nin PBS pH 6.8 ortamında $5.0-40.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ konsantrasyonları aralığında altı farklı konsantrasyonda farklı stok çözeltilerden üç kalibrasyon seti hazırlanmış ve ardından UV-spektrofotometre ile 315 nm'de analiz edilmiştir. Konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri her kalibrasyon seti için Tablo 5.6.'da sunulmuştur. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi, eğriye ait olan doğru denklemini ve korelasyon katsayısı değeri (R^2) Şekil 5.7.'de sunulmuştur.

Tablo 5.6. Doğrusallık çalışması sonuçları

DNP (µg/mL)	Absorbans Değerleri					
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama	Standart sapma	Standart hata
5.0	0.120	0.125	0.148	0.131	0.01	0.01
10.0	0.239	0.233	0.276	0.249	0.02	0.01
20.0	0.477	0.489	0.498	0.488	0.01	0.00
25.0	0.595	0.595	0.613	0.601	0.01	0.00
30.0	0.708	0.699	0.726	0.711	0.01	0.01
40.0	0.913	0.918	0.932	0.921	0.01	0.00



Şekil 5.7. DNP'nin PBS pH 6.8 ortamında standart eğrisi

5.1.2.3. Kesinlik

DNP için $15.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda 3 farklı çözelti hazırlanmıştır. Tüm konsantrasyonlar için 3 tekrar analizi, 3 gün artarda yapılmıştır. Analiz sonuçları doğrusallık çalışmasında elde edilen regresyon denklemi yardımıyla hesaplanmış ve tam konsantrasyonlar ile karşılaştırılarak yöntemin kesinliği incelenmiştir. Kesinlik çalışması sonuçları $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonlar için sırasıyla Tablo 5.7., Tablo 5.8. ve Tablo 5.9.'da gösterilmiştir.

Tablo 5.7. $15.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ derişim için kesinlik sonuçları

15.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$			
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Absorbans)	(Absorbans)	(Absorbans)
	0.366	0.370	0.366
	0.369	0.367	0.365
	0.367	0.366	0.367
	Gün 1	Gün 2	Gün 2
	(Derişim)	(Derişim)	(Derişim)
	15.016	15.193	35.070
	15.149	15.061	35.158
	15.061	15.016	35.026
Ortalama	15.075	15.090	15.016
Standart sapma (SS)	0.067	0.092	0.044
Varyasyon Katsayısı (% RSD)	0.447	0.608	0.294
%95 Güven Aralığı	0.167	0.228	0.109

Tablo 5.8. 25.0 µg.mL⁻¹ derişim için kesinlik sonuçları

25.0 µg.mL⁻¹			
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Absorbans)	(Absorbans)	(Absorbans)
	0.595	0.590	0.594
	0.594	0.591	0.591
	0.593	0.594	0.596
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Derişim)	(Derişim)	(Derişim)
	25.109	24.889	25.065
	25.065	24.933	24.933
	25.021	25.065	25.153
Ortalama	25.065	24.962	25.051
Standart sapma (SS)	0.044	0.092	0.111
Varyasyon Katsayısı (% RSD)	0.176	0.368	0.443
%95 Güven Aralığı	0.109	0.228	0.276

Tablo 5.9. 35.0 µg.mL⁻¹ derişim için kesinlik sonuçları

35.0 µg.mL ⁻¹			
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Absorbans)	(Absorbans)	(Absorbans)
	0.822	0.821	0.819
	0.819	0.823	0.821
	0.821	0.820	0.820
	Gün 1	Gün 2	Gün 3
	(Derişim)	(Derişim)	(Derişim)
	35.114	35.070	34.982
	34.982	35.158	35.070
	35.070	35.026	35.026
Ortalama	35.055	35.085	35.026
Standart sapma (SS)	0.067	0.067	0.044
Varyasyon Katsayısı (% RSD)	0.192	0.192	0.126
%95 Güven Aralığı	0.167	0.167	0.109

5.1.2.4. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğun kanıtlanması amacıyla üç farklı konsantrasyona (15.0 µg.mL⁻¹, 25.0 µg.mL⁻¹, 35.0 µg.mL⁻¹) DNP içeren stok çözeltiler hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 3 analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrusallık çalışmasında ‘ $y = 0.0227 + 0.0253x$ ’ olarak elde edilen regresyon denklemi kullanılarak hesaplanmış ve stok çözelti konsantrasyonları ile karşılaştırılmış, ardından yöntemin doğruluğu ‘% geri kazanım’ olarak hesaplanmıştır. DNP için doğruluk çalışması sonuçları Tablo 5.10.’da sunulmuştur.

Tablo 5.10. DNP için elde edilen doğruluk değerleri

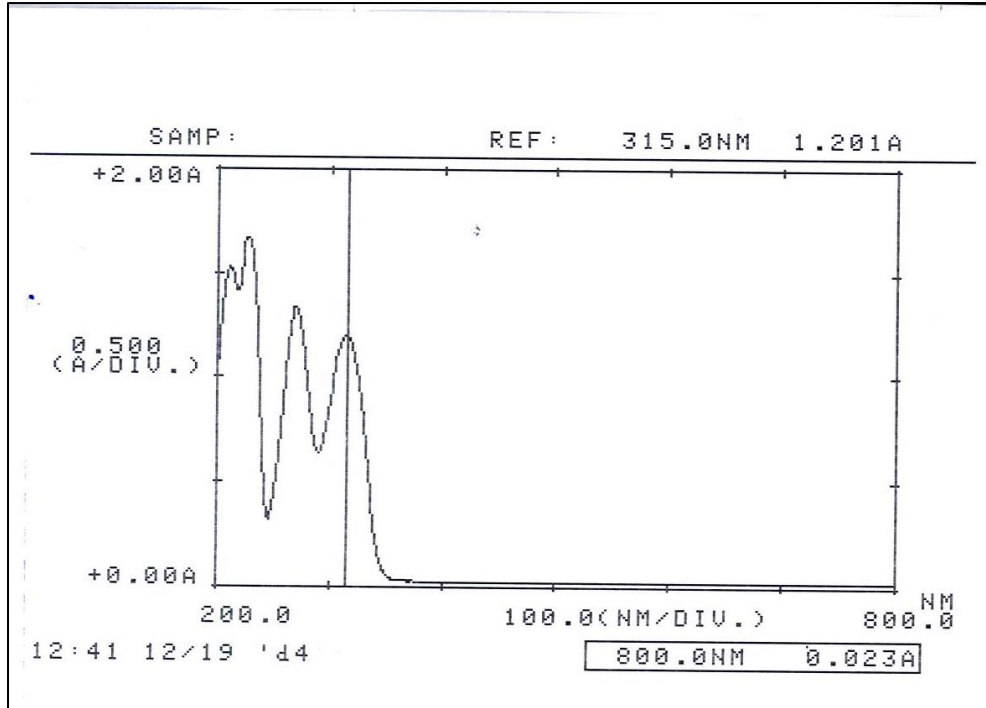
	Derişim		
	15.0 µg.mL ⁻¹	25.0 µg.mL ⁻¹	35.0 µg.mL ⁻¹
Elde edilen absorbanslar	0.367	0.588	0.820
	0.368	0.600	0.819
	0.365	0.587	0.821
Bulunan Derişimler	15.061	24.801	35.026
	15.105	25.330	34.982
	14.972	24.757	35.070
% Geri Kazanım	100.404	99.203	100.074
	100.697	101.319	99.948
	99.816	99.027	100.200
Ortalama % Geri Kazanım	100.306	99.850	100.074
Standart sapma (SS)	0.449	1.275	0.126
Varyasyon Katsayısı (%RSD)	0.447	1.277	0.126
%95 Güven Aralığı	1.115	3.168	0.313

5.1.2.5. Duyarluluk

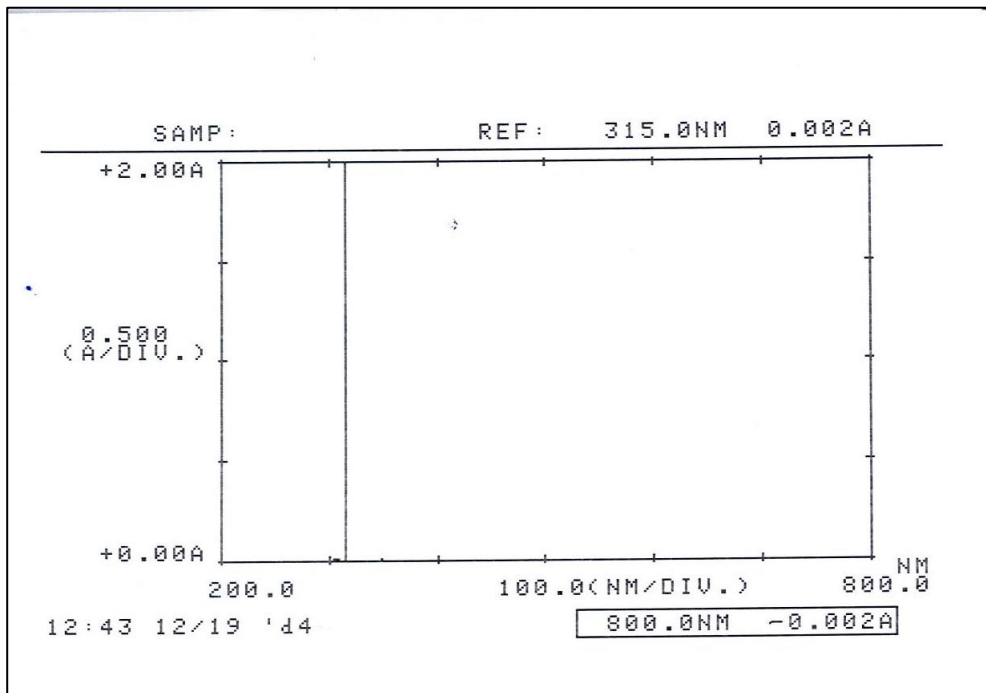
LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1.220 µg.mL⁻¹ ve 3.697 µg.mL⁻¹ olarak elde edilmiştir.

5.1.2.6. Seçicilik

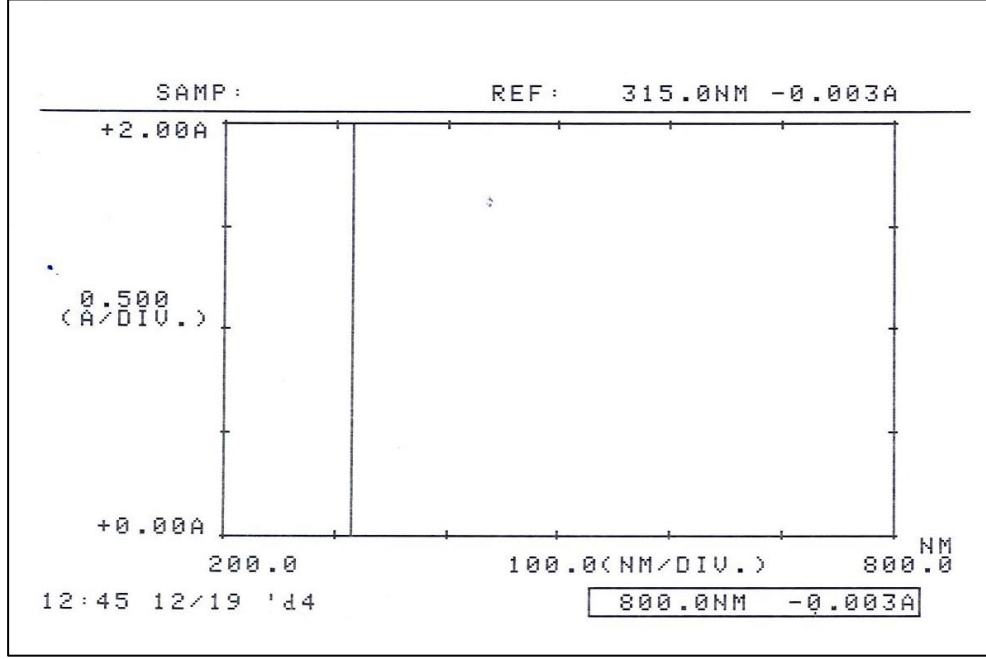
Seçicilik çalışması için UV-Spektrofotometre'den elde edilen spektrumlar DNP, PBS pH 6.8 ve I-Blank (Blank formülasyon) için sırasıyla Şekil 5.8., Şekil 5.9. ve Şekil 5.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 5.8. DNP'e ait spektrum



Şekil 5.9. PBS pH 6.8'e ait spektrum



Şekil 5.10. I-Blank kodlu formülasyona ait spektrum

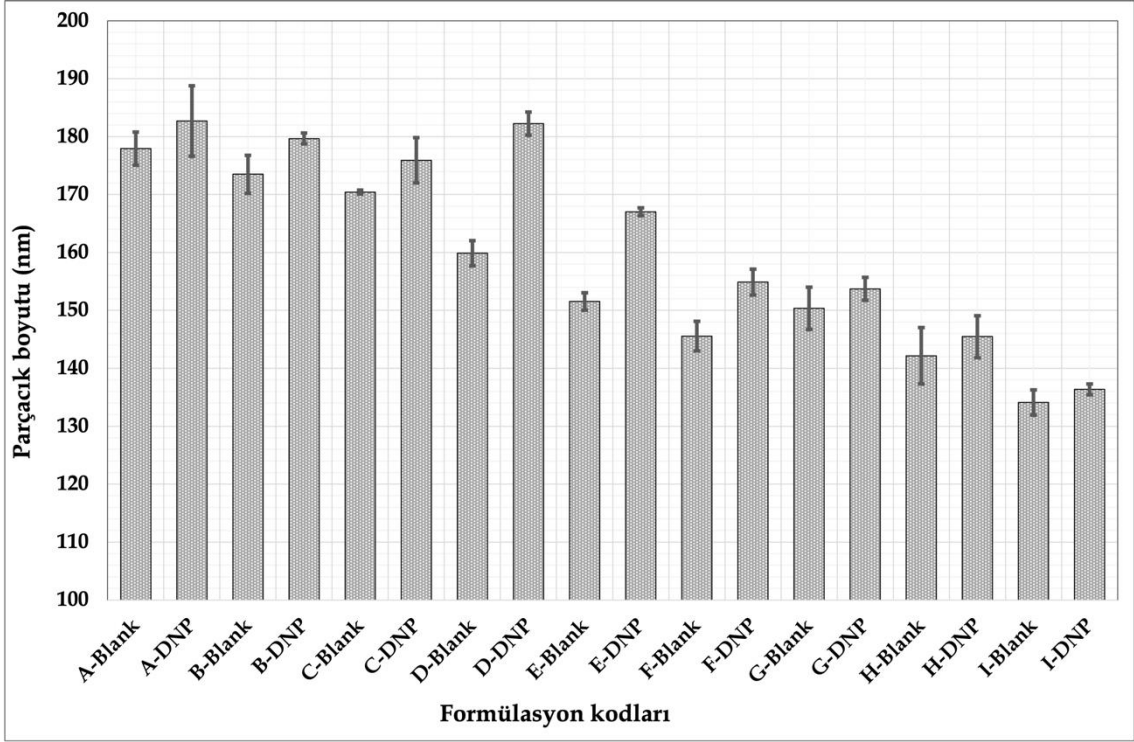
5.2. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu

5.2.1. Parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı

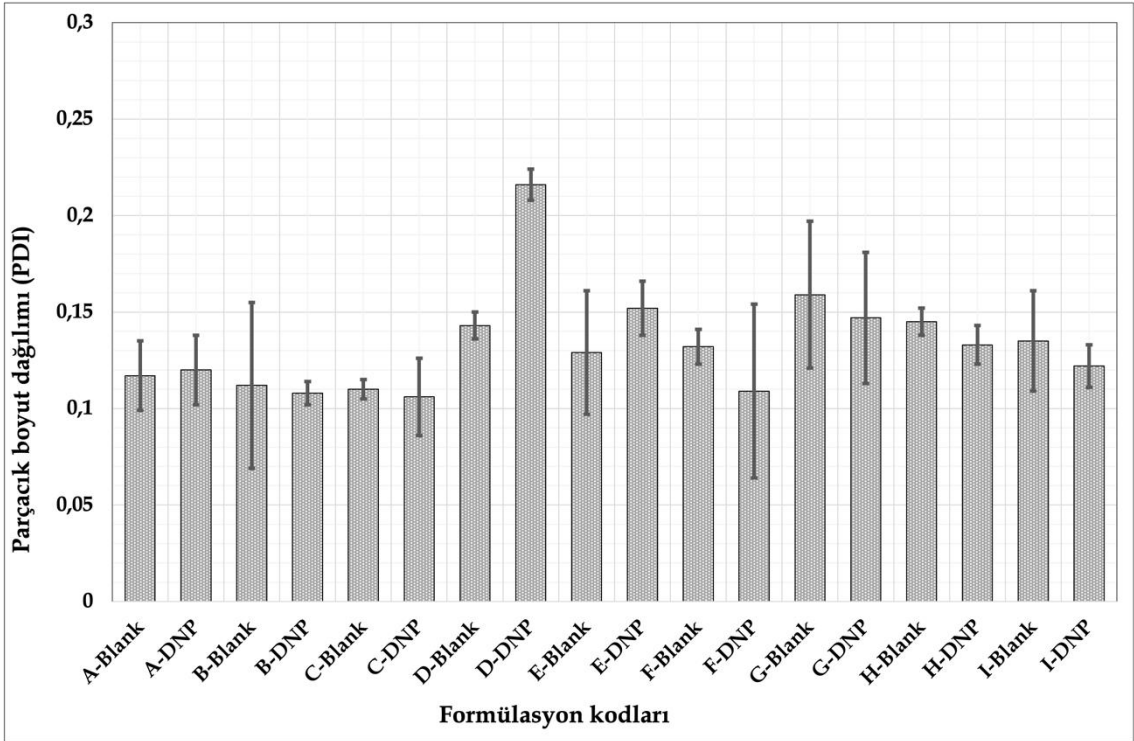
Bu tez çalışmasında formüle edilen tüm blank ve DNP yüklü nanopartikül formülasyonlarının parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı (PDI) değerleri Tablo 5.11.'de sunulmuştur. Daha net anlaşılabilmesi ve karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla Şekil 5.11. ve Şekil 5.12.'de sırasıyla elde edilen parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı (PDI) değerleri grafik olarak gösterilmiştir. Zetasizer Nano ZS cihazından alınan parçacık boyut dağılım raporları ise A-Blank, A-DNP, B-Blank, B-DNP, C-Blank, C-DNP, D-Blank, D-DNP, E-Blank, E-DNP, F-Blank, F-DNP, G-Blank, G-DNP, H-Blank, H-DNP, I-Blank ve I-DNP kodlu formülasyonlar için sırasıyla Şekil 5.13., Şekil 5.14., Şekil 5.15., Şekil 5.16., Şekil 5.17., Şekil 5.18., Şekil 5.19., Şekil 5.20., Şekil 5.21., Şekil 5.22., Şekil 5.23., Şekil 5.24., Şekil 5.25., Şekil 5.26., Şekil 5.27., Şekil 5.28., Şekil 5.29. ve Şekil 5.30.'da sunulmuştur.

Tablo 5.11. Formülasyonların parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı (PDI) değerleri

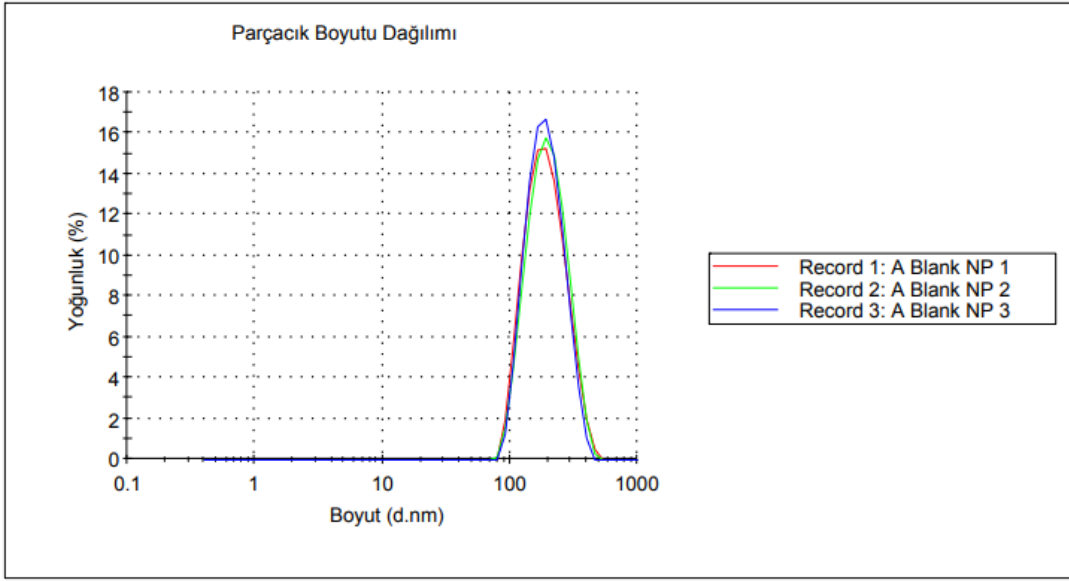
Kod	Parçacık Boyutu, nm (ortalama±standart sapma)	Parçacık Boyutu Dağılımı, PDI (ortalama±standart sapma)
A-Blank	177.93 ± 2.84	0.117 ± 0.018
A-DNP	182.70 ± 6.08	0.120 ± 0.018
B-Blank	173.50 ± 3.28	0.112 ± 0.043
B-DNP	179.67 ± 0.93	0.108 ± 0.006
C-Blank	170.43 ± 0.35	0.110 ± 0.005
C-DNP	175.93 ± 3.89	0.106 ± 0.020
D-Blank	159.87 ± 2.20	0.143 ± 0.007
D-DNP	182.23 ± 1.99	0.216 ± 0.008
E-Blank	151.53 ± 1.50	0.129 ± 0.032
E-DNP	167.03 ± 0.67	0.152 ± 0.014
F-Blank	145.57 ± 2.54	0.132 ± 0.009
F-DNP	154.90 ± 2.23	0.109 ± 0.045
G-Blank	150.37 ± 3.66	0.159 ± 0.038
G-DNP	153.73 ± 1.97	0.147 ± 0.034
H-Blank	142.17 ± 4.88	0.145 ± 0.007
H-DNP	145.47 ± 3.62	0.133 ± 0.010
I-Blank	134.10 ± 2.19	0.135 ± 0.026
I-DNP	136.37 ± 0.93	0.122 ± 0.011



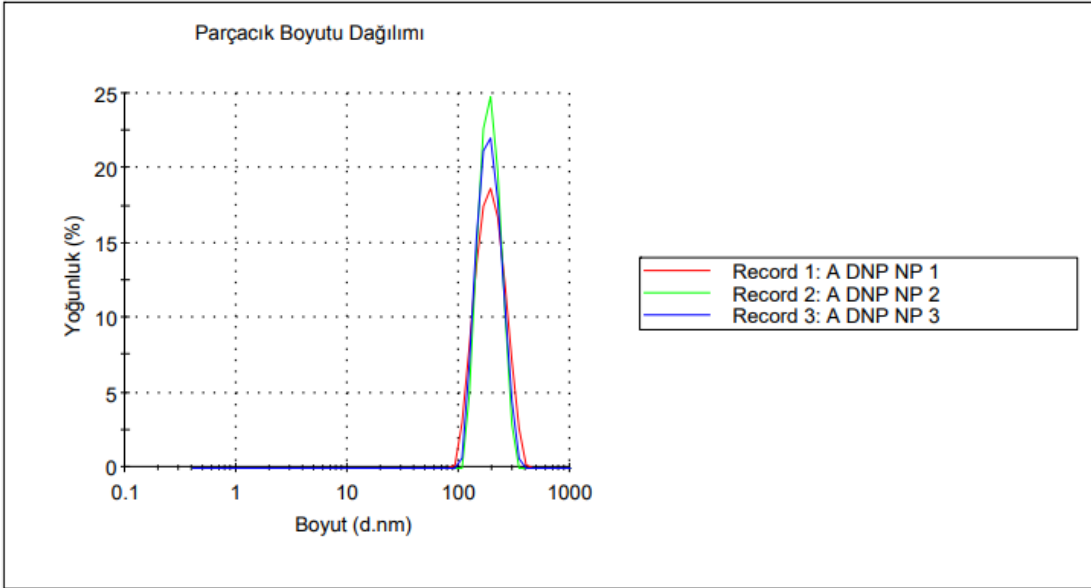
Şekil 5.11. Formülasyonların parçacık boyut değerleri grafiği



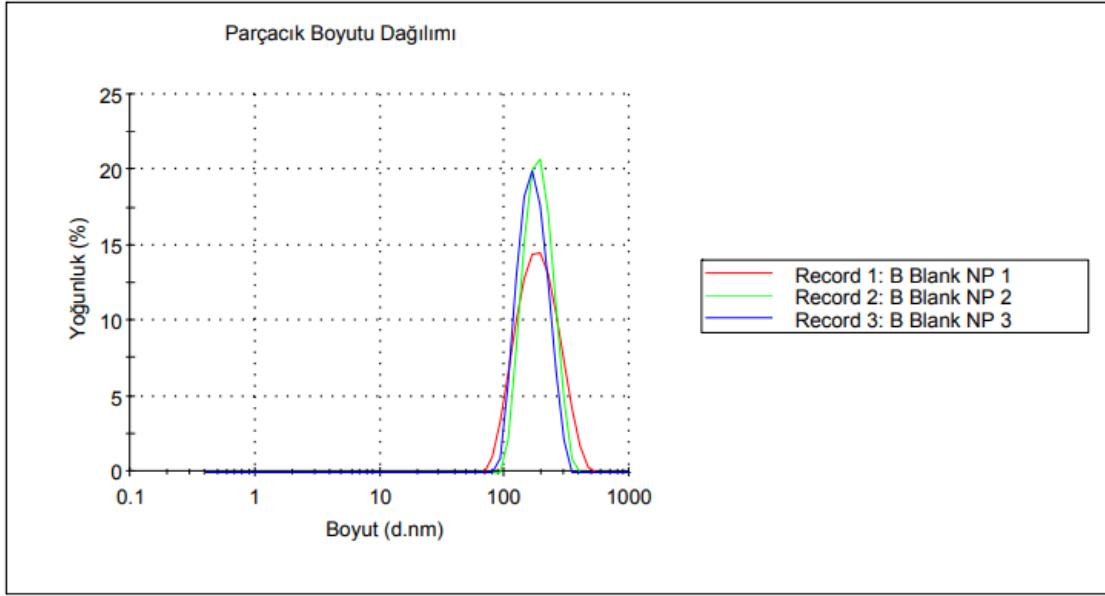
Şekil 5.12. Formülasyonların parçacık boyutu dağılımı (PDI) değerleri grafiği



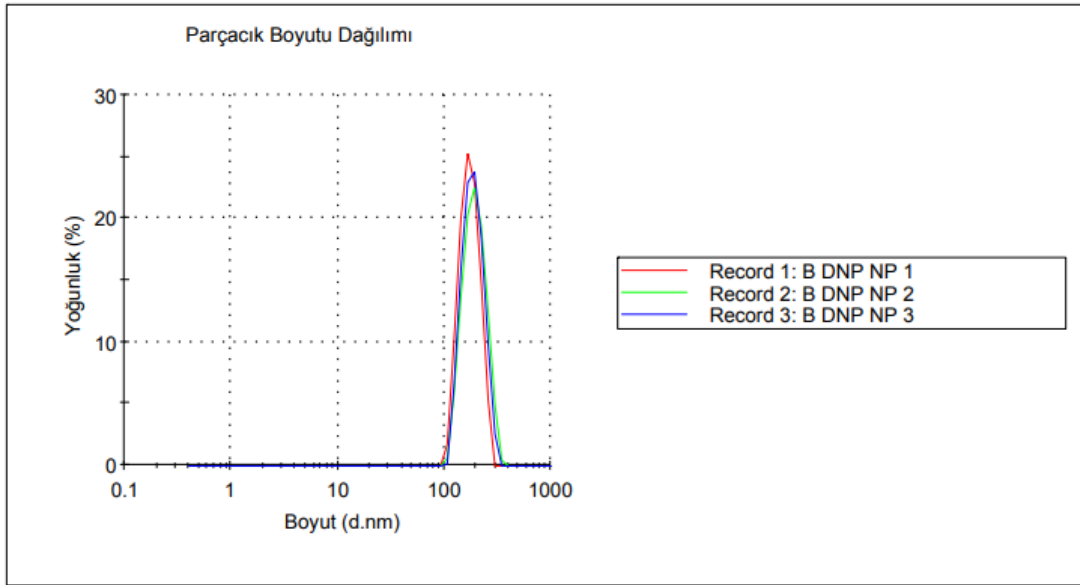
Şekil 5.13. A-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



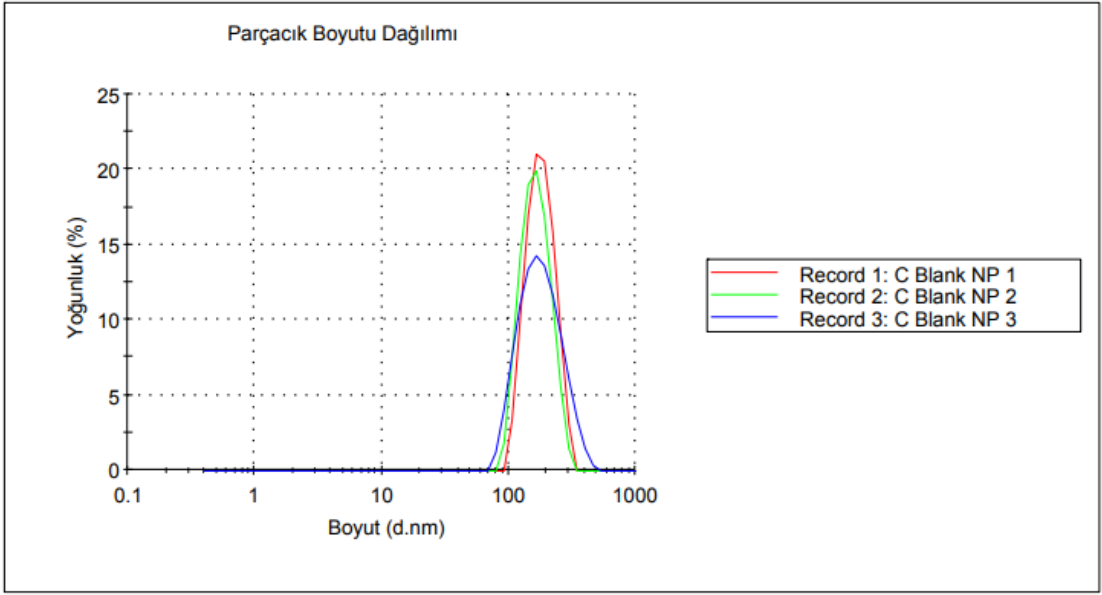
Şekil 5.14. A-DNP için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



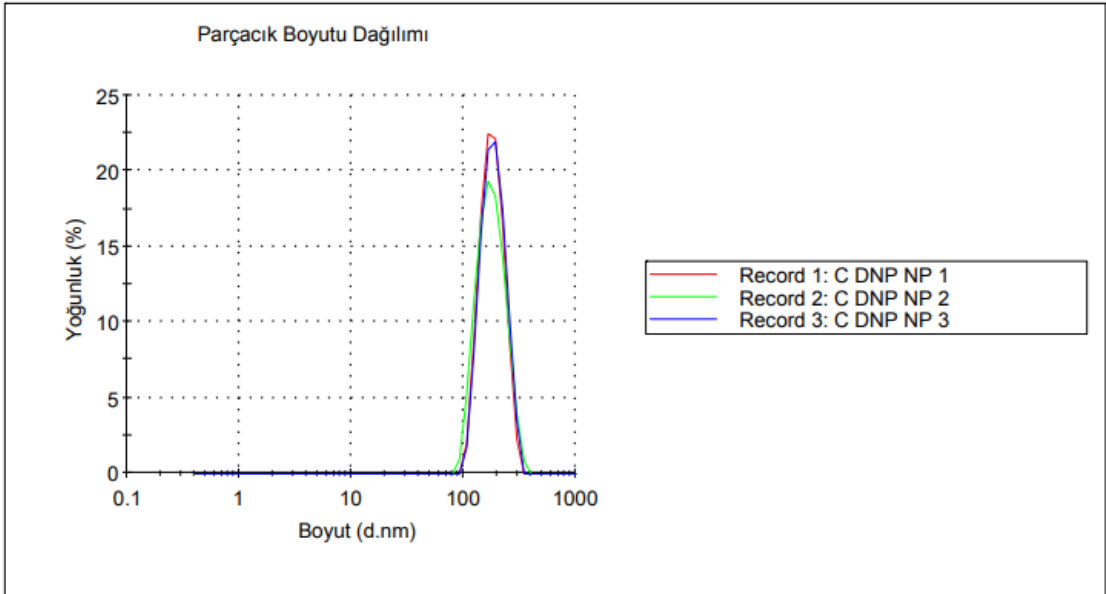
Şekil 5.15. B-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



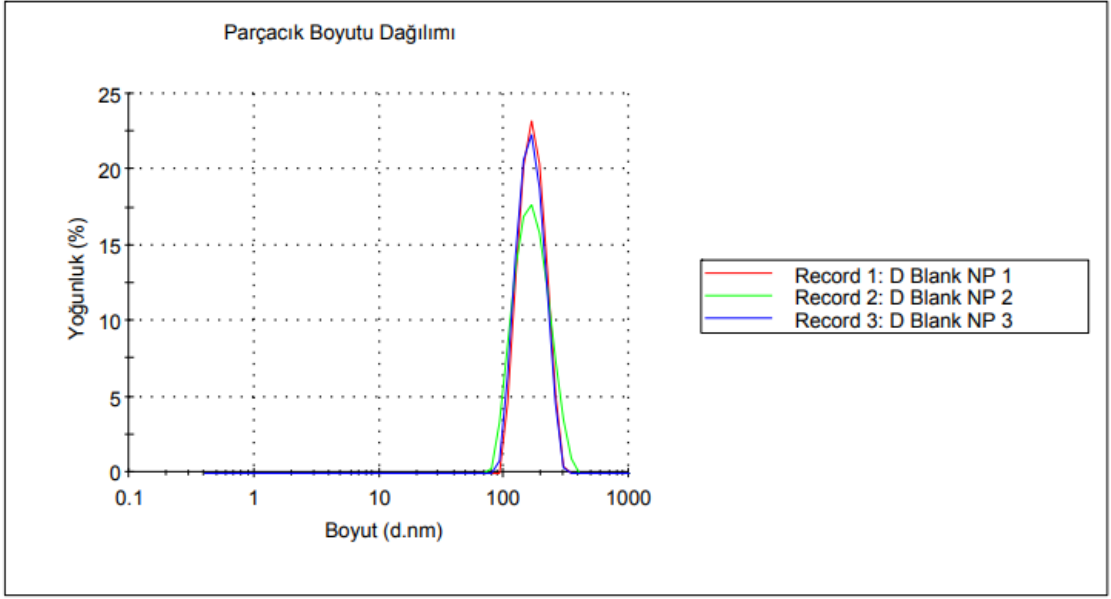
Şekil 5.16. B-DNP için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



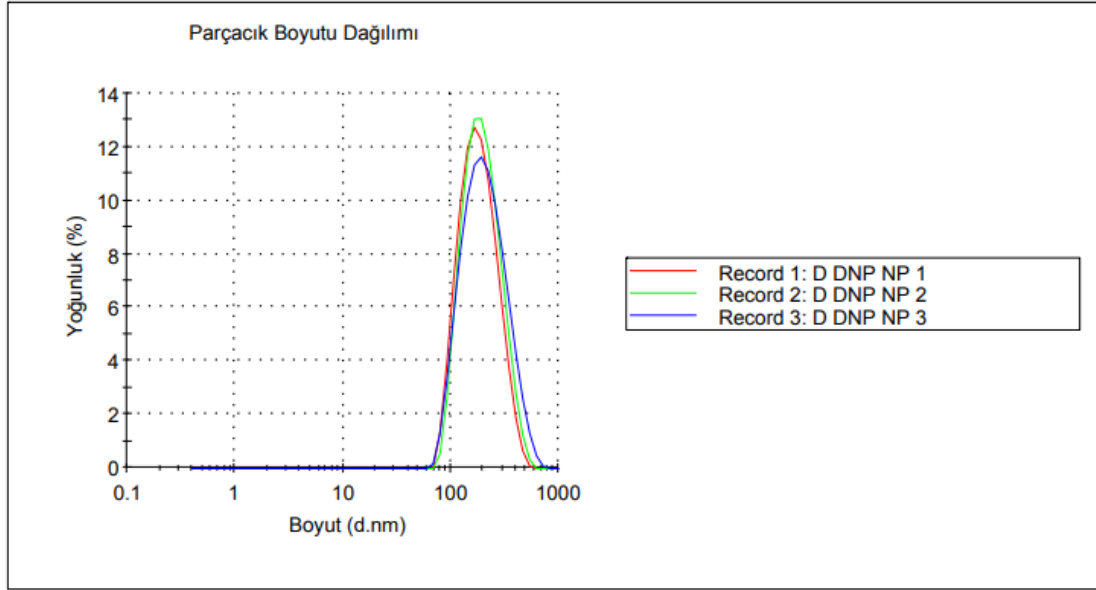
Şekil 5.17. C-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



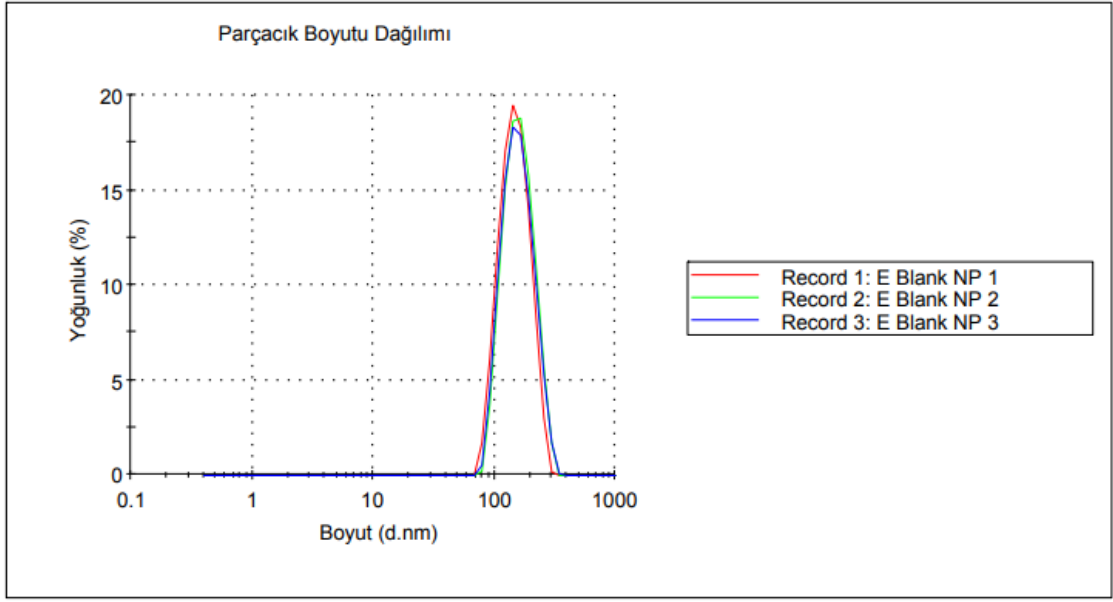
Şekil 5.18. C-DNP için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



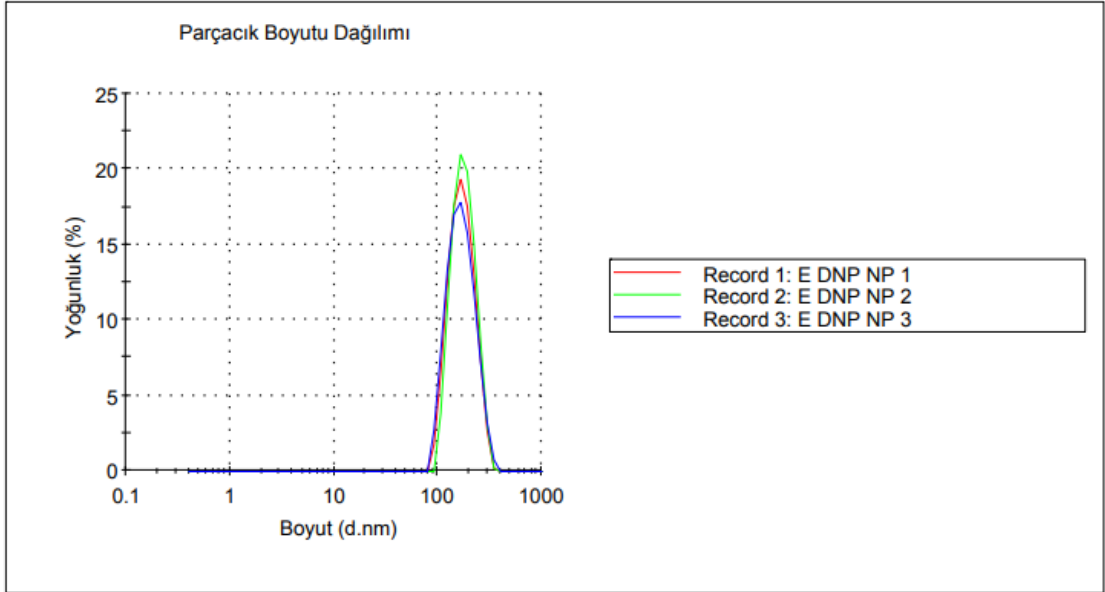
Şekil 5.19. D-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



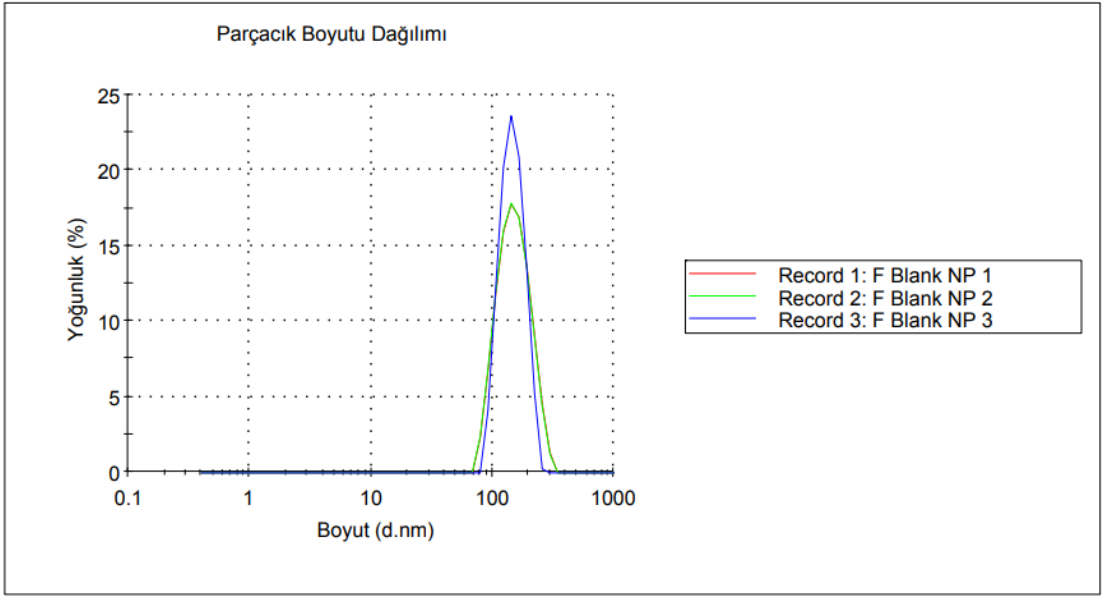
Şekil 5.20. D-DNP için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



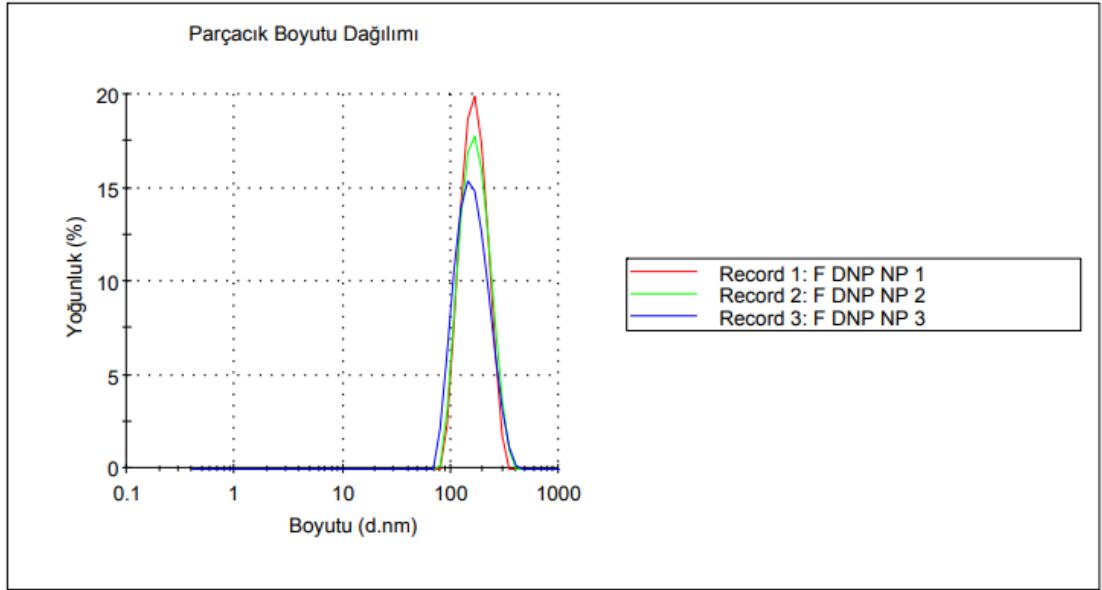
Şekil 5.21. E-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



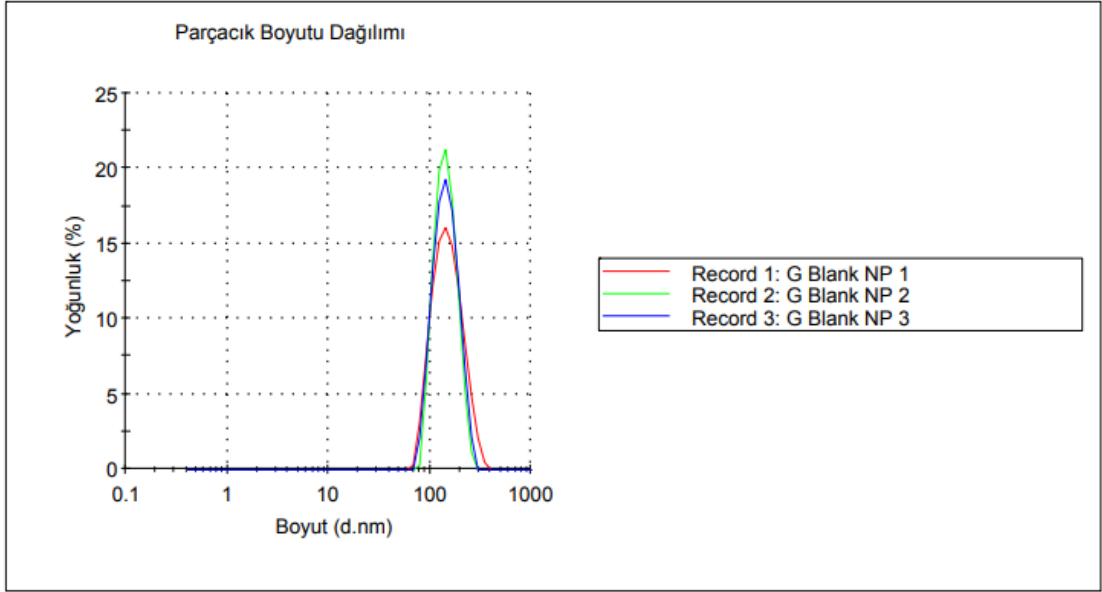
Şekil 5.22. E-DNP için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



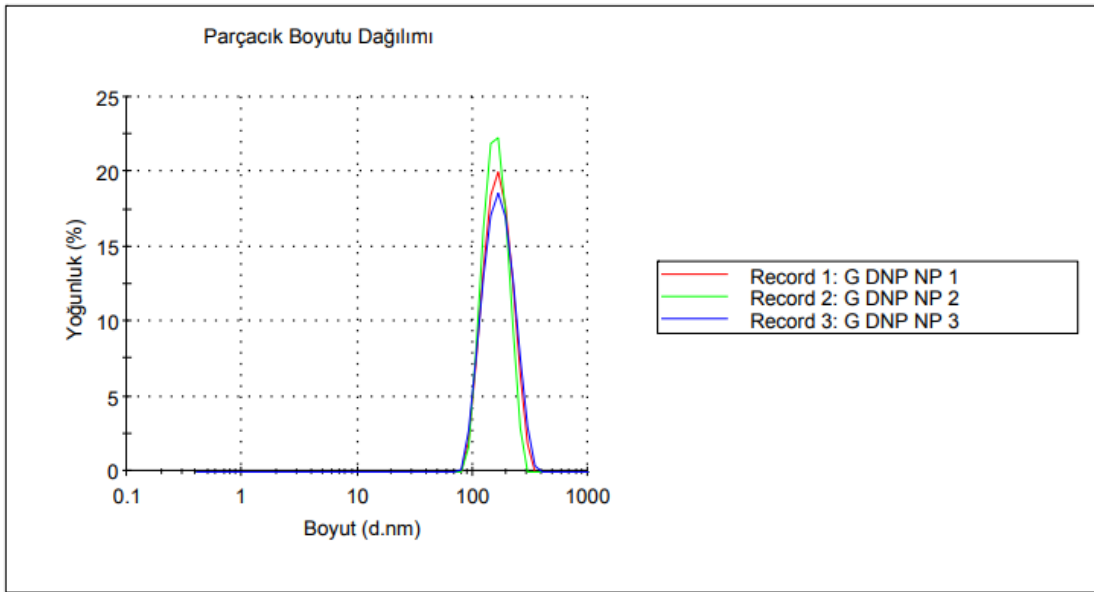
Şekil 5.23. F-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



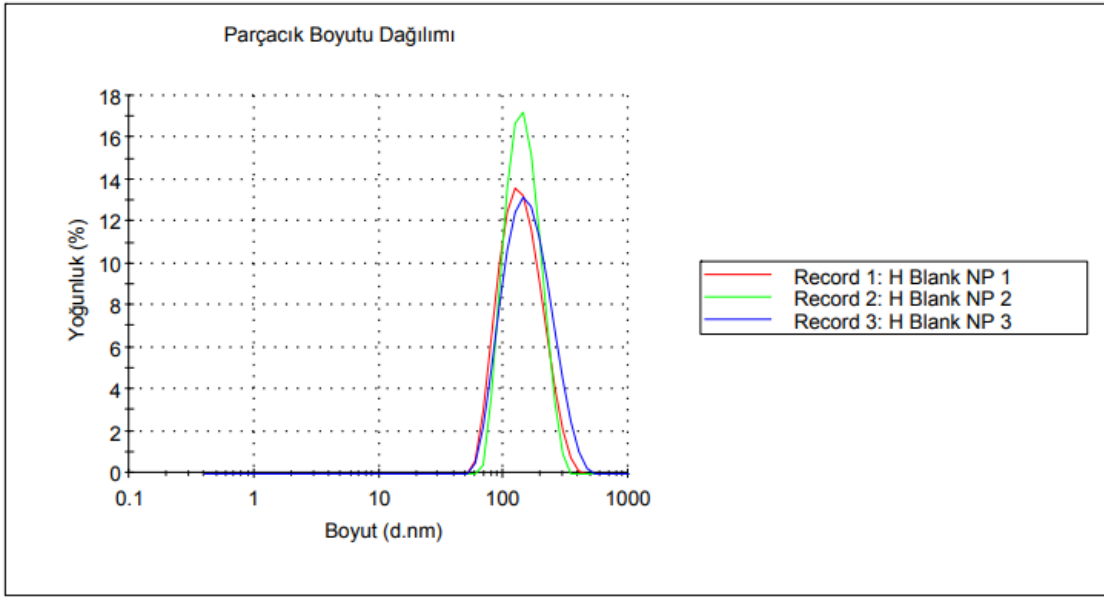
Şekil 5.24. F-DNP için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



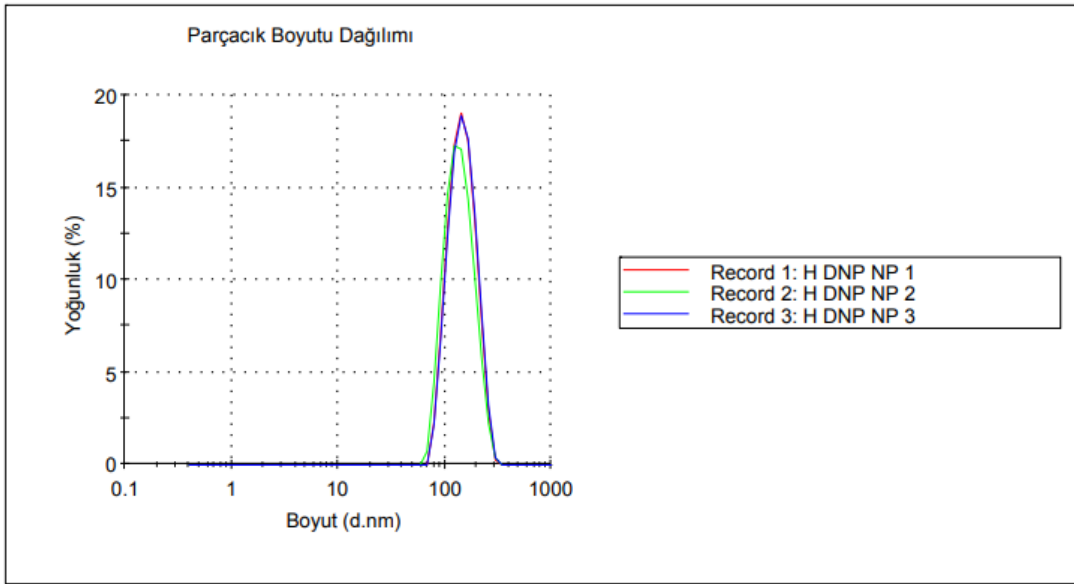
Şekil 5.25. G-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



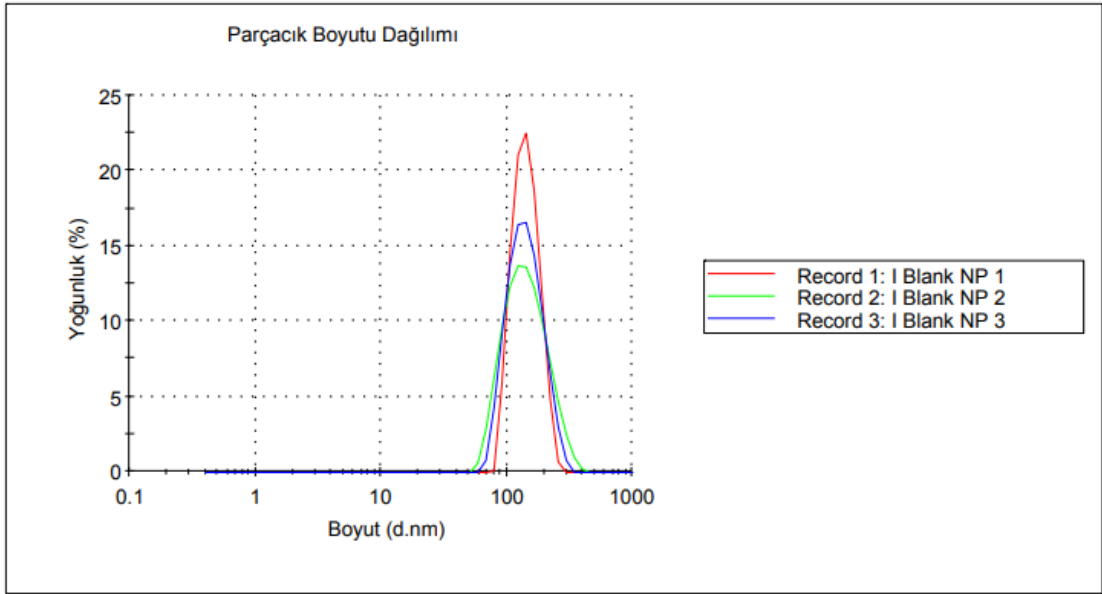
Şekil 5.26. G-DNP için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



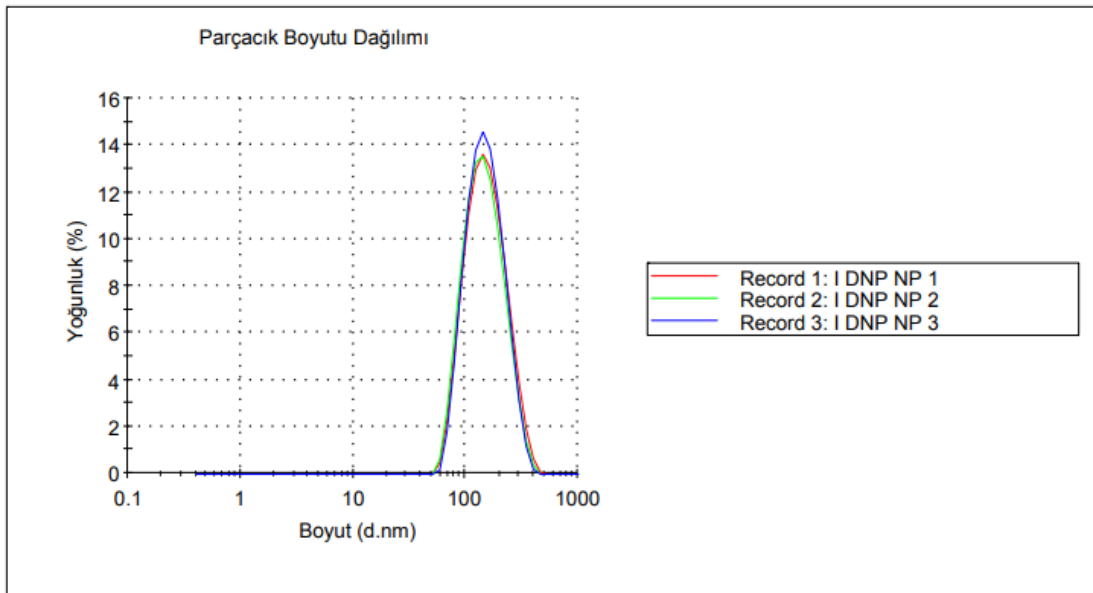
Şekil 5.27. H-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



Şekil 5.28. H-DNP için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



Şekil 5.29. I-Blank için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu



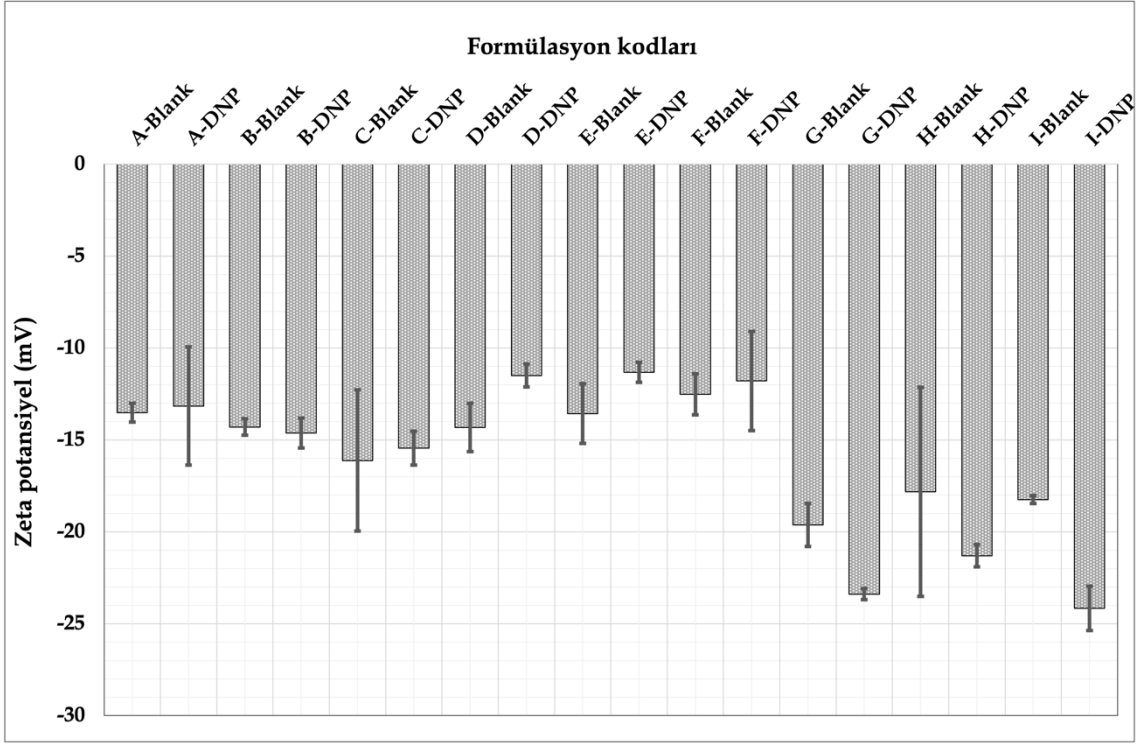
Şekil 5.30. I-DNP için Zetasizer Nano ZS parçacık boyut dağılım raporu

5.2.2. Zeta potansiyel

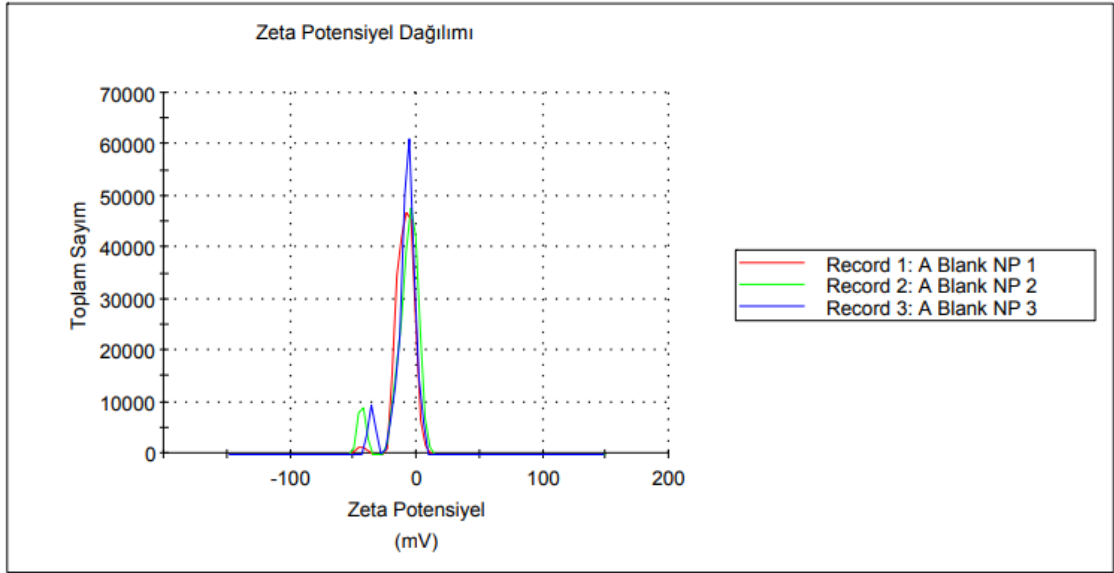
Hazırlanan tüm blank ve DNP yüklü nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyel analiz sonuçları Tablo 5.12.'de sunulmuştur. Elde edilen değerlerin daha net anlaşılabilmesi ve karşılaştırma yapılabilmesi için zeta potansiyel değerleri grafik olarak Şekil 5.31.'de gösterilmiştir. Zetasizer Nano ZS cihazından alınan zeta potansiyel değerlerinin gösterildiği raporlar ise A-Blank, A-DNP, B-Blank, B-DNP, C-Blank, C-DNP, D-Blank, D-DNP, E-Blank, E-DNP, F-Blank, F-DNP, G-Blank, G-DNP, H-Blank, H-DNP, I-Blank ve I-DNP kodlu formülasyonlar için sırasıyla Şekil 5.32., Şekil 5.33., Şekil 5.34., Şekil 5.35., Şekil 5.36., Şekil 5.37., Şekil 5.38., Şekil 5.39., Şekil 5.40., Şekil 5.41., Şekil 5.42., Şekil 5.43., Şekil 5.44., Şekil 5.45., Şekil 5.46., Şekil 5.47., Şekil 5.48. ve Şekil 5.49.'da sunulmuştur.

Tablo 5.12. Zeta potansiyel sonuçları

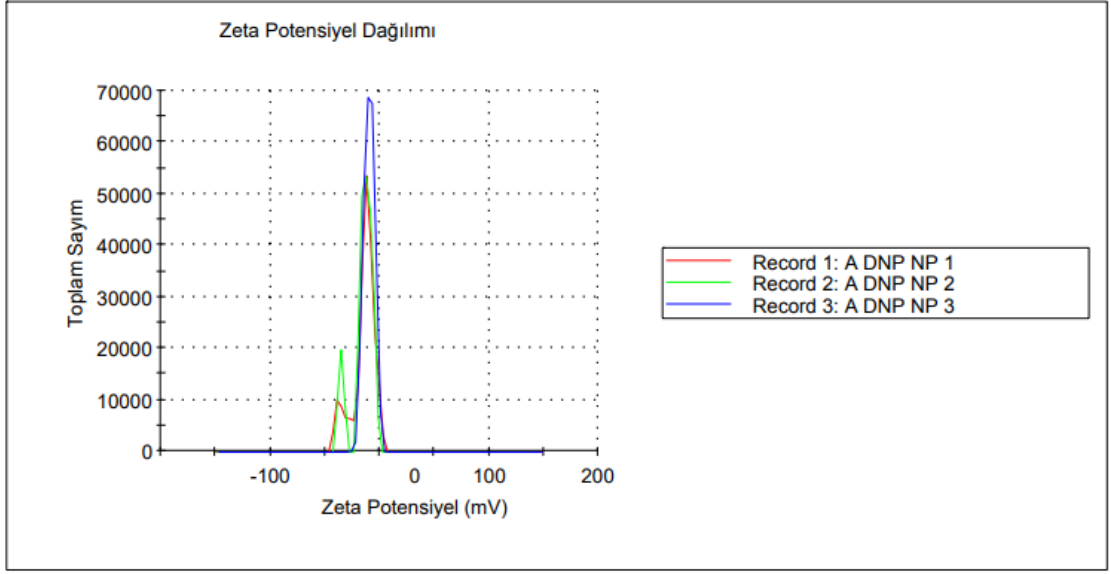
Kod	Zeta potansiyel, mV (ortalama±standart sapma)
A-Blank	-13.53 ± 0.51
A-DNP	-13.16 ± 3.21
B-Blank	-14.30 ± 0.44
B-DNP	-14.63 ± 0.81
C-Blank	-16.13 ± 3.84
C-DNP	-15.46 ± 0.92
D-Blank	-14.33 ± 1.32
D-DNP	-11.50 ± 0.62
E-Blank	-13.57 ± 1.63
E-DNP	-11.33 ± 0.55
F-Blank	-12.53 ± 1.12
F-DNP	-11.80 ± 2.69
G-Blank	-19.63 ± 1.17
G-DNP	-23.39 ± 0.30
H-Blank	-17.83 ± 5.69
H-DNP	-21.30 ± 0.61
I-Blank	-18.25 ± 0.21
I-DNP	-24.17 ± 1.21



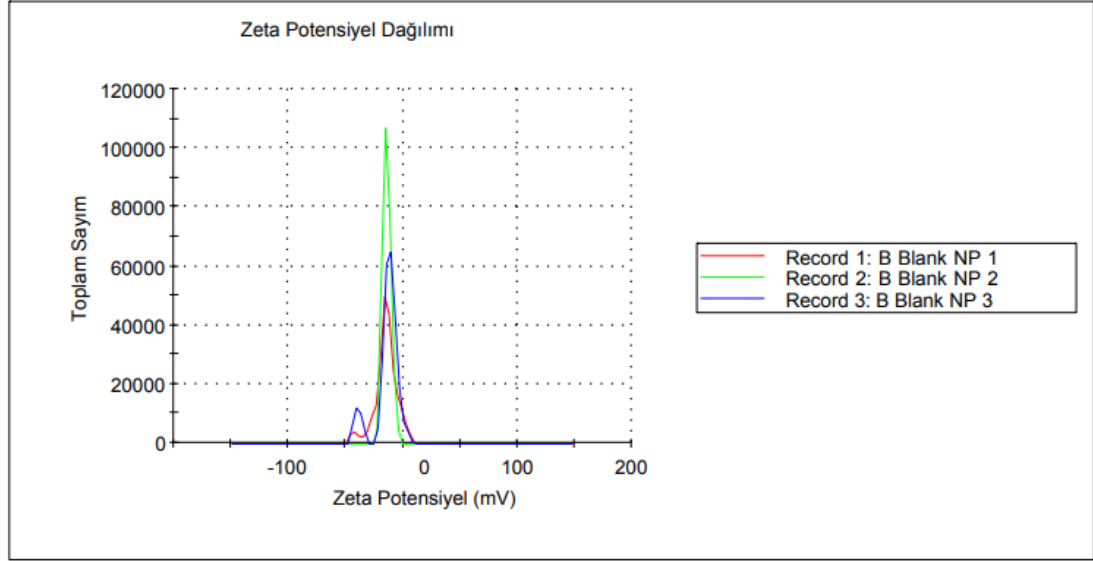
Şekil 5.31. Formülasyonların zeta potansiyel değerleri grafiği



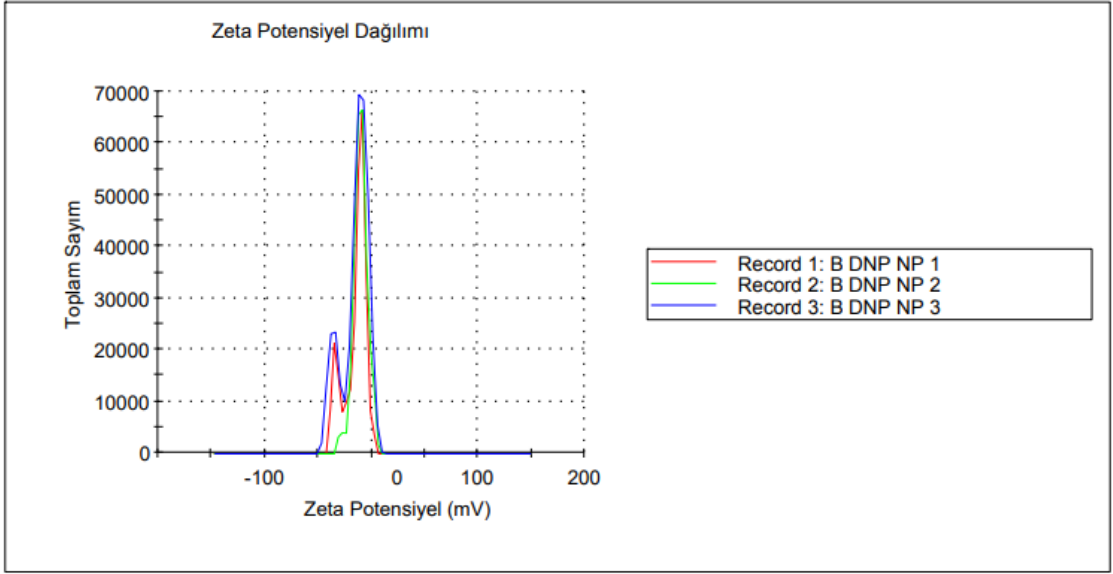
Şekil 5.32. A-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



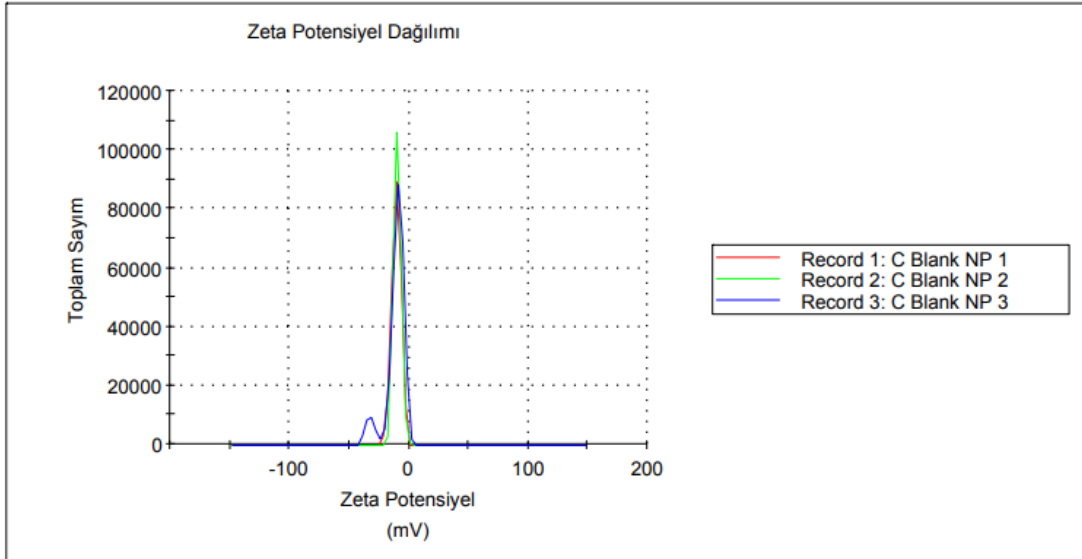
Şekil 5.33. A-DNP için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



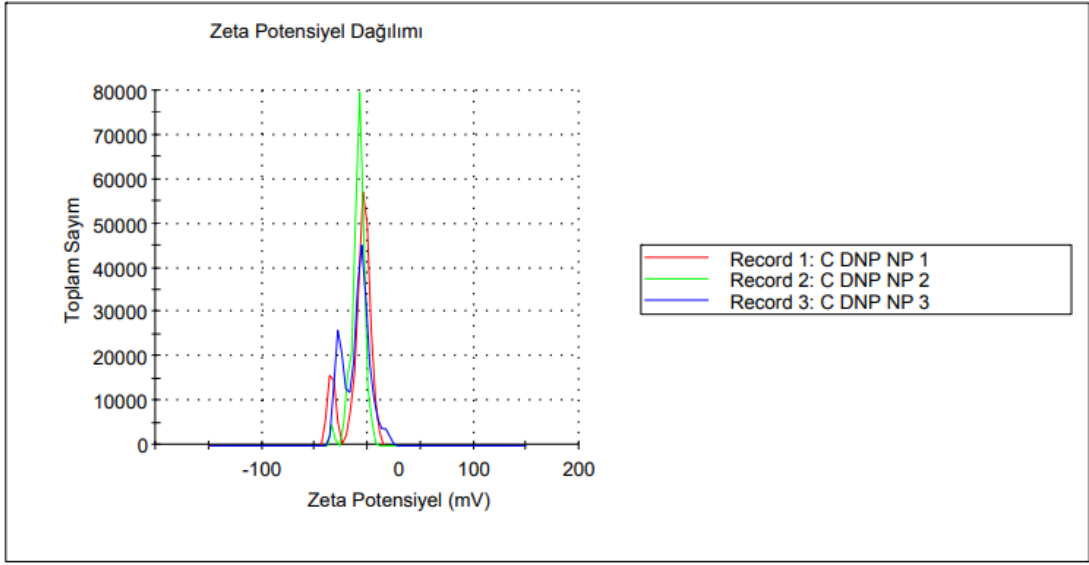
Şekil 5.34. B-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



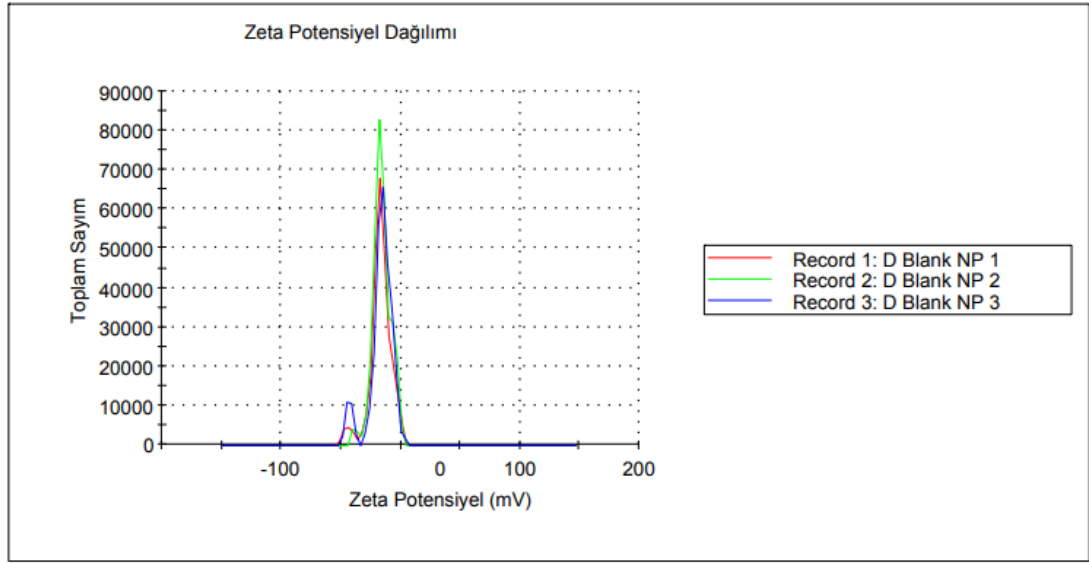
Şekil 5.35. B-DNP için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



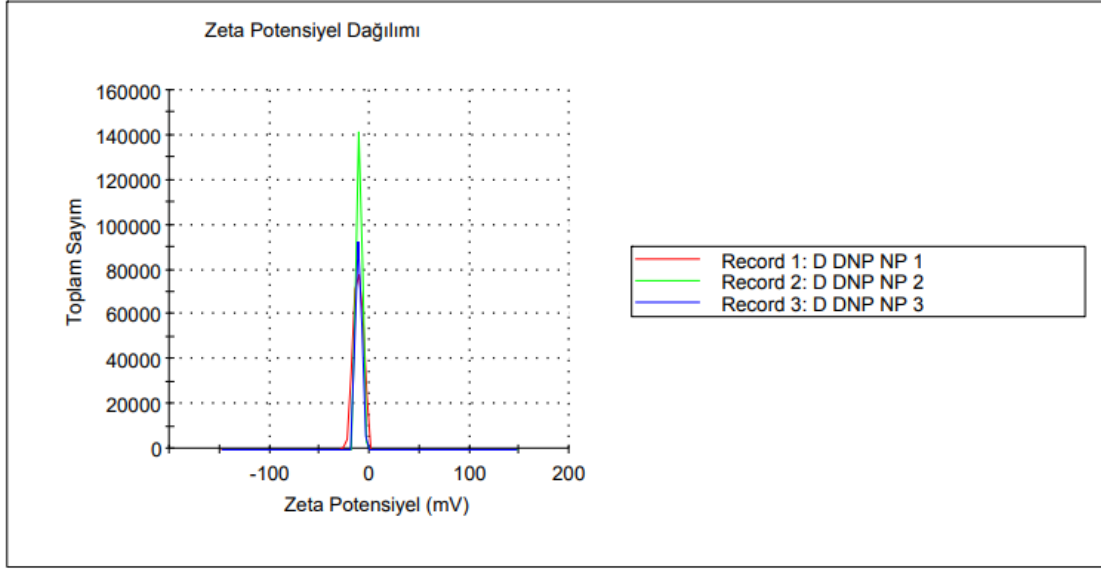
Şekil 5.36. C-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



Şekil 5.37. C-DNP için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



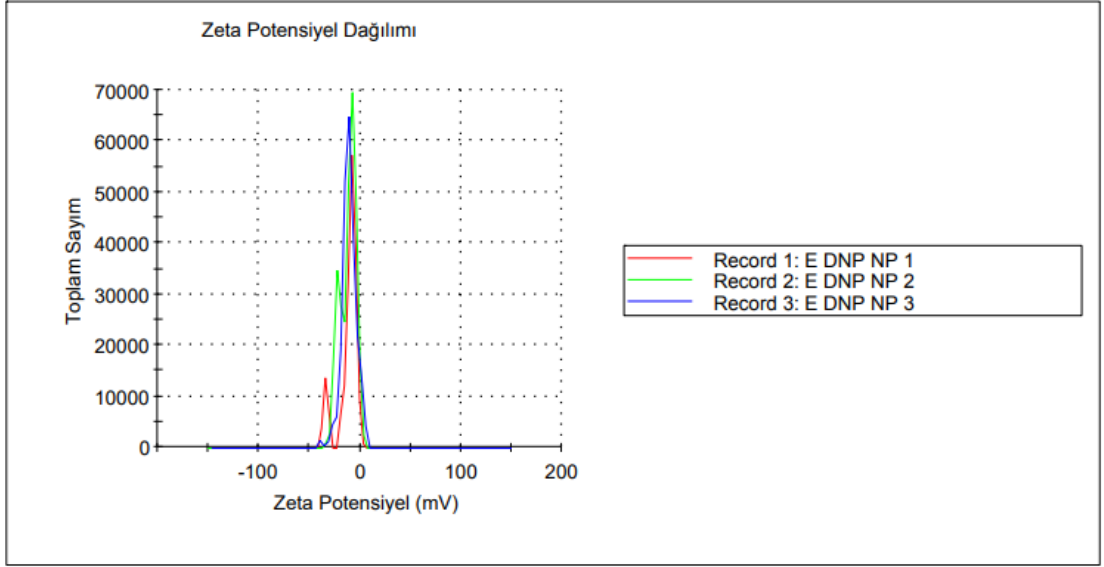
Şekil 5.38. D-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



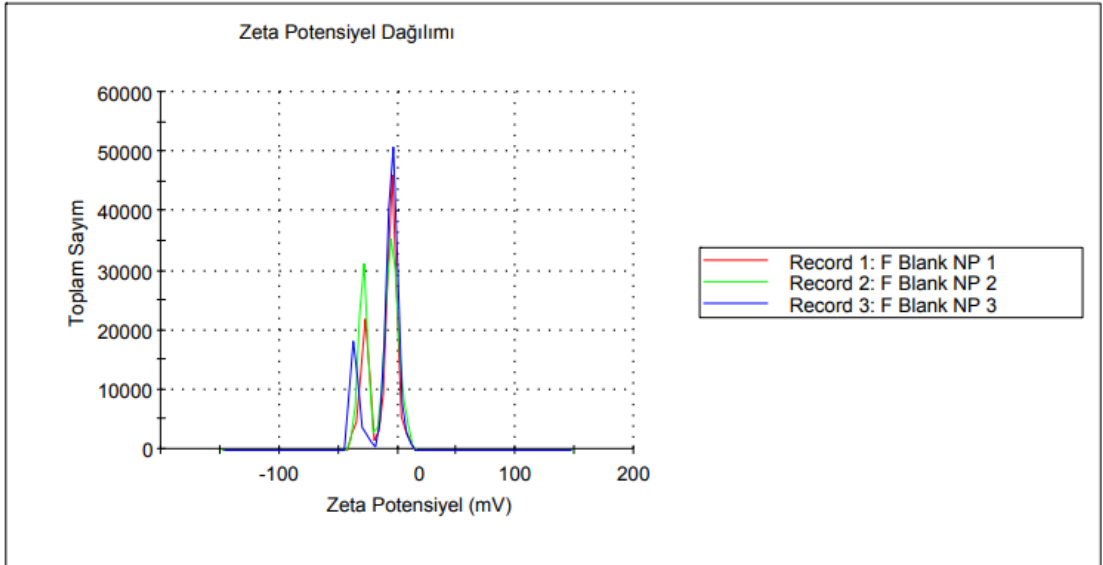
Şekil 5.39. D-DNP için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



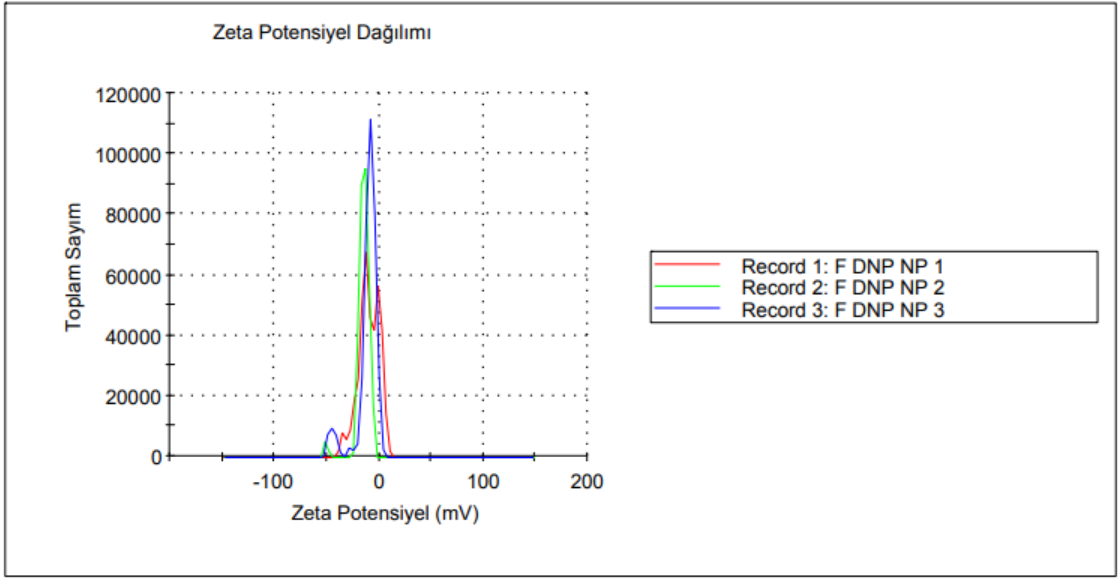
Şekil 5.40. E-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



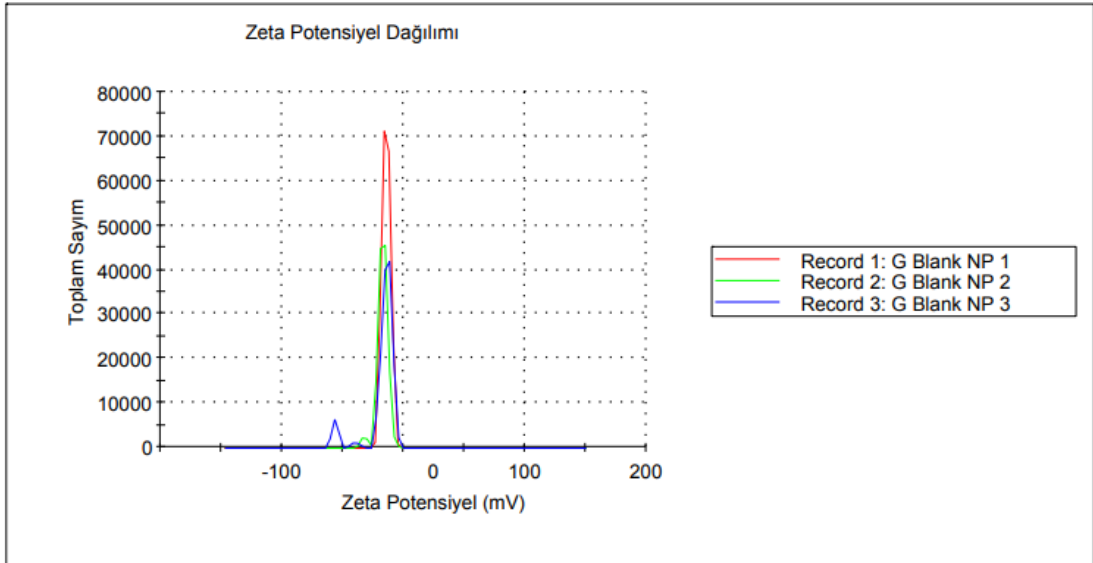
Şekil 5.41. E-DNP için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



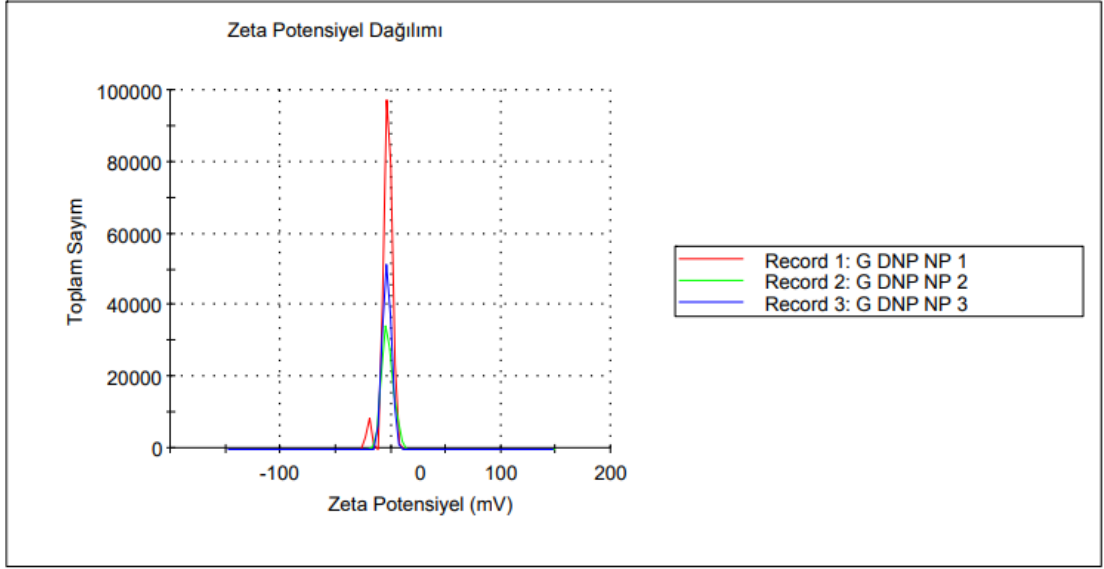
Şekil 5.42. F-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



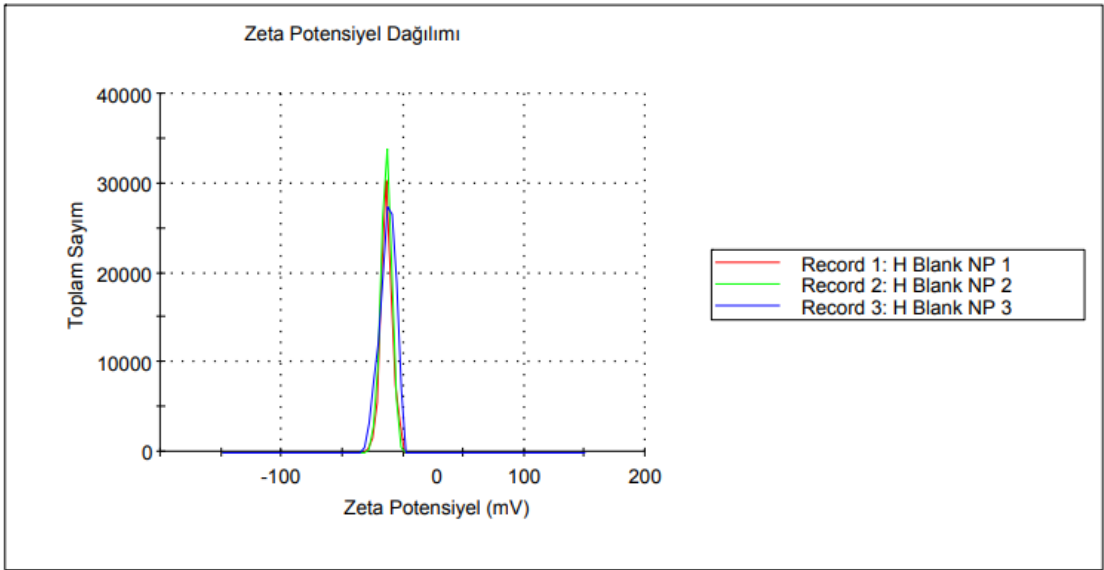
Şekil 5.43. *F-DNP için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu*



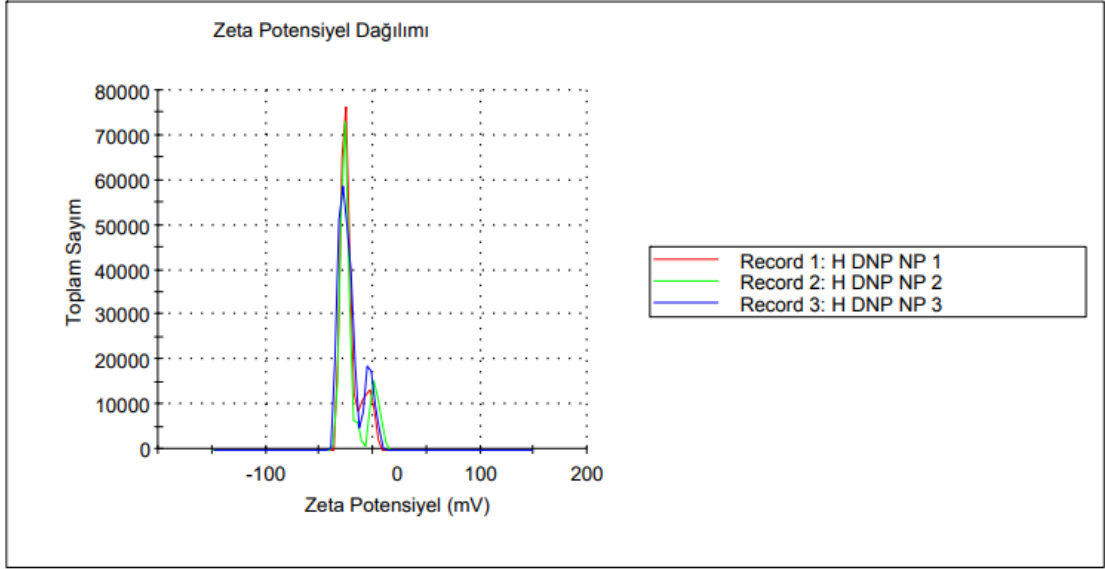
Şekil 5.44. *G-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu*



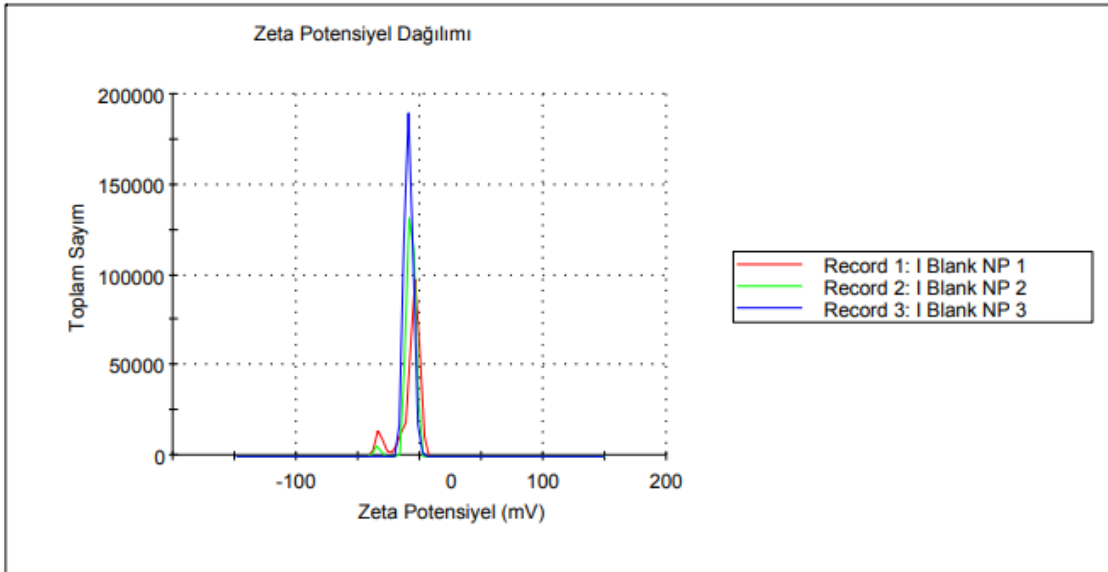
Şekil 5.45. G-DNP için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



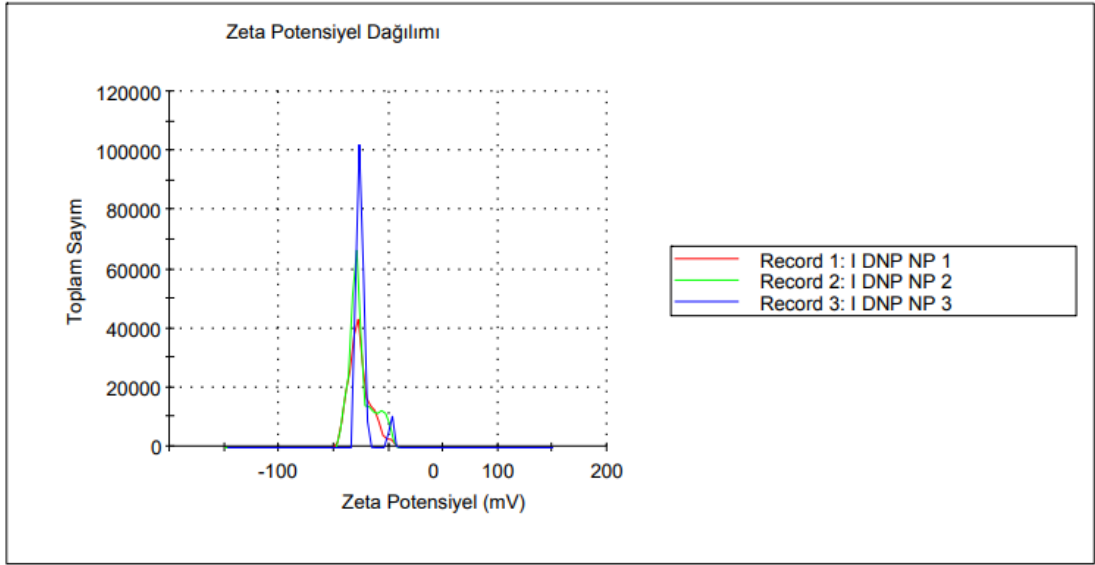
Şekil 5.46. H-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



Şekil 5.47. H-DNP için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



Şekil 5.48. I-Blank için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu



Şekil 5.49. I-DNP için Zetasizer Nano ZS zeta potansiyel raporu

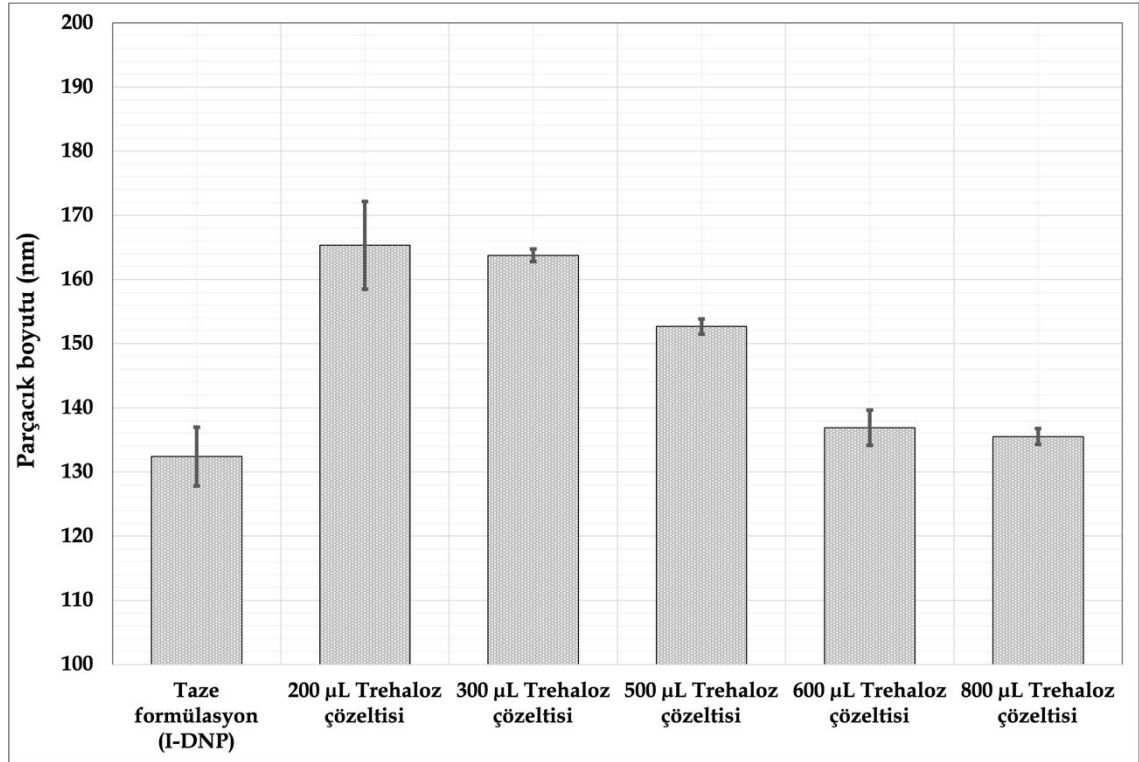
5.3. Kriyoprotektan Etki ve Saklama Koşullarının Belirlenmesi

5.3.1. Parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı

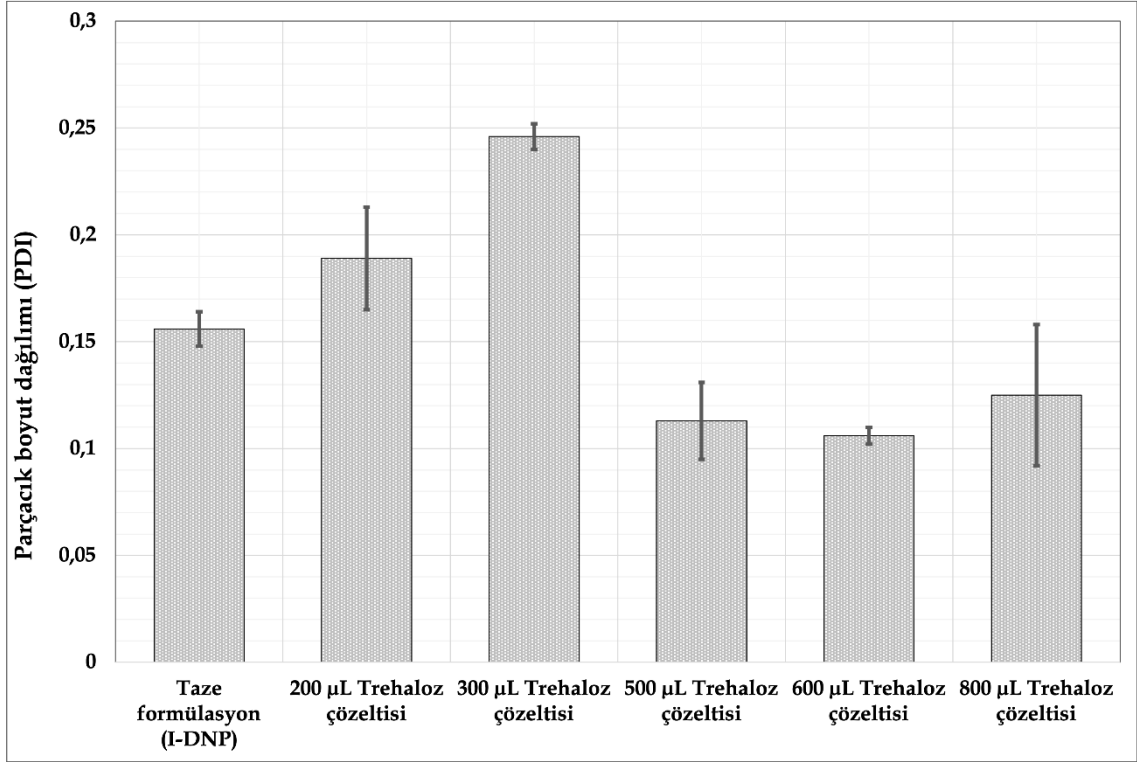
I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonu için gerçekleştirilen kriyoprotektan (trehaloz) etkinin belirleme çalışmalarından elde edilen parçacık boyutu (nm) ve parçacık boyutu dağılımı (PDI) sonuçları Tablo 5.13.'te verilmiştir. Elde edilen sonuçların daha net anlaşılabilmesi için Şekil 5.50. ve Şekil 5.51.'de sırasıyla parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı (PDI) verileri grafik olarak sunulmuştur.

Tablo 5.13. Farklı trehaloz konsantrasyonlarının parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı (PDI) üzerindeki etkisi

	Parçacık Boyutu, nm (ortalama \pm standart sapma)	Parçacık Boyutu Dağılımı, PDI (ortalama \pm standart sapma)
Taze formülasyon	132.40 \pm 4.59	0.156 \pm 0.008
200 μ L Trehaloz çözeltisi	165.33 \pm 6.83	0.189 \pm 0.024
300 μ L Trehaloz çözeltisi	163.77 \pm 0.97	0.246 \pm 0.006
500 μ L Trehaloz çözeltisi	152.67 \pm 1.16	0.113 \pm 0.018
600 μ L Trehaloz çözeltisi	136.90 \pm 2.74	0.106 \pm 0.004
800 μ L Trehaloz çözeltisi	135.53 \pm 1.25	0.125 \pm 0.033



Şekil 5.50. Farklı trehaloz konsantrasyonlarının parçacık boyut üzerine etki grafiği



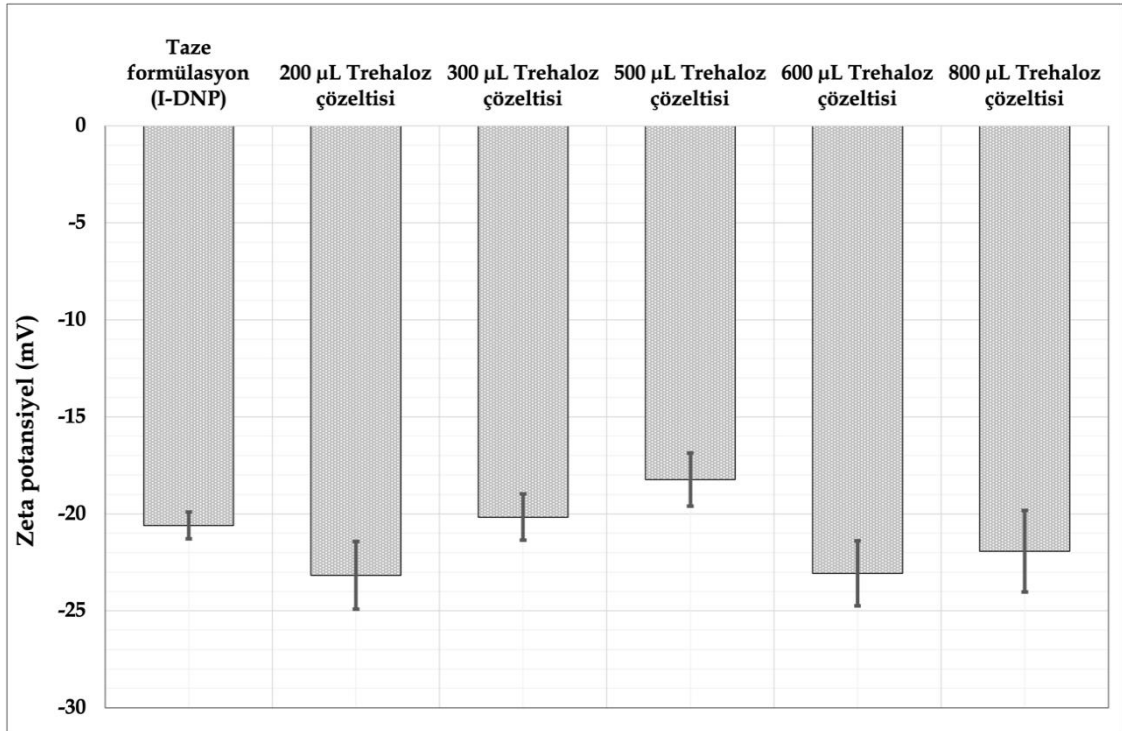
Şekil 5.51. Farklı trehaloz konsantrasyonlarının parçacık boyut dağılım (PDI) üzerine etki grafiği

5.3.2. Zeta potansiyel

Hazırlanan I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonu için gerçekleştirilen kriyoprotektan (trehaloz) etkinin belirleme çalışmalarından elde edilen zeta potansiyel sonuçları Tablo 5.14.'te sunulmuştur. Elde edilen değerlerin karşılaştırma yapılabilmesi ve daha net anlaşılabilmesi için Şekil 5.52.'de zeta potansiyel değerleri grafik olarak gösterilmiştir.

Tablo 5.14. Farklı trehaloz konsantrasyonlarının zeta potansiyel üzerindeki etkisi

Zeta Potansiyel (mV, ortalama \pm standart sapma)	
Taze formülasyon	-20.60 \pm 0.69
200 μ L Trehaloz çözeltisi	-23.17 \pm 1.75
300 μ L Trehaloz çözeltisi	-20.17 \pm 1.19
500 μ L Trehaloz çözeltisi	-18.23 \pm 1.37
600 μ L Trehaloz çözeltisi	-23.07 \pm 1.67
800 μ L Trehaloz çözeltisi	-21.93 \pm 2.10



Şekil 5.52. Farklı trehaloz konsantrasyonlarının zeta potansiyel üzerindeki etki grafiği

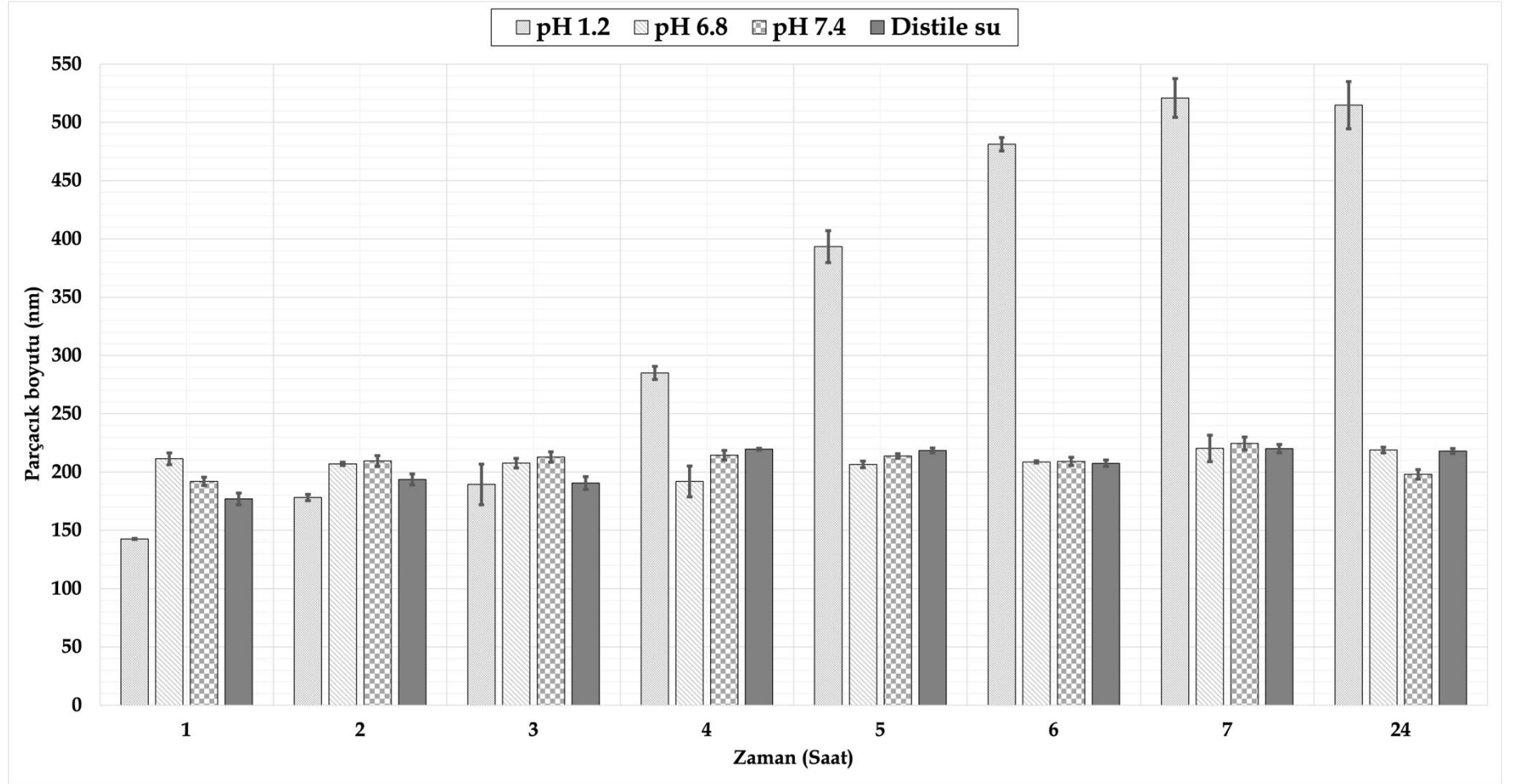
5.4. Gastrointestinal Stabilité Değerlendirme

I-DNP kodlu PLGA nanopartikül formülasyonunun gastrointestinal sıvıları taklit eden pH 1.2 HCl tamponu, pH 6.8 fosfat tamponu, pH 7.4 fosfat tamponu ve distile su içinde

24 saat boyunca gerçekleştirilen kısa süreli kararlılığının incelendiği araştırmanın sonuçları Tablo 5.15.'te sunulmuştur.

Tablo 5.15. *I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonu için gastrointestinal stabilite sonuçları*

Saat	Parçacık Boyutu (nm, ortalama \pm standart sapma)			
	pH 1.2	pH 6.8	pH 7.4	Distile su
1	142.6 \pm 0.4	211.4 \pm 5.0	192.0 \pm 3.5	177.0 \pm 5.0
2	178.1 \pm 2.7	207.0 \pm 1.4	209.5 \pm 4.7	193.7 \pm 4.7
3	189.4 \pm 17.5	207.7 \pm 4.2	212.9 \pm 4.4	190.5 \pm 5.5
4	285.1 \pm 5.6	192.0 \pm 13.2	214.5 \pm 4.1	219.6 \pm 0.8
5	393.4 \pm 13.7	206.6 \pm 2.8	213.7 \pm 2.0	218.5 \pm 2.1
6	481.2 \pm 5.8	208.7 \pm 0.9	209.2 \pm 3.5	207.6 \pm 2.7
7	521.0 \pm 16.6	220.3 \pm 11.4	224.5 \pm 5.4	220.0 \pm 3.7
24	514.8 \pm 20.3	218.9 \pm 2.5	198.1 \pm 4.1	218.1 \pm 2.2



Şekil 5.53. I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonun gastrointestinal stabilite sonuç grafiği

5.5. Enkapsülasyon Etkinliği

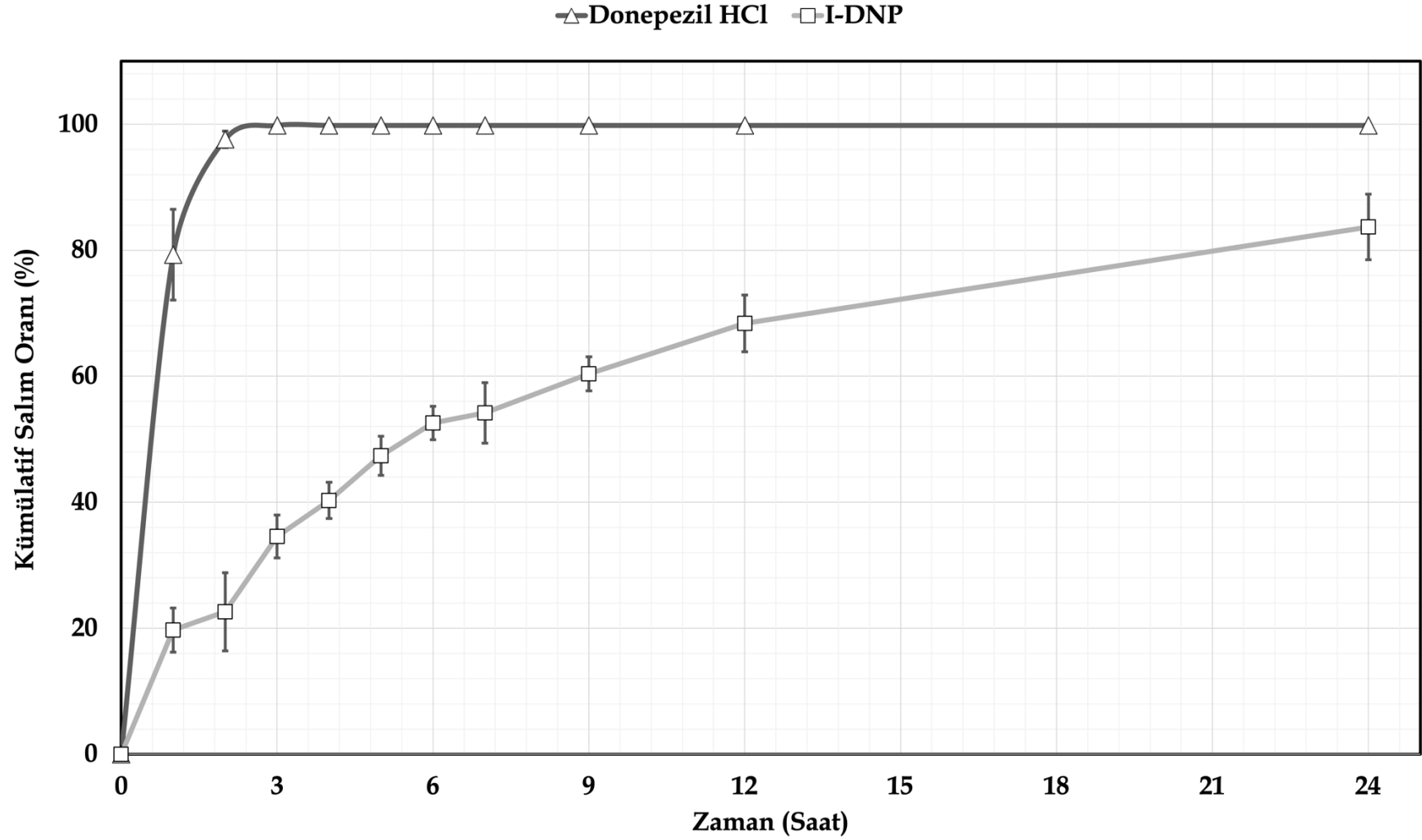
Bölüm '4.3.4. Enkapsülasyon etkinliği' çalışmasında belirtilen Denklem 4.3. ile hesaplanan enkapsülasyon etkinliği sonucu 69.22 ± 4.84 (Ortalama \pm standart sapma) olarak elde edilmiştir (n=3).

5.6. In Vitro Dissolüsyon

DNP ve DNP yüklü I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonu için zamana karşı kümülatif çözünen DNP miktarı değerleri 'ortalama \pm standart sapma' olarak Tablo 5.16.'da sunulmuştur. Analizler sonrası elde edilen tüm dissolüsyon verileri kullanılarak DNP ve I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonu için 24 saatlik *in vitro* dissolüsyon profilleri Şekil 5.54'te sunulmuştur.

Tablo 5.16. Donepezil HCl ve I-DNP kodlu formülasyon için % kümülatif salım/dissolüsyon verileri

Süre (Saat)	Donepezil HCl	I-DNP
1	79.3 \pm 6.8	19.7 \pm 3.5
2	97.6 \pm 2.3	22.6 \pm 6.2
3	99.8 \pm 0.1	34.6 \pm 3.4
4	99.8 \pm 0.1	40.3 \pm 2.9
5	99.8 \pm 0.1	47.4 \pm 3.1
6	99.8 \pm 0.1	52.6 \pm 2.6
7	99.8 \pm 0.1	54.2 \pm 4.8
9	99.8 \pm 0.1	60.4 \pm 2.7
12	99.8 \pm 0.1	68.4 \pm 4.5
24	99.8 \pm 0.1	83.7 \pm 5.2



Şekil 5.54. Donepezil HCl ve I-DNP kodlu formülasyon için kümülatif salım grafiği

5.7. Salım Kinetiği

Sıfırıncı-derece, Sıfırıncı-derece (T_{lag}), Sıfırıncı derece (F_0), Birinci-derece, Birinci-derece (T_{lag}), Birinci-derece (F_{max}), Birinci-derece (T_{lag} ve F_{max}), Higuchi, Higuchi (T_{lag}), Higuchi (F_0), Korsmeyer-Peppas, Korsmeyer-Peppas (T_{lag}), Korsmeyer-Peppas (F_0), Hixson-Crowell, Hixson-Crowell (T_{lag}), Hopfenberg, Hopfenberg (T_{lag}), Baker-Lonsdale, Baker-Lonsdale (T_{lag}), Peppas-Sahlin, Peppas-Sahlin 1 (T_{lag}), Peppas-Sahlin 2, Peppas-Sahlin 2 (T_{lag}), Quadratic, Quadratic (T_{lag}), Weibull 1, Weibull 2, Weibull 3 ve Weibull 4 modelleri için 24 saatlik R^2 , $R^2_{adjusted}$, MSC ve AIC değerleri, ilgili modellerin denklemleri ile beraber Tablo 5.17.'de sunulmuştur.

DDSolver programından otomatik olarak alınan Sıfırıncı-derece, Sıfırıncı-derece (T_{lag}), Sıfırıncı derece (F_0), Birinci-derece, Birinci-derece (T_{lag}), Birinci-derece (F_{max}), Birinci-derece (T_{lag} ve F_{max}), Higuchi, Higuchi (T_{lag}), Higuchi (F_0), Korsmeyer-Peppas, Korsmeyer-Peppas (T_{lag}), Korsmeyer-Peppas (F_0), Hixson-Crowell, Hixson-Crowell (T_{lag}), Hopfenberg, Hopfenberg (T_{lag}), Baker-Lonsdale, Baker-Lonsdale (T_{lag}), Peppas-Sahlin, Peppas-Sahlin 1 (T_{lag}), Peppas-Sahlin 2, Peppas-Sahlin 2 (T_{lag}), Quadratic, Quadratic (T_{lag}), Weibull 1, Weibull 2, Weibull 3 ve Weibull 4 modelleri için salım kinetik grafikleri sırasıyla Şekil 5.55.- Şekil 5.81.'de sunulmuştur.

Tablo 5.17. I-DNP kodlu formülasyon için 24 saatlik salım kinetiği sonuçları

Model Kodu	Model ^a	R^2	$R^2_{adjusted}$	MSC	AIC
#301 ^b	Sıfırıncı-derece $F=k_0 * t$	-0.163	-0.163	-0.351	85.363
#302 ^{b, c}	Sıfırıncı-derece (T_{lag}) $F=k_0 * (t-T_{lag})$	0.830	0.809	1.374	68.112
#303 ^{b, d}	Sıfırıncı derece (F_0) $F=F_0+k_0 * t$	0.830	0.809	1.374	68.112

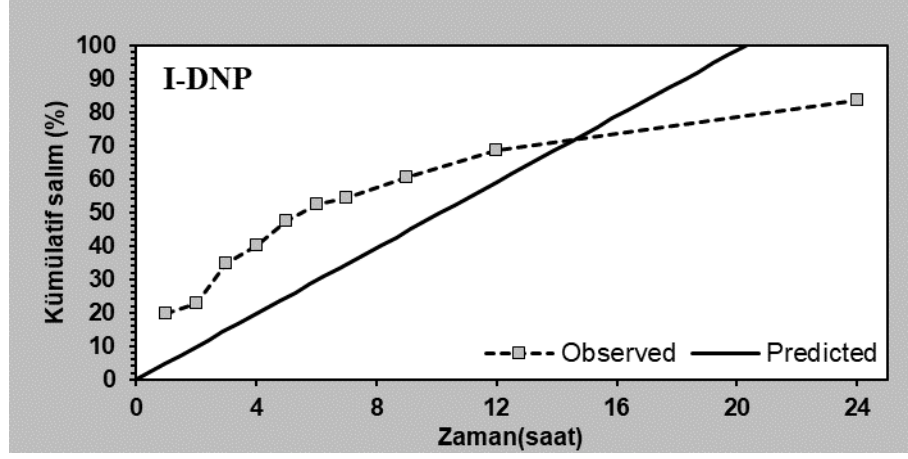
#304 ^e	Birinci-derece	0.873	0.873	1.863	63.227
	$F=100 * [1-Exp(-k_1 * t)]$				
#305 ^{c. e}	Birinci-derece (T_{lag})	0.949	0.943	2.583	56.026
	$F=100 * \{1-Exp[-k_1 * (t-T_{lag})]\}$				
#306 ^{e. f}	Birinci-derece (F_{max})	0.954	0.948	2.672	55.131
	$F=F_{max} * [1-Exp(-k_1 * t)]$				
#307 ^{c. e. f}	Birinci-derece (T_{lag} ve F_{max})	0.991	0.989	4.117	40.683
	$F=F_{max} * \{1-Exp[-k_1 * (t-T_{lag})]\}$				
#308 ^g	Higuchi	0.942	0.942	2.650	55.355
	$F=k_H * t^{0.5}$				
#309 ^{c. g}	Higuchi (T_{lag})	0.914	0.903	2.048	61.376
	$F=k_H * (t-T_{lag})^{0.5}$				
#310 ^{d. g}	Higuchi (F₀)	0.954	0.948	2.671	55.147
	$F=F_0+k_H * t^{0.5}$				
#311 ^h	Korsmeyer-Peppas	0.939	0.932	2.401	57.847
	$F=k_{KP} * t^n$				
#312 ^{c. h}	Korsmeyer-Peppas (T_{lag})	0.966	0.956	2.772	54.137
	$F=k_{KP} * (t-T_{lag})^n$				
#313 ^{d. h}	Korsmeyer-Peppas (F₀)	0.875	0.840	1.482	67.030
	$F=F_0+k_{KP} * t^n$				
#314 ⁱ	Hixson-Crowell	0.820	0.820	1.513	66.725
	$F=100 * [1-(1-k_{HC} * t)^3]$				
#315 ^{c. i}	Hixson-Crowell (T_{lag})	0.916	0.905	2.076	61.089

		$F=100 * \{1-[1-k_{HC} * (t-T_{lag})]^3\}$				
#316ⁱ	Hopfenberg		0.861	0.843	1.571	66.139
		$F=100 * [1-(1-k_{HB} * t)^n]$				
#317^{c.j}	Hopfenberg (T_{lag})		0.916	0.892	1.876	63.089
		$F=100 * \{1-[1-k_{HB} * (t-T_{lag})]^n\}$				
#318^k	Baker-Lonsdale		0.973	0.973	3.404	47.811
		$3/2 * [1-(1-F/100)^{(2/3)}]-F/100=k_{BL} * t$				
#319^{c.k}	Baker-Lonsdale (T_{lag})		0.976	0.973	3.314	48.709
		$3/2 * [1-(1-F/100)^{(2/3)}]-F/100=k_{BL} * (t-T_{lag})$				
#322^m	Peppas-Sahlin 1		0.967	0.957	2.797	53.882
		$F=k_1 * t^m+k^2 * t^{(2*m)}$				
#323^{c.m}	Peppas-Sahlin 1 (T_{lag})		0.979	0.968	3.049	51.365
		$F=k_1 * (t-T_{lag})^m+k_2 * (t-T_{lag})^{(2*m)}$				
#324ⁿ	Peppas-Sahlin 2		0.974	0.971	3.258	49.268
		$F=k_1 * t^{0.5}+k_2 * t$				
#325^{c.n}	Peppas-Sahlin 2 (T_{lag})		0.984	0.980	3.541	46.439
		$F=k_1 * (t-T_{lag})^{0.5}+k_2 * (t-T_{lag})$				
#328^{p.q}	Weibull 1		0.986	0.982	3.664	45.211
		$F=100 * \{1-Exp[-((t-T_i)^\beta)/\alpha]\}$				
#329^p	Weibull 2		0.990	0.989	4.202	39.832
		$F=100 * \{1-Exp[-(t^\beta)/\alpha]\}$				
#330^{f.p}	Weibull 3		0.989	0.986	3.932	42.533
		$F=F_{max} * \{1-Exp[-(t^\beta)/\alpha]\}$				

Weibull 4				
#33 ^{f, p, q}	0.980	0.971	3.135	50.508
$F = F_{max} * \{1 - \text{Exp}[-((t - T_i)^\beta) / \alpha]\}$				

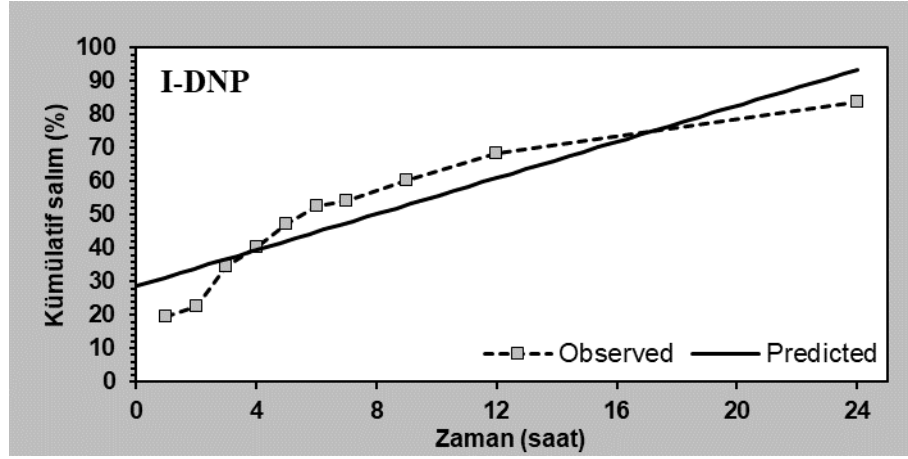
[**Tablo 5.17.** (Devam) *I-DNP kodlu formülasyon için 24 saatlik salım kinetiği sonuçları*]

Açıklamalar: **Rsqr** korelasyon katsayısı (r^2); **Rsqr_adj** düzeltilmiş korelasyon katsayısı ($r^2_{adjusted}$); **AIC** Akaike bilgi kriteri; **MSC** Model seçme kriteri; ^a Tüm modellerde **F**. **t** zamanında salınan ilacın fraksiyonudur (%); ^b **k₀** sıfır dereceli serbest bırakma sabitidir; ^c **T_{lag}** ilaç salımından önceki gecikme süresidir; ^d **F₀** bir patlama salımından kaynaklanan çözeltideki ilacın başlangıç fraksiyonudur; ^e **k₁** birinci dereceden serbest bırakma sabitidir; ^f **F_{max}** sonsuz zamanda salınan ilacın maksimum fraksiyonudur; ^g **k_H** Higuchi salım sabitidir; ^h **k_{KP}** ilaç dozaj formunun yapısal ve geometrik özelliklerini içeren salım sabitidir; **n** ilaç salım mekanizmasını gösteren difüzyon üssüdür; ⁱ **k_{HC}** Hixson–Crowell modelindeki salım sabitidir; ^j **k_{HB}** Hopfenberg modelindeki birleşik sabittir. **k_{HB} = k₀ / (C₀ × a₀)**. burada **k₀** erozyon oranı sabitidir. **C₀** matristeki ilk ilaç konsantrasyonudur ve **a₀** bir küre veya silindir için başlangıç yarıçapıdır veya bir levhanın yarı kalınlığı. **n** bir levha, silindir ve küre için sırasıyla 1, 2 ve 3'tür; ^k **k_{BL}**. Baker-Lonsdale modelindeki birleşik sabittir. **k_{BL} = [3 × D × C_s / (r₀² × C₀)]**, burada **D** difüzyon katsayısıdır, **C_s** doyma çözünürlüğüdür, **r₀** bir küre için başlangıç yarıçapıdır veya bir levha için silindir veya yarı kalınlık ve **C₀** matristeki ilk ilaç yüklemesidir; ^m **k₁** Fickian kinetiğiyle ilgili sabittir, **k₂** Durum-II gevşeme kinetiğiyle ilgili sabittir, **m** kontrollü salınımı engelleyen herhangi bir geometrik şekle sahip bir cihazın yayılma üssüdür; ⁿ **k₁** $t^{0.5}$ 'e bağlı ilaç difüzyonunun ilaç salımına nispi katkısını gösteren sabittir, **k₂**, t 'ye bağlı polimer gevşemesinin ilaç salımına nispi katkısını gösteren sabittir; ^o **k₁** t^2 'ye bağlı ilaç salımının nispi katkısını gösteren Quadratic modeldeki sabittir, **k₂**, t 'ye bağlı ilaç salımının nispi katkısını gösteren Quadratic modeldeki sabittir; ^p **α**, sürecin zaman ölçeğini tanımlayan ölçek parametresidir, **β** eğriyi ya üstel ($\beta=1$; durum 1), sigmoid, S-şekilli, yukarı doğru eğrilik ve ardından bir dönüş noktası ($\beta>1$; durum 2), ya da daha yüksek bir başlangıç eğimi ile ve bundan sonra üstel ile tutarlı ($\beta<1$; durum 3) şekil parametresidir; ^q **T_i**, çözünme veya salıverme sürecinin başlangıcından önceki gecikme süresini temsil eden konum parametresidir ve çoğu durumda sıfıra yakın olmaktadır;



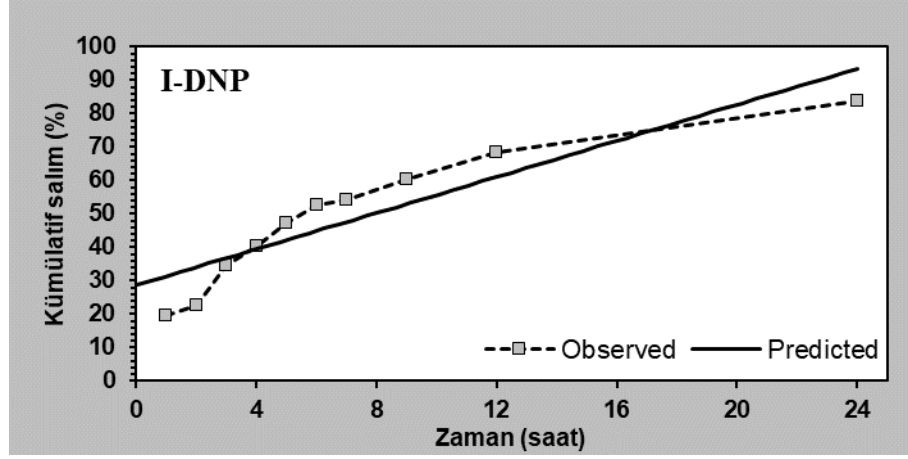
Şekil 5.55. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Sıfıncı Derece Kinetik)

***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.



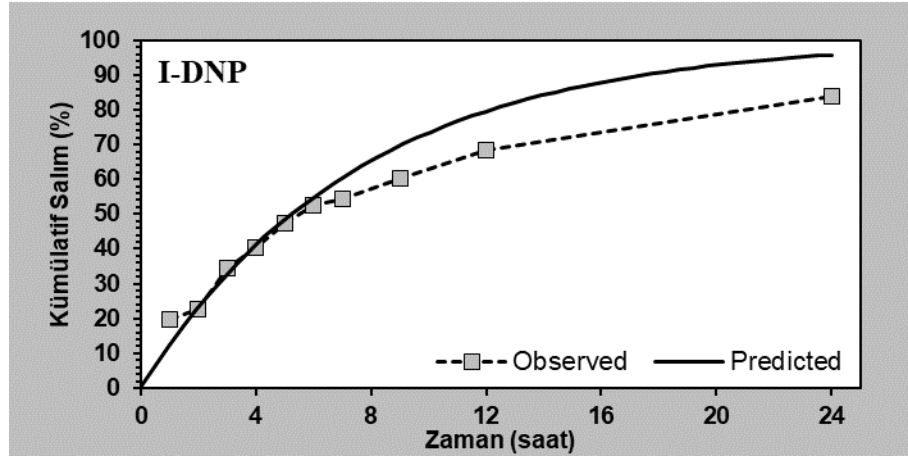
Şekil 5.56. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Sıfıncı Derece Kinetik, T_{lag})

***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.



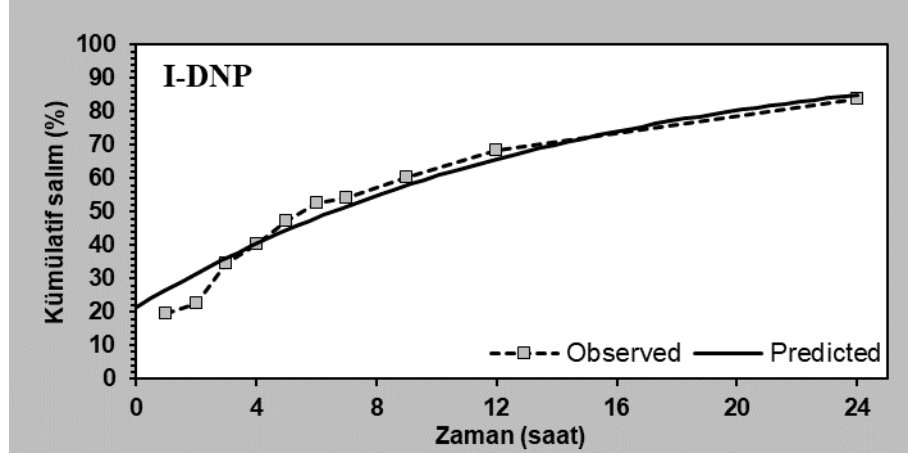
Şekil 5.57. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Sıfırıncı Derece Kinetik, F_0)

***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.



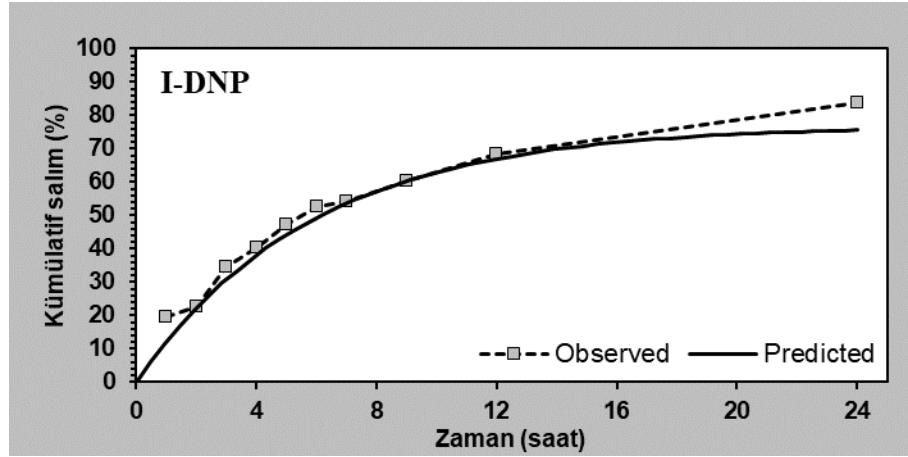
Şekil 5.58. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik)

***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.



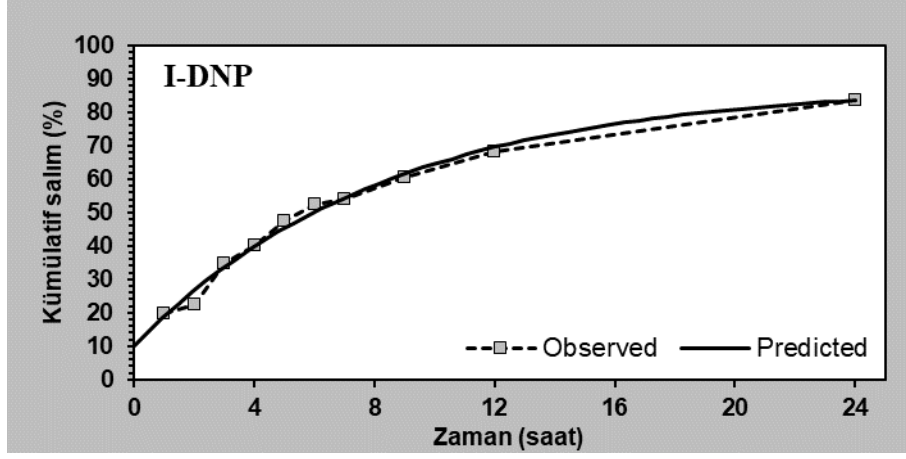
Şekil 5.59. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik, T_{lag})

***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.



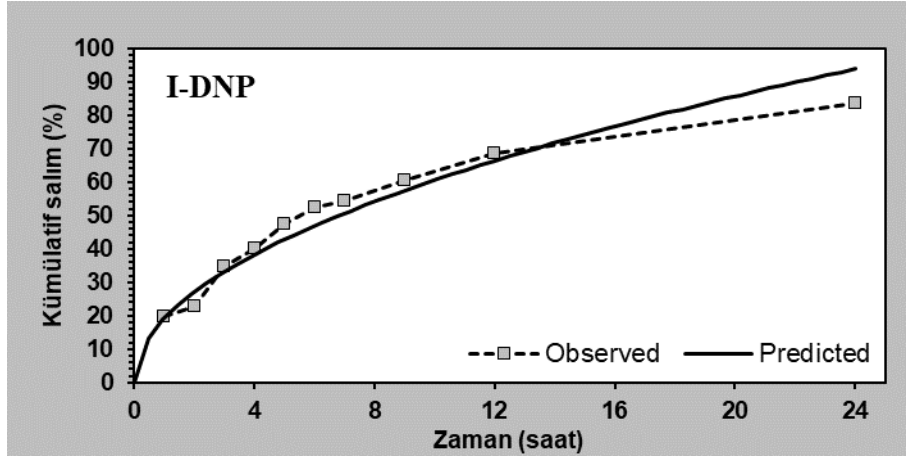
Şekil 5.60. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik, F_{max})

***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.



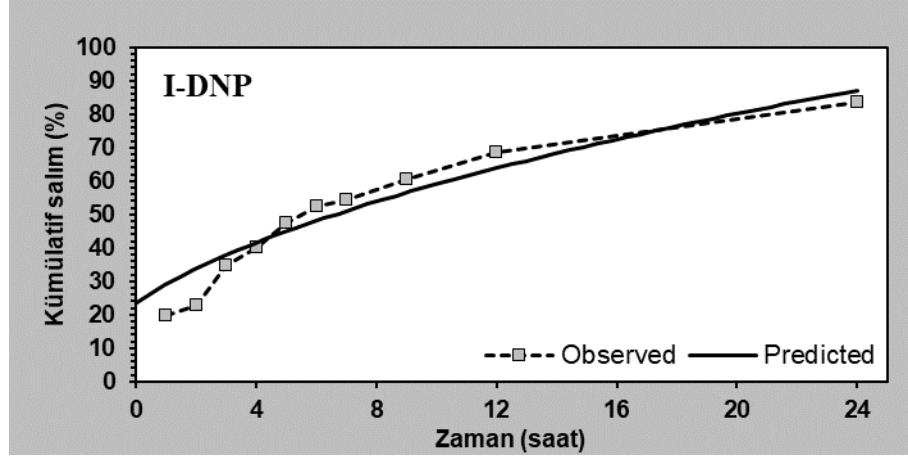
Şekil 5.61. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Birinci Derece Kinetik, F_{max} ve T_{lag})

***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.



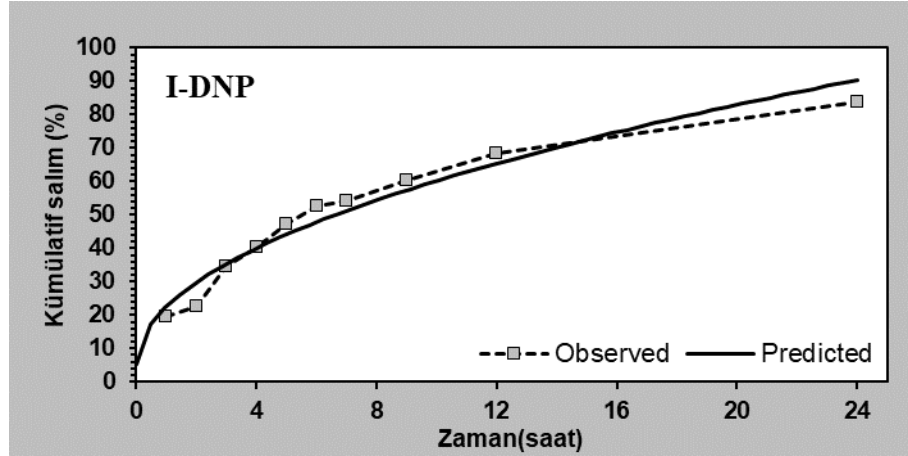
Şekil 5.62. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Higuchi Modeli)

***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.



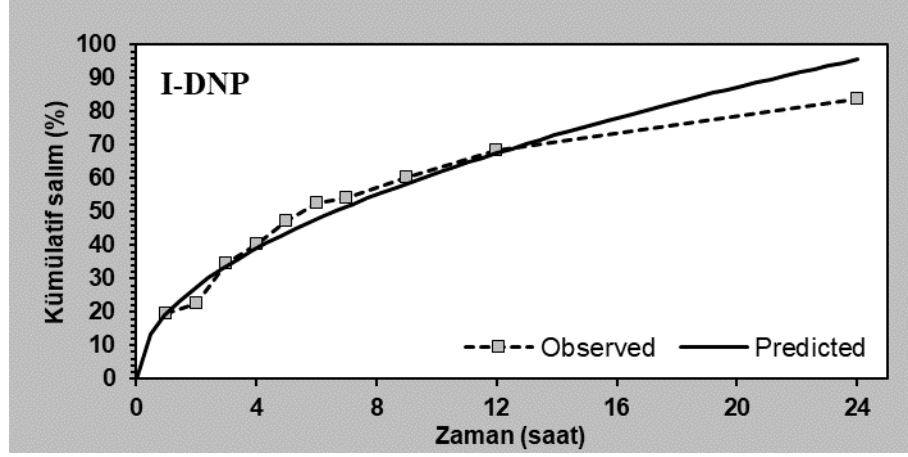
Şekil 5.63. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Higuchi modeli, T_{lag})

***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.



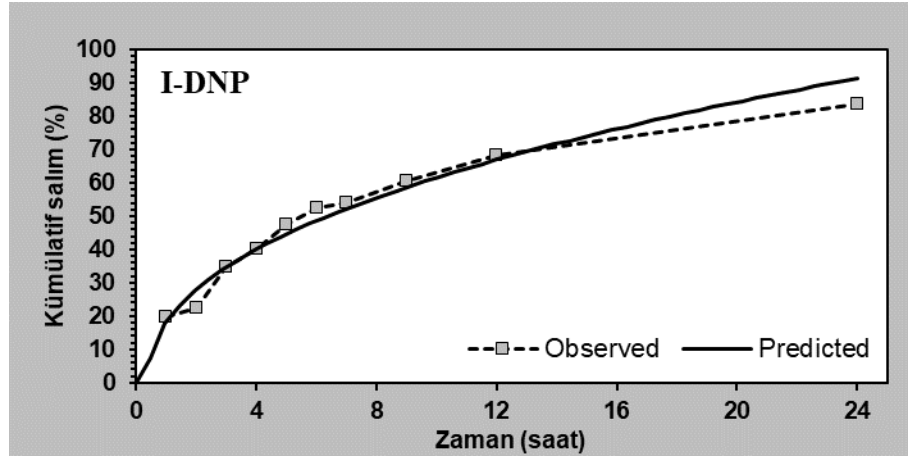
Şekil 5.64. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Higuchi modeli, F_0)

***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.



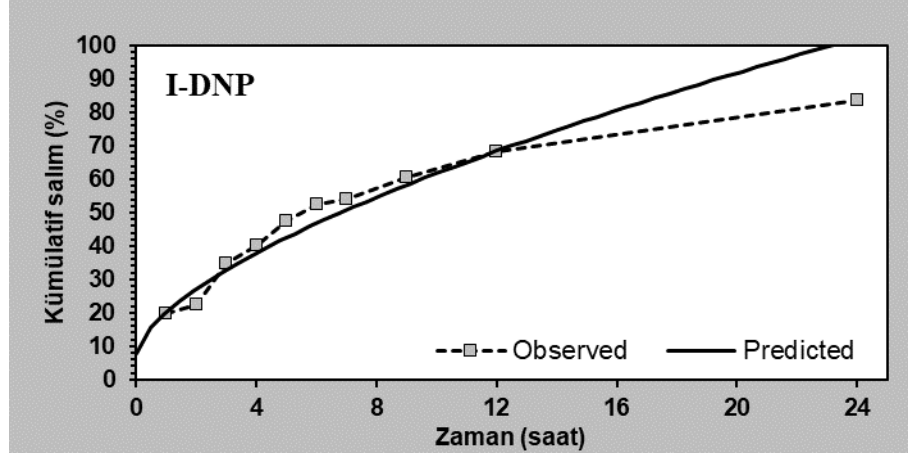
Şekil 5.65. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Korsmeyer-Peppas Modeli)

***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.

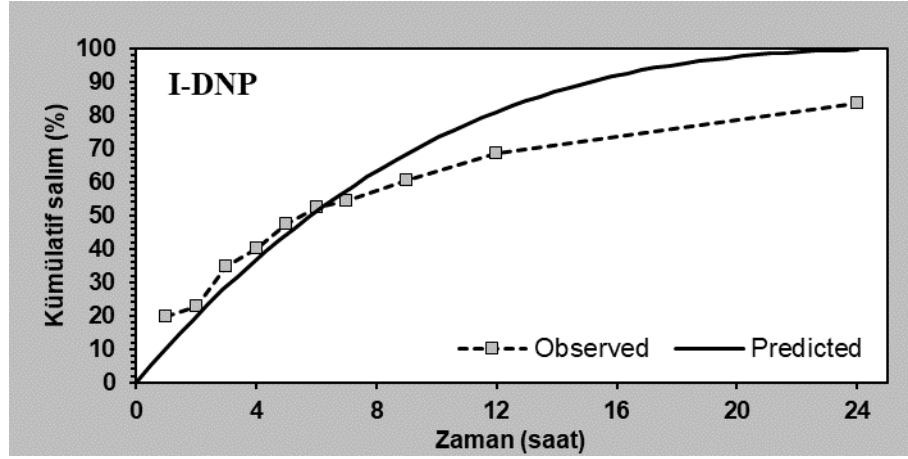


Şekil 5.66. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Korsmeyer-Peppas Modeli, T_{lag})

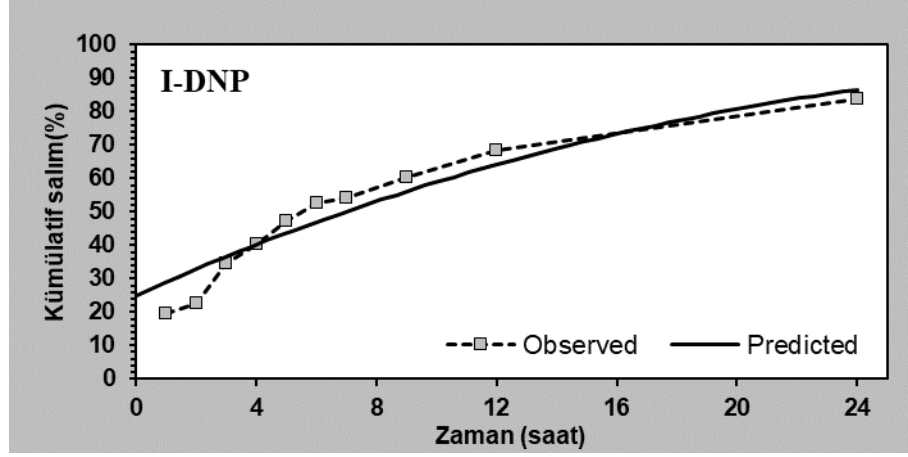
***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.



Şekil 5.67. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Korsmeyer-Peppas modeli, F_0)
 *Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.

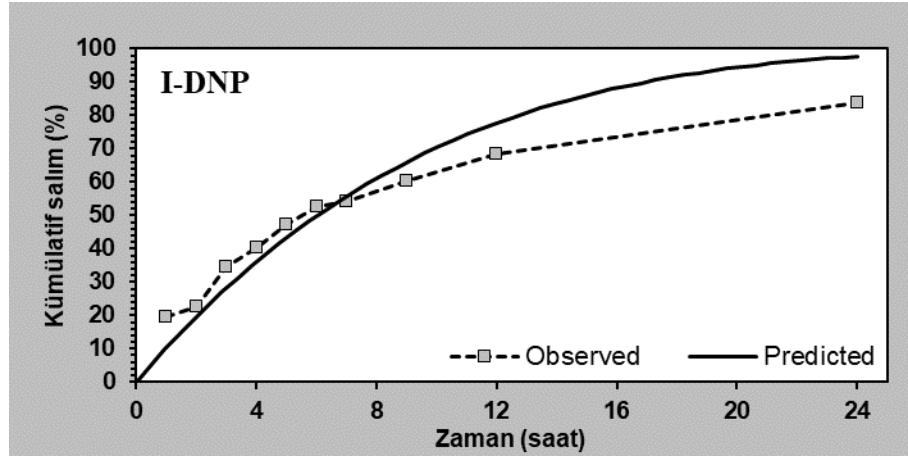


Şekil 5.68. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Hixson-Crowell modeli)
 *Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



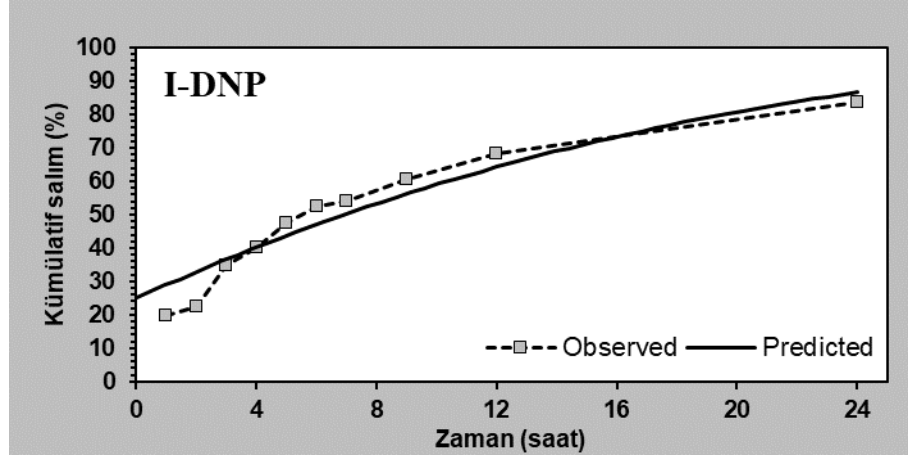
Şekil 5.69. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Hixson-Crowell modeli, T_{lag})

***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.



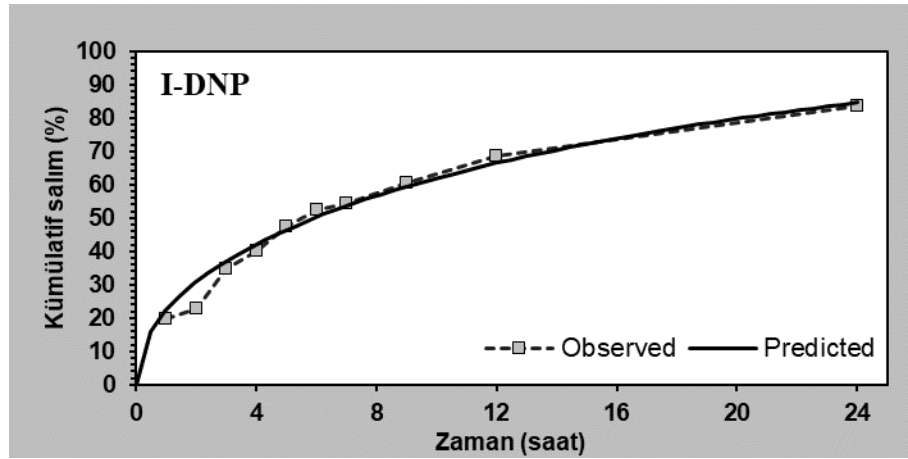
Şekil 5.70. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Hopfenberg modeli)

***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.



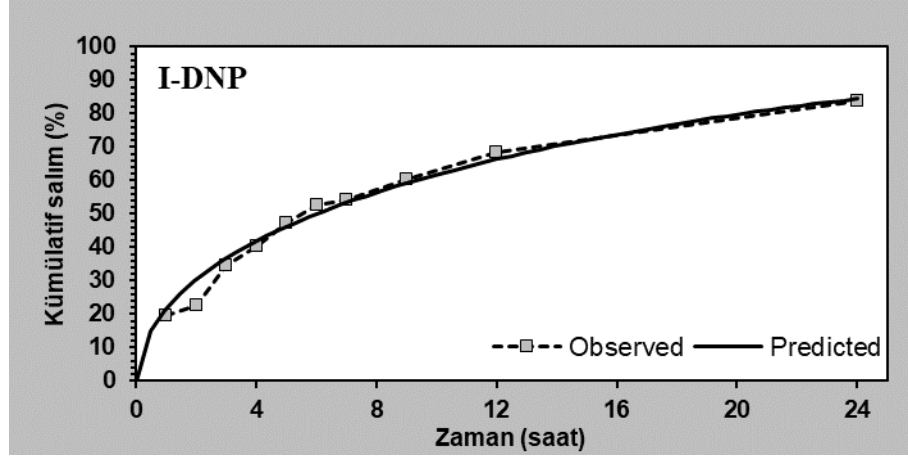
Şekil 5.71. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Hopfenberg modeli, T_{lag})

***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.



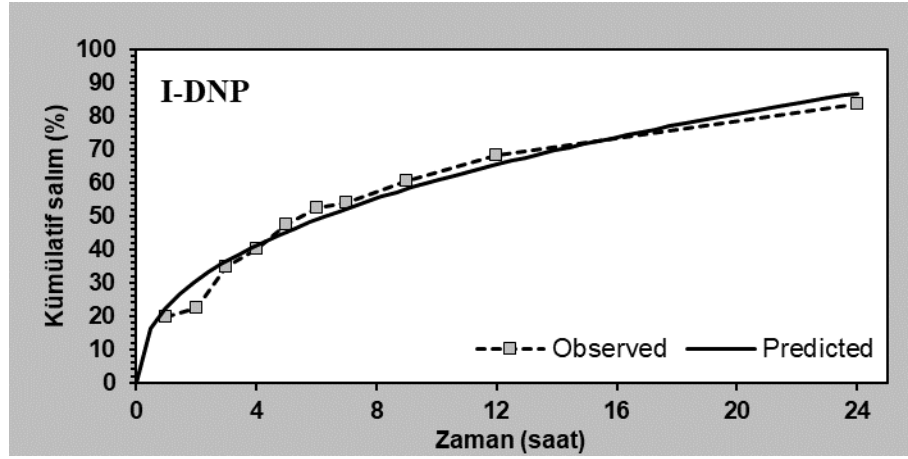
Şekil 5.72. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Baker-Lonsdale modeli)

***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.



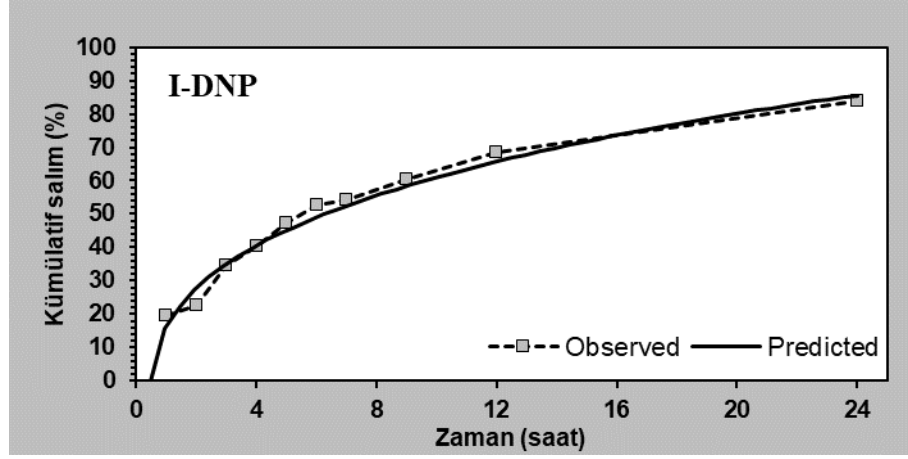
Şekil 5.73. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Baker-Lonsdale modeli, T_{lag})

***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.

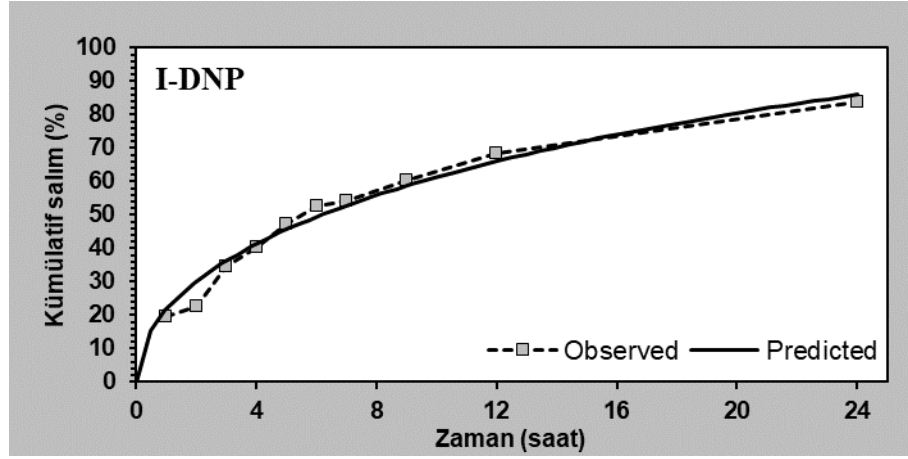


Şekil 5.74. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 1 modeli)

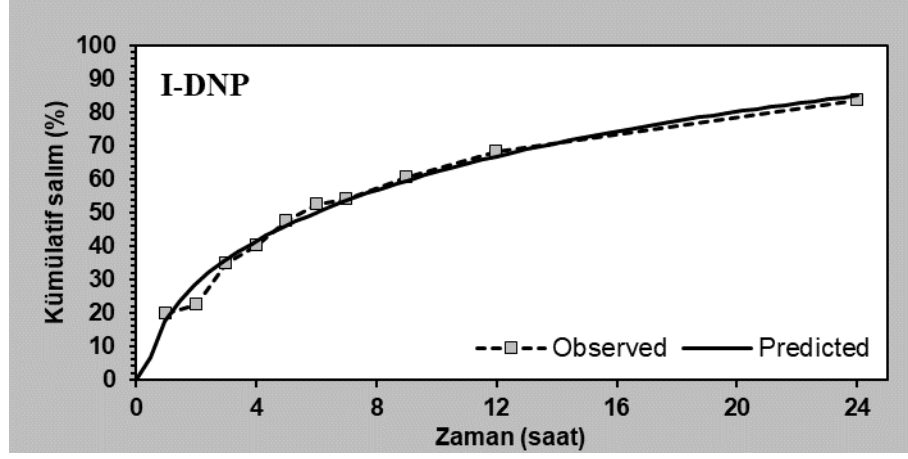
***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.



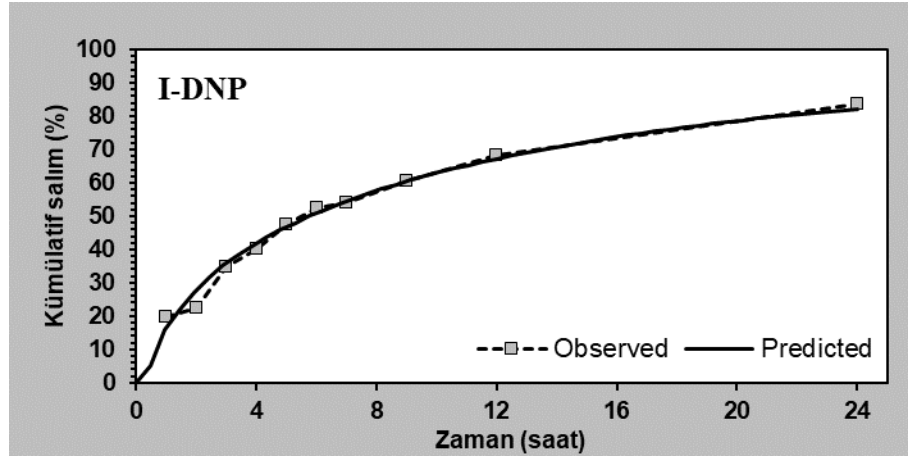
Şekil 5.75. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 1 modeli, T_{lag})
 *Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



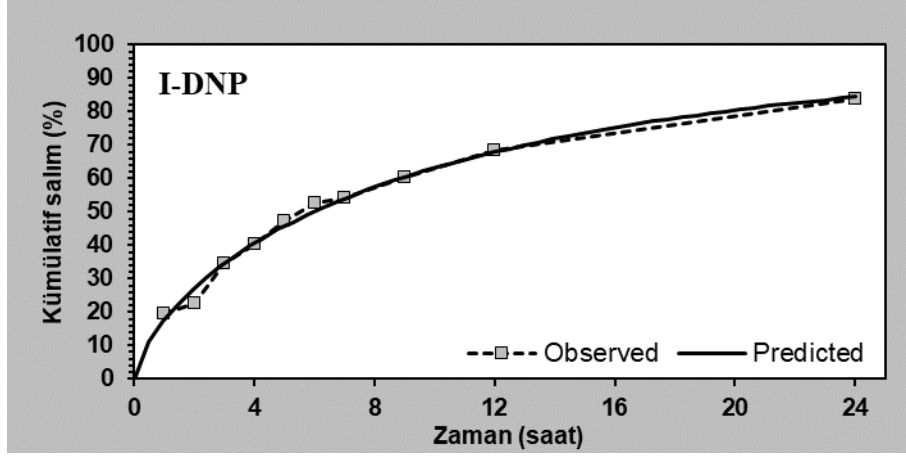
Şekil 5.76. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 2 modeli)
 *Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



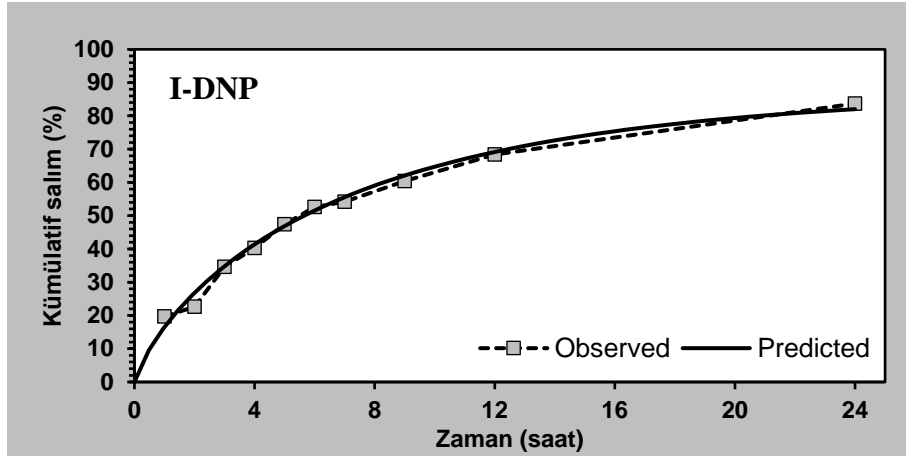
Şekil 5.77. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Peppas-Sahlin 2 modeli, T_{lag})
 *Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



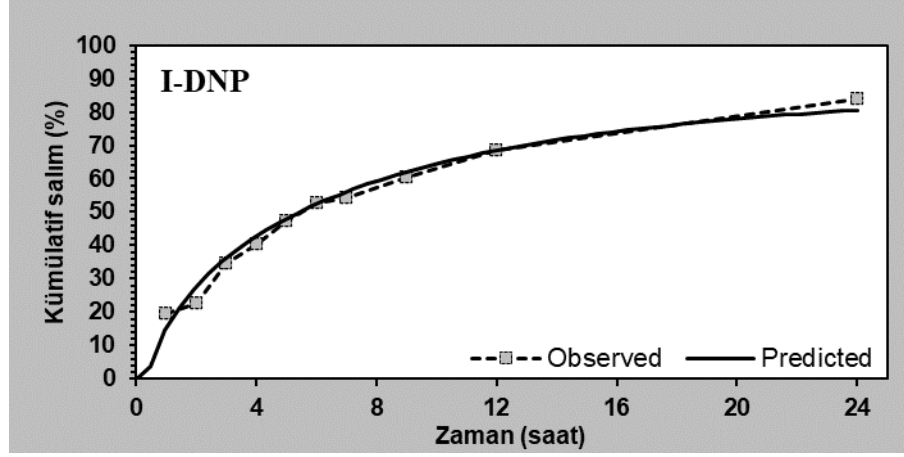
Şekil 5.78. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Weibull 1 modeli)
 *Observed: Elde edilen salım profili, Predicted: Beklenen salım profili.



Şekil 5.79. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Weibull 2 modeli)
 ***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.



Şekil 5.80. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Weibull 3 modeli)
 ***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.



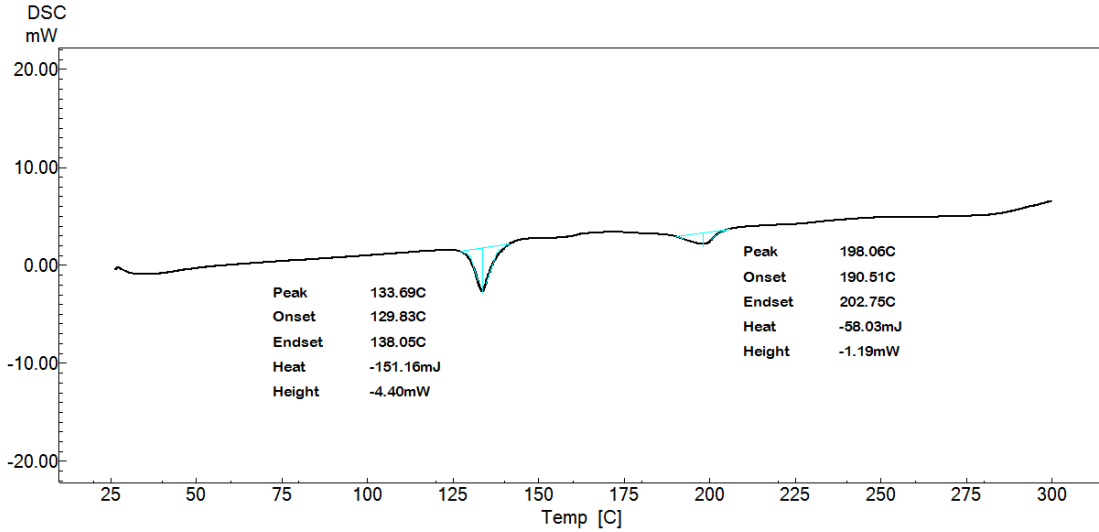
Şekil 5.81. I-DNP kodlu formülasyon için salım kinetik modeli (Weibull 4 modeli)

***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.

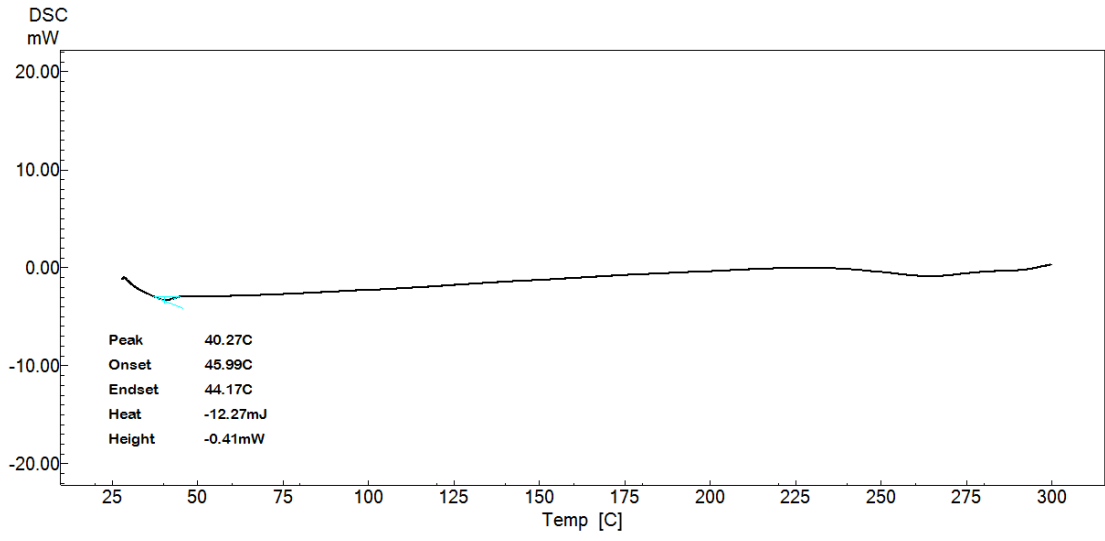
5.8. Katı Hal Karakterizasyonları

5.8.1. Termal analiz

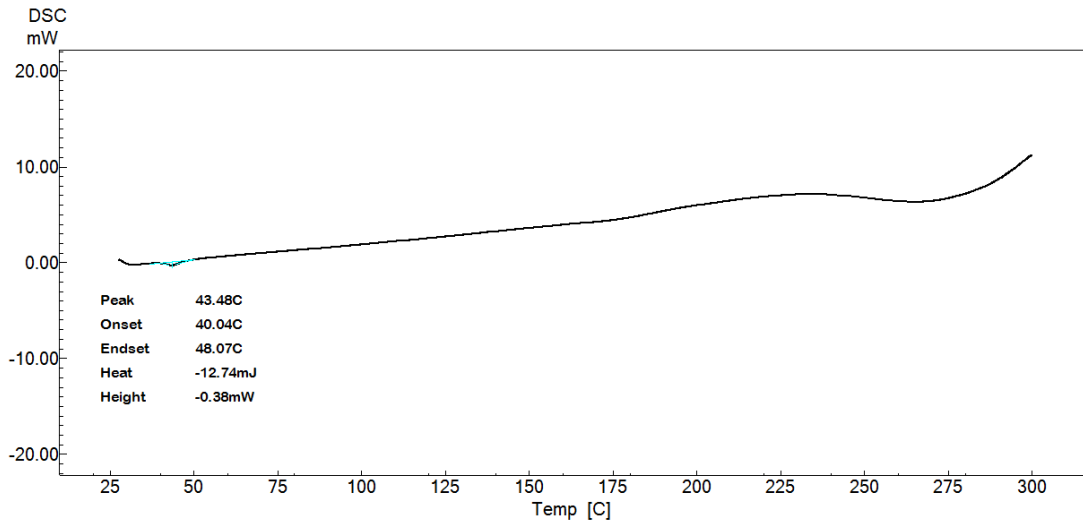
DNP, PLGA, I-Blank kodlu formülasyon, DNP yüklü I-DNP kodlu formülasyon ve fiziksel karışıma ait termogramlar / DSC eğrileri sırasıyla Şekil 5.82., Şekil 5.83., Şekil 5.84., Şekil 5.85. ve Şekil 5.86.'da sunulmuştur.



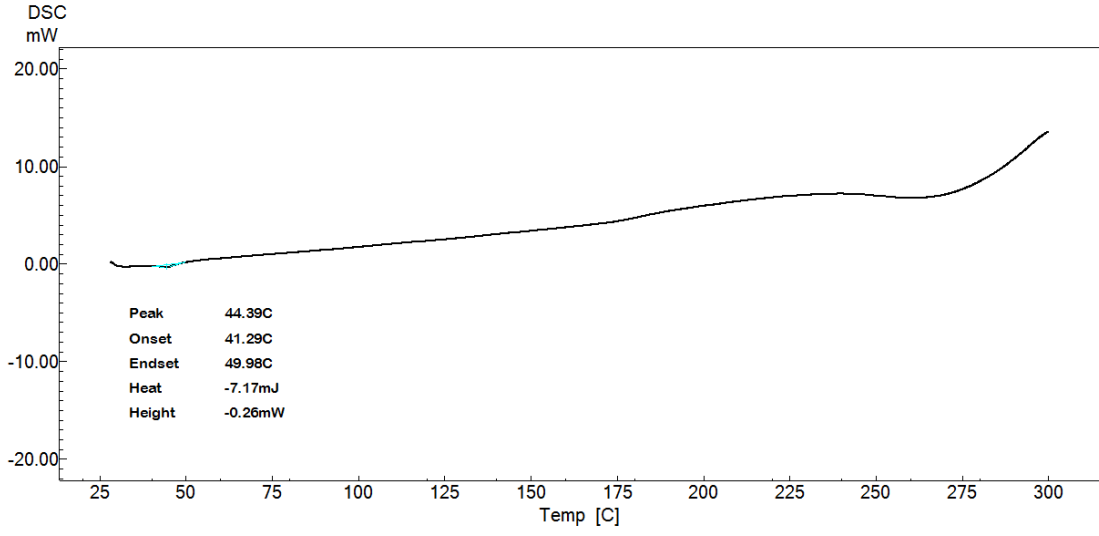
Şekil 5.82. DNP'e ait DSC eğrisi



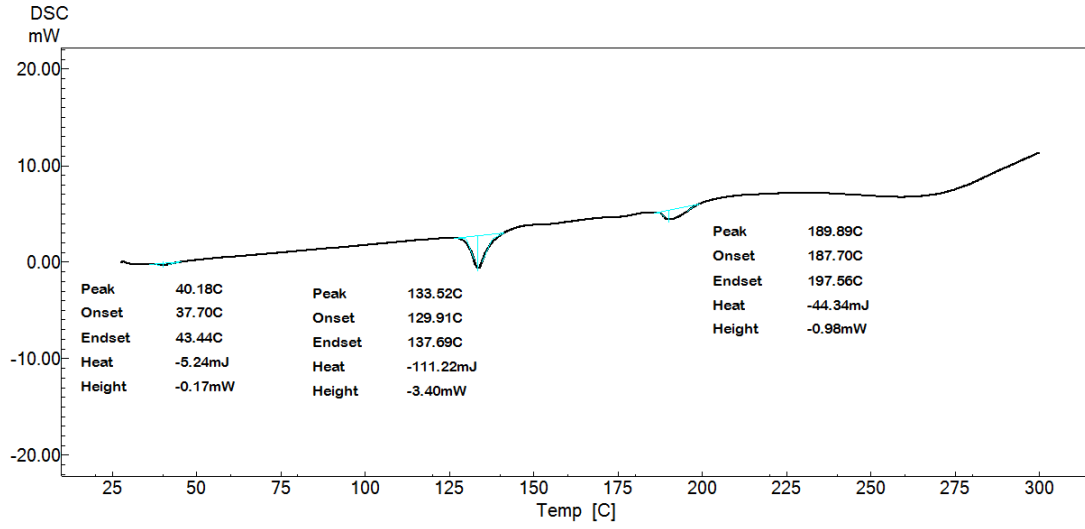
Şekil 5.83. PLGA polimerine ait DSC eğrisi



Şekil 5.84. I-Blank kodlu formülasyona ait DSC eğrisi



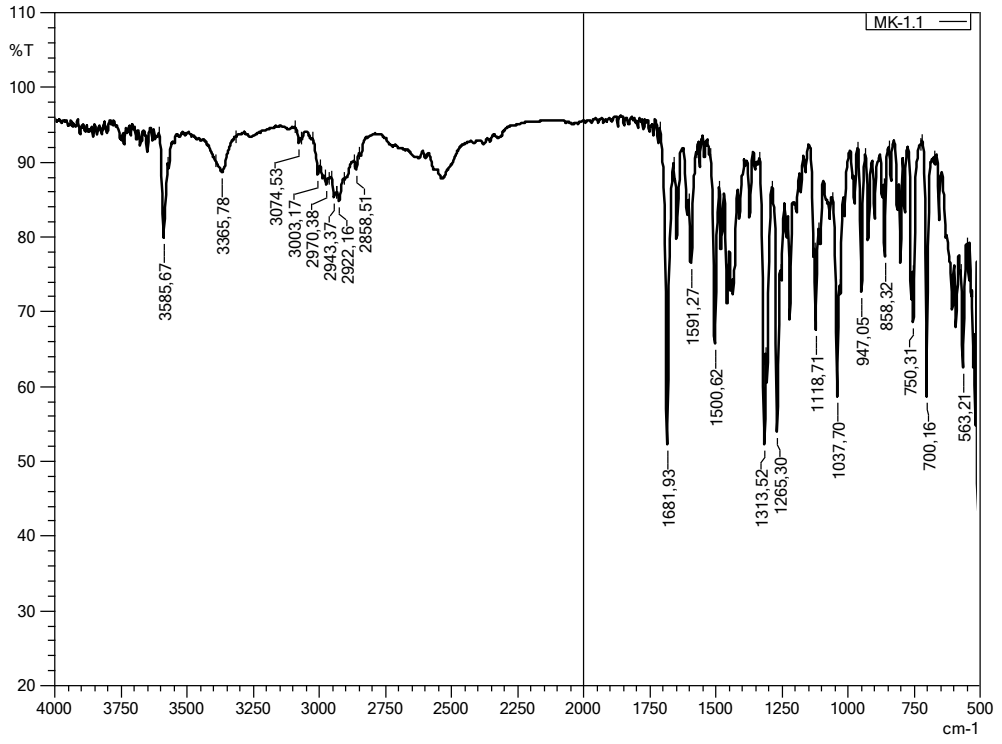
Şekil 5.85. I-DNP kodlu formülasyona ait DSC eğrisi



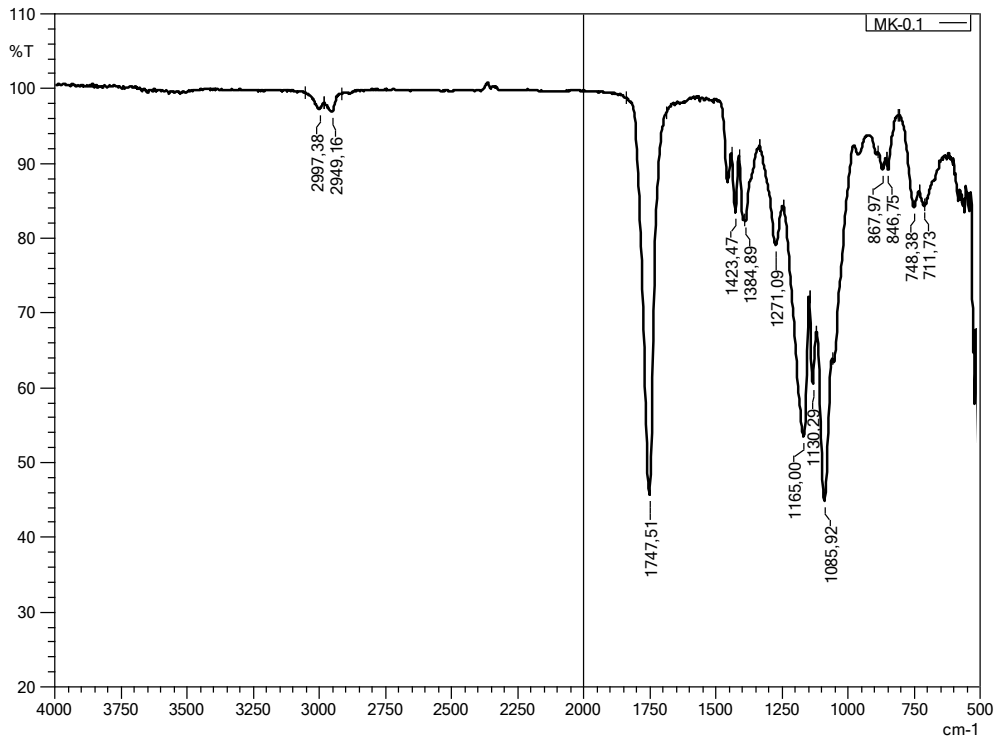
Şekil 5.86. Fiziksel karışıma ait DSC eğrisi

5.8.2. FT-IR analizleri

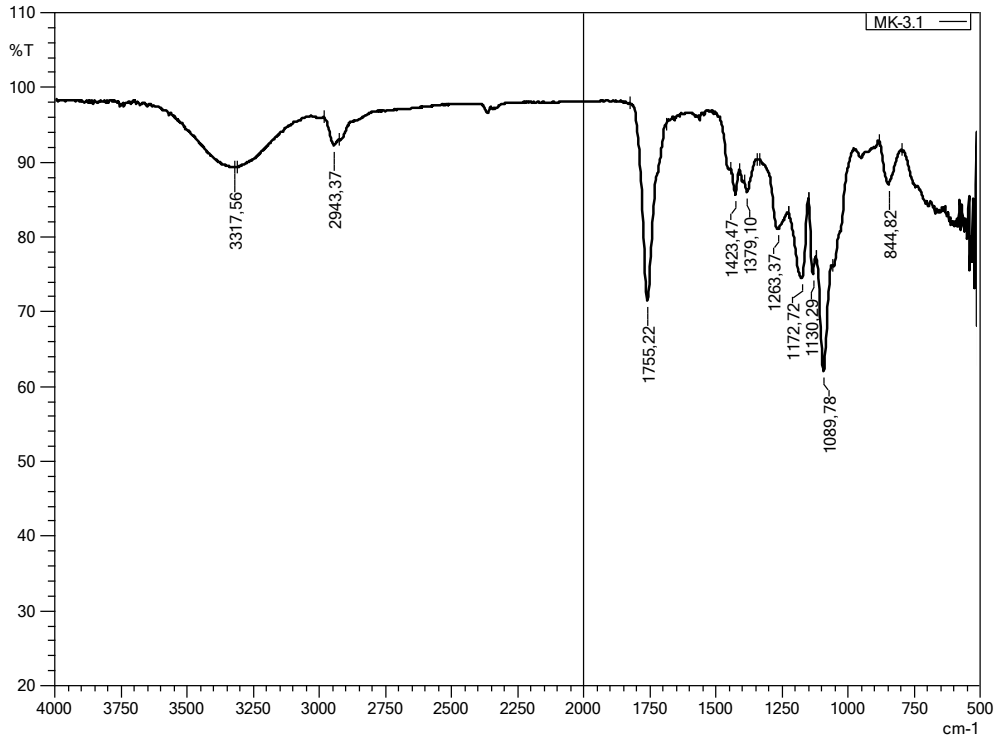
DNP, PLGA, I-Blank kodlu formülasyon, DNP yüklü I-DNP kodlu formülasyon ve fiziksel karışıma ait FT-IR spektrumları sırasıyla Şekil 5.87., Şekil 5.88., Şekil 5.89., Şekil 5.90. ve Şekil 5.91.'de sunulmuştur.



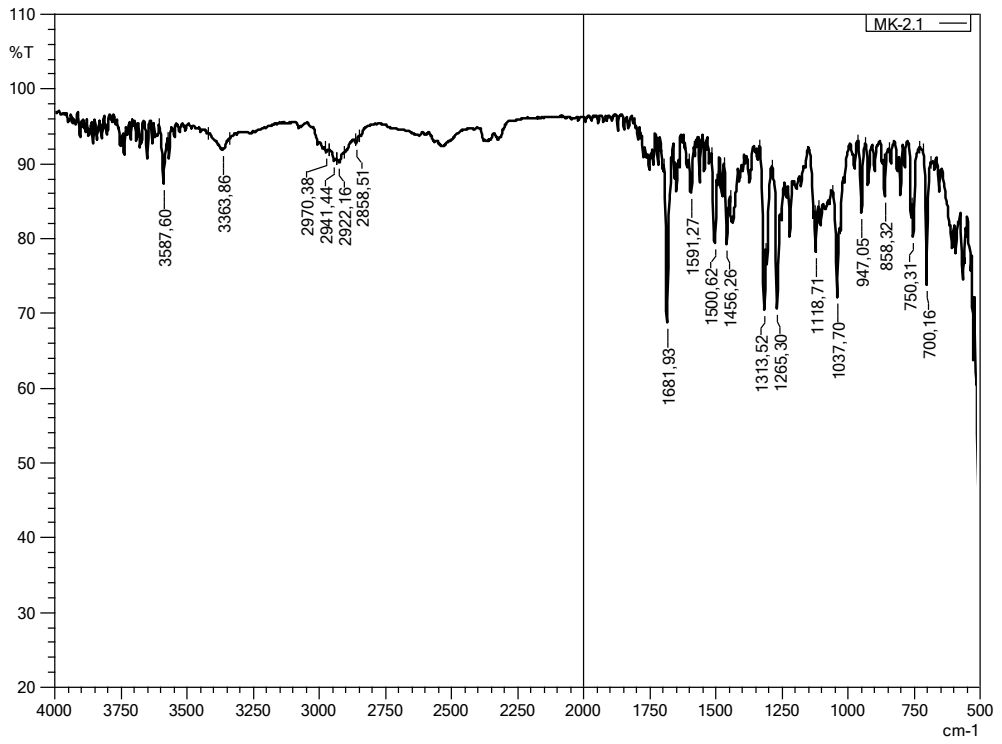
Şekil 5.87. DNP'e ait FT-IR spektrumu



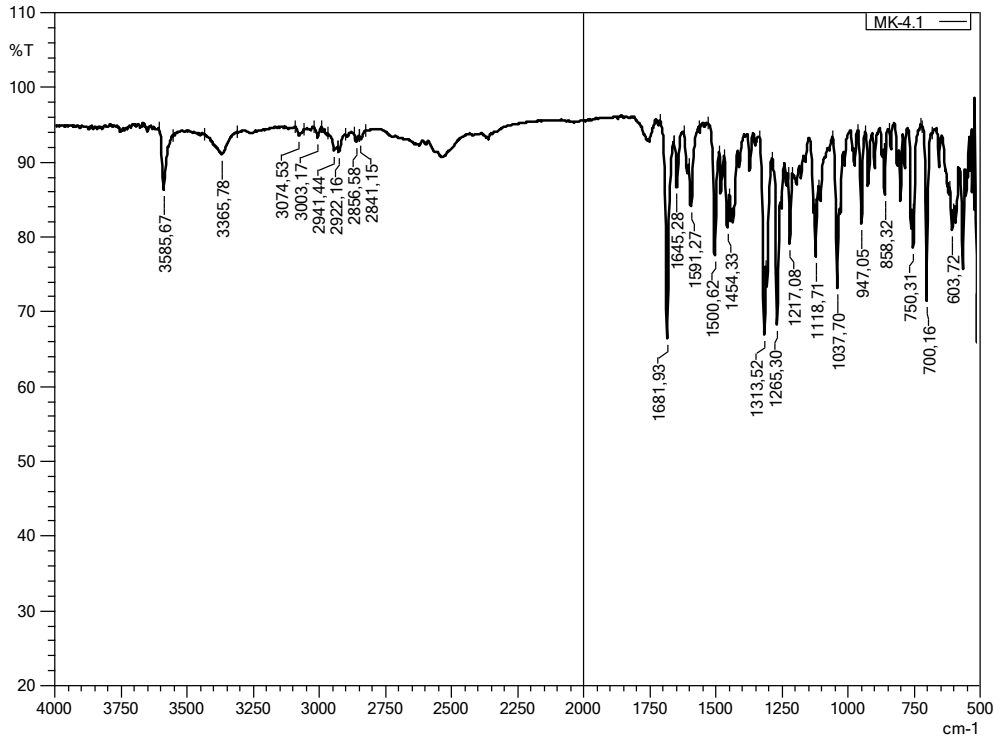
Şekil 5.88. PLGA polimerine ait FT-IR spektrumu



Şekil 5.89. I-Blank kodlu formülasyona ait FT-IR spektrumu



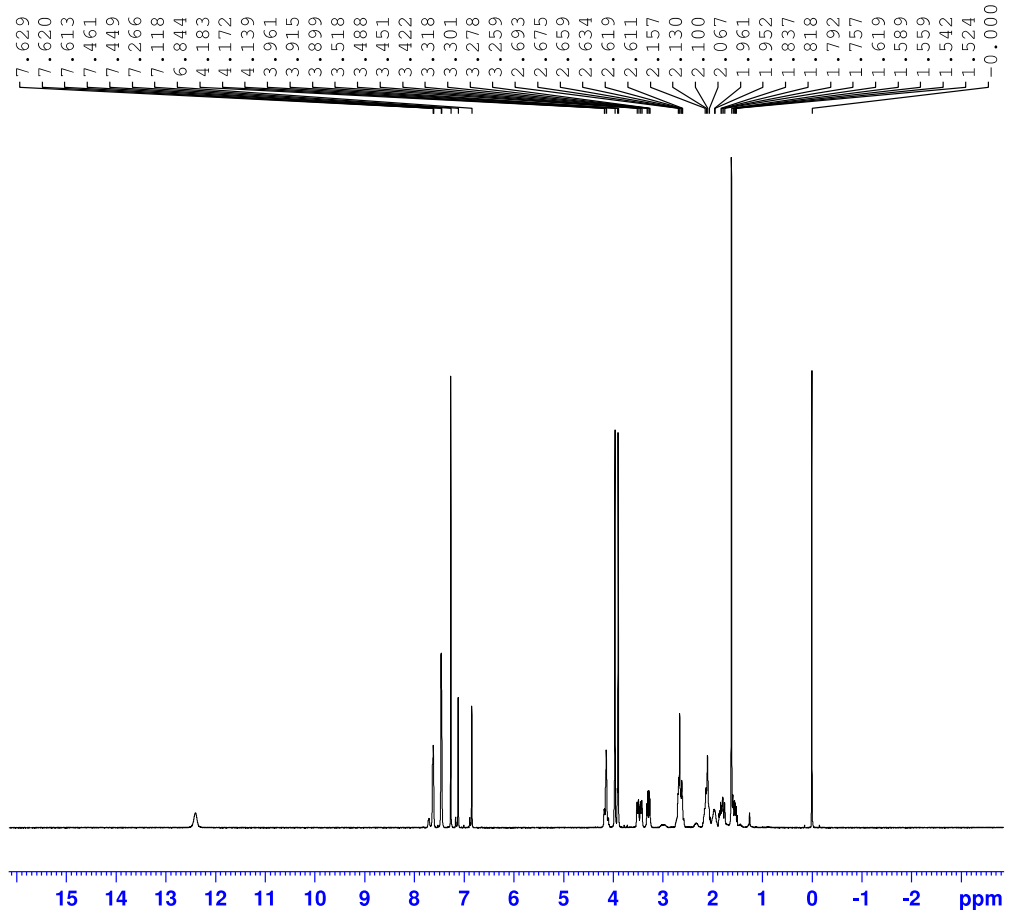
Şekil 5.90. I-DNP kodlu formülasyona ait FT-IR spektrumu



Şekil 5.91. Fiziksel karışıma ait FT-IR spektrumu

5.8.3. $^1\text{H-NMR}$ analizleri

DNP, PLGA, I-Blank kodlu formülasyon, DNP yüklü I-DNP kodlu formülasyon ve fiziksel karışıma ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumları sırasıyla Şekil 5.92., Şekil 5.93., Şekil 5.94., Şekil 5.95. ve Şekil 5.96.'da sunulmuştur.



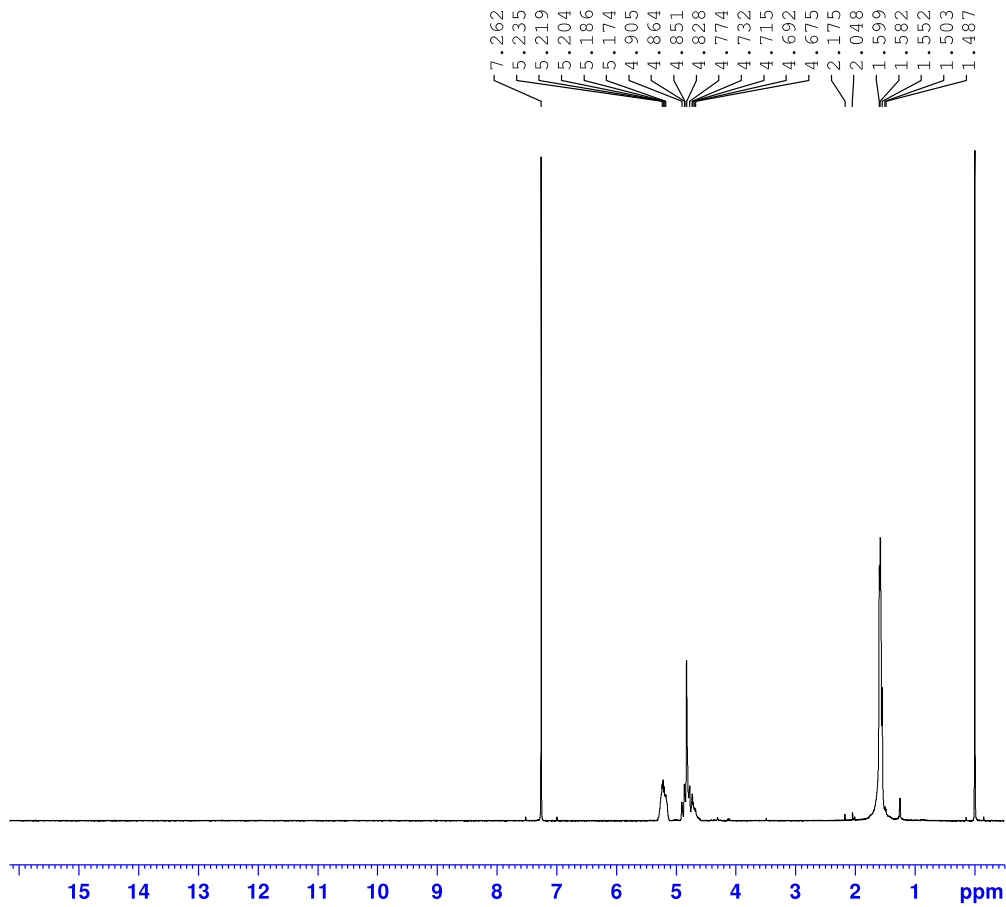
```

Current Data Parameters
NAME          MK1
EXPNO         10
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20221105
Time          13.39 h
INSTRUM       spect
PROBHD        Z866401_0004 (
PULPROG       zg30
TD            65536
SOLVENT       CDC13
NS            16
DS            2
SWH           8012.820 Hz
FIDRES        0.244532 Hz
AQ            4.0894465 sec
RG            249.66
DW            62.400 usec
DE            6.50 usec
TE            294.6 K
D1            1.00000000 sec
TD0           1
SFO1          400.1324708 MHz
NUC1          1H
P1            8.00 usec
PLW1          10.94900036 W

F2 - Processing parameters
SI            65536
SF            400.1300072 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            0.30 Hz
GB            0
PC            1.00
  
```

Şekil 5.92. DNP'e ait ¹H-NMR spektrumu

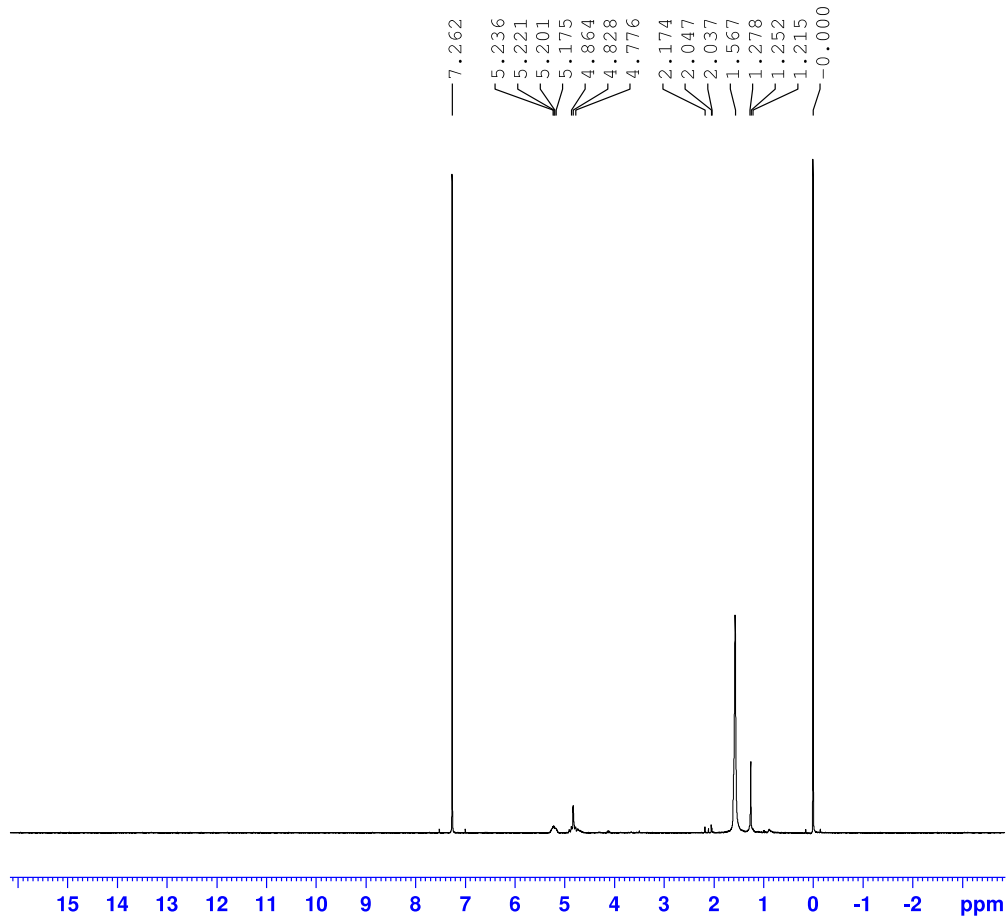


Current Data Parameters
NAME MK0
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20221105
Time 13.35 h
INSTRUM spect
PROBHD Z866401_0004 ()
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCL3
NS 16
DS 2
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 0.244532 Hz
AQ 4.0894465 sec
RG 311.2
DW 62.400 usec
DE 6.50 usec
TE 294.7 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1
SF01 400.1324708 MHz
NUC1 1H
P1 8.00 usec
PLW1 10.94900036 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 400.1300087 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

Şekil 5.93. PLGA polimerine ait ¹H-NMR spektrumu



```

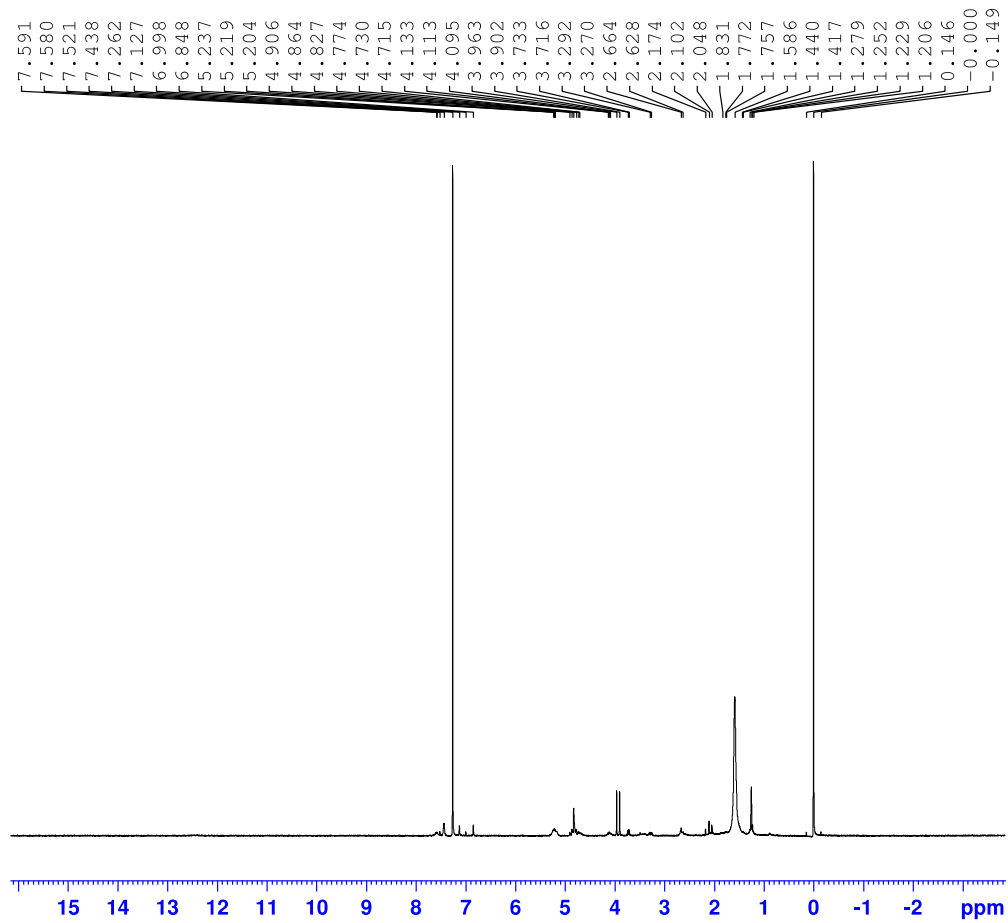
Current Data Parameters
NAME          MK3
EXPNO         10
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20221105
Time          13.31 h
INSTRUM       spect
PROBHD        Z866401_0004 (
PULPROG       zg30
TD            65536
SOLVENT       CDCl3
NS            16
DS            2
SWH           8012.820 Hz
FIDRES        0.244532 Hz
AQ            4.0894465 sec
RG            560.35
DW            62.400 usec
DE            6.50 usec
TE            294.7 K
D1            1.00000000 sec
TD0           1
SFO1          400.1324708 MHz
NUC1          1H
P1            8.00 usec
PLW1          10.94900036 W

F2 - Processing parameters
SI            65536
SF            400.1300089 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            0.30 Hz
GB            0
PC            1.00

```

Şekil 5.94. I-Blank kodlu formülasyona ait ^1H -NMR spektrumu

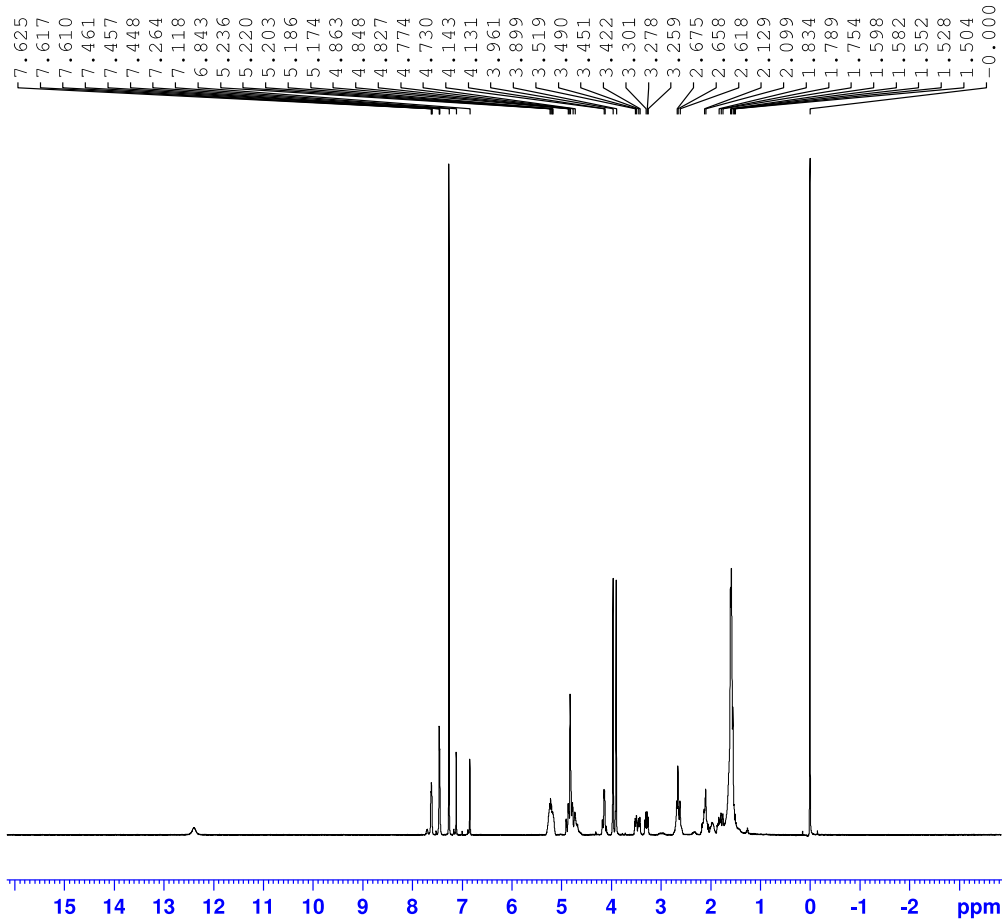


Current Data Parameters
NAME MK2
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20221105
Time 13.27 h
INSTRUM spect
PROBHD Z866401_0004 (
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 2
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 0.244532 Hz
AQ 4.0894465 sec
RG 366.37
DW 62.400 usec
DE 6.50 usec
TE 294.8 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1
SFO1 400.1324708 MHz
NUC1 1H
P1 8.00 usec
PLW1 10.94900036 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 400.1300088 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

Şekil 5.95. I-DNP kodlu formülasyona ait ^1H -NMR spektrumu



```

Current Data Parameters
NAME           MK4
EXPNO          10
PROCNO         1

F2 - Acquisition Parameters
Date_          20221105
Time           13.23 h
INSTRUM        spect
PROBHD         Z866401_0004 (
PULPROG        zg30
TD             65536
SOLVENT        CDC13
NS             16
DS             2
SWH            8012.820 Hz
FIDRES         0.244532 Hz
AQ            4.0894465 sec
RG            249.66
DW            62.400 usec
DE            6.50 usec
TE            294.9 K
D1            1.00000000 sec
TD0           1
SFO1          400.1324708 MHz
NUC1          1H
P1            8.00 usec
PLW1         10.94900036 W

F2 - Processing parameters
SI            65536
SF           400.1300081 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            0.30 Hz
GB           0
PC            1.00
  
```

Şekil 5.96. Fiziksel karışıma ait ^1H -NMR spektrumu

5.9. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

5.9.1. In vitro AChE ve BChE inhibitör aktivite yöntemi ile anti-Alzheimer etki analizleri

5.9.1.1. AChE inhibitör aktivite sonuçları

AChE inhibitör aktivite sonuçları Tablo 5.18.'de verilmiştir. Aktivite sonuçlarına göre, asetilkolinesteraz inhibitörü olan DNP ile karşılaştırıldığında $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda $\%96.88 \pm 0.16$ inhibisyon ile I-DNP kuvvetli anti-AChE aktivite göstermiştir. Blank ise aktivite göstermemiştir.

Tablo 5.18. DNP, I-DNP ve I-Blank kodlu formülasyonun AChE inhibitör aktivite sonuçları

Test maddesi	Konsantrasyon / İnhibisyon (%)			
	400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g/mL}^{-1}$	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
I-DNP	96.88 \pm 0.16	94.47 \pm 0.68	90.95 \pm 1.14	28.80
I-Blank	-	-	-	-
DNP	93.67 \pm 1.21	89.19 \pm 1.51	84.38 \pm 0.03	31.06

*(-) aktivite görülmemiştir.

5.9.1.2. BChE inhibitör aktivite sonuçları

BChE inhibitör aktivite sonuçları Tablo 5.19.'da verilmiştir. Aktivite sonuçlarına göre, DNP ile karşılaştırıldığında $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda $\%82.96 \pm 0.57$ inhibisyon ile I-DNP kuvvetli anti-BChE aktivite göstermiştir. Blank ise aktivite göstermemiştir.

Tablo 5.19. DNP, I-DNP ve I-Blank kodlu formülasyonun BChE inhibitör aktivite sonuçları

Test maddesi	Konsantrasyon / İnhibisyon (%)			
	400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g/mL}^{-1}$	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
I-DNP	82.96 \pm 0.57	76.35 \pm 0.7	71.04 \pm 0.69	36.75
I-Blank	-	-	-	-
DNP	89.50 \pm 0.04	78.55 \pm 0.08	63.03 \pm 0.02	43.07

*(-) aktivite görülmemiştir.

Sonuç olarak anti-Alzheimer aktivite sonuçlarına göre asetilkolinesteraz inhibitörü olan DNP ile karşılaştırıldığında I-DNP kuvvetli anti-AChE ve anti-BChE aktivite göstermiştir.

5.5.2. CAM (The chorioallantoic membrane assay) yöntemi ile *in vivo* anjiyogenik etkinlik sonuçları

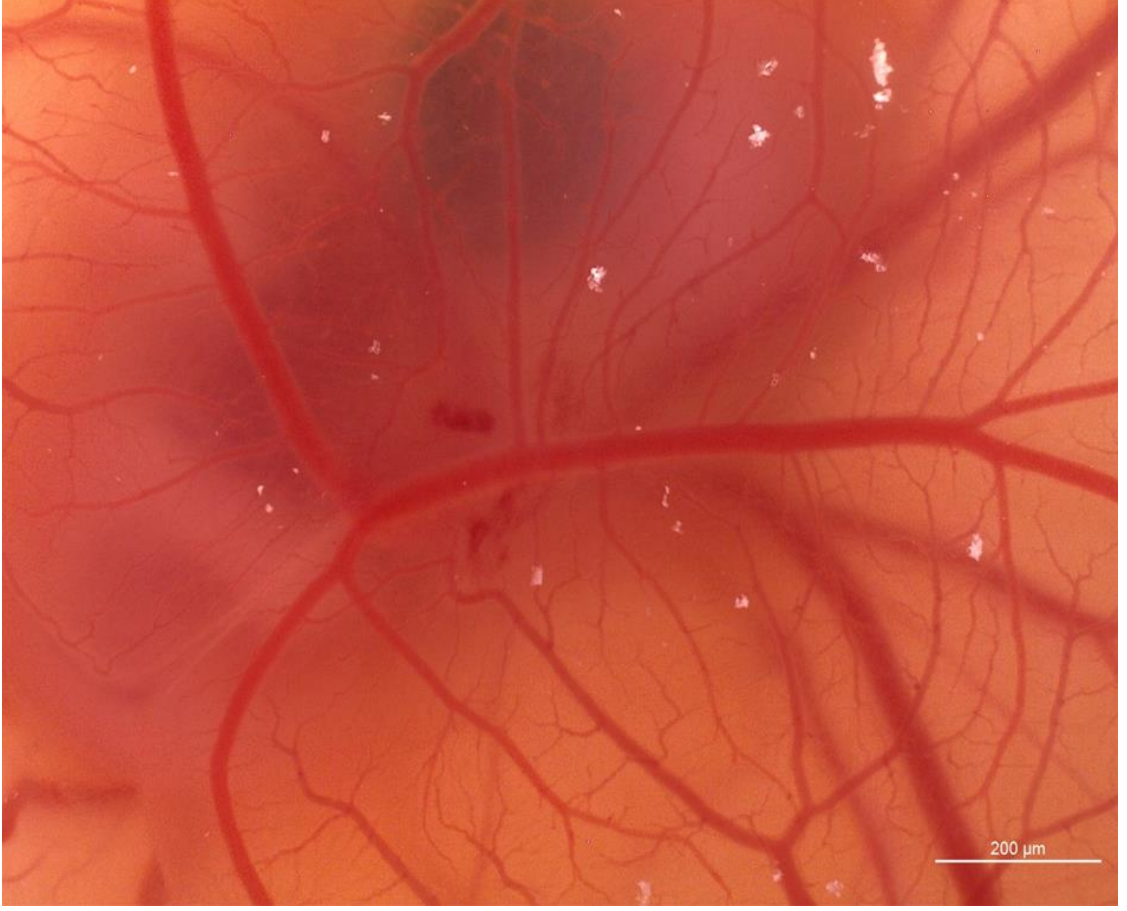
Saf DNP, I-DNP ve I-Blank kodlu formülasyonların *in vivo* anjiyogenik etki sonuçları Tablo 5.20.'de sunulmuştur. CAM sonuçlarına göre kör (%2.5 agaroz) ve I-Blank kodlu formülasyon ile karşılaştırıldığında I-DNP 10 µg.pellet⁻¹ konsantrasyonda belirgin bir şekilde kapiler damar gelişimini inhibe ederek *in vivo* anti-anjiyogenik etki göstermiştir. Kapiler alanın azalmasına bağlı olarak aktivite sıralaması I-DNP > DNP > Blank olarak tespit edilmiştir.

DNP'nin anti-anjiyogenik etkisi (10 µg.pellet⁻¹), Şekil 5.97.'de, I-DNP kodlu formülasyonun anti-anjiyogenik etkisi (10 µg.pellet⁻¹), Şekil 5.98.'de, I-Blank kodlu formülasyonun etkisi (10 µg.embriyo⁻¹) Şekil 5.99.'da, agaroz ile normal embriyo gelişimi (%2.5, a/h) Şekil 5.100.'de sunulmuştur.

Tablo 5.20. *In vivo* anjiyogenik etki sonuçları

Test Maddesi (10µg/pellet)	Total Kapiler Damarlı Alan
DNP	17.982 ± 2.595
I-DNP	14.702 ± 3.395
I-Blank	20.362 ± 3.353
%2.5 (a/h) Agaroz	37.023± 1.230

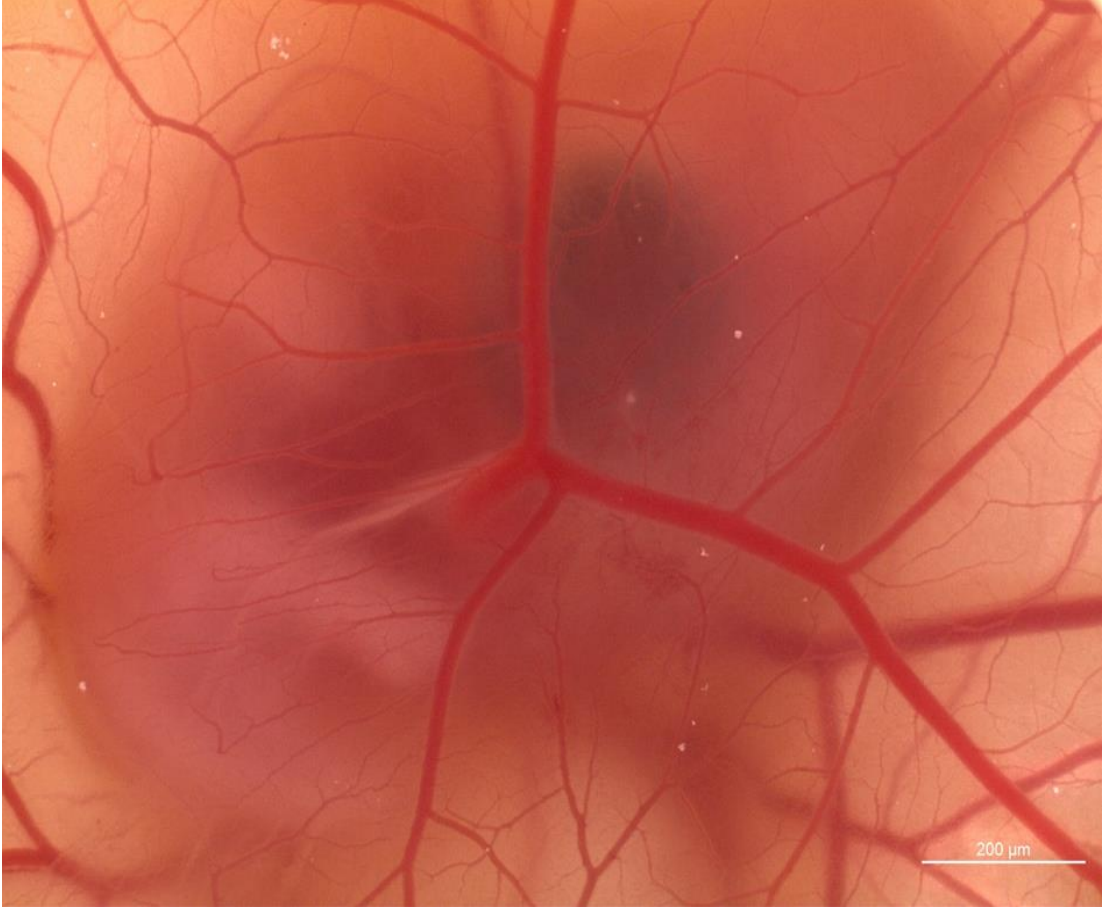
*Ortalama kapiler damarlı alan ± standart sapma (n = 15 test maddeleri için), **p*<0.05, Agaroz ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 5.97. *DNP'nin anti-anjiyogenik etkisi (10 µg.pellet¹) (Total kapiler damarlı alan=17.982 ± 2.595)*



Şekil 5.98. *I-DNP kodlu formülasyonun anti-anjiyogenik etkisi (10 µg.pellet¹) (Total kapiler damarlı alan=14.702 ± 3.395)*



Şekil 5.99. *I-Blank kodlu formülasyonun etkisi ($10 \mu\text{g.embriyo}^{-1}$) (Total kapiler damarlı alan= 20.362 ± 3.353)*



Şekil 5.100. *Agaroz ile normal embriyo gelişimi (%2.5, a/h) (Total kapiler damarlı alan=37.023± 1.230)*

6. TARTIŞMA

6.1. Analitik Miktar Tayini için Validasyon Çalışmaları

Analitik yöntemler; gıda üretimi, doğal ürün analizleri, çevre analizleri, farmasötik ve biyomedikal analizler, yaşam bilimleri gibi birçok dalda önemli rol oynamaktadır. Güvenilir, doğru ve tekrarlanabilir verilere ulaşmak için valide edilmiş analitik yöntemlerin belirli kriterlere ve amaçlara ulaşması gerekmektedir (Ozkan, 2018). Validasyon; doğrusalık, kesinlik, doğruluk, tespit sınırı (LOD) ve miktar tayini / ölçüm sınırı (LOQ) ve seçiciliğin rapor edildiği validasyon sonuçlarıyla belirlenen bir yöntemin güvenilirliğini kontrol etmede kilit faktördür. Valide edilmiş analitik yöntemler, özellikle ilaç endüstrisinde nihai ürünün kalite ve güvenliğinin sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Gumustas vd., 2013).

Genel bir ifade olarak, analitik yöntemler üç temel adımda gerçekleştirilir. Birincisi uygun ve gerekli doğrulama parametrelerinin belirlenmesi, ikincisi parametre değerlendirmesi için deney tasarımı ve sonucu kabul kriterlerinin belirlenmesidir (Ozkan, 2018). UV spektrofotometri tekniği dışındaki diğer analitik teknikler pahalılık, karmaşık aletler işlemler gerektirmesi, örneklerden ilaç analizi için zaman alıcı olması gibi dezavantajlara sahiptir (Rapalli vd., 2020). Bu sebeple bu çalışmada UV spektrofotometre tercih edilmiştir.

Validasyon çalışmaları için en önemli parametrelerden biri analitlerin çözünürlükleridir ve bu bilgilere göre validasyon çalışmalarının yapılması oldukça önemlidir. Literatürde DNP'nin kloroform, diklorometan ve metanolde serbestçe çözüldüğü, suda çözüldüğü, etanol, n-bütanol ve asetonitrilde az çözünür olduğu ve asetonda çok az çözünür olduğu bildirilmiştir (Shirwaikar vd., 2014). Literatürde PLGA'nın halojenli hidrokarbonlar (kloroform ve diklorometan), aseton, etil asetat, dioksan ve tetrahidrofuran dahil olmak üzere birçok yaygın organik çözücüde çözünmektedir (Kaval vd., 2023).

Tüm tez çalışmasında DNP miktar tayin analizlerinde UV spektrofotometre kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında yapılan validasyon çalışmalarına ait elde edilen değer ve sonuçlar '6.1.1. Donepezil HCl için aseton: su (1:1 *h/h*) ortamında validasyon çalışması' ve '6.1.2. Donepezil HCl için PBS pH:6.8 ortamında validasyon çalışması' isimli bölümlerde tartışılmıştır.

6.1.1. Donepezil HCl için aseton: su (1:1 h/h) ortamında validasyon çalışması

Enkapsülasyon etkinliği (% EE) analizlerinin öncesinde, DNP için UV spektrofotometrik analiz yöntemi geliştirilmiştir. UV yöntemi, 325.0 nm'de ve kuvars küvet kullanılarak UV-160A / Shimadzu (Japonya) marka UV/VIS Spektrofotometresinde gerçekleştirilmiştir. % EE çalışmasında DNP için kullanılan UV spektrofotometrik miktar tayini yöntemi farklı ICH kriterleri açısından valide edilmiştir. Stok çözelti için, tam tartılan 25 mg DNP, 25 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve son konsantrasyon $1000.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olacak şekilde aseton: su (1:1, *h/h*) içinde çözündürülmüştür. Kalibrasyon eğrisi, stok çözeltinin $5.0-50.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyon ile elde edilmiştir. Çözeltiler üç set halinde hazırlanmış ve analizleri gerçekleştirilmiştir. En küçük kareler regresyon yöntemi ile hesaplanan doğrusal regresyon analizi ile doğrusallık verileri değerlendirilmiştir. Bu validasyon çalışmasının kesinliği, tekrarlanabilirlik (gün içi) ve ara kesinlik (günler arası) ile belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik, numunelerin aynı konsantrasyonda ve aynı gün içinde analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir. Ara kesinlik, farklı günlerdeki (3 gün) testler karşılaştırılarak incelenmiştir (Mendez, Steppe ve Schapoval, 2003). Her konsantrasyon için üç set çözelti ($15.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $25.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $35 \mu\text{g.mL}^{-1}$) hazırlanmış ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Doğruluk, işlemin başında çözeltilere eklenen bilinen miktarlarda DNP referans standardının geri kazanılmasıyla belirlenmiştir (A Alper Öztürk ve Merve Güven, 2019). Bu amaç doğrultusunda tam tartılmış 10 mg DNP, 100 mL'lik ölçülü balona aktarılmış ve son konsantrasyon $100.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ aseton: su (1:1, *h/h*) içinde çözündürülmüş. Bu hazırlanan çözeltiden doğruluk çalışması için $15.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $25.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $35.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmış ve analiz edilmiştir.

$50.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda DNP çözeltisinin UV aralığında (200-800 nm) taranmasıyla elde edilen maksimum absorbans 325.0 nm olarak bulunmuş (Bkz. Şekil 5.1. ve Şekil 5.3.) ve aseton:su (1:1, *h/h*) (Bkz. Şekil 5.4.), DNP içermeyen I-Blank kodlu boş formülasyon (Bkz. Şekil 5.4.) 325.0 nm'de herhangi bir absorbans vermemiştir. Bu sonuçlar yöntemin seçiciliğini kanıtlar niteliktedir (Rapalli vd., 2020).

Doğrusallık çalışması sonucunda elde edilen $y = 0.0186x + 0.0177$ olan regresyon denkleminin korelasyon katsayısı (R^2) değeri 0.9992 olarak hesaplanmıştır (Bkz. Şekil 5.2.). Literatür ve yasal kılavuzlar incelendiğinde R^2 değerinin 1'e yakın (kabul edilebilir minimum korelasyon katsayısı kriteri, $R^2 = 0.9900$ 'dan büyük olmalıdır) olması

gerekmekte ve bu değer yöntemin doğrusallığını kanıtlamaktadır (Borman ve Elder, 2017; Enggi vd., 2022; Mıgues vd., 2022). Bu bilgiler doğrultusunda, bu çalışmada 0.9992 olarak elde edilen R^2 değeri yöntemin doğrusallığını kanıtlamaktadır.

Üç farklı gün boyunca yapılan kesinlik çalışması sonucunda $15.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki DNP için 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda sırasıyla % 0.416, % 0.746 ve % 0.548 (Bkz. Tablo 5.2.); $25.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki DNP için 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda sırasıyla % 0.329, % 1.569 ve % 0.570 (Bkz. Tablo 5.3.); $35.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki DNP için 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda sırasıyla % 0.308, % 0.089 ve % 0.385 (Bkz. Tablo 5.4.); olarak elde edilen RSD (% , varyasyon katsayısı) değerleri %2'den düşüktür. DNP'nin her bir kesinlik seviyesinde üç tekrarlı çözeltisi için hesaplanan %RSD'nin %2'den az olduğu tespit edildiğinden, yöntemin kesin olduğu sonucuna varılmıştır (Abdelazim vd., 2022).

Doğruluk çalışmasında $15.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $25.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $35.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyon için sırasıyla % 100.124 ± 0.207 , % 99.770 ± 0.431 ve % 99.925 ± 0.387 olarak elde edilen geri kazanımlar yöntemin doğruluğunu kanıtlamaktadır (Bkz. Tablo 5.5.). LOD ve LOQ sırasıyla $1.275 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $3.863 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak elde edilmiştir ve uygunluğunu doğrusallıkta çalışılan en düşük konsantrasyonda daha düşük olması ile kanıtlamıştır (A Alper ztrk, Güven ve Yenilmez, 2018; Farid vd., 2022).

Tüm bu sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde DNP için aseton: su (1:1 *h/h*) ortamında seçici, basit ve ucuz bir yöntem geliştirildiği söylenebilir (A. Alper ztrk, Aygül ve şenel, 2019; A Alper ztrk, nver ve Kıyan, 2023).

6.1.2. Donepezil HCl için PBS pH:6.8 ortamında validasyon alışması

In vitro dissolüsyon analizlerinin öncesinde, DNP için spesifik ve seçici olan UV spektrofotometrik analiz yöntemi geliştirilmiştir. UV yönteminde, UV-160A / Shimadzu (Japonya) marka UV/VIS Spektrofotometresinde 315.0 nm'de ve kuvars küvet kullanılmıştır. Tez alışmasında DNP için kullanılan UV spektrofotometrik miktar tayini yöntemi doğrusallık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık ve seçicilik açısından valide edilmiştir. Stok zelti için, tam tartılan 25 mg DNP, 25 mL'lik balon jöjeye aktarılmış ve son konsantrasyon $1000.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olacak şekilde PBS pH 6.8 içinde çözündürülmüştür. Kalibrasyon eğrisi, stok çözeltinin $5.0-40.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyon

aralığında 6 farklı konsantrasyon ile elde edilmiştir. Çözeltiler üç set halinde hazırlanmış ve analizleri gerçekleştirilmiştir. En küçük kareler regresyon yöntemi ile hesaplanan doğrusal regresyon analizi ile doğrusallık verileri değerlendirilmiştir. Bu validasyon çalışmasının kesinliği, tekrarlanabilirlik (gün içi) ve ara kesinlik (günler arası) ile belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik, numunelerin aynı konsantrasyonda ve aynı gün içinde analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir. Ara kesinlik, farklı günlerdeki (3 gün) testler karşılaştırılarak incelenmiştir (Mendez, Steppe ve Schapoval, 2003). Her konsantrasyon için üç set çözelti ($15.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $25.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $35.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) hazırlanmış ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Doğruluk, işlemin başında çözeltilere eklenen bilinen miktarlarda DNP referans standardının geri kazanılmasıyla belirlenmiştir (A. Alper Öztürk ve Merve Güven, 2019). Bu amaç doğrultusunda tam tartılmış 10 mg DNP, 100 mL'lik ölçülü balona aktarılmış ve son konsantrasyon $100.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ PBS pH 6.8 içinde çözündürülmüştür. Bu hazırlanan çözeltilerden doğruluk çalışması için $15.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $25.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmış ve analiz edilmiştir.

$40.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda DNP çözeltilisinin UV aralığında (200-800 nm) taranmasıyla elde edilen maksimum absorbans 315.0 nm olarak bulunmuş (Bkz. Şekil 5.6. ve Şekil 5.8.) ve PBS pH 6.8 (Bkz. Şekil 5.9.), DNP içermeyen I-Blank kodlu boş formülasyon (Bkz. Şekil 5.10.) 315.0 nm 'de herhangi bir absorbans vermemiştir. Bu sonuçlar yöntemin seçiciliğini kanıtlar niteliktedir (Rapalli vd., 2020).

Doğrusallık çalışması sonucunda elde edilen $y = 0.0227x + 0.0253$ olan regresyon denkleminin korelasyon katsayısı (R^2) değeri 0.9991 olarak hesaplanmıştır (Bkz. Şekil 5.7). Literatür ve yasal kılavuzlar incelendiğinde R^2 değerinin 1'e yakın (kabul edilebilir minimum korelasyon katsayısı kriteri, $R^2 = 0.9900$ 'dan büyük olmalıdır) olması gerekmekte ve bu değer yöntemin doğrusallığını kanıtlamaktadır (Borman ve Elder, 2017; Enggi vd., 2022; Miguez vd., 2022). Bu bilgiler doğrultusunda, bu çalışmada 0.9991 olarak elde edilen R^2 değeri yöntemin doğrusallığını kanıtlamaktadır.

Üç farklı gün boyunca yapılan kesinlik çalışması sonucunda $15.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki DNP için 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda sırasıyla % 0.447, % 0.608 ve % 0.294 (Bkz. Tablo 5.7.); $25.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki DNP için 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda sırasıyla % 0.176, % 0.368 ve % 0.443 (Bkz. Tablo 5.8.); $35.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyondaki DNP için 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda sırasıyla % 0.192, % 0.192 ve % 0.126 (Bkz. Tablo 5.9.); olarak elde edilen RSD (% , varyasyon katsayısı)

değerleri %2'den düşüktür. DNP'nin her bir kesinlik seviyesinde üç tekrarlı çözeltisi için hesaplanan %RSD'nin %2'den az olduğu tespit edildiğinden, yöntemin kesin olduğu sonucuna varılmıştır (Abdelazim vd., 2022).

Doğruluk çalışmasında $15.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $25.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $35.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyon için sırasıyla % 100.306 ± 0.449 , % 99.850 ± 1.275 ve % 100.074 ± 0.126 olarak elde edilen geri kazanımlar yöntemin doğruluğunu kanıtlamaktadır (Bkz. Tablo 5.10.). LOD ve LOQ sırasıyla $1.220 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $3.694 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak elde edilmiştir ve uygunluğunu doğrusalılıkta çalışılan en düşük konsantrasyonda daha düşük olması ile kanıtlamıştır (A Alper Öztürk, Güven ve Yenilmez, 2018; Farid vd., 2022).

Tüm bu sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde DNP için PBS pH 6.8 ortamında seçici, basit ve ucuz bir yöntem geliştirildiği söylenebilir (A Alper Öztürk, Aygül ve Şenel 2019; A Alper Öztürk, Ünver ve Kıyan, 2023).

6.2. Nanopartikül Formülasyonların Hazırlanması

Bu çalışmada hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonları hazırlamak PLGA (Poli Laktik-ko-Glikolik Asit) kullanılmış ve hazırlama yöntemi olarak çift emülsifikasyon çözücü uçurma tekniği tercih edilmiştir. Bu teknik, aynı zamanda "emülsiyon emülsiyonları" olarak da isimlendirilmekte olup, dağılmış fazın damlacıklarının kendilerinden bir ya da daha çok sayıda daha küçük dağılmış damlacıklar içerdiği kompleks sistemlerdir. Çift emülsifikasyon tekniği hem hidrofobik hem de hidrofilik ilaçları, kozmetik ürünleri, gıdaları ve protein gibi özel ürünlerin enkapsülasyonuna izin vermektedir. Çift emülsifikasyon tekniği, klasik emülsiyonlarda dış sulu faza hızlı etkin madde göçü nedeniyle düşük enkapsülasyon etkinliğinden muzdarip DNP gibi hidrofilik etkin maddelerin enkapsülasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Çift emülsifikasyon tekniğinde, bir lipofilik çözücünün suyla karışabilen bir yarı polar çözücüyle yer değiştirmesi, yüzey üzerinde polimerin birikmesine neden olur. Çözücü olmayan maddenin hızlı yayılması, yüzeydeki bir artışa ve böylece küçük organik çözücü damlacıklarının oluşmasına neden olan iki faz arasındaki ara yüzey gerilimini azaltır. Bu çok oldukça basit ve ekonomik bir yöntem olduğu için bu çalışmada tercih edilmiştir (Iqbal vd. 2015), (BBTS Mishra, Patel ve Tiwari, 2010).

Bu tez çalışması kapsamında sulu faz içeriğinde bulunan PVA konsantrasyonun ve prob sonikasyon süresinin nanopartikül özellikleri üzerine etkisini incelemek için 9 adet Blank ve 9 adet DNP yüklü formülasyon hazırlanmıştır. A (A-Blank ve A-DNP), D (D-Blank ve D-DNP) ve G (G-Blank ve G-DNP) kodlu formülasyonlarda sulu fazda bulunana PVA konsantrasyonu %0.5 (*a/h*), %0.75 (*a/h*) ve %1.0 (*a/h*) olup hazırlanmalarında 60 saniye prob sonikasyon koşulu kullanılmıştır. B (B-Blank ve B-DNP), E (E-Blank ve E-DNP) ve H (H-Blank ve H-DNP) kodlu formülasyonlarda sulu fazda bulunana PVA konsantrasyonu %0.5 (*a/h*), %0.75 (*a/h*) ve %1.0 (*a/h*) olup hazırlanmalarında 90 saniye prob sonikasyon koşulu kullanılmıştır. C (C-Blank ve C-DNP), F (F-Blank ve F-DNP) ve I (I-Blank ve I-DNP) kodlu formülasyonlarda sulu fazda bulunana PVA konsantrasyonu %0.5 (*a/h*), %0.75 (*a/h*) ve %1.0 (*a/h*) olup hazırlanmalarında 120 saniye prob sonikasyon koşulu kullanılmıştır. Formülasyonların hazırlanması ardından parçacık boyut, parçacık boyut dağılımı ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüş ve optimum formülasyon hazırlanmıştır.

6.3. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu

6.3.1. Parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı ve zeta potansiyel

Parçacık boyutu analizleri medikal alanda kullanılacak nanopartiküllerin en önemli iki özelliğidir, çünkü bu iki özellik ilaç salım oranı, muko-adezyon, biyolojik dağılım, hücresel alım gibi özellikleri yakından etkilemektedir. Terapötik etkiyi ve klinik sonuçları iyi hale getirmek açısından PDI değeri düşük ya da başka bir deyişle dar boyut dağılımına sahip nanopartiküllerin üretimi oldukça kritiktir (A. A. Öztürk, Gündüz ve Ozisik, 2018).

Parçacık boyut analizlerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda, A-Blank, A-DNP, B-Blank, B-DNP, C-Blank, C-DNP, D-Blank, D-DNP, E-Blank, E-DNP, F-Blank, F-DNP, G-Blank, G-DNP, H-Blank, H-DNP, I-Blank, I-DNP kodlu formülasyonlar için sırasıyla 177.93 nm \pm 2.84, 182.70 nm \pm 6.08, 173.50 nm \pm 3.28, 179.67 nm \pm 0.93, 170.43 nm \pm 0.35, 175.93 nm \pm 3.89, 159.87 nm \pm 2.20, 182.23 nm \pm 1.99, 151.53 nm \pm 1.50, 167.03 nm \pm 0.67, 145.57 nm \pm 2.54, 154.90 nm \pm 2.23, 150.37 nm \pm 3.66, 153.73 nm \pm 1.97, 142.17 nm \pm 4.88, 145.47 nm \pm 3.62, 134.10 nm \pm 2.19 ve 136.37 nm \pm 0.93 olarak elde edilmiştir (Bkz. Tablo 5.11.). Parçacık boyutu analiz sonuçları incelendiğinde öncelikle göze çarpan nokta, DNP yüklenmiş nanopartikül formülasyonlarının blank nanopartikül formülasyonlarından büyük bir parçacık boyutuna sahip olmasıdır.

Literatürde bulunan önceki çalışmalar incelendiğinde, etkin madde yüklü nanopartikül formülasyonlarının parçacık boyutunun blank formülasyonlardan daha büyük olabileceği bildirilmiştir. Bu durum polimer gibi büyük moleküllü maddelerin etkin maddeyi enkapsülleyerek nanopartikülü oluşturması ve dolayısıyla hazırlanan nanopartikül partikül boyutunda büyüme olabilmesi şeklinde aydınlatılmıştır (Ekambaram ve Sathali, 2011; A. Alper Öztürk, Yenilmez ve Yazan, 2015).

Daha önce belirtildiği üzere bu tez çalışmasının ana amaçlarından biri sulu faz içeriğinde bulunan PVA konsantrasyonun ve prob sonikasyon süresinin nanopartikül formülasyonlarının parçacık boyut üzerine etkisinin araştırılmasıdır. Aynı PVA konsantrasyonlarının (%0.5 *a/h*) kullanıldığı A, B ve C kodlu formülasyonlarda hazırlama koşulu olarak sırasıyla 60 saniye, 90 saniye ve 120 saniye prob sonikasyon tercih edilmiştir. Parçacık boyutu sonuçları incelendiğinde hem blank hem de DNP yüklü formülasyonlarda parçacık boyut sıralaması $A > B > C$ olarak elde edilmiştir. Aynı PVA konsantrasyonlarının (%0.75 *a/h*) kullanıldığı D, E ve F kodlu formülasyonlarda hazırlama koşulu olarak sırasıyla 60 saniye, 90 saniye ve 120 saniye prob sonikasyon tercih edilmiştir. Parçacık boyutu sonuçları incelendiğinde hem blank hem de DNP yüklü formülasyonlarda parçacık boyut sıralaması $D > E > F$ olarak elde edilmiştir. Aynı PVA konsantrasyonlarının (%1.0 *a/h*) kullanıldığı G, H ve I kodlu formülasyonlarda hazırlama koşulu olarak sırasıyla 60 saniye, 90 saniye ve 120 saniye prob sonikasyon tercih edilmiştir. Parçacık boyutu sonuçları incelendiğinde hem blank hem de DNP yüklü formülasyonlarda parçacık boyut sıralaması $G > H > I$ olarak elde edilmiştir. En küçük parçacık boyutu en yüksek PVA konsantrasyonu (%1.0 *a/h*) ve en yüksek prob sonikasyon süresine (120 saniye) sahip I-Blank ve I-DNP kodlu formülasyonda elde edilmiştir. Sonuç olarak hazırlama sırasında yüzey etkin madde olarak kullanılan PVA'nın artan konsantrasyonlarında ve artan prob sonikasyon süresinde parçacık boyutunda azalma tespit edilmiştir. Bu durum nanopartiküllerin hazırlaması sırasında sulu fazda yüzey etkin maddenin varlığıyla yüzey gerilimini azaldığı ve daha küçük parçacıkların üretimi sırasında yeni gelişen yüzeylerin daha kolay stabilize edildiği şeklinde yorumlanabilmektedir (Şenel ve Öztürk, 2019), (Zirak ve Pezeshki, 2015). Bu tez çalışmasında elde edilen bu bulguları destekleyen sonuçlar literatürde mevcuttur (Koppolu vd., 2010; Mainardes ve Evangelista, 2005).

Parçacık boyut dağılımı (PDI) sonuçları A-Blank, A-DNP, B-Blank, B-DNP, C-Blank, C-DNP, D-Blank, D-DNP, E-Blank, E-DNP, F-Blank, F-DNP, G-Blank, G-DNP, H-Blank, H-DNP, I-Blank, I-DNP kodlu formülasyonlar için sırasıyla 0.117 ± 0.018 , 0.120 ± 0.018 , 0.112 ± 0.043 , 0.108 ± 0.006 , 0.110 ± 0.005 , 0.106 ± 0.020 , 0.143 ± 0.007 , 0.216 ± 0.008 , 0.129 ± 0.032 , 0.152 ± 0.014 , 0.132 ± 0.009 , 0.109 ± 0.045 , 0.159 ± 0.038 , 0.147 ± 0.034 , 0.145 ± 0.007 , 0.133 ± 0.010 , 0.135 ± 0.026 ve 0.122 ± 0.011 olarak elde edilmiştir (Bkz. Tablo 5.11). Hazırlanan nanopartiküllerin monodispersliğini gösteren PDI değerlerinin 0.3'ten küçük olmasını optimum değer olarak kabul etmektedir fakat 0.5'ten küçük değerler de kabul edilebilir olduğu literatürde bildirilmiştir (Büyükköroğlu vd., 2016). Literatürde verilen bilgi doğrultusunda, sonuç olarak bu tez kapsamında hazırlanan tüm PLGA nanopartiküllerinin kaliteli ve monodispers olarak hazırlandığı sonucuna varılabilir.

A-Blank, A-DNP, B-Blank, B-DNP, C-Blank, C-DNP, D-Blank, D-DNP, E-Blank, E-DNP, F-Blank, F-DNP, G-Blank, G-DNP, H-Blank, H-DNP, I-Blank ve I-DNP kodlu formülasyonlar için sırasıyla Şekil 5.13., Şekil 5.14., Şekil 5.15., Şekil 5.16., Şekil 5.17., Şekil 5.18., Şekil 5.19., Şekil 5.20., Şekil 5.21., Şekil 5.22., Şekil 5.23., Şekil 5.24., Şekil 5.25., Şekil 5.26., Şekil 5.27., Şekil 5.28., Şekil 5.29. ve Şekil 5.30.'da sunulan Zetasizer Nano ZS cihazından alınan parçacık boyut dağılım raporları ise tez çalışmasında hazırlanan formülasyonların monodispersliğini kanıtlar niteliktedir.

Nanopartiküllerin boyutu, nanosistemlerin kan beyin bariyeri gibi belirli biyolojik engelleri geçip geçemeyeceğini belirleyen önemli bir faktördür. Yapılan bir çalışmada hazırlanan tüm nanopartiküllerin parçacık boyutu 250 nm'den daha düşük olarak elde edilmiş ve bu boyutun kan beyin bariyeri boyunca geçişi sağlayan önemli bir özellik olduğu sonucuna varılmıştır (Pinheiro vd., 2020). Başka bir çalışmada ise alzheimer gibi hastalıklarda 150 nm'den daha düşük parçacık boyutuna sahip sistemlerin uygun olduğu söylenmiştir (Revdekar ve Shende, 2021). Bir diğer çalışmada ise alzheimer tedavisi için hazırlanan nanosistemin parçacık boyutu 121 nm olarak belirtilmiştir (Madhu, Komala ve Pandian, 2021). Sonuç olarak literatürde kan beyin bariyerinin geçilebilmesi için düşük parçacık boyutuna sahip nanosistemlerin kullanılması vurgulanmıştır, bu sebeple bu proje kapsamında en düşük parçacık boyutuna sahip I-DNP kodlu formülasyon optimum formülasyon olarak seçilmiştir.

Bu tez çalışmasında hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonları için negatif zeta potansiyel sonuçları elde edilmiştir. Zeta potansiyel sonuçları A-Blank, A-DNP, B-Blank, B-DNP, C-Blank, C-DNP, D-Blank, D-DNP, E-Blank, E-DNP, F-Blank, F-DNP, G-Blank, G-DNP, H-Blank, H-DNP, I-Blank, I-DNP kodlu formülasyonlar için sırasıyla -13.53 mV \pm 0.51, -13.16 mV \pm 3.21, -14.30 mV \pm 0.44, -14.63 mV \pm 0.81, -16.13 mV \pm 3.84, -15.46 mV \pm 0.92, -14.33 mV \pm 1.32, -11.50 mV \pm 0.62, -13.57 mV \pm 1.63, -11.33 mV \pm 0.55, -12.53 mV \pm 1.12, -11.80 mV \pm 2.69, -19.63 mV \pm 1.17, -23.39 mV \pm 0.30, -17.83 mV \pm 5.69, -21.30 mV \pm 0.61, -18.25 mV \pm 0.21 ve -24.17 mV \pm 1.21 olarak elde edilmiştir (Bkz. Tablo 5.12). A-Blank, A-DNP, B-Blank, B-DNP, C-Blank, C-DNP, D-Blank, D-DNP, E-Blank, E-DNP, F-Blank, F-DNP, G-Blank, G-DNP, H-Blank, H-DNP, I-Blank ve I-DNP kodlu formülasyonlar için sırasıyla Şekil 5.32., Şekil 5.33., Şekil 5.34., Şekil 5.35., Şekil 5.36., Şekil 5.37., Şekil 5.38., Şekil 5.39., Şekil 5.40., Şekil 5.41., Şekil 5.42., Şekil 5.43., Şekil 5.44., Şekil 5.45., Şekil 5.46., Şekil 5.47., Şekil 5.48. ve Şekil 5.49.'da sunulan Zetasizer Nano ZS cihazından alınan zeta potansiyel sonuç raporları negatif zeta potansiyel dağılımını kanıtlar niteliktedir.

Nötr ortamdaki PLGA, terminal karboksil gruplarından dolayı negatif yüzey potansiyeline sahiptir ve bu durum hazırlanan formülasyonlarda elde edilen negatif zeta potansiyeli değerlerini açıklar niteliktedir (Lima vd., 2018). Hazırlanan nanosistemlerde zeta potansiyel değeri +/- 30 mV olan bir koloidal sistem, kararlı bir sistem olarak kabul edilmektedir (Öztürk ve Aygül, 2020). Bir nanosistemde elde edilen -5.0 ve -15.0 mV arasındaki zeta potansiyel değerleri nanosistemin flokülasyonun sınır bölgesinde olduğunu göstermekte olup ve -5.0 ile -3.0 mV arasındaki değerler bir nanosistem için ise maksimum flokülasyon bölgesi olduğu daha önce bildirilmiştir (Müller, Mäder ve Gohla, 2000). Bu bilgiye göre optimum olarak seçilen I-DNP kodlu formülasyonun -24.17 mV \pm 1.21 olarak elde edilen zeta potansiyel değeri sayesinde kararlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

6.3.2. Kriyoprotektan etki ve saklama koşullarının belirlenmesi

Liyofilizasyon (dondurarak kurutma) farmasötik ürünlerin ve nanosistemlerin kararlılığını arttırmak ve saklanmalarını kolaylaştırmak için sıklıkla tercih edilir (Martín-Banderas vd., 2012; Öztürk vd., 2019). Nanopartikül formülasyonlarının liyofilizasyonunda dondurma ve kurutma aşamalarında parçacık boyutlarının

yükselebilmek riski bulunmaktadır, liyofilizasyon işlemine geçilmeden önce hazırlanan nanopartikül formülasyonu içine kriyoprotektan adı verilen bazı özel ajanların eklenmesi gerekmektedir. En çok kullanılan kriyoprotektan ajanlar trehaloz, sükröz, glukoz ve mannitol gibi şeker türevleridir (Abdelwahed vd., 2006).

Bu tez kapsamında optimum olarak seçilen I-DNP kodlu formülasyonun dondurma ve kurutma aşamalarından sonra parçacık boyutunun değişimini önlemek için farklı konsantrasyonlarda trehaloz çözeltisiyle bir çalışma planlanmıştır. Bu çalışma kapsamında taze hazırlanan ve santrifüje edilen partiküllerin yıkama proseslerinin ardından üzerine %5.0 (*a/h*) konsantrasyonunda hazırlanan trehaloz çözeltisinden 1 mL eklenip vortekslenmiş ve 5 eşit kısma ayrılmış ve bu tüplere sırasıyla %5.0 *a/h* konsantrasyondaki trehaloz çözeltisinden 1. tüpe 200 µL, 2. tüpe 300 µL, 3. tüpe 500 µL, 4. tüpe 600 µL, 5. tüpe 800 µL eklenmiştir. Tüm tüpler -20°C'de buzdolabında dondurulmasının ardından liyofilizatörde liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon sonucu, liyofilize toz nanopartikül formülasyonlarının üzerine 1 mL distile su eklenip vortekslenerek dağıtılmıştır. Her tüp için parçacık boyutu, PDI ve zeta potansiyeli ölçülmüştür. 200 µL trehaloz çözeltisi, 300 µL trehaloz çözeltisi, 500 µL trehaloz çözeltisi, 600 µL trehaloz çözeltisi ve 800 µL trehaloz çözeltisi eklenen tüplerde liyofilizasyon sonrası elde edilen parçacık boyutları sırasıyla 165.33 nm ± 6.83, 163.77 nm ± 0.97, 152.67 nm ± 1.16, 136.90 nm ± 2.74 ve 135.53 nm ± 1.25 olarak elde edilmiştir (Bkz. Tablo 5.13. ve Şekil 5.50.). Bu sonuçlar doğrultusunda 800 µL trehaloz çözeltisinin dondurarak kurutma işleminden sonra parçacık boyutunun sabit tutulması için yeterli olduğuna karar verilmiştir. 800 µL trehaloz çözeltisinin eklendiği analizde parçacık boyut dağılımı değerlerinin (Bkz. Tablo 5.13. ve Şekil 5.51.) ve zeta potansiyel değerlerinin (Bkz. Tablo 5.14. ve Şekil 5.52.) taze formülasyonun değerlerine benzer olması 800 µL trehaloz çözeltisinin kullanılmasının taze formülasyonun özelliklerinin değişmemesi için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.

6.3.3. Gastrointestinal stabilite değerlendirme

Kısa süreli gastrointestinal kararlılık ve *In vitro* salım profillerinin daha iyi anlaşılması için tez kapsamında optimum olarak seçilen I-DNP kodlu formülasyonun stabilitesi farklı gastrointestinal ortamlarda 37 °C'de analiz edilmiştir. Bu analizler 24 saat

boyunca pH 1.2 HCl tamponu, pH 6.8 fosfat tamponu, pH 7.4 fosfat tamponu ve distile su içinde gerçekleştirilmiştir.

Hidrolitik bozunabilir polimerlerden oluşan nanopartiküllerin zamanla bozunduğu bilinmektedir. Sıcaklık ve pH'ın ilaçların uzun süreli stabilitesi üzerinde çok önemli etkileri olduğu bildirilmiştir (A. Alper Öztürk, Banderas vd., 2018). Yapılan analizler sonuçları incelendiğinde (Bkz. Tablo 5.15 ve Şekil 5.53.) pH 6.8 fosfat tamponu, pH 7.4 fosfat tamponu ve distile su içinde bulunan nanopartiküllerin parçacık boyutlarının daha yavaş ve az arttığı tespit edilmiştir. Öte yandan pH 1.2 HCl tamponunda bulunan naopartiküllerin parçacık boyutu sıfırıncı zamana göre oldukça artmış ve 24. saatin sonunda $514.8 \text{ nm} \pm 20.3$ değerine ulaşmıştır. Literatür incelendiğinde bu çalışmada hazırlanan I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonunun pH 1.2 HCl tamponunda hızlı degradasyonla ve diğer ortamlarda yavaş degradasyonla parçalandığı sonucuna varılabilir (A. Alper Öztürk, Yenilmez ve Özarda, 2019).(Öztürk vd., 2019).

6.3.4. Enkapsülasyon etkinliği

Enkapsülasyon etkinliği (% EE) hazırlanan naopartikül formülasyonları için önemli bir kriterdir çünkü daha yüksek enkapsülasyon & yükleme etkinliği, belirli bir doz ilaç için daha düşük miktarda nanopartikülün hastaya uygulanma avantajını sağlar. Bu tez kapsamında hazırlanan I-DNP kodlu formülasyonunun enkapsülasyon etkinliği 69.22 ± 4.84 olarak elde edilmiştir. Literatüre göre bu sonucun oral uygulama için ideal olduğu söylenebilir (Martín-Banderas vd. 2012; Panyam vd., 2004).

6.3.5. *In vitro* dissolüsyon

DNP ile ilgili literatüre girmiş daha önceki çalışmalarda pH 6.8 fosfat tamponu ortamının salım & dissolüsyon ortamı olarak seçildiği görülmüştür (Alshetaili vd., 2021; AnjiReddy ve Karpagam, 2021). Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen gastrointestinal stabilite değerlendirme çalışması ve literatür bilgisi ışığından dissolüsyon testinin pH 6.8 ortamında yapılmasına karar verilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında yapılan dissolüsyon testinde saf DNP, pH 6.8 PBS ortamında birinci saatin sonunda 79.3 ± 6.8 , ikinci saatin sonunda ise 97.6 ± 2.3 salım

oranı göstermiştir. Üçüncü saatin sonunda 99.8 ± 0.1 salım oranı ile DNP'nin neredeyse tamamı pH 6.8 PBS ortamında salınmıştır (Bkz. Tablo 5.16 ve Şekil 5.54). DNP içeren I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonundan DNP salım oranlarına bakıldığında 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12 ve 24. saatlerin sonunda sırasıyla 19.7 ± 3.5 , 22.6 ± 6.2 , 34.6 ± 3.4 , 40.3 ± 2.9 , 47.4 ± 3.1 , 52.6 ± 2.6 , 54.2 ± 4.8 , 60.4 ± 2.7 , 68.4 ± 4.5 ve 83.7 ± 5.2 değerleri elde edilmiştir (Bkz. Tablo 5.16 ve Şekil 5.54). Literatür incelendiğinde I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonundan DNP salımı saf DNP ile karşılaştırıldığında, I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonun daha yavaş ve 24 saatlik bir uzatılmış salım yaptığı oldukça açıktır (Bulut ve Şanlı, 2014; Raman, Khan ve Mahmood, 2022; Sutthapitaksakul, Dass ve Sriamornsak, 2021).

6.3.6. Salım kinetiği

Dissolüsyon testi sonucunda elde edilen salım verileri ve kümülatif salım profilleri belirlendikten sonra, salım kinetiğinin aydınlatılması açısından çok önemli ve popüler dört kriteri belirlemek için tüm dissolüsyon verileri veriler DDSolver programına aktarılmıştır. Bu önemli dört kriter korelasyon katsayısı (r^2), düzeltilmiş korelasyon katsayısı ($r^2_{adjusted}$), Model seçme kriteri (MSC) ve Akaike bilgi kriteri (AIC)'dir. Değerlendirmede en yüksek r^2 , $r^2_{adjusted}$, MSC değeri ile en düşük AIC değeri baz alınmıştır. Programda Sıfıncı-derece, Sıfıncı-derece (T_{lag}), Sıfıncı derece (F_0), Birinci-derece, Birinci-derece (T_{lag}), Birinci-derece (F_{max}), Birinci-derece (T_{lag} ve F_{max}), Higuchi, Higuchi (T_{lag}), Higuchi (F_0), Korsmeyer-Peppas, Korsmeyer-Peppas (T_{lag}), Korsmeyer-Peppas (F_0), Hixson-Crowell, Hixson-Crowell (T_{lag}), Hopfenberg, Hopfenberg (T_{lag}), Baker-Lonsdale, Baker-Lonsdale (T_{lag}), Peppas-Sahlin, Peppas-Sahlin 1 (T_{lag}), Peppas-Sahlin 2, Peppas-Sahlin 2 (T_{lag}), Quadratic, Quadratic (T_{lag}), Weibull 1, Weibull 2, Weibull 3 ve Weibull 4 modelleri incelenmiştir (Y. Zhang vd., 2010; Zuo vd., 2014).

Tablo 5.17. incelendiğinde ve kriterler göz önüne alındığında I-DNP kodlu formülasyondan DNP salımının Weibull modeline uygun olduğu gözlenmiştir. Literatür incelendiğinde Weibull modelinin matris tipte hazırlanmış nano ilaç taşıyıcı sistemler için oldukça uygun bir model olduğu bilgisine ulaşılmıştır (Dash vd., 2010; Goldsmith, Randall ve Ross, 1978; Langenbucher, 1972). Tüm kinetik sonuçları incelendiğinde r^2 , $r^2_{adjusted}$, MSC ve AIC değerleri Weibull modeli için en yüksek bulunmuştur fakat, bazı

modeller için elde edilen değerler Weibull modeli kadar yüksek olmasada yakın olarak elde edilmiştir. Farklı bir deyişle bazı modeller ve Weibull modelinde yüksek korelasyon gözlenmiştir (Bkz. Tablo 5.17. ve Şekil 5.55.- Şekil 5.81). Böyle bir durumun olabileceği daha önce literatürde bildirilmiştir. (A. Alper Öztürk ve Kıyan, 2020; Yang vd., 2019). Sonuç olarak elde edilen tüm veriler ve literatür incelemesi sonucu DNP'nin I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonundan salınması ağırlıklı olarak yalnızca bir mekanizma tarafından değil, fickian (saf difüzyon fenomeni) ve fickian olmayan salımın (ağlar arasındaki polimer zincirinin gevşemesinden dolayı) birleşik bir mekanizması şeklinde olduğu söylenebilir (Yang vd., 2019).

6.4. Katı Hal Karakterizasyonları

6.4.1. Termal analiz

Bu tez çalışması kapsamında saf DNP, PLGA, I-Blank kodlu boş formülasyon, DNP yüklü I-DNP kodlu formülasyon ve fiziksel karışım için termal analiz incelemesi yapılmış ve DSC eğrileri/termogramları elde edilmiştir (Bkz. Şekil 5.82.-5.86). Saf DNP sırasıyla 133.69°C ve 198.06°C'de iki erime piki sergilemiştir. Literatür incelendiğinde bu iki karakteristik endotermik erime piki DNP için uygundur (Alshetailei vd., 2021). I-Blank (Bkz. Şekil 5.83.) ve I-DNP (Bkz. Şekil 5.84) kodlu formülasyonlarda endotermik tepe noktası /erime noktası sırasıyla 43.48°C ve 44.39°C'de gözlenmiştir, bu pikler PLGA'nın camsı geçiş sıcaklığının bir göstergesidir (A. Alper Öztürk ve Kıymılıoğlu, 2019). NP yüklü I-DNP kodlu formülasyonun termogramında ilaç kristalliğindeki olası herhangi bir düşüş ve/veya erimiş taşıyıcıda ilacın çözülmesi nedeniyle net bir tepe noktası gözlenmemiştir (Bkz. Şekil 5.85.). Fiziksel karışımında ise hem DNP'nin karakteristik erime pikleri hem de PLGA'nın camsı geçiş sıcaklığına ait pikler gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 5.86). I-DNP kodlu formülasyonun termogramında DNP'nin erime tepe noktalarının kaybolması, DNP'nin muhtemelen amorf durumda kapsüllendiğini, polimerik yapı içinde moleküler olarak dağıldığını ve formülasyon hazırlama prosesinde kimyasal bir değişikliğin olmadığını göstermiştir (A. A. Öztürk, Çınar ve Yenilmez, 2019; A Alper Öztürk, Merve Güven vd., 2018).

6.4.2. FT-IR analizleri

Bu tez çalışması kapsamında saf DNP, PLGA, I-Blank kodlu boş formülasyon, DNP yüklü I-DNP kodlu formülasyon ve fiziksel karışım için FT-IR analiz incelmeleri yapılmış ve FT-IR spektrumları elde edilmiştir (Bkz. Şekil 5.87.-5.91.). DNP'nin FT-IR spektrumunda 1681.93 cm^{-1} ve 1313.5 cm^{-1} 'de gözlemlenen yoğun keskin absorpsiyon bandı, C=O'nun karakteristik tepe noktasına ve C-N gerilme titreşiminin bir göstergesidir (Bkz. Şekil 5.87.) (T. Liu vd., 2019). PLGA, I-Blank ve I-DNP kodlu formülasyonlarda, $1450-1200\text{ cm}^{-1}$ arasındaki orta yoğunluklu bantlar, sırasıyla PLGA polimerinden asimetrik ve simetrik C-C(=O)-O uzantılarına aittir. Ayrıca formülasyonlarda sırasıyla $1200-1050\text{ cm}^{-1}$ ve $1450-850\text{ cm}^{-1}$ aralığında C-O gerilmeleri ve C-H bükülmeleri gözlemlenmiştir. Bu gerilmeler ve bükülmeler PLGA'ya atfedilebilir niteliktedir (G. Singh vd. 2014). I-DNP kodlu formülasyonun FT-IR spektrumlarında yeni ve farklı bir pik olmaması nedeniyle PLGA ve DNP arasında hiçbir kimyasal etkileşim bulunmadığı şeklinde yorumlanabilir. I-DNP kodlu formülasyonda karakteristik DNP piklerinin yoğunluğunun azaldığı ve sonuç olarak DNP'nin kristalliğinin azaldığı gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 5.87). Sonuç olarak tüm FT-IR analizleri toplu olarak değerlendirildiğinde, DNP'nin formülasyon içinde moleküler olarak dağıldığını ve DSC sonuçlarını destekleyen polimerik yapı içinde kapsülendiğini göstermiştir (A.A. Öztürk vd., 2017; A.A. Öztürk, Yenilmez ve Yazan, 2019; Ahmet A Öztürk vd., 2020).

6.4.3. $^1\text{H-NMR}$ analizleri

Bu tez çalışması kapsamında saf DNP, PLGA, I-Blank kodlu boş formülasyon, DNP yüklü I-DNP kodlu formülasyon ve fiziksel karışım için $^1\text{H-NMR}$ analiz incelmeleri yapılmış ve $^1\text{H-NMR}$ spektrumları elde edilmiştir (Bkz. Şekil 5.92-5.96). DNP ile yapılan bir çalışmada DNP'e ait spesifik pikler $7.43-7.64\text{ ppm}$ aralığında, 7.09 ppm , 6.82 ppm , 3.95 ppm , 3.82 ppm , 3.66 ppm , $2.65-3.00\text{ ppm}$ aralığında, $1.84-2.06\text{ ppm}$ aralığında ve $1.54-1.85\text{ ppm}$ aralığında gözlemlendiği vurgulanmıştır (Saira ve Nath, 2013). DNP'e ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu incelendiğinde literatür ile uygun bulunmuştur (Bkz. Şekil 5.92.). Bu tez çalışmasında etkin maddesiz hazırlanan blank formülasyonun (I-Blank) $^1\text{H-NMR}$ analizinden elde edilen spektrumun, saf polimerin spektrumu ile benzerlik göstermiş ve DNP'e ait spesifik piklerin geldiği ppm noktaları ve aralıklarında bir pike rastlanmamıştır (Öztürk vd., 2019). Etkin maddeli hazırlanan I-DNP kodlu

formülasyonda DNP'e ait karakteristik pikler gözlenmiş fakat yoğunluk azalmıştır (Bkz. Şekil 5.95.). DNP'nin moleküler dağılımı ve konsantrasyon ile orantılı olarak az yoğunluk karakteristik ppm değerlerinde pik vermesi DNP'nin moleküler olarak polimerik yapının içinde dağıldığı düşünülmüştür. Bu durum aynı zamanda DNP'nin başarılı bir şekilde NP'lere yüklendiği şeklinde yorumlanmıştır (Şenel ve Öztürk, 2019).

6.5. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Enzimler biyolojik sistemlerin çok önemli kimyasallarıdır. Biyolojik sistemlerde hemen hemen tüm biyokimyasal reaksiyonlarda katalizör görevi görürler ve fizyolojik sürecin meydana gelmesini sağlarlar (Ketani ve Akbalık, 2015). İnhibitörler, biyolojik olarak önemli kimyasal olan enzimlerin in vitro ya da in vivo aktivitelerini azaltan ya da tamamen yok eden maddelerdir. Fizyolojik sistemlerde enzim moleküllerinin inhibisyona uğraması biyolojik sistemlerin en önemli kontrol mekanizmasından biridir. Bazı kimyasallar, ilaç etkin maddeleri ve zehirli bileşikler biyolojik sistemlerdeki etkilerini bu mekanizma ile gerçekleştirir (Dilek, Özçelik ve Yıldırım, 2019). Birçok fizyolojik şartta ilaç olarak etki etmeleri ve ilaçların bir kısmını oluşturması enzim inhibitörlerinin en önemli özelliklerinden birisidir (Copeland, Harpel ve Tummino, 2007).

Önemli bir nörodejeneratif hastalık olan alzheimer hastalığı, kolinerjik sistemdeki eksiklikler ile β - amiloit'in nörofibriler ağlar ve amiloit plaklar formunda birikimi karakterizedir. Kolinerjik sistemin bellek ve öğrenme süreçlerinin üzerindeki etkisi nedeniyle antikolinerjik yaklaşım, anti-Alzheimer ilaçlarının araştırılmasında ve geliştirilmesinde önem arz etmektedir. Kolinesteraz inhibitör ilaçlar, asetilkolini hidroliz eden asetilkolinesteraz (AChE, EC 3.1.1.7) enzimini inhibe ederek kolinerjik iletimi artırmaktadırlar. Hem AChE hem de bütirikolinesteraz (BChE, EC 3.1.1.8) enzimi plaklarının oluşumunun ilk evreleri boyunca oluşan β - amiloit agregasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Bu nedenle AChE ve BChE inhibisyonu, beyinde β - amiloit birikimini azaltmak ve asetilkolin kullanımını arttırmak suretiyle Alzheimer hastalığının etkili tedavisinde hedeftir (Anand ve Singh, 2013; Poyraz vd., 2021).

Bu tez hazırlanan I-DNP kodlu optimum formülasyonun Alzheimer hastalığında kullanılma potansiyelinin araştırılması için öncelikle AChE inhibitör etki ve BChE inhibitör etki çalışmaları yapılmıştır. Saf DNP ve DNP yüklü I-DNP kodlu formülasyon $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda sırasıyla $\%93.67 \pm 1.21$ ve $\%96.88 \pm 0.16$ AChE inhibitör

etki göstermiştir (Bkz. Tablo 5.18.) Saf DNP ve DNP yüklü I-DNP kodlu formülasyon 400 µg.mL⁻¹ konsantrasyonda sırasıyla %89.50 ± 0.04 ve %82.96 ± 0.57 BChE inhibitör etki göstermiştir (Bkz. Tablo 5.19.). Tüm yapılan çalışma anti-Alzheimer aktivite sonuçlarına göre asetilkolinesteraz inhibitörü olan DNP ile karşılaştırıldığında I-DNP'nin kuvvetli anti-AChE ve anti-BChE aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu tez kapsamında AChE ve BChE inhibitör aktivite testleri sonrası etkinlik elde edildikten sonra *in vivo* anjiyogenez çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Anjiyogenez literatüre 17. yüzyılın sonunda İngiliz cerrah Dr. John Hunter tarafından “mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının oluşumu” olarak tanımlanmasıyla beraber girmiştir (Ribatti vd., 2001). Anjiyogenez mekanizması insan vücudunda fizyolojik ve patolojik olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Sağlıklı bir kişinin vücudunda embriyogenezde, yara iyileşme sürecinde ve kadın üreme sisteminde fizyolojik anjiyogenez gözlenir. Patolojik anjiyogenez ise psöriyazis, ateroskleroz, kronik enflamasyon, romatoid artrit, enflamatuvar bağırsak sendromu, tümör gelişimi ve metastazda ayrıca yaşa bağlı diyabetik retinopati ve maküler dejenerasyon gibi kardiyovasküler ve göz hastalıklarda ortaya çıkabilmektedir (Liekens, De Clercq ve Neyts, 2001; Özgürtaş, 2009; Ribatti, 2005, 2008, 2016; Ribatti vd., 2001).

Neovaskülarizasyon olarak bilinen anjiyogenez önceden var olan kan damarlarından endotel hücrelerinin aktivasyonu, adezyonu, göçü ve çoğalması gibi aşamalardan oluşan kompleks bir süreçtir (Helmlinger vd., 2000; Paper vd., 2005). Anjiyogeneze bağlı patolojiler yeniden damarlanmanın oluşup oluşmamasına göre neo-plastik hastalıklar ve neo-plastik olmayan hastalıklar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Neo-plastik hastalıklara tümörler örnek olarak verilebilirken neo-plastik olmayan hastalıklara neo-plastik hastalıkların aksine yeniden damarlanma söz konusu değildir sadece damarlar yeniden düzenlenir. Alzheimer, diyabet anjiyogeneze bağlı neo-plastik olmayan hastalıklara örnektir (Carmeliet, 2000; Carmeliet ve Jain, 2000; Potente, Gerhardt ve Carmeliet, 2011).

Bu tez kapsamında saf DNP, DNP yüklü I-DNP kodlu formülasyon ve I-Blank kodlu formülasyonların *in vivo* anjiyogenik etkileri CAM Yöntemi ile belirlenmiştir. CAM sonuçları kör olarak kullanılan %2.5 oranındaki agaroz ve I-Blank kodlu formülasyon ile karşılaştırıldığında DNP yüklü I-DNP kodlu formülasyona 10 µg.pellet⁻¹ konsantrasyonda belirgin bir şekilde kapiler damar gelişimini inhibe ederek *in vivo* anti-anjiyogenik etki göstermiştir. Kapiler alanın azalmasına bağlı olarak aktivite

sıralamasında I-DNP saf DNP'den daha etkili bulunmuştur (Bkz. Tablo 5.20 ve Şekil 5.97.-5.100). Aktivite sonuçlarının literatür verileri ile paralel olduğu saptanmıştır (Miyazaki vd., 2012).

İlgili çalışmada asetilkolinesteraz inhibitörleri tarafından kolinerjik stimülasyonun, PI3K aracılı IL-1 β indüksiyonunun inhibisyonu ve ardından VEGF ekspresyonunun azalması yoluyla anjiyogenez baskılandığını göstermiş ve asetilkolinesteraz inhibitörlerinin yeni bir anti-anjiyogenik tedavi olabileceği vurgulanmıştır. Özetle hem ilgili çalışmada hem de bu tez çalışmasında hazırlanan DNP yüklü I-DNP kodlu formülasyon ile tedavide anjiyogenez zayıflattığını (azalttığı/inhibe ettiği) gösterilmiştir. Kolinerjik sistemin uyarılması yeni bir anti-anjiyogenik tedavi olabileceği sonucuna varılmıştır (Miyazaki vd., 2012).

7. SONUÇ

Günümüzde oldukça popüler hale gelen nanopartikül sistemler ile tedavilerde büyük başarılar elde edilmiştir. Bu tez çalışmasında donepezil hidroklorür yüklü PLGA bazlı nanopartiküller ‘Çift Emülsifikasyon Çözücü Buharlaştırma’ yöntemi ile hazırlanmış ve sulu faz içeriğinde bulunan PVA konsantrasyonun ve prob sonikasyon süresinin nanopartikül özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Artan PVA konsantrasyonu ve prob sonikasyon süresinin parçacık boyutunda azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir. İncelemeler sonrası I-DNP kodlu formülasyon optimum olarak seçilmiştir. I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonunun parçacık boyutu $136.37 \text{ nm} \pm 0.93$ olarak elde edilmiş ve 0.122 ± 0.011 PDI değeri ile formülasyonun monodispers olduğu kanıtlanmıştır. Zeta potansiyel değeri $-24.17 \text{ mV} \pm 1.21$ elde edilmiş ve uzun süre kararlı olabileceği sonucuna varılmıştır. I-DNP kodlu formülasyonun üzerine trehaloz etkisi değerlendirilmiş ve saklama koşulları ortaya çıkmıştır. Gastrointestinal sıvılarda yapılan 24 saatlik stabilite testinde ise I-DNP kodlu formülasyonun asidik ortamlarda daha hızlı degrade olduğu sonucuna varılmıştır. Enkapsülasyon etkinliği çalışmasında oral uygulama için ideal olan $\%69.22 \pm 4.84$ değeri elde edilmiştir. I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonundan donepezil hidroklorür salımı saf donepezil hidroklorür ile karşılaştırıldığında, I-DNP kodlu nanopartikül formülasyonun daha yavaş ve 24 saatlik bir uzatılmış salım yaptığı belirlenmiştir. DDSolver ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda salım kinetiklerini ağırlıklı olarak yalnızca tek bir mekanizma tarafından değil, Fickian ve Fickian olmayan birleşik bir mekanizma tarafından yönetildiği sonucuna ulaşılmıştır. DSC, FT-IR ve ¹H-NMR analizleri ile enkapsülasyon kanıtlanmıştır. I-DNP kodlu formülasyon farmasötik teknoloji açısından karakterize edildikten sonra biyolojik aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Anti-Alzheimer aktivite sonuçlarına göre asetilkolinesteraz inhibitörü olan Donepezil hidroklorür ile karşılaştırıldığında I-DNP kuvvetli anti-AChE ve anti-BChE aktivite göstermiştir. In vivo CAM deneyleri ile I-DNP kodlu formülasyonun anjiyogenezi zayıflattığını (azalttığı/inhibe ettiği) belirlenmiş ve hazırlanan nanopartikül sistemin kolinerjik sistemin uyarılmasıyla yeni bir anti-anjiyojenik tedavi olabileceği sonucuna varılmıştır. Çalışmanın ileriki aşamalarında I-DNP kodlu formülasyonun uzun süreli kararlılık testleri, kan beyin engeli geçiş çalışmaları, farklı bir taşıyıcı sisteme eklenmesi ve farklı *in vivo* alzheimer modelleri ile karakterizasyonu planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

- Abdelazim, A. H., Ramzy, S., Abdelzaher, A. M., & Shahin, M. (2022). Comparative evaluation of different mathematical models for simultaneous UV spectrophotometric quantitative analysis of velpatasvir and sofosbuvir. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 267: 120536.
- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S. ve Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Advanced drug delivery reviews* 58(15): 1688-1713.
- Anand, P. ve Singh, B. (2013). A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of pharmacal research* 36: 375-99.
- Araújo, L. B. D. C., Silva, S. L., Galvão, M. A. M., Ferreira, M. R. A., Araújo, E. L., Randau, K. P., & Soares, L. A. L. (2013). Total phytosterol content in drug materials and extracts from roots of *Acanthospermum hispidum* by UV-VIS spectrophotometry. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23: 736-42.
- Astete, C. E. ve Sabliov, C. M. (2006). Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 17(3): 247-89.
- Baghirova, L., Tilki, E.K. ve Öztürk, A.A. (2023). Evaluation of Cell Proliferation and Wound Healing Effects of Vitamin A Palmitate-Loaded PLGA/Chitosan-Coated PLGA Nanoparticles: Preparation, Characterization, Release, and Release Kinetics. *ACS Omega*.
- Başaran, E., Öztürk, A. A., Şenel, B., Demirel, M. Sarica, Ş. (2022). Quercetin, Rutin And Quercetin-Rutin Incorporated Hydroxypropyl β -Cyclodextrin Inclusion Complexes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 172: 106153.
- Bhavna, B., Shadab, M., Mushir, A., Sanjula, B., Jasjeet, K.S., Aseem, B., Javed, A. (2014). Preparation, characterization, in vivo biodistribution and pharmacokinetic studies of donepezil-loaded PLGA nanoparticles for brain targeting. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 40(2): 278-87.

- Borman, P. ve Elder, D. (2017). Q2 (R1) validation of analytical procedures. *ICH Quality guidelines*: 127-66.
- Brewster, J. T., Dell'Acqua, S., Thach, D.Q. ve Sessler, J.S. (2019). Classics in Chemical Neuroscience: Donepezil. *ACS Chemical Neuroscience* 10(1): 155-67.
- Bulut, E. ve Şanlı, O. (2014). Optimization of release conditions of Alzheimer's drug donepezil hydrochloride from sodium alginate/sodium carboxymethyl cellulose blend microspheres. *Journal of Macromolecular Science, Part B* 53(5): 902-17.
- Büyükköroğlu, G. Şenel, B., Başaran, E., Yenilmez, E., Yazan, Y. (2016). Preparation and in vitro evaluation of vaginal formulations including siRNA and paclitaxel-loaded SLNs for cervical cancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 109: 174-83.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine* 6(4): 389-95.
- Carmeliet, P. ve Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *nature* 407(6801): 249-57.
- Chaofan, H., Guanxiong, Q., Zhenhua, W., Bin, X., Jing, D., Hongjing, D., Kang, S. (2014). Preparation and performance characterization of nanoscale ultrasonic imaging microcapsules 35: 1-8. doi: 10.7503/cjcu20130690
- Cohen-Sela, E. Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H.D., Golomb, G. (2009). A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 133(2): 90-95.
- Copeland, R. A., Harpel, M. R. ve Tummino, P.J. (2007). Targeting enzyme inhibitors in drug discovery. *Expert opinion on therapeutic targets* 11(7): 967-78.
- Crucho, C. I. C., ve Barros, M. T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering C* 80: 771-84.

- da Silva Luna, V., Randau, K. P., Ferreira, M. R. A., & Soares, L. A. L. (2022). Development and validation of analytical method by spectrophotometry UV-Vis for quantification of flavonoids in leaves of *Senna occidentalis* Link. *Research, Society and Development* 11(1): e14411118584-e14411118584.
- Dagron, S. (2014). Die International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). *Handbuch ethik und recht der forschung am menschen*: 541-45.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Breton, A.L., Pr eat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release* 161(2): 505-22.
- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L. ve Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm* 67(3): 217-23.
- Derman, S., Kızılbey, K. ve Akdeste, Z.M. (2013). Polimerik Nanopartiküller. *Sigma : Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi* 31(1): 107-20.
- Dilek, E.,  z elik, M. B. ve Yıldıırım, S. (2019). Antibiyotik Olarak Kullanılan Sultamisilin, Sefdinir, Vankomisin Hidroklorür ve Kolistin Etken Maddelerinin İnsan Serum Paraoksonaz1 Enzim Aktivitesi  zerine in vitro Etkilerinin İncelenmesi. *Erzincan University Journal of Science and Technology* 12(1): 349-57.
- Doody, R. S., Cummings, J. L. ve Farlow, M. R. (2012). Reviewing the Role of Donepezil in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research* 9(7): 773-81.
- Eggers, C., Herholz, K., Kalbe, E. ve Heiss, W. D. (2006). Cortical acetylcholine esterase activity and ApoE4-genotype in Alzheimer disease. *Neuroscience Letters* 408(1): 46-50.
- Ekambaram, P, ve Sathali, A. A. H. (2011). Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles of ramipril. *Journal of young pharmacists* 3(3): 216-20.
- Ekinci, M., Öztürk, A. A., Santos-Oliveira, R. ve İlem- zdemir, D. (2022). The use of Lamivudine-loaded PLGA nanoparticles in the diagnosis of lung cancer:

- Preparation, characterization, radiolabeling with ^{99m}Tc and cell binding. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 69: 103139.
- Enggi, C. K., Isa, H. T., Wijaya, S., Ardika, K. A. R., Asri, R. M., Donnelly, R. F., & Permana, A. D. (2022). Validation of spectrophotometric method to quantify cabotegravir in simulated vaginal fluid and porcine vaginal tissue in ex vivo permeation and retention studies from thermosensitive and mucoadhesive gels. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 267: 120600.
- Espinoza, L. C., Vacacela, M., Clares, B., Garcia, M. L., Fabrega, M. J., Calpena, A.C. (2018). Development of a Nasal Donepezil-loaded Microemulsion for the Treatment of Alzheimer's Disease: in vitro and ex vivo Characterization. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* 17(1): 43-53.
- Fang, Y., Zhang, N., Li, Q., Chen, J., Xiong, S., P, W. (2019). Characterizing the release mechanism of donepezil-loaded PLGA microspheres in vitro and in vivo. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 51(November 2018): 430-37.
- Farid, J. F., Mostafa, N. M., Fayez, Y. M., Essam, H.M., Eitanany, B. M. (2022). Chemometric quality assessment of Paracetamol and Phenylephrine Hydrochloride with Paracetamol impurities; comparative UV-spectrophotometric implementation of four predictive models. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 265: 120308.
- Foglio, E. ve Fabrizio, R. L. (2010). Aquaporins and Neurodegenerative Diseases. *Current Neuropharmacology* 8(2): 112-21.
- Fornaguera, C., Dols-Perez, A., Calderó, G., García-Celma, M. J., Camarasa, J., Solans, C. (2015). PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating using low-energy methods as efficient nanocarriers for drug delivery across the blood-brain barrier. *Journal of Controlled Release* 211: 134-43.
- Giacobini, E. (2004). Cholinesterase inhibitors: New roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological Research* 50(4): 433-40.

- Goldsmith, J. A., Randall, N. ve Ross, S. D. (1978). On methods of expressing dissolution rate data. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 30(1): 347-49.
- Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B. ve Ozkan, S. A. (2013). UPLC versus HPLC on drug analysis: advantageous, applications and their validation parameters. *Chromatographia* 76: 1365-1427.
- Guo, W., Quan, P., Fang, L., Cun, D., Yang, M. (2015). Sustained release donepezil loaded PLGA microspheres for injection: Preparation, in vitro and in vivo study. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 10(5): 405-14.
- Helmlinger, G., Endo, M., Ferrara, N., Hlatky, L., Jain, R. K. (2000). Formation of endothelial cell networks. *Nature* 405(6783): 139-41.
- Iqbal, M., Zafar, N., Fessi, H. ve Elaissari, A. (2015). Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *International journal of pharmaceutics* 496(2): 173-90.
- Jain, P. S., Chaudhari, A. J., Patel, S. A., Patel, Z. N., & Patel, D. T. (2011). Development and validation of the UV-spectrophotometric method for determination of terbinafine hydrochloride in bulk and in formulation. *Pharmaceutical methods* 2(3): 198-202.
- Kaval, B., Şen, F. D. Batmaz, K. K., Ekinci, M., Öztürk, A. A. (2023). Latest research about active pharmaceutical ingredient loaded Poly Lactic Acid-co-Glycolic Acid (PLGA) based drug delivery system in Türkiye. *European Journal of Life Sciences* 1(3): 127-39.
- Ketani, M. A. ve Akbalık, M. E. (2015). Enzim Histokimya ve Önemi. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* (2): 50-71.
- Kıyan, H. T., Demirci, B., Başer, K. H. C. ve Demirci, F. (2014). The in vivo evaluation of anti-angiogenic effects of Hypericum essential oils using the chorioallantoic membrane assay. *Pharmaceutical biology* 52(1): 44-50.
- Kim, D. S.H.L., Kim, J. Y. ve Han, Y. (2012). Curcuminoids in Neurodegenerative diseases. *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 7(3): 184-204.

- Koppolu, B., Rahimi, M., Nattama, S., Wadajkar, A., Truong-Nguyen, K. (2010). Development of multiple-layer polymeric particles for targeted and controlled drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 6(2): 355-61.
- Kumari, B. ve Khansili, A. (2020). Analytical method development and validation of UV-visible spectrophotometric method for the estimation of vildagliptin in gastric medium. *Drug Research* 70(09): 417-23.
- Langenbucher, F. (1972). Letters to the Editor: Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 24(12): 979-81.
- Liekens, S., De Clercq, E. ve Neyts, J. (2001). Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical pharmacology* 61(3): 253-70.
- Lima, I. A., Khalil, N. M., Tominaga, T. T., Lechanteur, A., Sarmiento, B., Mainardes, R. M. (2018). Mucoadhesive chitosan-coated PLGA nanoparticles for oral delivery of ferulic acid. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* 46(sup2): 993-1002.
- Liu, T., Wan, X., Luo, Z., Liu, C., Quan, P., Cun, D., Fang, L. (2019). A donepezil/cyclodextrin complexation orodispersible film: Effect of cyclodextrin on taste-masking based on dynamic process and in vivo drug absorption. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 14(2): 183-92.
- Liu, Z., Liu, Q., Zhang, B., Liu, Q., Fang, L., Gou, S. (2021). Blood-Brain Barrier Permeable and NO-Releasing Multifunctional Nanoparticles for Alzheimer's Disease Treatment: Targeting NO/cGMP/CREB Signaling Pathways. *Journal of Medicinal Chemistry* 64(18): 13853-72.
- Locatelli, E. ve Franchini, M. C. (2012). Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: Synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system. *Journal of Nanoparticle Research* 14(12): 1-17.
- Lü, J. M., Wang, X., Marin-Muller, C., Wang, H., Lin, P. H., Yao, Q., Chen, C. (2009). Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 9(4): 325-41.

- Machado, H. A., Abercrombie, J. J., You, T., Deluca, P. P., Leung, K. P. (2013). Release of a wound-healing agent from PLGA microspheres in a thermosensitive gel. *BioMed Research International* 2013.
- Madhu, S., Komala, M. ve Pandian, P. (2021). Formulation development and characterization of withaferin-A loaded polymeric nanoparticles for Alzheimer's disease. *BioNanoScience* 11: 559-66.
- Mahalingam, M. ve Krishnamoorthy, K. (2015). Selection of a suitable method for the preparation of polymeric nanoparticles: Multi-criteria decision making approach. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 5(1): 57-67.
- Mainardes, R. M., ve Evangelista, R. C. (2005). PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *International journal of pharmaceutics* 290(1-2): 137-44.
- Makadia, H. K., ve Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers* 3(3): 1377-97.
- Martín-Banderas, L., Álvarez-Fuentes, J., Durán-Lobato, M., Prados, J., Melguizo, C., Fernández-Arévalo, M. ve Holgado M. A. (2012). Cannabinoid derivate-loaded PLGA nanocarriers for oral administration: formulation, characterization, and cytotoxicity studies. *International journal of nanomedicine* 7: 5793.
- Mendez, A. S. L., Steppe, M. ve Schapoval, E. E. S. (2003). Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 33(5): 947-54.
- Migues, V. H., David, J. M., Gomes, A. F. ve David, J. P. (2022). Determination of Soybean Isoflavone by HPLC/DAD and Simple UV Spectroscopic Analysis: a Comparative Study. *Food Analytical Methods* 15(2): 367-76.
- Minost, A., Delaveau, J., Bolzinger, M. ve Fessi, H. (2012). Nanoparticles via Nanoprecipitation Process. : 250-58.

- Mishra, B., Patel, B. B. ve Tiwari, S. (2010). Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine* 6(1): 9-24.
- Miyazaki, R., Ichiki, T., Hashimoto, T., Ikeda, J., Kamiharaguchi, A., Narabayashi, E., Matsuura, H., Takeda, K., Sunagawa, K. (2012). Acetylcholinesterase inhibitors attenuate angiogenesis. *Clinical science* 123(4): 241-49.
- Mohanraj, V. J. ve Chen, Y. (2007). Nanoparticles - A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 5(1): 561-73.
- Mushtaq, G., Khan, J., Joseph, E. ve Kamal, M. (2015). Nanoparticles, Neurotoxicity and Neurodegenerative Diseases. *Current Drug Metabolism* 16(8): 676-84.
- Müller, R. H., Mäder, K. ve Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 50(1): 161-77.
- Nagavarma, B. V. N., Yadav, H. K. S., Ayaz, A., Vasudha, L. S., Shivakumar, H. G. (2012). Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 5(SUPPL. 3): 16-23.
- Ozkan, S. A. (2018). Analytical method validation: the importance for pharmaceutical analysis. *Pharm Sci* 24(1): 1-2.
- Özgürtaş, T. (2009). Anjiyogenezde bir in-vivo model: civciv koriyoallantoik membran. *Gülhane Tıp Dergisi* 51(1): 67-69.
- Öztürk, A. A., Yenilmez, E. ve Yazan, Y. (2015). Preparation and Characterization of Dexketoprofen Trometamol Loaded Eudragit® RS 100 Nanoparticles. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* 6(4): 71.
- Öztürk, A. A., Yenilmez, E. ve Yazan, Y. (2017). Development and validation of high performance liquid chromatography (HPLC) modified method for dexketoprofen trometamol. *European International Journal of Science and Technology* 6(5): 33-41. www.eijst.org.uk.

- Öztürk, A.A. Yenilmez, E., Arslan, R., Şenel, B., Yazan, Y. (2017). Dexketoprofen trometamol-loaded kollidon® SR and eudragit® RS 100 polymeric nanoparticles: Formulation and in vitro-in vivo evaluation. *Latin American Journal of Pharmacy* 36(11).
- Öztürk, A. A., Gündüz, A. B. ve Ozisik, O. (2018). Supervised Machine Learning Algorithms for Evaluation of Solid Lipid Nanoparticles and Particle Size. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 21(9): 693-99.
- Öztürk, A. A., Güven, U.M. ve Yenilmez, E. (2018). Flurbiprofen loaded gel based topical delivery system: Formulation and in vitro characterization with new developed UPLC method. *ACTA Pharmaceutica Scientia* 56(4).
- Öztürk, A. A., Güven, U. M., Yenilmez, E. ve Şenel, B. (2018). Effects of Different Derivatives of Eudragit Polymer on Entrapment Efficiency, In Vitro Dissolution, Release Kinetics and Cell Viability Results on Extended Release Flurbiprofen Loaded Nanomedicines. *Lat. Am. J. Pharm* 37(10): 1981-92.
- Öztürk, A. A., Banderas, L. M., Otero- Cayero, M. D., Yenilmez, E., Yazan, Y. (2018). New Approach to Hypertension Treatment: Carvediol-Loaded PLGA Nanoparticles, Preparation, In Vitro Characterization and Gastrointestinal Stability. *Lat. Am. J. Pharm* 37(9): 1730-71.
- Öztürk, A. A. ve Yurttaş-Kırımlioğlu, G. (2019). Preparation and in vitro of characterization lamivudine loaded nanoparticles prepared by acid or ester terminated PLGA for effective oral antiretroviral therapy. *J. Res. Pharm* 23(5): 897-913.
- Öztürk, A. A. ve Güven, U. M. (2019). Cefaclor monohydrate loaded microemulsion formulation for topical application: Characterization with new developed UPLC method and stability study. *Journal of Research in Pharmacy* 23(3): 426-40.
- Öztürk, A. A., Aygül, A. ve Şenel, B. (2019). Influence of glyceryl behenate, tripalmitin and stearic acid on the properties of clarithromycin incorporated solid lipid nanoparticles (SLNs): Formulation, characterization, antibacterial activity and cytotoxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 54: 101240.

- Öztürk, A. A., Yenilmez, E. ve Özarda, M. G. (2019). Clarithromycin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecularweight and surface modification with chitosan on formulation, nanoparticle characterization and antibacterial Effects. *Polymers* 11(10).
- Öztürk, A.A., Yenilmez, E. ve Yazan, Y. (2019). Dexketoprofen trometamol-loaded eudragit® rl 100 nanoparticle formulation, characterization and release kinetics. *Acta Pharmaceutica Scientia* 57(1).
- Öztürk, A. A., Çınar, N. İ. ve Yenilmez, E. (2019). Development of nano-sized ketoprofen lysine incorporated Eudragit ® S100 nanomedicine by double emulsion solvent evaporation and in vitro characterization. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research* 7(1): 47-58.
- Öztürk, A. A., Banderas, L. M., Otero- Cayero, M. D., Yenilmez, E., Şenel, B., Yazan, Y. (2019). Dexketoprofen trometamol-loaded poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles: Preparation, in vitro characterization and cytotoxicity. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 18(1): 1-11.
- Öztürk, A. A. ve Aygül, A. (2020). Design of cefaclor monohydrate containing nanoparticles with extended antibacterial effect by nano-spray dryer: A nanoenglobing study. *J. Res. Pharm* 24(1): 110-111.
- Öztürk, A. A. ve Kıyan, H. T. (2020). Treatment of oxidative stress-induced pain and inflammation with dexketoprofen trometamol loaded different molecular weight chitosan nanoparticles: Formulation, characterization and anti-inflammatory activity by using in vivo HET-CAM assay. *Microvascular Research* 128: 103961.
- Öztürk, A. A., Namlı, İ., Güleç, K. ve Kıyan, H. T. (2020). Diclofenac sodium loaded PLGA nanoparticles for inflammatory diseases with high anti-inflammatory properties at low dose: Formulation, characterization and in vivo HET-CAM analysis. *Microvascular research* 130: 103991.

- Öztürk, A. A., Namlı, İ., Güleç, K. ve Görgülü, Ş. (2020). Design of lamivudine loaded nanoparticles for oral application by nano spray drying method: a new approach to use an antiretroviral drug for lung cancer treatment. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* 23(10): 1064-79.
- Öztürk, A.A., Namlı, İ. ve Aygül, A. (2021). Cefaclor Monohydrate-Loaded Colon-Targeted Nanoparticles for Use in COVID-19 Dependent Coinfections and Intestinal Symptoms: Formulation, Characterization, Release Kinetics, and Antimicrobial Activity. *ASSAY and Drug Development Technologies* 19(3): 156-75.
- Öztürk, A. A., Ünver, H. ve Kıyan, H. T. (2023). Antioxidant and Antiangiogenic Effect of Homoleptic Palladium (II) Car-boxamide Complex Loaded Chitosan Modified PLGA Nanoparticles: In vitro Evaluation and In vivo Chick Embryo Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay. *Letters in Drug Design & Discovery* 20(8): 1158-70.
- Öztürk, A. A., Başaran, E., Şenel, B., Demirel, M., Sarıca, Ş. (2023). Synthesis, characterization, antioxidant activity of Quercetin, Rutin and Quercetin-Rutin incorporated β -cyclodextrin inclusion complexes and determination of their activity in NIH-3T3, MDA-MB-231 and A549 cell lines. *Journal of Molecular Structure* 1282: 135169.
- Pal, S. L., Jana, U., Manna, P. K., Mohanta, G. P., Manavalan, R. (2011). Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01(06): 228-34.
- Panigrahi, D., Sahu, P. K., Swain, S. ve Verma, R. K. (2021). Quality by design prospects of pharmaceuticals application of double emulsion method for PLGA loaded nanoparticles. *SN Applied Sciences* 3(6).
- Panyam, J., William, D., Dash, A., Leslie-Pelecky, D., Labhasetwar, V. (2004). Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. *Journal of pharmaceutical sciences* 93(7): 1804-14.
- Paper, D. H., Karall, E., Kremser, M. ve Krenn, L. (2005). Comparison of the antiinflammatory effects of *Drosera rotundifolia* and *Drosera madagascariensis* in the HET-CAM assay. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to*

Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives 19(4): 323-26.

Pinheiro, R. G. R., Granja, A., Loureiro, J. A., Pereira, M. C., Pinheiro, M., Neves, A. R., Reis, S. (2020). Quercetin lipid nanoparticles functionalized with transferrin for Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 148: 105314.

Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J. ve Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2(1): 8-21.

Poovaliah, N., Davoudi, Z., Peng, H., Schlichtmann, B., Mallapragada, S., Narasimhan, B., Wang, Q. (2018). Treatment of neurodegenerative disorders through the blood-brain barrier using nanocarriers. *Nanoscale* 10(36): 16962-83.

Potente, M., Gerhardt, H. ve Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146(6): 873-87.

Poyraz-Eröz, İ., Kıyan, H. T., Zeybekoğlu, E., Özzambak, Mustafa E., Öztürk, N. (2021). Farklı Nergis Kültür Çeşitleri Soğanlarının *In Vitro* Antioksidan, Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Aktiviteleri. *Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri Ve Biyoteknoloji* 10(2): 90-101.

Pulingam, T., Foroozandeh, P., Chuah, J. A. ve Sudesh, K. (2022). Exploring Various Techniques for the Chemical and Biological Synthesis of Polymeric Nanoparticles. *Nanomaterials* 12(3).

Qian, C., Yuan, C., Li, C., Liu, H., Wang, X. (2020). Multifunctional nano-enabled delivery systems in Alzheimer's disease management. *Biomaterials Science* 8(20): 5538-54.

Raman, S., Khan, A.A. ve Mahmood, S. (2022). Nose to brain delivery of selegiline loaded PLGA/lipid nanoparticles: Synthesis, characterisation and brain pharmacokinetics evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 77: 103923.

- Rao, J. P. ve Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science (Oxford)* 36(7): 887-913.
- Rapalli, V. K., Kaul, V., Gorantla, S., Waghule, T., Dubey, S. K., Pandey, M. M., & Singhvi, G. (2020). UV Spectrophotometric method for characterization of curcumin loaded nanostructured lipid nanocarriers in simulated conditions: Method development, in-vitro and ex-vivo applications in topical delivery. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 224: 117392.
- Revdekar, A. ve Shende, P. (2021). Block copolymers in Alzheimer's disease therapy: A perceptive to revolutionize biomaterials. *Journal of Controlled Release* 340: 271-81.
- Ribatti, D. (2005). The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *British journal of haematology* 128(3): 303-9.
- Ribatti, D. (2008). *History of research on tumor angiogenesis*. Springer Science & Business Media.
- Ribatti, D. (2016). The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mechanisms of development* 141: 70-77.
- Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Roncali, L., Burri, P. H., & Djonov, V. (2001). Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 264(4): 317-24.
- Sah, H., Thoma, L. A., Desu, H. R., Sah, E., Wood, G. C. (2013). Concepts and practices used to develop functional PLGA-based nanoparticulate systems. *International Journal of Nanomedicine* 8: 747-65.
- Saira, M. ve Nath, M. R. (2013). Synthesis, Isolation, and Characterization of Donepezil Open Ring Impurity. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5(3): 826-29.

- Sengel-Turk, C. T. ve Hasçıçek, C. (2009). Polimerik nanopartikuler ilaç taşıyıcı sistemlerde yüzey modifikasyonu. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 38(2): 137-54.
- Sharma, S., Parmar, A., Kori, S. ve Sandhir, R. (2016). PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 80: 30-40.
- Shirwaikar, A., Devi, S., Rajagopal, P. L., Kiron, S. S., Sreejith, K. R. (2014). Development and validation of analytical method for determination of Donepezil hydrochloride in pure and dosage forms. *Asian J Pharm Clin Res* 7(1): 149-53.
- Singh, G., Kaur, T., Kaur, R. ve Kaur, A. (2014). Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer-PLGA. *Int J Pharmacol Pharm Sci* 1(2): 30-42.
- Singh, R. ve Geetanjali. (2017). Nanoneuromedicines for Neurodegenerative Diseases. *Nanoscience & Nanotechnology-Asia* 9(1): 58-63.
- Sutthapitaksakul, L., Dass, C. R. ve Sriamornsak, P. (2021). Donepezil—An updated review of challenges in dosage form design. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 63: 102549.
- Şenel, B. ve Öztürk, A. A. (2019). New approaches to tumor therapy with siRNA-decorated and chitosan-modified PLGA nanoparticles. *Drug development and industrial pharmacy* 45(11): 1835-48.
- Tripathi, S. K., Patel, B., Shukla, S., Pachouri, C., Pathak, S., Pandey, A. (2021). Donepezil loaded PLGA Nanoparticles, from Modified Nano-Precipitation, an Advanced Drug Delivery System to treat Alzheimer Disease. *Journal of Physics: Conference Series* 1849(1).
- Vauthier, C. ve Bouchemal, K. (2009). Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical research* 26(5): 1025-58.
- Yang, H., Li, J., Patel, S. K., Palmer, K. E., Devlin, B., & Rohan, L. C. (2019). Design of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles for vaginal co-delivery of

- griffithsin and dapivirine and their synergistic effect for HIV prophylaxis. *Pharmaceutics* 11(4): 184.
- Yasir, M., Singh Sara, U. V., Chauhan, I., Bisht, D., Puri, D., Maurya, J. (2020). Donepezil Base: Physicochemical Characterization, HPLC Method Development, Validation and its Application for the Determination of Shelf Life in Developed Solid Lipid Nanoparticles. *Current Nanomedicine (Formerly: Recent Patents on Nanomedicine)* 10(1): 48-62.
- Yenilmez, E., Öztürk, A. A. ve Başaran, E. (2023). Preparation and In vitro, Ex vivo Evaluation of Benzidamine Hydrochloride Loaded Fast Dissolving Oral Strip Formulations: Treatment of Oral Mucositis Due to Side Effects of Chemotherapy and Radiotherapy. *LETTERS IN DRUG DESIGN AND DISCOVERY* 20(8).
- Zhang, P., Chen, L., Gu, W., Xu, Z., Gao, Y., Li, Y. (2007). In vitro and in vivo evaluation of donepezil-sustained release microparticles for the treatment of Alzheimer's disease. *Biomaterials* 28(10): 1882-88.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., & Xie, S. (2010). DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS journal* 12(3): 263-71.
- Zirak, M. B. ve Pezeshki, A. (2015). Effect of surfactant concentration on the particle size, stability and potential zeta of beta carotene nano lipid carrier. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 4(9): 924-32.
- Zuo, Jieyu, Yuan Gao, Nadia Bou-Chacra, ve Raimar Löbenberg. (2014). Evaluation of the DDSolver software applications. *BioMed research international* 2014.
- http-1: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/search> (Erişim tarihi: 06.06.2023)
- http-2: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/aldrich/719897> (Erişim tarihi: 06.06.2023)
- http-3. <https://rxmpws.com/> 2022 RxMediaPharma Eczane Yönetim Sistemi, (Erişim tarihi: 14.11.2022)