T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

RASAJİLİN MESİLAT YÜKLÜ KATI LİPİT NANOPARTİKÜL İÇEREN ISIYA DUYARLI MUKOADEZİF JEL SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO - EX VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

MAHMUT OZAN TOKSOY

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

NİSAN 2021

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

Gazi

1926

RASAJİLİN MESİLAT YÜKLÜ KATI LİPİT NANOPARTİKÜL İÇEREN ISIYA DUYARLI MUKOADEZİF JEL SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO - EX VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

Mahmut Ozan TOKSOY

DOKTORA TEZİ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NİSAN 2021

ETİK BEYAN

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

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Mahmut Ozan TOKSOY
29/04/2021

RASAJİLİN MESİLAT YÜKLÜ KATI LİPİT NANOPARTİKÜL İÇEREN ISIYA DUYARLI MUKOADEZİF JEL SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO – EX VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Mahmut Ozan TOKSOY

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nisan 2021

ÖZET

Rasajilin mesilat, Parkinson hastalığı tedavisinde kullanılan bir ilaç olup Türkiye ilaç pazarında oral tablet formülasyonları bulunmaktadır. Oral kullanıma bağlı karaciğer ilk geçiş etkisine uğrar ve biyoyararlanımı düşer. Beyin kan dolaşımından bir bariyerle ayrılmıştır. Bu bariyer birçok molekülün beyne geçişini engellemektedir. Katı lipit nanopartiküller nano boyuttaki lipit yapıları nedeniyle beyne hedeflenebilmeleri açısından sıklıkla kullanılan sistemlerdir. Beyin merkezli hastalıklarda öncelik, kan-beyin bariyerini aşabilmektir. Nazal uygulama bu yöntemlerden birisidir. Oral ve parenteral yola alternatif olarak gösterilir. İlaçları nazal yoldan uygulamanın; karaciğerin ilk geçiş etkisinden kurtarmak, ilaçların hızla emilip biyoyararlanım artışı sağlamak ve beyne hedefleme imkânı sağlamak gibi avantajları bulunmaktadır. Ancak buruna uygulanan sistemlerin bu bölgede kalış süreleri, mukosilier hareketlerden dolayı kısadır. Bu olumsuzluğu gidermek için mukoadezif jeller geliştirilmiştir. Çalışmada rasajilin mesilat içeren katı lipit nanopartiküller hazırlanmış ve ısıya duyarlı mukoadezif jel sistemi ile birleştirilmiştir. Geliştirilen formülasyonda karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Katı lipit nanopartiküller hazırlanırken bileşen oranlarının belirlenmesi için deney tasarımı yapılmıştır. Geliştirilen formülasyonun uygulanabilirliği açısından akış ve viskozite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İn vitro ve ex vivo ortamlarında salım ve mukozadan geçiş çalışmaları yapılmış, stabilitesi incelenmiştir. Çalışmalar sonunda geliştirilen formülasyonun uygulanabilirliğinin kolay olduğu, rasajilin mesilatın karaciğer ilk geçiş etkisinden nazal uygulama ile kurtarılabileceği, bunun yanında nazal olfaktori bölgeden de emilerek doğrudan beyne geçebileceği düşünülmektedir.

Bilim Kodu	: 1020
Anahtar Kelimeler	: Katı Lipit Nanopartikül, Mukoadezyon, Rasajilin Mesilat, Ex-Vivo Geçiş, Beyne Hedefleme, Nazal İlaç Verilişi
Sayfa Adedi	: 136
Danışman	: Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ

DEVELOPMENT AND IN VITRO – EX VIVO EVALUATION OF A THERMOSENSITIVE MUCOADHESIVE GEL SYSTEM CONTAINING RASAGILINE MESYLATE LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLE

(Ph. D. Thesis)

Mahmut Ozan TOKSOY

GAZI UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

April 2021

ABSTRACT

Rasagiline mesylate is a drug used in the treatment of Parkinson's disease. There are oral tablet formulations in the Turkish drug market. Due to the oral use, Rasagiline mesylate undergoes first pass effect and its bioavailability decreases. The brain is separated from the bloodstream by a barrier. This barrier prevents many molecules from entering the brain. Solid lipid nanoparticles are frequently used systems in terms of being targeted to the brain due to their nano-sized lipid structures. In brain-centered diseases, the priority is to cross the blood-brain barrier. Nasal application is one of these methods. It is shown as an alternative way to the oral and parenteral route. Advantages of the nasal administration of the drugs are; rapid absorption, eliminate hepatic first pass effect, thus increased bioavailability and provides targeting to the brain. However, systems that applied to the nose have a short residence time due to the mucociliary movements. Mucoadhesive gel systems have been developed to eliminate this problem. In this study, solid lipid nanoparticles containing Rasagiline mesylate were prepared and combined with the thermosensitive mucoadhesive gel system. Characterization studies were carried out. An experimental design was made to determine the components proportions. Flow properties and viscosity studies were carried out for the applicability of the formulation. In vitro release and ex vivo permeation studies was performed, stability of the formulation was investigated. It was determined that the formulation developed was easy to apply. It is thought that first pass effect was eliminated by nasal administration. In addition, it is thought that Rasagiline mesylate can be absorbed from olfactory region and directly pass into the brain.

Science Code : 1020

Key Words : Solid Lipid Nanoparticle, Mucoadhesion, Rasagiline Mesylate, Ex-Vivo Permeation, Targeting To The Brain, Nasal Administration

Page Number : 136

Supervisor : Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın her aşamasında bilgi, tecrübelerini benimle paylaşan, karşılaştığım her sorunu çözmede yardım eden, ilgisini esirgemeyen tez danışman hocam Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ' a,

Çalışmalarım boyunca tecrübeleri ve bilimsel katkılarıyla beni yönlendiren, karşılaştığım her zorlukta bana destek olan hocalarım Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ' ye ve Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK' e,

Moral verici ve destekleyici yaklaşımlarıyla çalışmalarımı yürütmede bana destek olan Prof. Dr. Sevgi TAKKA' ya, Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN' e, Doç. Dr. Sibel İLBASMIŞ TAMER' e, Doç. Dr. Tuba İNCEÇAYIR' a, Doç. Dr. Fatma Nur TUĞCU DEMİRÖZ' e, Dr. Öğr. Üyesi Başaran MUTLU AĞARDAN' a,

Çalışmamın her anında bana destek olan, yol gösteren ve yardım eden Dr. Öğr. Üyesi Serdar TORT'a,

Mukoadezyon çalışmalarımda bana yardımcı olan Doç. Dr. Ayşe DEMİREL' e ve Utku USTA'ya,

SEM görüntülerinin elde edilmesindeki katkılarından dolayı Doç. Dr. Murat YAVUZ' a,

Deney tasarımı çalışmalarımdaki yardımlarından dolayı Uzm. Ecz. Mehtap SAYDAM' a,

İhtiyacımın olduğu her an yanımda olan Alptuğ Eren KARAKÜÇÜK' e, Tahir Emre YALÇIN' a, Diren SARISALTIK YAŞIN' a, Duygu YILMAZ USTA' ya, SILA GÜLBAĞ PINAR' a, Bülent SAMANCI' ya, Cennet DURAN' a, Yasin TURANLI' ya, Esra KODAN' a, tüm fakülte ve bölüm arkadaşlarıma ve Fatma ÇELİK' e,

02/2019-13 kodlu proje ile tez çalışmalarımı destekleyen Gazi Üniversitesi' ne,

Başından beri her durumda yanımda olan, her zaman yardıma hazır arkadaşlarım Ayşenur OKTAY' a, Mehmet BİRER' e, Hazal Ezgi GÜLTEKİN' e, Gamze RÜZGAR' a ve Onuralp AKAR' a,

Bütün imkânsızlıkları benim için olduran ve varlıklarıyla bana güç veren Mahmut TOKSOY, Sibel TOKSOY, Orhan Umut TOKSOY ve Selen ERDOĞAN' a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ ix

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xii

RESİMLERİN LİSTESİ xvi

SİMGELER VE KISALTMALAR xvii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Parkinson Hastalığı 3

2.1.1. Tanım ve genel bilgiler 3

2.1.2. Tedavi yöntemleri 4

2.2. Kan Beyin Bariyeri 5

2.3. Beyne Hedefleme Yöntemleri 7

2.4. Mukoadezyon 10

2.4.1. Mukoadezyon mekanizmaları 11

2.4.2. Mukoadezyon teorileri 12

2.5. Nazal Uygulama 13

2.6. Katı Lipit Nanopartiküller 15

2.6.1. Tanım ve genel bilgiler 15

2.6.2. Üretim yöntemleri 17

2.7. Rasajilin Mesilat 20

2.7.1. Rasajilin mesilatın yapısı ve fizikokimyasal özellikleri 20

Sayfa

2.7.2. Rasajilin mesilatın farmakolojisi ve etki mekanizması 20

3. GEREÇ VE YÖNTEM 23

3.1. Gereç 23

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler 23

3.1.2. Kullanılan cihaz ve malzemeler 23

3.2. Yöntem 24

3.2.1. Önformülasyon çalışmaları 24

3.2.2. Katı lipit nanopartikül formülasyonunun hazırlanması ve karakterizasyonu 28

3.2.3. Isıya duyarlı jel formülasyonunun hazırlanması ve karakterizasyonu 37

3.2.4. Sonuç formülasyonun hazırlanması ve karakterizasyonu 39

4. BULGULAR 45

4.1. Önformülasyon Çalışmaları 45

4.2. Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu 53

4.3. Isıya Duyarlı Jel Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu 66

4.4. Rasajilin Mesilat Yüklü Liyofilize KLN İçeren Jel Formülasyonunun Hazırlanması ve Karakterizasyonu 72

5. TARTIŞMA 93

5.1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Çalışmalar 93

5.2. Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonu Üzerinde Yapılan Çalışmalar 96

5.3. Isıya Duyarlı Jel Formülasyonunun Hazırlanması 99

5.4. Sonuç Formülasyon Üzerinde Yapılan Çalışmalar 102

6. SONUÇ 111

KAYNAKLAR 113

ÖZGEÇMİŞ 135

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. Parkinson tedavisinde kullanılan etkin madde listesi 5

Çizelge 2.2. Farklı tip yağ ve yüzey etkin madde kullanılarak üretilen katı lipit nanopartiküller 16

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler 23

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar ve malzemeler 23

Çizelge 3.3. DSC çalışmasında hazırlanan maddeler ve bunların 1:1 oranında hazırlanan karışımları 27

Çizelge 3.4. Katı lipit nanopartikül hazırlanmasında kullanılan maddeler 28

Çizelge 3.5. Tam faktöriyel tasarım ile oluşturulan formülasyonlar 31

Çizelge 3.6. Katı lipit nanopartikül oluşturabilen formülasyonlar 32

Çizelge 3.7. Hazırlanan formülasyonların içerikleri 37

Çizelge 3.8. İn-vitro ve ex-vivo çalışmalarda kullanılan formülasyonların içerikleri 41

Çizelge 4.1. Rasajilin mesilatın yapısında bulunan bağlar 46

Çizelge 4.2. Rasajilin mesilata ait kalibrasyon verileri 47

Çizelge 4.3. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvıdaki doğruluk ve geri elde sonuçları 49

Çizelge 4.4. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvıdaki deney içi kesinlik sonuçları 49

Çizelge 4.5. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvıdaki çözeltilerinin deneyler arası kesinlik sonuçları 50

Çizelge 4.6. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvıdaki çözeltisinin 25°C' deki stabilite sonuçları 51

Çizelge 4.7. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvıdaki çözeltisinin 80°C' deki stabilite sonuçları 51

Çizelge 4.8. Karıştırma hızı ve süresinin F13 formülasyonu üzerine etkisi 54

Çizelge 4.9. Karıştırma hızı ve süresinin F35 formülasyonu üzerine etkisi 54

Çizelge 4.10. Karıştırma hızı ve süresinin F46 formülasyonu üzerine etkisi 54

Çizelge 4.11. Karıştırma hızı ve süresinin F13 formülasyonu üzerine etkisi 55

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.12. Karıştırma hızı ve süresinin F35 formülasyonu üzerine etkisi 58

Çizelge 4.13. Karıştırma hızı ve süresinin F46 formülasyonu üzerine etkisi 61

Çizelge 4.14. Standardizasyon işlemi sonucu hazırlanan KLN formülasyonlarının toplu olarak partikül büyüklüğü ve PDI değerleri 64

Çizelge 4.15. Katı lipit nanopartiküllerde liyofilizasyon işlemi öncesi ve sonrasına ait partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi sonuçları..... 66

Çizelge 4.16. Farklı oranlardaki Poloksamer 188' nin jelleşme sıcaklıkları 67

Çizelge 4.17. Farklı oranlardaki Poloksamer 407' nin jelleşme sıcaklıkları 67

Çizelge 4.18. Polimer karışımlarının jelleşme sıcaklıkları 67

Çizelge 4.19. Formülasyonların 25°C' deki viskozite ölçümü 68

Çizelge 4.20. Formülasyonların 32°C' deki viskozite ölçümü 68

Çizelge 4.21. Formülasyonların K ve n değerleri 70

Çizelge 4.22. Formülasyonların 25 °C' de mukoadezif kuvvetinin belirlenmesi..... 70

Çizelge 4.23. Formülasyonların 32 °C' de mukoadezif kuvvetinin belirlenmesi..... 71

Çizelge 4.24. Rasajilin mesilat yüklü KLN içeren jel formülasyonunun jelleşme sıcaklığının incelenmesi 72

Çizelge 4.25. %2 RM içeren jel sisteminin 25°C ve 32°C' deki viskozite ölçümü..... 73

Çizelge 4.26. Rasajilin mesilat yüklü KLN içeren jel formülasyonunun 25°C ve 32°C' deki viskozite ölçümü..... 74

Çizelge 4.27. Rasajilin mesilat yüklü formülasyonların 25°C ve 32°C' deki K ve n değerleri 75

Çizelge 4.28. Rasajilin mesilat yüklü formülasyonlarda 25 °C' de mukoadezif kuvvetinin belirlenmesi..... 75

Çizelge 4.29. Rasajilin mesilat yüklü formülasyonlarda 32 °C' de mukoadezif kuvvetinin belirlenmesi..... 76

Çizelge 4.30. Rasajilin mesilat çözeltisine ait in-vitro salım verileri 80

Çizelge 4.31. Rasajilin mesilat yüklü jel formülasyonuna ait in-vitro salım verileri 80

Çizelge 4.32. Rasajilin mesilat yüklü KLN süspansiyonuna ait in-vitro salım verileri 80

Çizelge 4.33. Sonuç formülasyonuna ait in-vitro salım verileri 81

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.34. İncelenen formülasyonların regresyon analiz sonuçları 83

Çizelge 4.35. Rasajilin mesilat çözeltisine ait ex vivo geçiş verileri..... 87

Çizelge 4.36. Rasajilin mesilat yüklü jel formülasyonuna ait ex vivo geçiş verileri..... 87

Çizelge 4.37. Rasajilin mesilat yüklü KLN süspansiyonuna ait ex vivo geçiş verileri . 87

Çizelge 4.38. Rasajilin mesilat yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonuna ait ex vivo geçiş verileri 87

Çizelge 4.39. Formülasyonlara ait akı ve permeabilite değerleri 89

Çizelge 4.40. Formülasyonun +4°C deki partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli değişimleri..... 90

Çizelge 4.41. Formülasyonun +25°C ve %60 bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli değişimleri..... 90

Çizelge 4.42. Formülasyonun +40°C ve %75 bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli değişimleri..... 90

Çizelge 4.43. 15 ay sonunda saklanma koşullarına bağlı formülasyonlarda görülen akış özellikleri değişimi..... 91

Çizelge 4.44. 15 ay sonunda farklı sıcaklıklarda saklanan formülasyonların 25°C' deki K ve n değerleri..... 92

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Kan beyin bariyeri ve bu bariyeri oluşturan yapıların şematik gösterimi 6

Şekil 2.2. Burun yapısı ve bölümleri 10

Şekil 2.3. Mukoadezif polimer ile mukoza arasındaki etkileşim 11

Şekil 2.4. Islatma teorisi..... 12

Şekil 2.5. Katı lipit nanopartiküllerin yapısı..... 17

Şekil 2.6. Rasajilin mesilatın molekül yapısı..... 20

Şekil 3.1. Mikroemülsiyon yöntemi ile RM içeren katı lipit nanopartiküllerin hazırlanması 29

Şekil 3.2. Texture Analyzer aleti ve mukoadezif güç elde grafiği..... 39

Şekil 4.1. Rasajilin mesilatın erime derecesi tayini 45

Şekil 4.2. Rasajilin mesilata ait FTIR spektrumu 46

Şekil 4.3. Rasajilin mesilat çözeltisinin pH 6,5 yapay nazal sıvısı içindeki spektrumu..... 47

Şekil 4.4. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvısındaki kalibrasyon doğrusu 48

Şekil 4.5. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvıdaki çözeltisinin 25°C' deki stabilite grafiği 51

Şekil 4.6. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvıdaki çözeltisinin 80°C' deki stabilite grafiği 52

Şekil 4.7. Rasajilin mesilat, Poloksamer 407, HPMC E5, Gelucire 50/13, Mannitol' e ait DSC termogramı 52

Şekil 4.8. RM-Gelucire 50/13, RM-Poloksamer 407, RM-HPMC E5, RM-Mannitol, tüm maddelerin fiziksel karışımı ve liyofilize RM-KLN' nin DSC termogramı..... 53

Şekil 4.9. F13 formülasyonunda tam faktöriyel tasarıma göre teorik ve pratikte olması beklenen – olan partikül boyutu..... 56

Şekil 4.10. F13 formülasyonunda tam faktöriyel tasarıma göre teorik ve pratikte olması beklenen – olan polidispersite indeksi 56

Şekil 4.11. F13 formülasyonundaki tam faktöriyel tasarıma göre karıştırma hızı ve süresinin partikül büyüklüğü üzerine etkisi..... 57

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.12. F13 formülasyonundaki tam faktöriyel tasarıma göre karıştırma hızı ve süresinin polidispersite indeksi üzerine etkisi 57

Şekil 4.13. F13 formülasyonuna ait partikül büyüklüğü ve dağılımı 58

Şekil 4.14. F35 formülasyonunda tam faktöriyel tasarıma göre teorik ve pratikte olması beklenen – olan partikül boyutu..... 59

Şekil 4.15. F35 formülasyonunda tam faktöriyel tasarıma göre teorik ve pratikte olması beklenen – olan polidispersite indeksi 59

Şekil 4.16. F35 formülasyonundaki tam faktöriyel tasarıma göre karıştırma hızı ve süresinin partikül büyüklüğü üzerine etkisi..... 60

Şekil 4.17. F35 formülasyonundaki tam faktöriyel tasarıma göre karıştırma hızı ve süresinin polidispersite indeksi üzerine etkisi 60

Şekil 4.18. F35 Formülasyonuna ait partikül büyüklüğü ve dağılımı..... 61

Şekil 4.19. F46 formülasyonunda tam faktöriyel tasarıma göre teorik ve pratikte olması beklenen – olan partikül boyutu..... 62

Şekil 4.20. F46 formülasyonunda tam faktöriyel tasarıma göre teorik ve pratikte olması beklenen – olan polidispersite indeksi 62

Şekil 4.21. F46 formülasyonundaki tam faktöriyel tasarıma göre karıştırma hızı ve süresinin partikül büyüklüğü üzerine etkisi..... 63

Şekil 4.22. F46 formülasyonundaki tam faktöriyel tasarıma göre karıştırma hızı ve süresinin polidispersite indeksi üzerine etkisi 63

Şekil 4.23. F46 Formülasyonuna ait partikül büyüklüğü ve dağılımı..... 64

Şekil 4.24. Rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartikül formülasyonunun partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi. 65

Şekil 4.25. Rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartikül formülasyonunun mannitol ile (1:0.2) liyofilizasyonu sonucu elde edilen tozun partikül büyüklüğü dağılımı 66

Şekil 4.26. Formülasyonların 25°C' deki kayma hızlarına karşılık viskozite grafiği..... 69

Şekil 4.27. Formülasyonların 32°C' deki kayma hızlarına karşılık viskozite grafiği..... 69

Şekil 4.28. P407 %17 + HPMC E5 %0,25 ve P407 %17 + HPMC E5 %0,5' in 25°C deki karışımlarına ait log kayma hızına karşılık log viskozite grafiği..... 69

Şekil 4.29. P407 %17 + HPMC E5 %0,25 ve P407 %17 + HPMC E5 %0,5' in 32°C deki karışımlarına ait log kayma hızına karşılık log viskozite grafiği..... 70

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.30. P407 %17 + HPMC E5 %0,25' in 25°C' deki karışımına ait adezyon grafiği 71

Şekil 4.31. P407 %17 + HPMC E5 %0,5' in 25°C' deki karışımına ait adezyon grafiği 71

Şekil 4.32. P407 %17 + HPMC E5 %0,25' in 32°C' deki karışımına ait adezyon grafiği 71

Şekil 4.33. P407 %17 + HPMC E5 %0,5' in 32°C' deki karışımına ait adezyon grafiği 72

Şekil 4.34. RM-JEL sisteminin 25°C ve 32°C' deki kayma hızına karşılık viskozite grafiği 73

Şekil 4.35. RM-JEL sisteminin 25°C ve 32°C' deki log kayma hızına karşılık log viskozite grafiği 74

Şekil 4.36. Rasajilin mesilat yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonunun 25°C ve 32°C' deki kayma hızına karşılık viskozite grafiği 74

Şekil 4.37. Rasajilin mesilat yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonuna ait 5°C ve 32°C' deki log kayma hızına karşılık log viskozite grafiği 75

Şekil 4.38. Rasajilin mesilat yüklü jel formülasyonunun 25°C' deki adezyon grafiği... 76

Şekil 4.39. Rasajilin mesilat yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonunun 25°C' deki adezyon grafiği 76

Şekil 4.40. Rasajilin mesilat yüklü jel formülasyonunun 32°C' deki adezyon grafiği... 77

Şekil 4.41. Rasajilin mesilat yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonunun 32°C' deki adezyon grafiği 77

Şekil 4.42. Rasajilin mesilat yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonunun partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi 78

Şekil 4.43. Tüm formülasyonların 32°C' de zamana karşı % salınan RM grafiği 80

Şekil 4.44. Formülasyonların zamana karşı yığılmalı mg grafiği..... 81

Şekil 4.45. Formülasyonların zamana karşı yığılmalı mg/cm^2 grafiği 81

Şekil 4.46. Formülasyonların zamanın kareköküne karşı yığılmalı mg/cm^2 grafiği 81

Şekil 4.47. Rasajilin mesilat çözeltisinin zamana karşı ln kalan fraksiyon grafiği..... 83

Şekil 4.48. Rasajilin mesilat yüklü KLN süspansiyon formülasyonu ve sonuç formülasyonuna uygulanan zamana karşı salınan fraksiyon grafiği..... 85

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.49. Tüm formülasyonların 32°C' de zamana karşı RM için burun mukozasından geçiş grafiği 87

Şekil 4.50. Zamana ve sıcaklığa bağlı, formülasyonlarda görülen partikül büyüklüğü değişimi..... 89

Şekil 4.51. 15. ay sonunda saklanma koşullarına bağlı sonuç formülasyonda görülen kayma hızına karşılık viskozite değişimi..... 90

Şekil 4.52. 15. Ay sonunda saklanma koşullarına bağlı sonuç formülasyonda görülen log kayma hızına karşılık log viskozite değişimi 90

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 4 1. Rasajilin mesilat yüklü KLN süspansiyon formülasyonuna ait SEM görüntüsü..... 78

Resim 4.2. Rasajilin mesilat yüklü liyofilize KLN sisteminin suda dağıtıldıktan sonraki SEM görüntüsü..... 79

Resim 4.3. Rasajilin mesilat yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonuna ait SEM görüntüleri..... 79

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklamalar**
%	Yüzde
√	Karekök
°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
cm	Santimetre
cm^2	Santimetrekare
cm^3	Santimetreküp
Da	Dalton
dk	Dakika
g	Gram
kV	Kilovolt
L	Litre
m^2	Metrekare
mg	Miligram
mj	Milijul
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mPa	Milipaskal
mV	Milivolt
N	Newton
nm	Nanometre
s	Saniye
sa	Saat
Vd	Dağılım hacmi

Kısaltmalar	Açıklamalar
ABS	Absorbans
AUC	Eğri Altında Kalan Alan
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BS	Bağıl Sapma
C_{max}	Maksimum Plazma Konsantrasyonu
COMT	Kateşol-o-Metil Transferaz
DoE	Deney Tasarımı
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
HLB	Hidrofilik – Lipofilik Denge
HPMC	Hidroksipropil Metil Selüloz
KBB	Kan Beyin Bariyeri
KLN	Katı Lipit Nanopartikül
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu
LDC	Lipit – İlaç Konjugatı
LOD	Duyarlılık Sınırı
LOQ	Saptama Sınırı
MAO-B	Monoamin Oksidaz Tip B
NLC	Nano Lipit Taşıyıcı
ORT	Ortalama
P407	Poloksamer 407
PDI	Polidispersite İndeksi
PVA	Polivinil Alkol
RM	Rasajilin Mesilat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
S.H	Standart Hata
S.S	Standart Sapma
T_{max}	Plazma doruk süresi
UV	Ultraviyole
YEM	Yüzey Etkin Madde
YNS	Yapay Nazal Sıvı
YYEM	Yardımcı Yüzey Etkin Madde

1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı, beyinde gözlenen nörodejeneratif bir bozukluk olup; belirtilerini titreme, kasılma, kaslarda sertlik, motor hareketlerin yavaşlaması olarak gösteren çağımızın en önemli hastalıklarından biridir. Klinik belirtilerini genellikle beynin merkezinde yer alan dopaminerjik nöronların %60'ının bozulması ile göstermektedir. Dünyada 50 yaş ve üzeri nüfusun %3' lük kısmına Parkinson hastalığı teşhisi konulmuş olmakla birlikte, bu orandan daha fazlasının klinik belirtileri göstermemesine rağmen Parkinson hastası olduğu bilinmektedir.

Parkinson hastalığının ilk iki evresinde klinik belirtiler gözlenmezken, üçüncü evrede motor fonksiyon kayıpları; son evrede ise motor fonksiyonun tamamen yitirilmesi şeklinde belirtiler vermektedir. Parkinson tedavisinde amaç hastanın yaşam kalitesini arttırmaya yöneliktir.

Dopamin eksikliği nedeniyle oluşan Parkinson hastalığının tedavisinde genellikle dopamin prekürsörleri ve dopamin metabolizasyonunu inhibe eden monoamin oksidaz tip B ve kateşol-o-metiltransferaz inhibitörleri kullanılmaktadır.

Beyin, kan dolaşımından kendisine özgü bariyer ile ayrılmıştır. Kan beyin bariyeri olarak bilinen bu yapı, astrosit ve perisit hücreleriyle birlikte bunların arasında bulunan sıkı bağlantılardan oluşmaktadır. Kan beyin bariyeri, birçok molekülün beyne geçişini önlemektedir. Bu yüzden beyin merkezli hastalıklarda öncelik, kan-beyin bariyerini aşabilmektir. Bu nedenle ilaç moleküllerinin beyne rahatlıkla geçebileceği yöntemler üzerinde çalışılmaktadır. Bu yöntemlerden birisi de ilaçların nazal mukozaya uygulanmasıdır.

Katı lipit nanopartiküller hedefleme yapabilmeleri, akut ve kronik toksisiteyi azaltabilmeleri, lipofilik ve hidrofilik ilaç yüklenebilmesi gibi avantajlarından ötürü sıklıkla kullanılan sistemlerdir. Lipit yapılarından ötürü beyne hedeflemede taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur.

Beyne ilaç hedeflemede non-invazif yöntemlerden birisi olan nazal uygulama, oral ve paranteral yola alternatif olarak gösterilmektedir. İlaçları nazal yoldan uygulamanın;

karaciğerin ilk geçiş etkisinden kurtarmak, ilaçların hızla emilip sistemik dolaşıma doğrudan katılımını sağlamak, biyoyararlanım artışı sağlamak ve olfaktori bölgeden doğrudan beyne geçiş imkânı sağlamak gibi avantajları bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında Parkinson hastalığı tedavisinde monoamin oksidaz tip B inhibitörü etkin maddelerinden biri olan rasajilin mesilat kullanılmıştır. Türkiye ilaç pazarında sadece konvansiyonel tablet formülasyonları bulunmaktadır. Oral uygulandıktan sonra yüksek oranda karaciğer ilk geçiş etkisine uğramaktadır. Bu tez çalışmasının amacı, rasajilin mesilatın doğrudan beyne hedeflenmesi hem hastalık bölgesine direk etki, hem de karaciğer ilk geçiş etkisini elimine etme amacını taşımaktadır.

Bu kapsamda bu tez çalışmasında hidrofilik özellikte olan rasajilin mesilatın yüksek oranda yüklenebildiği, fiziksel ve kimyasal olarak stabil, burun sıcaklığında jelleşen bir sistem içinde katı lipit nanopartikül formülasyonunun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilecek bu formülasyonla, etkin maddenin karaciğer ilk geçiş etkisinden nazal uygulama ile kurtarılabileceği; bunun yanında nazal olfaktori bölgeden de emilerek doğrudan beyne geçebileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı

2.1.1. Tanım ve genel bilgiler

Parkinson hastalığı asıl sebebi bilinmeyen, ancak beyin hücrelerinde hasar ve kayıp ile seyreden bir hastalıktır. Alzheimer hastalığından sonra dünyada en çok görülen nörodejeneratif hastalık olan Parkinson hastalığının görülmesindeki ana faktör yaş olmasına rağmen, genetik farklılık, cinsiyet, ırk ve çevresel etkiler de hastalık faktörleri arasında yer almaktadır. Parkinson hastalığı hareketlerde bozukluk, uyku bozukluğu, gastrointestinal rahatsızlıklar, duygu bozuklukları, koku almada kayıplar, el ve ayak bileklerinde görülen titremeler, sanrılar, ilgisizlik, anksiyete, sinirlilik, bilişsel bozukluklar, depresyon, acı ve ağrı hissi şeklinde kendisini göstermektedir (Lee ve Gilbert, 2016). Parkinson hastalığının belirtileri her hastada farklı şekillerde ortaya çıkmaktadır. Bu belirtiler herhangi bir yaşta gözlenebilmektedir. Ortalama 50 yaş ve üzeri kişilerde gözlenen Parkinson hastalığı, 30 yaş ve altı kişilerde nadir de olsa gözlenmiştir. Genç yaşlarda gözlenen Parkinson hastalığının genetik nedenlerden dolayı olduğu düşünülmektedir. Dünyada yaklaşık 7-10 milyon insanın Parkinson hastası olduğu belirtilmektedir (Lunati ve diğerleri, 2018).

Parkinson hastalığının temel nedeni dopamin eksikliğidir. Dopamin vücut hareketlerinin kontrol edilmesinde görevli bir kimyasaldır. Beynin belirli bölgelerinde dopamin üreten hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler özellikle beynin orta bölgesinde (substansiya nigra) yoğunlaşmıştır. Dopamin üreten hücrelerde meydana gelen hasar ya da kayıp sonucu yeterli dopamin üretilememesine bağlı Parkinson hastalığının belirtileri ortaya çıkmaktadır. Dopamin üreten hücrelerin %60 ya da daha fazlasının hasarı sonucu hücrelerin işlev kaybına uğraması durumunda kişilerde Parkinson hastalığı belirtileri ortaya çıkmaktadır (Tabakman ve diğerleri, 2004).

Parkinson hastalığının genetik olarak aktarıldığı da bildirilmiştir. Parkinson hastalarının yaklaşık %15 kadarının ailesinde bu hastalığa ait öykü bulunmaktadır. Bu genetik farklılıktan ötürü bireyler erken yaşlarda Parkinson hastalığına yakalanabilmektedir. Toplamda 19 farklı genin Parkinson hastalığına sebep olduğu kanıtlanmıştır (Deng ve

diğerleri, 2018). Genetik aktarımın yanında pestisitler, kafa sarsıntısı/yaralanmaları gibi çevresel faktörler de Parkinson hastalığına sebep olabilmektedir (Lee ve Gilbert, 2016).

Parkinson hastalığını net bir şekilde tanımlayabilmek için özel bir test bulunmamaktadır. Parkinson hastalığı teşhisi, benzer belirtilere sahip hastalıkların elendiği ve hastanın Parkinson hastalığına özgü ilaçlara yanıt verdiği zaman konulabilmektedir. Ancak günümüzde hastalığın tanısı için özel biyomarkerlar geliştirilmekte ve klinik olarak çalışmalarda başarılar kaydedilmektedir (Khodadadian ve diğerleri, 2018). Parkinson hastalığında farklı evrelerin tedavi yaklaşımları da farklılık göstermektedir. Tedavi yaklaşımı hastalık belirtilerini hafifletmeye yönelik olsa da asıl amaç, hastanın yaşam kalitesini arttırmaktır (Lecht ve diğerleri, 2007).

2.1.2. Tedavi yöntemleri

Parkinson hastalığı tedavisinde en önemli konulardan birisi, her hastaya aynı tedavinin uygulanamamasıdır. Hastanın yaşı, hastalığın belirtileri, hastalığın evresine göre farklı tedavi yöntemleri bulunmaktadır.

İlk ve en sık kullanılan tedavi yöntemi, levodopa gibi dopamin prekürsörlerinin kullanılmasıdır. Levodopa, dopaminerjik nöronlardaki dopamin seviyelerini arttırır ve hastanın motor fonksiyonlarında gözlenen kaybı düzenler. Bu tedavi, hastalığın ilk evrelerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Hasta levodopaya dirençli ise, triheksifenidil önerilmektedir. Triheksifenidil, levodopa ile kombine olarak da verilebilmekte ve levodopanın etkisini arttırdığından doz azaltımına gidilmesi avantajı sağlamaktadır (Olanow ve diğerleri., 2004; Reich ve Savitt, 2019).

Tedavide diğer bir yaklaşım ise dopamini metabolize eden enzimlerin inhibisyonudur. Bunlar kateşol-o-metiltransferaz (COMT) ve monoamin oksidaz tip B (MAO-B) inhibitörleridir. Bu inhibitörler ile tedavide dopamin seviyesi artış gösterdiğinden hastanın rahatlaması sağlanmaktadır. Bu tedavi genellikle Parkinson hastalığının erken evrelerinde kullanılmaktadır (Lyytinen ve diğerleri, 1997; Talati ve diğerleri, 2009).

Parkinson tedavisinde kullanılan etkin maddeler Çizelge 2.1’ de gösterilmektedir.

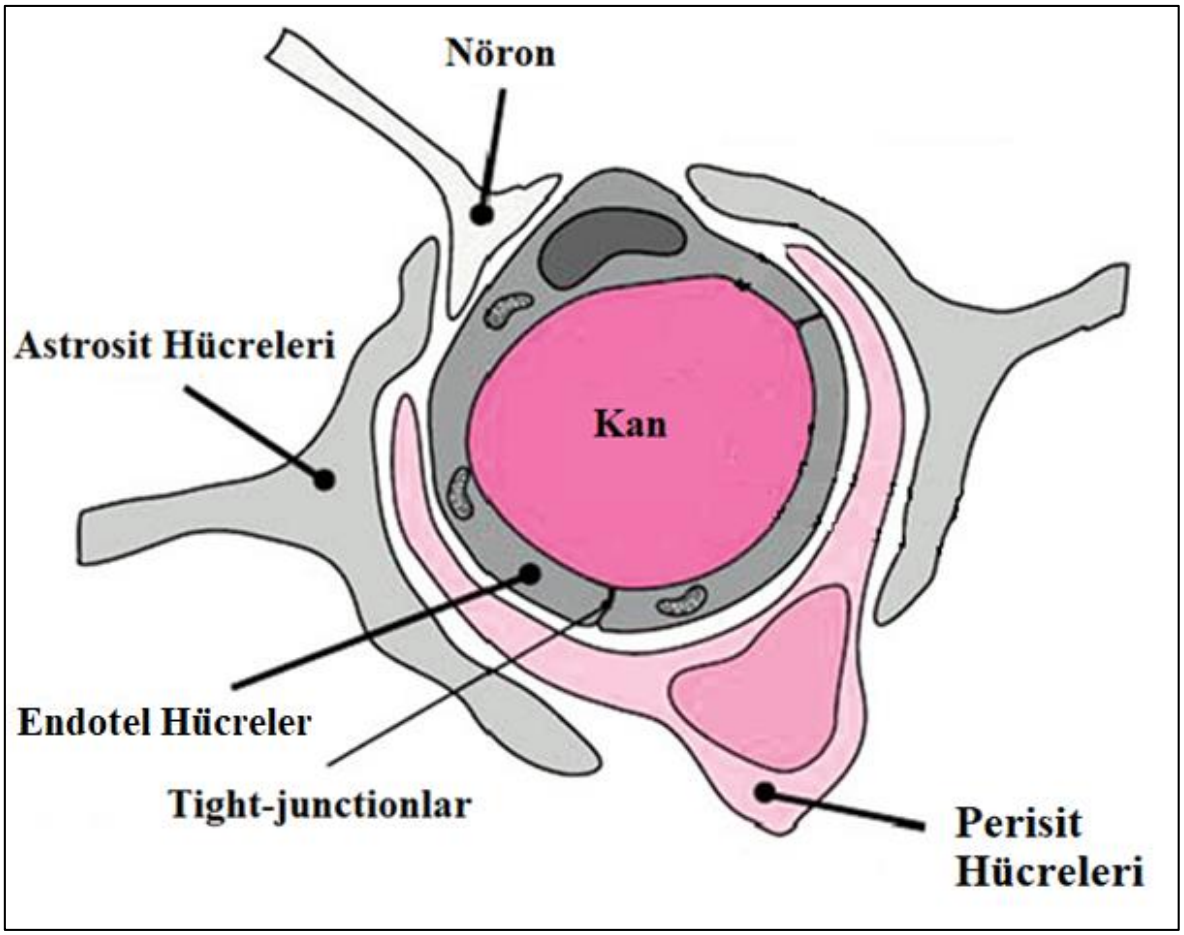
Çizelge 2.1. Parkinson tedavisinde kullanılan etkin madde listesi (Williams-Gray ve Worth, 2016)

Tedavi Yaklaşımları	**Etkin madde**
Levodopa gibi etki eden Dopamin prekürsörleri	Madopar
	Sinemet
	Duodopa
Dopamin agonistleri	Ropirinol
	Pramipeksol
	Rotigotin
	Apomorfin
MAO-B inhibitörleri	Rasajilin
	Selejilin
COMT inhibitörleri	Entakapon
	Tolkapon
Antikolinerjikler	Triheksifenidil
	Orfenadrin

2.2. Kan Beyin Bariyeri

Beyin, tüm vücut fonksiyonlarını ve faaliyetlerini kontrol eden, vücuttan izole halde bulunan bir sistemdir. Sistemik kan dolaşımından kendisine özgü bir bariyer ile ayrılmıştır. Bu bariyer, kan dolaşımı ile beyne geçebilecek birçok maddeden beyni korumaktadır. Beyin, istenmeyen kimyasallar yanında terapötik etkili maddelerin büyük kısmının da geçişine kendisini kapatmıştır. Bu yüzden merkezi sinir sistemi rahatsızlıklarında kullanılan ilaçların birçoğunun etkisi azalmaktadır. Bu açıdan bakıldığında beyne hedeflemenin önemi anlaşılmaktadır (Mehmood, 2015).

Sistemik kan dolaşımı ile beyin arasındaki bariyeri oluşturan hücreler, vücuttaki diğer hücrelerden farklı olarak çok sıkı dizili bir düzene sahiptir. Bu hücreler arasında boşluk bulunmaz. Kan beyin bariyeri (KBB), astrosit ve perisit ve endotel hücrelerinden oluşmaktadır. KBB ve bu bariyeri oluşturan hücre ve bağlar, Şekil 2.1’ de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Kan beyin bariyeri ve bu bariyeri oluşturan yapıların şematik gösterimi (Bodor ve Buchwald, 2003)

Kan beyin bariyerinin, hidrofilik bileşiklerin beyne geçişini büyük çoğunlukla engellediği gözlenmiştir. Ayrıca iyonik permeabiliteyi belirleyen transendotel elektrik direncinin KBB' de, diğer hücrelere göre yaklaşık 100-500 kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Bu durum moleküllerin beyne geçişini zorlaştıran faktörlerden biridir (Maherally ve diğerleri, 2018; Srinivasan ve Kolli, 2019).

Kan beyin bariyerinde adenilat siklaz, guanilat siklaz kateşol-o-metiltransferaz, monoamin oksidaz gibi farklı enzimler bulunmaktadır. Bu enzimler beyne geçmeye çalışan molekülleri engellemektedir (Ghersi-Egea ve diğerleri, 1994; Golden ve Pollack, 1998). Enzimlerin yanında, aktif taşıma sağlayan protein yapıları da mevcuttur. Günümüzde belirli moleküllerin, belirli taşıyıcılar ile kandan beyne taşındığı belirlenmiştir. Glikoz, aminoasitler ve peptitler, kendilerine özgü aktif taşıyıcılar ile beyne taşınabilmektedir (Krogh, 1946; Taylor, 2002).

Beyinde efflux pompaları bulunmaktadır. Bu pompalar, moleküllerin beyinden atılımını sağlamaktadır. Bu pompalar arasında en önemlisi ve en çok bilineni, P-glikoprotein (P-gp) dir (Deguchi ve diğerleri, 1997; Sadeque ve diğerleri, 2000; Savolainen ve diğerleri, 2002; Suzuki ve diğerleri, 1997).

2.3. Beyne Hedefleme Yöntemleri

İlaç molekülünün özellikleri

Moleküllerin sistemik dolaşımdan beyne geçebilmesi genellikle difüzyon olayı ile olmaktadır (Goldstein ve Betz, 1986). Küçük molekül boyutu ve yüksek lipofiliteye sahip ilaç moleküllerinin difüzyonu daha kolay olmaktadır. Bunun yanı sıra lipofilik moleküller, kan dolaşımından perifer dokulara doğru geçme eğilimindedirler (Williams-Gray ve Worth, 2016). Bu durum beyne girebilecek molekül miktarının azalmasına sebep olur. İlaç moleküllerinin lipitteki çözünürlüğünün ve boyutunun yanında; yükü, üç boyutlu yapısı, protein bağlama derecesi beyne geçişindeki önemli etkenlerdendir (Lipinski ve diğerleri, 2001; Wang ve diğerleri, 2019).

Ön ilaç kullanımı

Ön ilaçlar farmakolojik olarak aktif olmayan ya da az çok aktif olup, uygulamadan sonra vücutta aktif forma dönüşen bileşiklerdir. Ön ilaç uygulaması ile ilaç moleküllerinin membran permeabilitesi arttırılmakta, sudaki ve/veya yağdaki çözünürlüğü değiştirilmekte ve böylece ilaç moleküllerinin bariyerleri geçebilmesi sağlanabilmektedir (Gould, 1975; Rautio ve diğerleri, 2008a; Rautio ve diğerleri, 2008b; Redasani ve Bari, 2015; Stella, 1975). Genellikle ilaç molekülünün lipofilitesini arttırma ile KBB' nin aşılabileceği belirtilmektedir. Ayrıca ilaç molekülüne glikoz, folik asit gibi moleküller bağlanarak özel membran taşıyıcılarına yapılan hedefleme ile de ilaç moleküllerinin KBB' yi geçebileceği düşünülmektedir (Han ve Amidon, 2000; Prokai-Tatrai ve Prokai, 2011).

İnvazif yöntemlerin kullanımı

Kan beyin bariyerini aşmada en etkili yöntem invazif yöntemdir. Bu yöntemde beyne ya da beyin omurilik sıvısına doğrudan ilaç uygulaması yapılmaktadır. Bu yöntem intrakranial kanama, infeksiyon, beyin ödemi, nörotoksisite gibi birçok risk taşımaktadır. Bu yolla beyne

ilaç uygulamada implantlar ve çözeltiler kullanılmaktadır (Harbaugh ve diğerleri, 1988; Krewson ve diğerleri, 1995; Westphal ve diğerleri, 2006; Yan ve diğerleri, 1994).

Kan beyin bariyerinin yapısının değiştirilmesi

Bu yöntemde karotid artere "mannitol, arabinoz" gibi % 0,9' luk sodyum klorür çözeltisinden daha yüksek bir osmotik basınç gösteren (hiperosmolar) maddelerin çözeltileri enjekte edilmekte ve beyinde bulunan endotel hücrelerinden dışarıya sıvı çıkışının olması sağlanmakta ve dokuların yapıları geçici olarak bozulmaktadır. Bu aşamadan sonra kan beyin bariyerinin o bölgedeki geçirgenliği arttırılmış olmaktadır (Millay ve diğerleri, 1986).

Bir diğer teknik ultrason kaynaklı mikro kabarcık oluşturma yöntemidir. Bu yöntemde normal dokulara zarar verilmeden geri dönüşümlü olarak hücreler arası sıkı bağlantılar (tight junction) etkisizleştirilir ve KBB hücreleri arasında boşluklar oluşturulur (Lin ve diğerleri, 2016). KBB yapısının değiştirilmesinde risk çok fazladır. Artan geçirgenliğe bağlı beynin kendini savunma mekanizmasının ortadan kaldırılması, geçici olarak da olsa kan dolaşımında bulunan toksik maddelerin, kimyasalların, fazla miktarda glikozun, plazma proteinlerinin ve mikroorganizmaların beyne geçip kalıcı hasar vermesine sebep olabilmektedir (Wohlfart ve diğerleri, 2012; Zhou ve diğerleri, 2018).

Reseptör aracılı taşımadan yararlanma

Kan beyin bariyerinde insülin, transferrin, leptin gibi peptitlere özgü reseptörler bulunmaktadır. İlaç molekülleri bu peptitlere bağlanarak reseptör aracılı taşıma ile beyne geçebilmektedirler. Buradaki sınırlama, reseptörlerin taşıma kapasiteleridir (Pardridge, 2002).

Hücreye penetrasyonu sağlayan peptitlerin kullanımı

Hücre delici peptitler olarak da adlandırılan penetratin, transportan gibi peptitler pozitif yüklüdür. Yapılarında en fazla 30 aminoasit içerirler. Hedef hücrenin negatif yüklü olması nedeniyle bu peptitler hücre ile etkileşime girerek hücreyi delme gibi bir etki gösterirler. Sonuç olarak etkin madde, bu sayede beyne giriş yapabilmektedir. Ancak bu yöntemde de kan dolaşımında bulunan toksik maddeler ve kimyasallar beyne geçip, kalıcı hasara sebep olabilmektedir (Guidotti ve diğerleri, 2017; Lindgren ve diğerleri, 2000).

Nazal yoldan ilaç moleküllerinin beyne geçişinin sağlanması

İnvazif olmayan yöntemlerden biri olan nazal uygulama, lokal, sistemik ve özellikle merkezi sinir sistemi etkili formülasyonların uygulanması açısından büyük önem taşımaktadır (Lungare ve diğerleri, 2016).

Burun, nefes alıp vermek gibi vücudun önemli bir fizyolojik olayını gerçekleştirmektedir. İki simetrik oyuktan oluşur ve bu oyuklar bir bölme ile birbirinden ayrılmıştır (Crowe ve diğerleri, 2018). Bu boşlukların yüzeyi mukoza tabakası ile kaplıdır. Mukoza tabakasının toplam alanı yaklaşık 150-160 cm^2 dir (Lochhead ve Thorne, 2012).

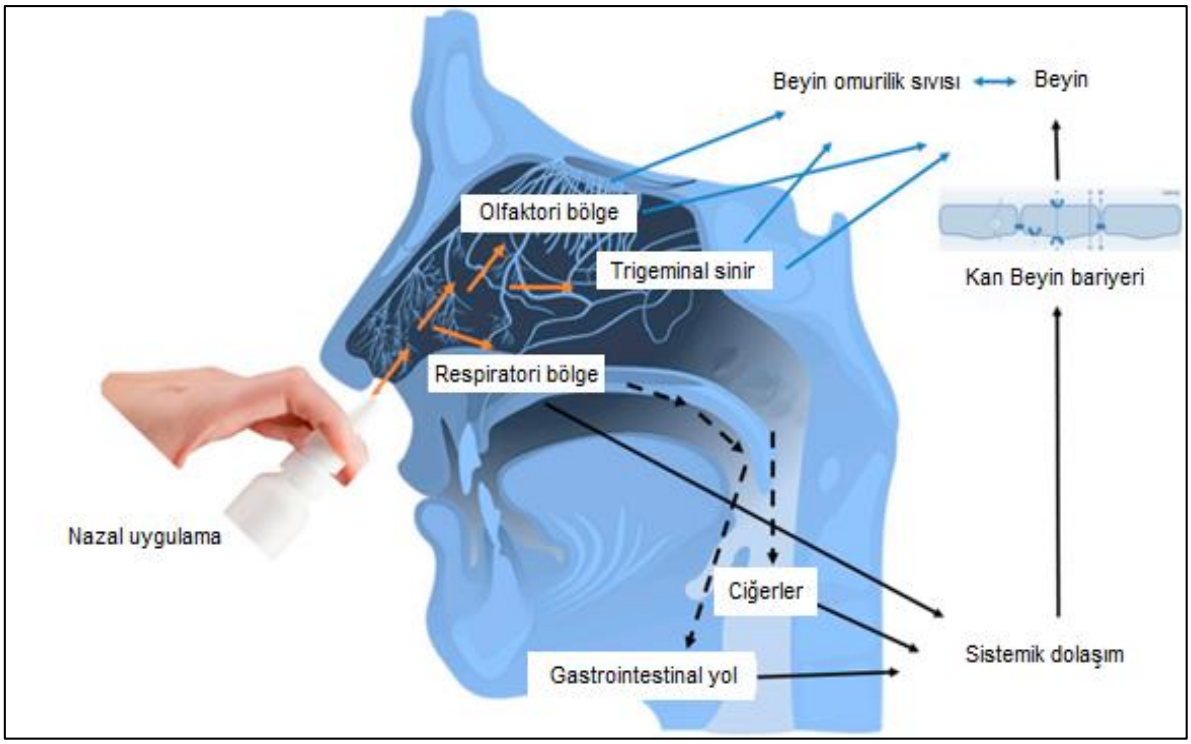
Nazal oyuklar, 3' er bölümden oluşmaktadır. Bunlardan ilki burnun girişinde bulunan vestibüler bölgedir. Yaklaşık 0,6 cm^2' lik bir alana sahiptir. Bu alandan emilim neredeyse imkânsızdır. Vestibüler bölge epitel doku hücreleri ile kaplıdır. Vestibüler bölgeden sonra respiratori bölge gelmektedir. Bu bölge, yüzey alanı ve damarlanmanın en yoğun olduğu bölgedir. Yüzey alanı yaklaşık 130 cm^2' dir. İlaç moleküllerinin sistemik kan dolaşımına geçişi bu bölgeden olmaktadır (Watelet ve Van Cauwenberge, 1999). Bu bölge mukus ile kaplıdır. Mukus tabakasının oluşturulmasını sağlayan goblet hücreleri de bu bölgede bulunmaktadır. Çevresel faktörlere göre mukus miktarı, burun nemi ve sıcaklığı ayarlamaktadır (Marttin ve diğerleri, 1998). İlaç moleküllerinin bu bölgeden absorblanması için mukus tabakasını geçip epitel dokuya ulaşması gerekmektedir.

Epitel dokuyu oluşturan hücreler çok sıkı dizilmiştir. Etkin maddelerin geçişi için zorlu bir engel gibi görünseler de bu hücreler etkin madde geçişi için yeterli hücre arası boşluğa sahiptirler (Deli, 2009). Epitel dokudan geçen ilaç molekülü ya doğrudan sistemik dolaşıma geçer ya da olfaktori bölgeye gelir. Buradan da beyin omurilik sıvısına (BOS) geçişi sağlanır. Mukusun viskozitesi yüksek olduğu için vestibüler bölgeden uzaklaşma hızı düşüktür. Bu durum, ilaç moleküllerine mukusu aşıp epitel dokuya ulaşması için yeterli süreyi vermektedir (Hussain, 1998).

Burun mukozası üzerinde silia denen kıvrımlı yapılar bulunmaktadır. Bu yapılar, burnun yüzey alanını arttırırlar. Burun yüzey alanının genişliği ve yüksek damarlanma oranı, ilaç moleküllerinin sistemik dolaşıma geçişi için bulunmaz bir fırsattır (Arora ve diğerleri, 2002). Son bölge olan olfaktori bölgede, olfaktori ve trigeminal nöronların başlangıcı bulunmaktadır.

Bu nöronlar, burun ile merkezi sinir sistemini birbirine bağlamaktadır. İlaç moleküllerinin merkezi sinir sistemine geçişleri bu bölgeden olmaktadır (Crowe ve diğerleri, 2018).

İlaç moleküllerinin nazal bölgeden beyne geçişi olfaktori veya trigeminal nöronlar aracılığıyla sağlanabilir (Gartziandia ve diğerleri, 2016). Bu geçişte, olfaktori nörona endositoz ile giren ilaç molekülü, ekzositoz ile beyin omurilik sıvısına atılır. Burnun yapısı ve ilaç moleküllerinin geçiş yerleri, Şekil 2.2 ‘ de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Burun yapısı ve bölümleri (Cunha ve diğerleri, 2017; Kapoor ve diğerleri, 2016)

2.4. Mukoadezyon

Adezyon, farklı iki yüzeyin birbirine yapışma eğilimini ifade eder. Biyoadhezyon ise; bir ilaç şeklinin biyolojik bir substrat ile olan etkileşimidir. Biyoadezyon ile ilacın uygulama yerinde kalış süresinde artış sağlamak; buna bağlı olarak da emilimde ve dolayısıyla biyoyararlanımda artış sağlamak mümkündür (Bruschi ve diğerleri, 2017; Hägerström, 2003; Hägerström ve Edsman, 2003; Huang ve diğerleri, 2000; Lee ve diğerleri, 2000; Woodley, 2001). Mukoadezif sistemler üretilirken, birçok polimerden yararlanılır. Bunlardan bazıları poliakrilik asitler, jelatinler, aljinatlar ve kitosanlardır (Chaturvedi ve diğerleri, 2011).

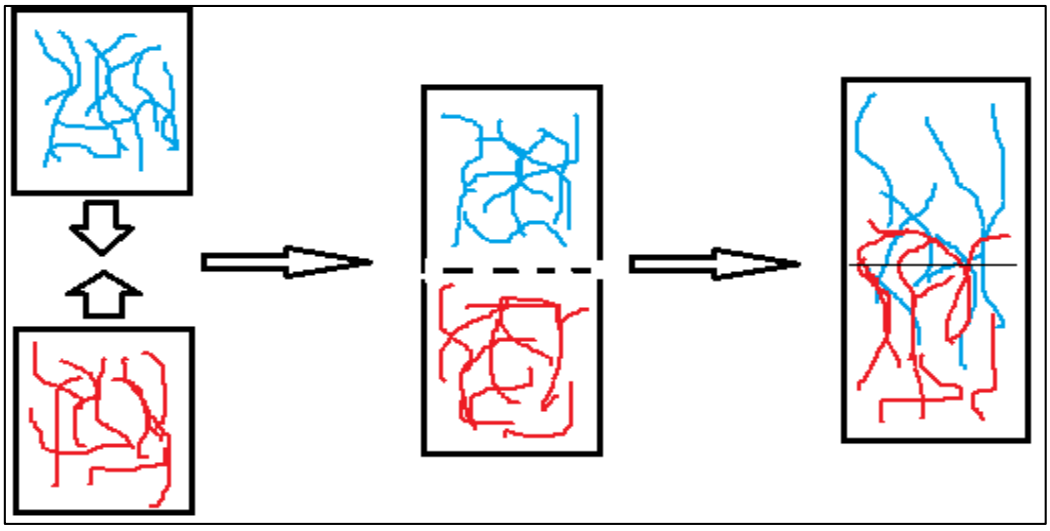
Literatürde Parkinson hastalığı tedavisinde kullanılan Ropirinol (Rao ve diğerleri, 2017), Selejilin hidroklorür (Sridhar ve diğerleri, 2018) ve levodopaya (Sharma ve diğerleri, 2014) ait mukoadezif jel çalışmaları bulunmaktadır.

2.4.1. Mukoadezyon mekanizmaları

Başarılı bir adezyon ve yüksek difüzyon için, formülasyonun geniş bir yüzeye yayılması gerekmektedir. Adezyon işi, yüzeylerin birbirlerini çekme kuvvetleri ile doğru orantılı artmaktadır (Lee ve diğerleri., 2000). Biyolojik substrat mukoza olduğunda, adezyon mukoadezyon olarak adlandırır. Adezif yüzeyi oluşturan tabaka mukustur (Das-Neves ve Bahia, 2006; Grabovac ve diğerleri, 2005).

Burundaki mukus, vücudun doğal bir savunma mekanizması olup, dış kaynaklı molekül ve bileşikleri burundan uzaklaştırma amacındadır. İlaç moleküllerinin absorbsiyonu için mukus tabakasını geçmesi ve epitel dokuya ulaşması gerekmektedir.

Mukoadhezyon mekanizması 2 aşamada gerçekleşmektedir. Bu aşamalar temas ve sağlamlaşma aşamalarıdır. İlk aşama, formülasyon ile mukus tabakasının temasıdır. Mukozayla etkileşimde mukosilier hareketler, organik sıvılar, osmotik basınç, elektrostatik itme ve Van der Waals çekme kuvvetleri etkilidir (Smart, 2005). Sağlamlaşma aşamasında ise, nem varlığında mukoadezif gücü oluşturan polimerler faaliyete geçmektedir. Formülasyon çeşitli bağlar ile mukus tabakasına bağlanmaktadır. Bu bağlanmada difüzyon ve dehidrasyon mekanizmaları ile hidrojen bağları rol almaktadır (Mathiowitz ve Chickering, 1999).



Şekil 2.3. Mukoadezif polimer ile mukoza arasındaki etkileşim (Smart, 2005)

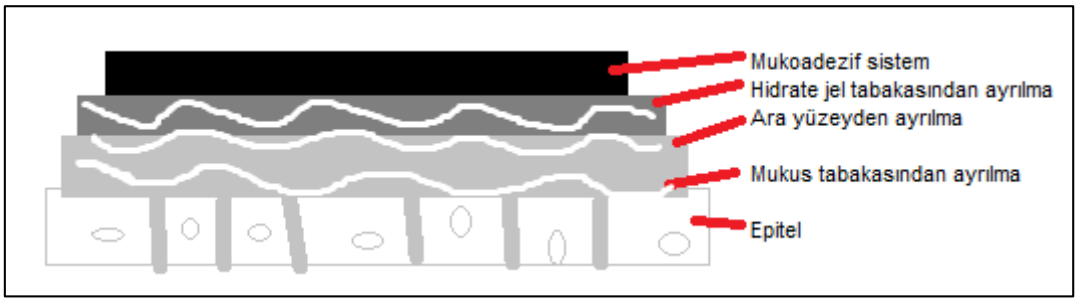
2.4.2. Mukoadezyon teorileri

Fiziksel ve kimyasal bağlarla birlikte gerçekleşen mukoadezyon olayı değişik teoriler kullanılarak açıklanmaya çalışılmıştır.

Elektriksel teori: Mukoadezif maddeler ile biyolojik maddeler arasındaki elektriksel çekime dayanan bir teoridir. Böylece iki yüzey birbiri ile temasta iken yükler birbirini çeker, çekiş gücü ile birlikte adezyon gerçekleşir.

Adsorpsiyon teorisi: Bu teoride mukoadezif maddeler mukozaya Van der Waals ve hidrojen bağları ile adsorbe olur. Adezyon teorisi olarak da adlandırılmaktadır.

Islatma teorisi: Bu teori sıvı sistemler için geçerlidir. Yüzeyler arası gerilim kuvveti ile ilişkilidir. Mukoza ile sıvı sistem arası temas açısı ne kadar düşükse, dokuya afinite o kadar büyük olur.



Şekil 2.4. Islatma teorisi (Smart, 2005)

Difüzyon teorisi: Bu teori polimer ile mukozanın teması sonrası polimer zincirlerinin mukoza içine giriş yapmasına dayanır. Polimerin doku ile temas süresi adezyonda en önemli etkendir.

Mekanik teori: Moleküler ağırlık, pH, konsantrasyon, temas süresi, iyonik gruplar gibi özelliklerden yola çıkarak moleküllerin etkileşimini göz önünde bulunduran bir teoridir (Hägerström ve Edsman, 2003; Huang ve diğerleri, 2000; Mansuri ve diğerleri, 2016; Paulsson, 2001; Smart, 2005). Mukoadezyon, polimerin özelliklerinden (molekül ağırlığı, konsantrasyon, viskozite, ıslanabilirlik), çevresel değişkenlerden (pH, basınç, temas ve süresi, su varlığı, basınç) ve fizyolojik özelliklerden (hastalık durumu, mukus miktarı) etkilenmektedir (Smart, 2005).

Mukoadezyonu etkileyen faktörler

Mukoadezyonu etkileyen faktörler aşağıda belirtilmiştir (Hägerström ve Edsman, 2003; Mansuri ve diğerleri, 2016; Smart, 2005):

- Polimere ilişkin faktörler (polimerin ağırlığı, polimerin konsantrasyonu, polimerin viskozitesi, polimerin ıslanabilirliği)
- Çevresel faktörler (pH, temas süresi, su varlığı, şişme)
- Fizyolojik faktörler (hastalık, mukus içeriği)

Mukoadezyon ölçümünde kullanılan yöntemler

Polimer ile mukoza arasındaki kuvvetin ölçümü için kullanılan yöntemlerden bazıları;

- Wilhelmy tablası ve yüzey gerilim metodu,
- Floresans işaretleme metodu,
- Değiştirilmiş yüzey gerilim metodu,
- Akış-kanal metodu,
- Yapışma metodu,
- Gerilme direnci metodudur.

Gerilme direnci metodu, en çok kullanılan metodlardan biri olup, Texture analyzer aleti bu metoda göre ölçüm yapmaktadır. Buna göre aletin alt kısmına preparat, üst kısmına ise biyolojik materyal yerleştirilir. Preparat ile materyalin belirli bir süre teması sonrasında yüzeylerin birbirinden ayrılması için gereken kuvvet ölçülür. Ölçülen kuvvetin, kullanılan biyolojik materyal alanına oranı mukoadezyon işini verir (Tugcu-Demiröz, 2017).

2.5. Nazal Uygulama

Nazal yoldan ilaç uygulanması, birçok avantaja sahiptir. Bunlardan bazıları;

- İnvazif olmayan bir ilaç uygulama yöntemi olması,
- Hastanın kendisi uygulayabilmesi,
- Etkin maddenin, karaciğer ilk geçiş etkisinden kurtulması,

- İlaç moleküllerinin beyne hedeflendirilebilmesi,
- Geniş bir absorpsiyon alanına sahip olması,
- Kan damarlarınca zengin yapısı,
- İlaçların hızlı absorpsiyonu ve buna bağlı yüksek biyoyararlanım göstermesi,
- Düşük enzimatik aktivite olması,
- İlaç moleküllerine yüksek geçirgenlik göstermesi,
- Oral yola alternatif bir yol olmasıdır (Erdo ve diğerleri, 2018).

Bunun yanında uygulama hacminin düşük, mukosiliyer arınmanın hızlı, yüksek iritasyon olasılığı ve enzimatik engeller, nazal yolun dezavantajları arasında yer almaktadır. Mukozadan geçiş transselüler, paraselüler yolla olmakla birlikte, iyon kanalları ve taşıyıcı proteinler de ilaç moleküllerinin taşınmasında rol almaktadır (Illum, 2003).

İlaçların nazal yoldan absorbsiyonunu etkileyen faktörler arasında şu sebepler yatmaktadır;

- Anatomik ve fizyolojik faktörler (Hastalık, çevresel faktörler),
- İlaca ait faktörler (Molekül ağırlığı, çözünürlük, pKa),
- Formülasyona ait faktörler (pH, viskozite, uygulama hacmi, konsantrasyon).

Nazal yoldan uygulanan dozaj şekilleri arasında damla, sprey, jel, merhem, toz, yıkama çözeltileri bulunmaktadır. Nazal uygulama, özellikle karaciğer ilk geçiş etkisini ortadan kaldırdığı için, düşük biyoyararlanım gösteren etkin maddelerin uygulanması açısından önemli bir yoldur. Ancak nazal mukozanın hızla yenilenmesi durumundan ötürü, mukoza yüzeyinde formülasyonun kalış süresinin kısa olması nedeniyle etkin maddenin biyoyararlanımının yeterli düzeyde olmadığı belirtilmiştir. Bu olumsuzluğu giderebilmek adına formülasyonların nazal mukozada kalış süresini arttırmaya yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu sistemlerden istenilenler nazal mukozaya yapışması, nazal mukoza yenilenmesinden etkilenme hızının yavaş olması önceliklidir (Choi ve diğerleri, 1998; Menzel ve diğerleri, 2017; Ravi ve diğerleri, 2015).

Biyoadezif polimerler kullanılarak yapılan çalışmalarda formülasyonların burunda kalış süreleri arttırılmış ve ilgili etkin maddenin biyoyararlanımında artış sağlanmıştır (Abouhussein ve diğerleri, 2018; Rao ve diğerleri, 2017; Ravi ve Baskaran, 2015).

Mukozada kalış süresinin arttırılmasına yönelik bir diğer yaklaşım, uygulama bölgesinde kendiliğinden jelleşen sistemlerin kullanılmasıdır. Bazı polimerlerin sıcaklık değişimine bağlı olarak jelleştiği bilinmektedir. Bu durum ısıya duyarlı jelleşme olarak adlandırılmaktadır (Bhalerao ve diğerleri, 2009; Ugwoke ve diğerleri, 2001, 2005; Zaki ve diğerleri, 2007).

Isıya duyarlı jel sistemleri, formülasyonun uygulanması esnasında (oda sıcaklığında) akışkan olup belirli sıcaklığa gelince jelleşirler. Özellikle burna uygulanan formülasyonlar için bu özellik idealdir. Uygulama, damlatma veya püskürtme ile olacağından, doğru miktarda doz ayarlaması yapılabilmektedir. Bu sistemlerde kullanılan polimerler düşük toksisiteye sahiptir, dokuyu tahriş etmezler ve suda çözünürlükleri yüksektir. Isıya duyarlı jelleşen polimerler olarak, genellikle poloksamerler, pektinler, kitosanlar, aljinik asitler ve türevleri kullanılmaktadır (Bhandwalkar ve Avachat, 2013; Miyazaki ve diğerleri, 1984).

Isıya duyarlı jel sistemleri ile mukoadezif polimerlerin bir arada kullanıldığı çalışmalar literatürde çokça mevcuttur. Nazal uygulanmak üzere poloksamer 407 ve hidroksipropil-beta-siklodekstrinin birlikte kullanıldığı ısıya duyarlı jel sistemi hazırlanıp, mukoadezif özellik kazandırmak amacıyla kitosan eklenmiştir. (Cho ve diğerleri, 2011). Poloksamer 407 ve Karbopol 934P ile ısıya duyarlı mukoadezif jel formülasyonu hazırlanmıştır (Majithiya ve diğerleri, 2006). Isıya duyarlı Poloksamer 407 ile mukoadezif bir polimer olan HPMC K4M kullanılarak nazal uygulanmak üzere bir formülasyon geliştirilmiştir (Rao ve diğerleri, 2017). Her üç formülasyonda yapılan incelemeler sonucunda artan mukoadezifliğe bağlı geçirgenliğin ve biyoyararlanımın arttığı, formülasyonun mukozada kalış süresinde artış olduğu saptanmıştır.

2.6. Katı Lipit Nanopartiküller

2.6.1. Tanım ve genel bilgiler

Katı lipit nanopartiküller (KLN), yağ/su tipi emülsiyonlara alternatif olarak üretilmiş sistemlerdir. Oda sıcaklığında katı halde olan lipit, yüksek sıcaklıkta su fazına eklenerek yağ/su tipi emülsiyonun yağ damlacıklarını oluşturur. Sistem soğutulduğunda katı lipitler elde edilir (Müller, 2000). Katı lipit nanopartiküller kesecik sistemler ve emülsiyonların avantajlarını içerirler. Parenteral, oral, oküler, topikal, nazal uygulanabilmektedirler (Ahmad ve diğerleri, 2019; Ban ve diğerleri, 2020; Mohammadi-Samani ve diğerleri, 2018; Wissing ve diğerleri, 2004). KLN' lerin avantajlarından bazıları;

- Düşük sistemik toksisite gösterirler,
- Biyo-bozunur ve biyo-uyumlu özelliktedirler,
- Kontrollü salım yapabilirler,
- Bu sistemlere hem hidrofilik hem de lipofilik etkin maddeler yüklenebilir,
- Otoklavda sterilize edilebilirler,
- Etki bölgesine hedeflenebilirler,
- Büyük ölçekli üretimlerinin kolay olmasıdır (Harms ve Müller-Goymann, 2011; Kaur ve diğerleri, 2008; Numanoğlu, 1994; Wissing ve diğerleri, 2004; Youssef ve diğerleri, 2018).

Katı lipit nanopartiküllerin kullanımını sınırlayan faktörler arasında;

- Düşük etkin madde yükleme oranı,
- Saklanması sırasında gözlenebilen polimorfik değişimler bulunmaktadır (Wissing ve diğerleri, 2004).

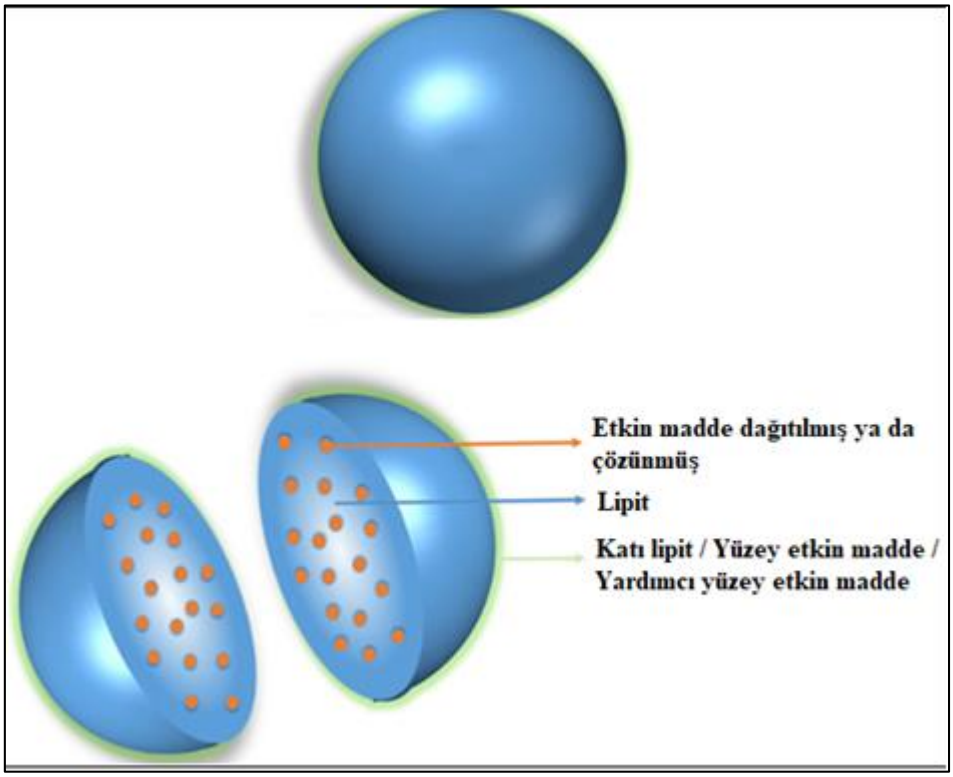
Kolloidal taşıyıcı sistemlerden olan katı lipit nanopartiküller, 50-1000 nanometre boyutundadırlar. Suda dağıtılan küresel katı lipit partiküllerden oluşurlar. Katı yağları içeren hidrofob çekirdekleri vardır. Hidrofilik veya lipofilik ilaçlar bu sistemlere yüklenebilmektedir (Kaur ve diğerleri, 2008).

Literatürde farklı tip yağlar ve yüzey etkin maddeler kullanılarak geliştirilen katı lipit nanopartiküller mevcuttur. Bunlar Çizelge 2.2' de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. Farklı tip yağ ve yüzey etkin madde kullanılarak üretilen katı lipit nanopartiküller

Katı Yağlar	**Yüzey etkin madde / Yardımcı yüzey etkin madde**	**Referans**
Compritol 888 ATO, Migliyol 812	Migliyol 812, Retinol	(Jenning ve diğerleri, 2000)
Stearik asit	PVA	(Pandey ve diğerleri, 2005)
Comprtiol 888 ATO	Poloksamer 188	(Freitas ve Müller, 1998)
Tristarin gliserit, Stearik asit	Lesitin, Poloksamer 188, PEG 400MS	(Mei ve diğerleri, 2003)
Imwitor 900, Dynasan 114, Compritol 888 ATO, Geleol, Cutina	Poloksamer 188, Span 85, Poloksamer 407, Tego Care 450, Tagat S	(Zimmermann, 2001)
Compritol 888 ATO, Setilpalmitat	Tween 80, Span 85	(Tabatt ve diğerleri, 2004)
Phospholipon 90G	Tween 80, Sorbitol	(Attama ve diğerleri, 2008)
Tripalmitin, Tristearin, Gelucire 50/13	Lesitin	(Chattopadhyay ve diğerleri, 2007)
Dokosanoik asit, Oktadekanoik asit, Heksadekanoik asit, Tetradekanoik asit	PVA	(Meng ve diğerleri, 2020)

Son yıllarda yeni nesil katı lipit nanopartiküller geliştirilmiştir. Bunlar nano yapılandırılmış lipit taşıyıcılar (Nano Lipid Carrier, NLC) ve lipit-lipit ilaç konjugatları (Lipid-Drug Conjugate, LDC) olarak adlandırılmıştır. Katı ve sıvı lipitlerin karışımlarından oluşan bir çekirdek ile karakterize edilirler. Karışım sonucu oluşan matris, katı lipitten daha düşük bir erime sıcaklığına sahiptir ancak vücut sıcaklığında katılığını korumaktadır. KLN' ler ve bu sistemler karşılaştırıldığında, daha fazla etkin madde yükleme ve ilacın sistemden kaçışını engelleme gibi özellikleri bulunmaktadır (Gastaldi ve diğerleri, 2014). Katı lipit nanopartiküllerin yapısı Şekil 2.3' de gösterilmektedir.



Şekil 2.5. Katı lipit nanopartiküllerin yapısı (Mishra ve diğerleri, 2018)

2.6.2. Üretim yöntemleri

<u>Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi</u>

Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi, sıcak ve soğuk homojenizasyon olmak üzere 2 ye ayrılmaktadır.

Sıcak teknikte, lipit, erime derecesinin biraz (5-10° C) üzerinde eritilir. Etkin madde bu erimiş lipitte çözülür. Kullanılacak yüzey etkin maddenin ve varsa yardımcı yüzey etkin

maddenin sulu çözeltisi de erimiş lipit ile aynı sıcaklığa getirilir. İki faz birbirine karıştırılarak yağ/su tipi kaba bir emülsiyon elde edilir. Bu emülsiyon yüksek basınç altında (100-1000 bar) dar bir alandan çıkışa zorlanır. Bu işlem formülasyon optimizasyonu ve istenilen tanecik büyüklüğüne göre birkaç defa (3-5 defa) tekrarlanır ve lipit damlasının boyutu küçülür. Son aşamada ise lipit damlacıkları katılaşır ve KLN süspansiyonu oluşur (Schwarz ve diğerleri, 1994).

Soğuk teknik, lipitlerde gözlenebilecek kristalizasyon ve/veya etkin maddenin sıcaklığa bağlı stabilitesindeki değişmeler nedeniyle kullanılmaktadır. İşlem sıcak teknik ile lipitlerin erime sıcaklıklarının biraz üzerinde eritilmesi ve etkin maddenin bu eriyiğe eklenmesi ile aynıdır. Ancak etkin madde eklendikten sonra bu eriyik kuru buz veya sıvı nitrojen yardımıyla hızlıca soğutulur. Ardından bu katı lipit kütle öğütülerek toz hale getirilir (Mukherjee ve diğerleri, 2009). Bu yöntem sonrası elde edilen KLN' ler ultrasonik enerji ile daha küçük boyutlara indirilebilir (Jannin ve diğerleri, 2018; Kumar ve diğerleri, 2020).

Yüksek hızda karıştırma-ultrasonikasyon yöntemi

Lipit, erime derecesinin biraz (5-10° C) üzerinde ısıtılır. Etkin madde bu erimiş lipitte çözülür (yağ fazı). Kullanılacak yüzey etkin maddenin ve varsa yardımcı yüzey etkin maddenin sulu çözeltisi de yağ fazı ile aynı sıcaklığa getirilir. İki faz birbirine karıştırılarak yağ/su tipi kaba bir emülsiyon elde edilir. Bu emülsiyon soğutulma aşamasında bir ultra-turrax yardımı ile yüksek hızda karıştırılır ve katı lipit nanopartiküller elde edilir. Bu yöntemde sisteme çok fazla enerji verileceğinden, elde edilen katı lipit nanopartiküllerin partikül boyutları çok geniş bir aralıkta olmaktadır (Jannin ve diğerleri, 2018).

Emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yöntemi

Bu yöntemde lipit, su ile karışmayan organik çözücüde çözündürülür. Bu çözelti, bir sulu faz içinde emülsifiye edilir. Bu çözeltiden organik faz buharlaştırılır ve KLN' ler elde edilir. Yöntem hazırlanırken herhangi bir ısı uygulanmaz. Yüksek sıcaklıklarda bozulabilen etkin maddelerle KLN hazırlanması için uygundur. Ancak organik çözücü kullanmak dezavantaj yaratmaktadır (Pooja ve diğerleri, 2016).

Çözücü enjeksiyon yöntemi

Bu yöntemde yağ fazı, su ile karışabilen bir çözücüde (etanol, aseton) çözündürülür. Bu karışım, yağın erime derecesinin üzerine ısıtılır ve iğne yardımı ile yüzey etkin madde içeren/içermeyen sulu faza damlatılır. Nano boyutta oluşan lipit damlalar katılaşırlar ve çökerler. Süzüldükten sonra KLN' ler elde edilmiş olur. Katı lipit nanopartiküllerin boyutu, kullanılan yağ, yüzey etkin madde, yardımcı yüzey etkin madde, çözücü ve dış fazın viskozitesinden etkilenir (Schubert, 2003).

Çifte emülsiyon yöntemi

Bu yöntem genellikle hidrofilik karakterdeki etkin maddeler için uygulanmaktadır. Etkin madde ve varsa yüzey etkin madde, su fazında çözündürülür ve bu faz lipit içeren organik faza eklenir ve karıştırılır. Yağ içinde su emülsiyonu (S/Y) elde edilir. Bu emülsiyon, emülgatör/surfaktan içeren sulu faz ile emülsifiye edilerek S/Y/S emülsiyonu oluşturulur. Daha sonra organik faz buharlaştırılarak KLN' ler elde edilir (Bodmeier ve diğerleri, 1992; Youssef ve diğerleri, 2018).

Membran kontraktör yöntemi

Bu yöntemde erime sıcaklığının biraz üzerinde ısıtılıp eritilen lipitler, basınç altında por genişliği belli olan membrandan belirli bir basınçla geçirilerek sulu faz içine gönderilir. Lipit damlacıklar karışmakta olan sulu faz içinde soğuyup donarak KLN' leri oluşturur. Lipitleri aniden katılaştırmak, daha küçük boyutlarda katı lipit nanopartiküllerin elde edilmesine olanak sağlar (Charcosset ve diğerleri, 2005).

Mikroemülsiyon yöntemi

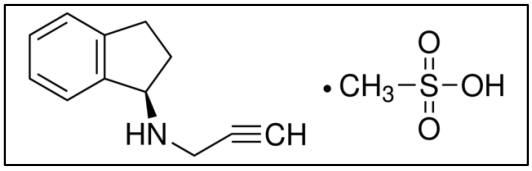
Bu yöntem Gasco tarafından bulunmuş ve patentlenmiş bir yöntemdir (Gasco, 1993). Çalışmamızda bu tekniği modifiye ederek kullanmış olmamız nedeniyle tekniğin ayrıntısından bahsedilecektir. Bu yöntemde kullanılacak lipit eritilir. Etkin madde, erimiş lipide eklenerek yağ fazı oluşturulur. Su fazı, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin maddenin sulu çözeltisinden oluşur ve yağ fazı ile aynı sıcaklığa getirilir. Bu fazlar manyetik karıştırıcıda belirli bir sıcaklıkta karıştırıldığında sıcak mikroemülsiyon elde edilir. Her ne kadar oluşan sisteme mikroemülsiyon denilmişse de, oluşan damlacıklar 1000 µm' den küçüktür. Sistem, yine

manyetik karıştırıcıda belirli bir süre soğumaya bırakılır ve yağ damlacıkları katılaşarak katı lipit nanopartikülleri oluşturur. Bu yöntemin en büyük problemi, yüksek oranda yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde içermesidir (Boonme ve diğerleri, 2013; Fadda ve diğerleri, 2013; Gasco ve diğerleri, 2009; Mao ve diğerleri, 2003; Mei ve diğerleri, 2003; Shah ve diğerleri, 2014; Trombino ve diğerleri, 2019; Tung ve diğerleri, 2019; Xia ve diğerleri, 2008).

2.7. Rasajilin Mesilat

2.7.1. Rasajilin mesilatın yapısı ve fizikokimyasal özellikleri

Molekül formülü $C_{12}H_{13}N.CH_4O_3S$ ve molekül ağırlığı 267,34 g/mol' dür. Biyofarmasötik sınıflandırma sistemine göre sınıf 3 grubundadır. Çözünürlük çalışmalarının yapıldığı literatürlerde değişik pH lardaki çözünürlük değerlerinin çok farklı olduğu saptanmıştır. Rasajilin mesilatın pH 3,5 - 4 deki çözünürlüğü 570 mg/mL, yapay nazal sıvıdaki (pH 5,5 – 6,5) çözünürlüğü 92 mg/mL, pH 10,5 - 11' de çözünürlüğü ise 5,5 mg/mL' dir. (Fernandez ve diğerleri, 2012; Kanwar ve diğerleri 2019; Meloun ve diğerleri, 2010; Peskin, 2010). Başka bir literatürde ise pH 6 daki çözünürlüğünü 19 mg/ml, pH 7' deki çözünürlüğünü 617 mg/ml olarak vermektedir (Genina ve diğerleri 2013; Singhal ve diğerleri, 2021). Hazırlanacak formülasyonun, nazal ortama uygulanacak olması nedeniyle çalışmamızda çözünürlük değeri olarak 92 mg/mL esas alınmıştır. Beyaz renkli kristal toz halindedir. Erime derecesi yaklaşık 158 °C' dir. Suda ve etanolde rahatça çözünür (Guay, 2006; Muller, 2014). Rasajilin mesilatın molekül yapısı Şekil 2.4' de gösterilmektedir.



Şekil 2.6. Rasajilin mesilatın molekül yapısı (Muller, 2014)

2.7.2. Rasajilin mesilatın farmakolojisi ve etki mekanizması

Rasajilin mesilatın etkisini, monoamin oksidaz tip B (MAO-B) enzimini inhibe ederek dopamin yıkımını azaltması sonucunda dopaminerjik aktivitede artışa neden olarak gösterdiği düşünülmektedir (Chahine ve Stern, 2011; Oldfield ve diğerleri, 2007; Riederer ve Laux, 2011; Weinreb ve diğerleri, 2011).

Rasajilin mesilat oral alındığında karaciğerde hızla metabolize olmaktadır. Karaciğerde N-dealkilasyona ve hidroksilasyona uğrar ve 3-hidroksi-N-propajil-1-aminoindan ve 3-hidroksi-1-aminoindan' a dönüşmektedir (Oldfield ve diğerleri, 2007). Etkin maddenin %64' ü metabolize olur. %1' den daha azı ise idrardan değişmeden atılır (Thebault ve diğerleri, 2004).

Rasajilin mesilat, 0,5-10 mg oral doz aralığında lineer farmakokinetik göstermektedir. Plazma proteinlerine %88-94, albümine %61-63 oranlarında bağlanmaktadır. Tek doz oral verildikten sonra hızla emilerek 30-45 dakika içinde (T_{max}) ve en yüksek plazma konsantrasyonuna (C_{max}) ulaşır. Dağılım hacmi (Vd) 182 L olup, klerensi 94,3 L/sa dır. Karaciğer ilk geçişine uğradığı için biyoyararlanımı %36' dır. Gıda alımına bağlı olarak t_{max} değeri değişmezken, C_{max} ve eğri altı alan (AUC) yaklaşık %20-60 oranında azalır. Besinlerle birlikte ya da aç karnına kullanılabilir. Türk ilaç pazarında 0,5 ve 1 mg' lık oral tablet formülasyonları bulunan rasajilin mesilatın önerilen günlük dozu 1 mg'dır (Chen ve Ly, 2006; Rabey ve diğerleri, 2000).

Stearik asit, lutrol ve tween 80 kullanılarak, rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartiküllerin hazırlandığı bir çalışmada 160 - 210 nm büyüklüğünde katı lipit nanopartiküller elde edilmiş, ilaç yükleme kapasitesi %73 – 76 olarak bulunmuştur. İn-vitro salım deneyi diyaliz torbasında 24 saat süresince gerçekleştirilmiş ve %92 oranında salım gözlenmiştir (Kunasekaran ve Krishnamoorthy, 2016).

Poloksamer 407, poloksamer 188 ve carbopol 934p ve kitosan kullanılarak, rasajilin mesilat yüklü mukoadezif in-situ jel sisteminin hazırlandığı bir çalışmada nazal uygulanan formülasyonun, oral uygulamaya göre biyoyararlanımda artışın mümkün olduğu düşünülmüştür. Tavşanlarda yapılan 4 saatlik geçiş çalışması sonucunda, biyoyararlanımın 4-6 kat arttığı gözlenmiştir (Ravi ve diğerleri, 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.1' de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Uretici	Ulke
Rasajilin Mesilat	Pharmactive	Istanbul/TURKIYE
Gelucire 50/13 (Stearoyl polyoxylglycerides)	Gattefosse	Saint-Priest/FRANSA
Cremophor RH40 (Polietilenglikol-40 Hidrojene hint yağı)	Basf	Saint-Priest/FRANSA
Labrasol (Kaprilokaproil polioksi-8 gliserit)	Gattefosse	Saint-Priest/FRANSA
Poloksamer 188 (Polietilen glikol-blok-polipropilen glikol-blok-polietilen glikol)	Basf	Ludwigshafen/ALMANYA
Poloksamer 407 (Polietilen glikol-blok-polipropilen glikol-blok-polietilen glikol)	Sigma Aldrich	Missouri/ABD
HPMC E5 (Hidroksipropil metil selüloz)	Sigma Aldrich	Missouri/ABD
Trehaloz	Sigma Aldrich	Missouri/ABD
Mannitol	Basf	Ludwigshafen/ALMANYA
Potasyum Klorür	Basf	Ludwigshafen/ALMANYA
Kalsiyum Klorür	Basf	Ludwigshafen/ALMANYA
Potasyum Dihidrojen Fosfat	Sigma Aldrich	Missouri/ABD
Sodyum Klorür	Basf	Ludwigshafen/ALMANYA
Sodyum Asetat	Sigma Aldrich	Missouri/ABD
Sodyum Hidroksit	Sigma Aldrich	Missouri/ABD
Bi distile su (Reverse osmos cihazından elde edilmiş, elektriksel iletkenlik 10^{-7} mOhm).		

3.1.2. Kullanılan cihaz ve malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan cihaz ve malzemeler Çizelge 3.2' de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar ve malzemeler

Cihaz	Marka/Model	Ülke
Hassas terazi	Ohaus	Çin
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Ika RCT	Almanya
Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)	Shimadzu DSC-60	Japonya
Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)	Perkin Elmer	ABD
Spektrofotometre cihazı	Shimadzu UV-1600	Japonya
Distile su sistemi	Mes Mp Minipure	Türkiye
Liyofilizatör	Christ Alpha 1-2LD Freeze Dryer	Almanya
pH metre	Sartorious	Almanya
Texture analyzer	TA-XT Plus	İngiltere
Viskometre aleti	Brookfield DV – III + Rheometer	İngiltere
Ultra - turrax	Heidolph SilentCrusher M	Almanya
Zetasizer	Malvern Nano ZS	İngiltere
Franz-difüzyon hücreleri	Çalışkan Cam	Türkiye
Santrifüj	Hitachi CS 150GXL	Japonya
Mikropipet (Isolab)	Eppendorf	Almanya
Diyaliz torbası (Cut off: 12000 Da)	Dispo Dialyzer Sigma	ABD
Stabilite test kabinleri	Nüve TK252	Türkiye

3.2. Yöntem

3.2.1. Önformülasyon çalışmaları

Rasajilin mesilatın erime derecesi tayini

Rasajilin mesilatın erime derecesi tayini için diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) aleti kullanılmıştır. Sıcaklık artış hızı 10°C/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Örneklerden 2 mg tartılarak alüminyum kaplara konulmuş ve analiz edilerek etkin maddenin termogramı çıkartılmıştır. Deney 25-300°C sıcaklık aralığında, azot gazı altında gerçekleştirilmiştir.

Rasajilin mesilatın FTIR analizi

Rasajilin mesilatın Fourier Transform Infrared (FTIR) spektrumu alınmıştır. 1mg tartılan etkin madde, cihaza konulur. Cihaz, örnek tarafından farklı dalga boylarında absorbe edilen enerjiyi ölçerek maddenin bileşenleri ve molekül yapısı hakkında bilgi verir. Farklı dalga boylarında elde edilen absorbsiyon bantları, maddenin kendisine özgüdür ve maddenin tanınmasında kullanılır.

Rasajilin mesilatın UV spektrofotometresinde dalga boyu taraması

Rasajilin mesilatın UV spektrofotometresi kullanılarak maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu (λmax) belirlenmiştir. Dalga boyu taraması için rasajilin mesilatın yapay nazal sıvı (YNS) içerisinde çözeltisi hazırlanmış ve 200-400 nm arasında 1 cm' lik kuvartz küvetler kullanılarak UV spektrumu alınmıştır. Rasajilin mesilat, yapay nazal sıvıda 265 nm' de maksimum absorbans vermiştir. Yapay nazal sıvı aşağıda verilmektedir (Castile ve diğerleri, 2013; Galgatte ve diğerleri, 2014).

Yapay Nazal Sıvı, pH 6,5

NaCl	*8,77 g*
KCl	*2,98 g*
$CaCl_2$	*0,59 g*
Distile Su ym	*1L*

Analitik yöntem validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, kullanılacak yöntemin sürekli olarak doğru ve güvenilir bir şekilde istenen ve beklenen sonuçları verdiğinin kanıtlanması için yapılan işlemlerin tümüdür. Validasyon işlemleri ile belirlenen yöntemin geçerliliği ve güvenirliği kanıtlanmış olur.

Bu çalışmada rasajilin mesilatın miktar tayininde (etkin madde enkapsülasyon etkinliği, yükleme kapasitesi, in-vitro salım deneyleri, ex-vivo geçiş çalışması) UV Spektrofotometresi kullanılmıştır.

Doğrusallık

Analitik yöntem doğrusallığı, belirlenen konsantrasyon aralığında numune konsantrasyonları ile elde edilen yanıtın orantılı olduğunun göstergesidir. Doğrusallık parametrelerini göstermek için rasajilin mesilatın stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılmış, farklı derişimlerde (0,125-300 µg/ml) absorbansları ölçülmüştür. Lineer regresyonla doğru denklemi elde edilmiş, gerekli istatistiksel parametreler hesaplanmıştır. Bu çalışmada 3 farklı stok çözelti hazırlanmış; her birinden ayrı ayrı seyreltmeler yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

Doğruluk ve geri elde

Analiz yönteminin doğruluğu, gerçek değerler ile ölçülen değerler arasındaki benzerlikle belirlenir. Miktar tayini yönteminin doğruluğu, geri elde yüzdesiyle ilişkilidir. Geri elde edilen değerin %95 olasılıkla daha önceden kabul edilmiş değerler arasında kalması gerekir. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvıda (YNS) hazırlanan ve 80, 100 ve 120 µg/ml derişimlerindeki çözeltilerinde, kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde miktarları hesaplanmış ve veriler gerekli istatistiksel parametreler ile değerlendirilmiştir.

Kesinlik

Bir yöntemin tekrarlı ölçümleri arasındaki benzerlik derecesini ifade eden kavram, kesinliktir. Analitik yöntem kesinliğini tayin etmek amacı ile deney içi ve deneyler arası kesinlik çalışmaları yapılmış ve gerekli istatistiksel parametreler değerlendirilmiştir.

Deney içi kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

Rasajilin mesilatın 100 µg/ml derişimdeki çözeltisi, λmax dalga boyunda art arda 10 defa okunmuştur. Elde edilen sonuçlar, gerekli istatistiksel parametreler ile değerlendirilmiştir.

Deneyler arası kesinlik (Tekrar elde edilebilirlik)

Rasajilin mesilatın 50, 75 ve 100 µg/ml derişimlerde çözeltileri hazırlanmış; çözeltilerin absorbansı 3 gün boyunca 3 defa belirlenmiştir. Elde edilen absorbanslara karşı gelen derişimlerin ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayı değerleri hesaplanmıştır.

Özgünlük ve seçicilik

Kullanılan analiz yönteminin, analiz edilecek maddeye özgü olması gerekmektedir. Bu amaçla formülasyon içindeki yardımcı maddelerin aynı dalga boyunda absorbans verip vermediğine bakılmıştır. Formülasyon hazırlanmasında kullanılan tüm yardımcı maddeler incelenmiş, suda çözünen her yardımcı madde için 265 nm dalga boyunda UV spektrofotometresinde ölçüm yapılmıştır.

Duyarlılık ve saptama sınırı

Duyarlılık (LOD), analitik yöntemin saptayabileceği en küçük konsantrasyon değeridir. Kantitatif olarak tayin edilebilen en küçük konsantrasyon değeri ise saptama sınırı (LOQ) olarak ifade edilir. Duyarlılık ve saptama sınırı, aşağıdaki denklemler ile hesaplanır (ICH Expert Working Group, 2005).

Duyarlılık sınırı (LOD) = (3,3 x σ) / S
Saptama sınırı (LOQ) = (10 x σ) / S
σ: Kalibrasyon eşitliğinin standart sapma değeri
S: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Rasajilin mesilat çözeltisinin stabilitesinin incelenmesi

Stabilite çalışmaları, formülasyonun dayanıklılığının belirlenmesi sebebiyle gerçekleştirilmektedir. Stabilite problemi, fiziksel, kimyasal, terapötik, toksikolojik ya da

mikrobiyolojik olarak ortaya çıkabilir. Rasajilin mesilatın kimyasal stabilitesini belirlemek adına değişik çalışmalarda HPLC ve UV spektrofotometresi miktar tayini tekniği olarak kullannılmıştır (Kunasekaran ve Krishnamoorthy, 2015; Mulsa ve diğerleri, 2013; Patel ve Mulgund, 2013.). Yapılan bu çalışmada da kimyasal analiz yöntemi olarak UV spektrofotometre tekniği kullanılmıştır.

Stabilite çalışmasında rasajilin mesilatın pH 6,5 YNS içinde 275 µg/ml konsantrasyonundaki çözeltileri kullanılmıştır. Bu çalışma, oda sıcaklığında ve yüksek sıcaklıklarda yapılan çalışmalar sırasında, rasajilin mesilatın dayanıklı olup olmadığını anlamak için yapılmıştır. Katı lipit nanopartikül hazırlama yöntemlerinden mikroemülsiyon yöntemine göre, kullanılacak yağlar erime derecelerinin 10°C üzerinde ısıtılırlar. Gelucire 50/13' ün 45°C' de eridiği bilinmektedir. Hazırlanan çözeltiler hem oda sıcaklığında (25°C) hem de stres koşulları düşünülerek 80°C sıcaklıkta 24 saat tutulmuş ve stabiliteleri incelenmiştir. Hızlandırılmış ve uzun süreli stabilite çalışmalarında oluşmayan ancak daha yüksek sıcaklıklarda olası degredasyonu ürünlerini belirleyebilmek amacıyla stres testleri yapılır. Bu testlerde belirlenen sıcaklık, lipitin erime sıcaklığının ve formülasyon hazırlanırken ortam sıcaklığının 15-20°C üzerinde olmalıdır. Bu sebeple stres koşullarında belirlenen sıcaklık 80°C olarak ayarlanmıştır (ICH Expert Working Group, 2005). Numunelerden farklı zaman aralıklarında örnekler alınmış, miktar tayinleri yapılmıştır.

Etkin madde – yardımcı madde etkileşimleri

Çalışmalar DSC' de 10°C/dk tarama hızında, 200°C' ye kadar yapılmıştır. Katı lipit nanopartikül formülasyonunun hazırlanmasında kullanılan tüm maddelerin ve bunların 1:1 oranında fiziksel karışımları hazırlanıp termogramları alınmıştır. Bunun için örnekler tartılarak alüminyum örnek kaplarına konulmuş; hücrelerin kapakları kapatılarak DSC nin ısıtma hücresine yerleştirilmiş ve 20-200°C sıcaklık aralığında azot gazı altında deneyler yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan maddeler ve bunların karışımları Çizelge 3.3' de belirtilmiştir.

Çizelge 3.3. DSC çalışmasında hazırlanan maddeler ve bunların 1:1 oranında hazırlanan karışımları

Maddeler	Karışımlar
Rasajilin mesilat	Rasajilin mesilat: Gelucire 50/13 (1:1)
Gelucire 50/13	Rasajilin mesilat: Poloksamer 407 (1:1)
Poloksamer 407	Rasajilin mesilat: Mannitol (1:1)
Mannitol	Rasajilin mesilat: HPMC E5 (1:1)
HPMC E5	Tüm maddelerin fiziksel karışımı

3.2.2. Katı lipit nanopartikül formülasyonunun hazırlanması ve karakterizasyonu

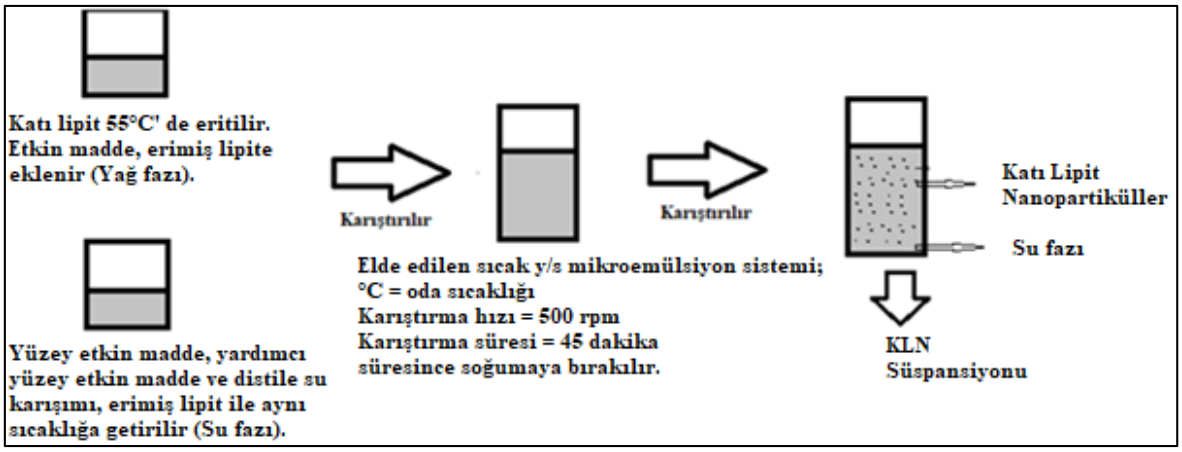
Katı lipit nanopartikül hazırlanmasında kullanılan yağ ve yüzey etkin maddelerin özellikleri, yağ/su yapısındaki emülsiyonun oluşturulabilmesi için çok önemlidir. Katı lipitin erime derecesi, formülasyonun hazırlanması sırasında uygulanacak sıcaklık derecesinin belirlenmesi açısından önemlidir. Bu nedenle literatürdeki çalışmalar incelenmiş, katı lipit nanopartikül üretiminde kullanılan katı yağlar değerlendirilmiştir. Bunlar arasında, pellet ve toz formunda olan, Gelucire 50/13, Gelucire 48/16, Precirol ATO 5, Compritol 888 ATO, Compritol HD5 ATO bulunmaktadır. Bu yağlardan erime derecesi en düşük olan ve edinebildiğimiz Gelucire 50/13' ün kullanılmasına karar verilmiştir (Date ve diğerleri, 2011; Hazzah ve diğerleri, 2015). Tez kapsamında katı lipit nanopartikül hazırlanmasında kullanılan bileşenler Çizelge 3.4' de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Katı lipit nanopartikül hazırlanmasında kullanılan maddeler

Ticari Adı	Erime Derecesi (°C)	HLB Değeri	Görevi
Gelucire 50/13	45	11 *a	Katı yağ
Labrasol	Oda sıcaklığında sıvı	14 *b	Yardımcı yüzey etkin madde
Cremophor RH 40	Oda sıcaklığında sıvı	14-16 *c	Yüzey etkin madde

* a) (Panigrahi ve diğerleri, 2018), b) (Caddeo ve diğerleri, 2012), c) (Zeng ve diğerleri, 2017)

Katı lipit nanopartiküllerin hazırlanmasında Bölüm 2.6' da bahsedilen mikroemülsiyon yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Formülasyonlar hazırlanırken Gelucire 50/13, 55°C' de eritilmiştir. Gelucire 50/13, 45°C' de eriyor olmasına rağmen, ısının sistemde homojen iletilmesi için bu sıcaklık belirlenmiştir. Etkin madde, bu erimiş lipite eklenmiş ve yağ fazı oluşturulmuştur. 55°C' de çözelti görünümünde olan yağ fazı tümüyle berrak durumdadır; bu bize etkin maddenin bu sıcaklıkta yağ fazında tümüyle çözündüğünü göstermektedir. Su fazı olarak yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde içeren sulu çözelti, erimiş lipit ile aynı sıcaklığa getirilmiştir. Fazlar karıştırılarak yağ/su mikroemülsiyon sistemi oluşturulmuştur. Ardından oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı altında 500 rpm karıştırma hızında 45 dakika karıştırılarak soğumaya bırakılmıştır. Katı lipit nanopartikül hazırlama yöntemi, Şekil 3.1' de şematize edilmiştir. Etkin madde yüklü KLN' ler hazırlanırken, etkin madde erimiş yağ fazına eklenmiştir.



Şekil 3.1. Mikroemülsiyon yöntemi ile RM içeren katı lipit nanopartiküllerin hazırlanması

Kullanılan deney tasarımı ve yazılım

Herhangi bir formülasyonu geliştirirken olası tüm değişkenler arasındaki etkileşimlerin incelenmesi çok önemlidir. Bu amaçla konvansiyonel formülasyon geliştirme çalışmalarına göre harcanan zaman ve yapılan deney sayısında tasarruf sağlamak için istatistiksel deney tasarımı (Design of Experiment, DoE) yapılmaktadır. Deney tasarımı, formülasyon geliştirme basamağındaki birçok parametreyi kontrol ve optimize etmek, değişkenler arasındaki ilişkileri belirlemek, elde edilen veriler ile optimum formülasyon geliştirmek amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Tasarım sonucu elde edilen veriler yorumlanarak belirli bir deney tasarım alanı oluşturulabilir. Bunun sonucunda daha az çalışma ve zaman gereksinimi, gereksiz madde/malzeme kayıplarına sebep olmadan optimize formülasyon eldesi, olası problemlerin önlenmesi, ölçek büyütme aşamasında uyumun kolay sağlanması gibi avantajlar sağlanır. Deney tasarımı, tam faktöriyel tasarım, kısmi faktöriyel tasarım, box-behnken tasarım, merkezi kompozit tasarımlar olarak sınıflandırılmaktadır.

Bu çalışmada katı lipit nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında, istatistiksel tasarım programı olan Design Expert® 6 (Stat-Ease Inc., ABD) kullanılmış olup tam faktöriyel tasarım ve merkezi kompozit tasarım kullanılmıştır.

Tam faktöriyel tasarım

En az iki parametreye ait en az iki seviyenin bulunduğu deneylerde, seviyelerin birbirleri ile çarpımı sonucu oluşan kombinasyonlardır. Deney tekrarı, rastgele deney ve bloklama gibi 3

temel prensibe sahiptir. Bu prensiplerin temel amacı, bilinmeyen ve kontrol edilemeyen hataların deneyi etkilemesini önlemektir (Severino ve diğerleri, 2012).

Merkezi kompozit tasarım

Bu tasarım, tam faktöriyel tasarıma alternatif olarak kullanılır ve daha az sayıda deney ile daha fazla bilgi elde edilebilinir (Aslan, 2007). Bu deney tasarımında eksen noktaları kullanılır. Bu noktalar, her faktör için düşük ve yüksek değerler gerektirir. Grafik üzerinde bulunan eksen noktaların merkez noktalardan uzaklığı, faktör sayısına göre değişiklik göstermektedir (Khataee ve diğerleri, 2010).

Bu çalışmada temel olarak Gasco' nun patentindeki bilgiler temel alınmıştır (Gasco, 1993). Design Expert programı ile tam faktöriyel tasarım kullanılarak farklı oranlarda yağ, yüzey etkin madde, yardımcı yüzey etkin madde ve su karışımları hazırlanmış ve katı lipit nanopartiküller oluşturulmaya çalışılmış; kullanılan kimyasal maddelerin formülasyondaki oranlarının katı lipit nanopartikül oluşumuna etkileri 80 farklı formülasyonda incelenmiştir. Tasarım sonucu oluşturulan formülasyonlar Çizelge 3.5' de gösterilmektedir.

Bu deney tasarımındaki bağımsız parametreler;

A: Yağ oranı (%10 - %20 - %30 - %40)
B: Yüzey etkin madde oranı (%12 - %15 - %20 - %25 - %30)
C: Yardımcı yüzey etkin madde oranı (%3 - %5 - %10 - %15).

İşlem parametreleri, Şekil 3.1' de belirtildiği gibi sabit tutulmuştur.

Bağımlı parametre (cevap);

A: Katı lipit nanopartikül süspansiyonunun oluşup oluşmaması.

Bağımsız parametrelerdeki oranlar, oluşturulacak KLN süspansiyonundaki maddelerin formülasyondaki oranlardır.

Çizelge 3.5. Tam faktöriyel tasarım ile oluşturulan formülasyonlar

Formülasyon	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Faktör 4	Cevap 1
	% Yağ	% Yüzey Etkin Madde	% Yardımcı Yüzey Etkin Madde	% Su	KLN Oluşumu
F1	10	25	3	62	-
F2	20	15	15	50	-
F3	30	20	3	47	-
F4	20	15	5	60	-
F5	10	30	5	55	-
F6	30	20	10	40	-
F7	30	12	10	48	-
F8	40	20	5	35	-
F9	10	15	10	65	-
F10	40	25	15	20	-
F11	30	12	3	55	-
F12	40	25	5	30	-
F13	**10**	**12**	**3**	**75**	**+**
F14	20	25	5	50	-
F15	40	30	3	27	-
F16	40	25	3	32	-
F17	10	25	5	60	-
F18	30	15	15	40	-
F19	10	20	10	60	-
F20	40	20	10	30	-
F21	30	30	10	30	-
F22	40	20	3	37	-
F23	30	30	15	25	-
F24	20	20	10	50	-
F25	20	12	5	63	-
F26	10	20	15	55	-
F27	40	15	10	35	-
F28	20	15	3	62	-
F29	20	15	10	55	-
F30	40	15	3	42	-
F31	10	12	10	68	-
F32	30	20	5	45	-
F33	40	15	15	30	-
F34	30	12	15	43	-
F35	**10**	**15**	**3**	**72**	**+**
F36	10	25	15	50	-
F37	30	25	3	42	-
F38	30	12	5	53	-
F39	40	12	10	38	-
F40	40	30	10	20	-
F41	40	12	3	45	-
F42	20	30	3	47	-

Çizelge 3.5. (devam) Tam faktöriyel tasarım ile oluşturulan formülasyonlar

Formülasyon	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Faktör 4	Cevap 1
	% Yağ	% Yüzey Etkin Madde	% Yardımcı Yüzey Etkin Madde	% Su	KLN Oluşumu
F43	40	20	15	25	-
F44	20	30	15	35	-
F45	10	12	15	63	-
F46	**10**	**12**	**5**	**73**	**+**
F47	30	15	5	50	-
F48	30	25	5	30	-
F49	40	12	15	33	-
F50	30	25	10	35	-
F51	30	30	5	35	-
F52	10	20	3	67	-
F53	40	15	5	40	-
F54	30	15	10	45	-
F55	30	25	15	30	-
F56	30	15	3	52	-
F57	20	12	15	53	-
F58	20	20	15	45	-
F59	10	30	10	50	-
F60	10	30	3	57	-
F61	10	30	15	45	-
F62	30	30	3	37	-
F63	20	12	5	63	-
F64	10	25	10	55	-
F65	20	25	3	52	-
F66	40	25	10	25	-
F67	20	20	3	57	-
F68	20	25	10	45	-
F69	20	20	5	55	-
F70	20	30	10	40	-
F71	10	15	15	60	-
F72	20	25	15	40	-
F73	10	20	5	65	-
F74	30	20	15	35	-
F75	20	12	3	65	-
F76	40	12	5	43	-
F77	10	15	5	70	-
F78	40	30	15	15	-
F79	20	12	10	58	-
F80	40	30	5	25	-

Bu deney tasarımı sonucunda formülasyonlardan;

Çizelge 3.6. Katı lipit nanopartikül oluşturabilen formülasyonlar

Formülasyon	% Yağ	% Yüzey etkin madde	% Yardımcı yüzey etkin madde	% Su
F13	10	12	3	75
F35	10	15	3	72
F46	10	12	5	73

ile çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir. Hazırlanan diğer formülasyonların soğutma aşamasında fiziksel yapılarını değiştirip dondukları gözlenmiş; katı lipit içeren süspande sistem oluşturamadıkları saptanmıştır.

Standardizasyon çalışmaları

Partikül boyutu ve dağılımı hem sistemin fiziksel stabilitesi hem de hazırlanacak katı lipit nanopartiküllerin beyne geçişinin sağlanabilmesi için çok önemlidir. Formülasyonlar her hazırlandığında, belirlenen sınırlar içinde aynı partikül büyüklüğü ve dağılımına sahip olmalıdır.

Katı lipit nanopartikül oluşturabilen formülasyonların (F13, F35, F46) karıştırma hızı ve sürelerine göre tam faktöriyel ve merkezi kompozit deney tasarımı yapılmış ve formülasyonların partikül büyüklükleri, polidispersite indeksleri ve zeta potansiyelleri incelenmiştir. Bu çalışmanın amacı, ilgili 3 formülasyon için, partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksinin en düşük düzeyde olmasını sağlayacak, uygun bir zeta potansiyele sahip formülasyon için, uygun karıştırma hızı ve süresini tespit etmektir. Bu değerler tespit edilirken, parametreler arası istatistiksel denklemler önem taşır (ANOVA). ANOVA sonucunda kurulan parametreler arası ilişkinin gücü belirlenir.

Bu deney tasarımındaki bağımsız parametreler (işlem parametreleri),

A: Karıştırma hızı (rpm)
B: Karıştırma süresi (dakika)

Bağımlı parametreler (cevaplar) ise,

A: Partikül büyüklüğü
B: Polidispersite indeksidir.

Standardizasyon çalışmalarında denenen hususlar:

3 farklı formülasyonla (F13, F35, F46) elde edilen sıcak mikroemülsiyon sistemleri, aşağıdaki 2 farklı teknikle soğutularak, yağ damlacıklarının katılaşıp katı lipit nanopartiküllere dönüşmesi incelenmiştir.

1) Mikroemülsiyon tekniği ile KLN hazırlanmasında mikroemülsiyonun 5000-10000 rpm arasında ultra-turraxda 30 – 60 saniye süresince karıştırılarak oda sıcaklığında soğutulduğunda küresel ve nano boyutta katı lipit nanopartiküllerin elde edildiği bildirilmiştir (Ahlin ve diğerleri, 1998; Cengiz ve diğerleri, 2006). Design Expert 6.0 yazılımında merkezi kompozit deney tasarımı kullanılarak belirlenen rpm ve karıştırma süresinde her bir formülasyon ultra-turraxtan geçirilerek belirlenen partikül büyüklükleri ve polidispersite indeksi incelenmiştir. Deney tasarımı sonucu denenmesi gerekecek rpm değerleri 3964.5 – 5000 – 7500 – 10000 – 11035.53; karıştırma süreleri ise 23.28 - 30 - 45 - 60 - 66.2 sn olarak bulunmuştur. Merkezi kompozit tasarımın sonucunda elde edilen küsüratlı sayılar, ultra-turrax da ayarlanamayacak sayılar olduğundan yukarıya yuvarlama yapılmıştır. Çalışma sonucunda formülasyonlar 100 kat seyreltilmiş, partikül boyutu ve PDI değerleri incelenmiş ve bu değerlerin çok yüksek olduğu saptanmıştır. Bu nedenle ultra-turrax kullanımından vazgeçilmiştir. Uygun bulunmamasına rağmen sonuçlar bulgularda gösterilmiştir.
2) Oda sıcaklığında yapılan soğutma işlemi esnasında, lipit partiküllerin yapışmasını engellemek için sistem belirli bir rpm' de manyetik karıştırıcı altında karıştırılmış ve bunun standardizasyonu yapılmıştır. Tam faktöriyel deney tasarımı kullanılarak yapılan bu çalışmada formülasyonlarda 500, 750 ve 1000 rpm karıştırma hızı ve 30, 45 ve 60 dk karıştırma süreleri denenmiş; formülasyonlar 100 kat seyreltilmiş ve en düşük partikül büyüklüğü, polidispersite indeksini veren koşul saptanmıştır. Tüm seyreltmeler bidistile su ile yapılmıştır. Formülasyonların zeta potansiyelleri ölçülmüştür. İstatistiksel analizleri yapılmıştır. Analiz sonucunda "F" değeri 0.05' den küçük olanlar anlamlı kabul edilir. (Agbo ve diğerleri, 2016; Triplett ve Rathman, 2008).

Formülasyonlar, 100 kat seyreltilerek partikül büyüklükleri ve polidispersite indeksleri incelenmiş, KLN formülasyonu hazırlamak için gerekli karıştırma hızı 500 rpm ve karıştırma süresi 45 dk olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak F13, F35 ve F46 formülasyonlarının KLN' ye dönüşmesi esnasında karıştırma hızının 500 rpm, karıştırma süresinin 45 dk, soğutma sıcaklığının oda sıcaklığı olmasının uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu aşamada hazırlanan 3 formülasyon partikül büyüklüğü, polidispersite indeksleri, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde miktarları açısından kıyaslanmış ve bu değerlerin olabildiğince küçük olması istendiği için, çalışmalara formülasyonlardan F13 ile devam edilmesi kararlaştırılmıştır. Bundan sonraki tüm çalışmalar, F13 formülasyonu ile gerçekleşmiştir.

KLN süspansiyonunda partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksinin belirlenmesi

Hazırlanan etkin madde içermeyen katı lipit nanopartikül süspansiyonu ve etkin madde yüklü katı lipit nanopartikül süspansiyonunun (RM-KLN) partikül büyüklükleri, dağılımı ve zeta potansiyeli Malvern Zetasizer Nano ZS aleti ile ölçülmüştür. Partikül büyüklüğü ölçüm aralığı bu cihaz için 0,3 nm – 10 µm' dir. Cihaz partikül büyüklüğü ve dağılımını ölçerken Dinamik Işık Saçılımı tekniğini kullanmaktadır. Bu teknik ile partikül büyüklüğünün ve dağılımının ölçülmesi, ışığın farklı şiddetlerde saçılmasını sağlayan Brown hareketlerini gerçekleştiren partiküllerin gönderilen lazer ışığını farklı derecelerde saçmasından dolayı olmaktadır. Partiküllerin boyut farklılığı sayesinde ışık farklı şiddetlerde saçılmakta ve Stokes-Einstein eşitliği kullanılarak partiküllerin büyüklükleri belirlenmektedir.

Hazırlanan katı lipit nanopartikül süspansiyonları hiç bekletilmeden partikül büyüklüğü ölçme küvetine konmuş ve ölçümler üç paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (n=3).

Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi

Rasajilin mesilatın günlük kullanımda dozu 1 mg dır (Rabey ve diğerleri, 2000). Bu tez çalışmasının amacı burundan uygulanabilecek bir sistem geliştirmektir. Bu nedenle formülasyonun bir damlalık yardımıyla damlatılarak ya da ölçülü doz veren bir alet ile püskürtülerek uygulanacağı düşünülmüştür. Hazırlanan formülasyonun dansitesi ölçülmüş, gerekli ayarlamalar yapılmış ve standart damlalık ile 1 damlasında 1 mg rasajilin mesilat olacak şekilde ayarlanmıştır.

Enkapsülasyon etkinliği hesaplanırken, 0.2 g etkin madde yüklü 10 g katı lipit nanopartikül süspansiyon formülasyonu ve etkin madde içermeyen 10 g katı lipit nanopartikül süspansiyon formülasyonu hazırlanmıştır. Her iki formülasyon da 4°C' de, 18000 rpm hızda, 1 saat boyunca santrifüj edilmiştir. Etkin madde içeren katı lipit nanopartikül süspansiyonunun süpernatantından alınan örnek, 100 kat seyreltildikten sonra etkin madde içermeyen formülasyonun süpernatantından alınan 100 kat seyreltilmiş örneğe karşı UV spektrofotometresinde 265 nm' de değerlendirilmiştir. Enkapsülasyon etkinliğini hesaplamak için kullanılan eşitlik aşağıda belirtilmektedir (Eş. 3.1), (Kunasekaran ve Kannan, 2015).

$$\%EE = \frac{Pratikte\ analiz\ edilen\ etkin\ madde\ miktarı}{Teorikte\ ilave\ edilen\ etkin\ madde\ miktarı}\ x\ 100 \tag{3.1}$$

Liyofilizasyon işlemi

Liyofilizasyon işlemi su bazlı çözelti veya süspande haldeki sistemin dondurulması ve düşük basınçta suyun süblime olarak buharlaşıp sistemden uzaklaştırılması sonucu yapının kurutulmasını sağlar. Liyofilizasyon işleminden sonra yapının tekrar suda dağıtılabilmesini kolaylaştırmak için liyoprotektanlar/kriyoprotektanlar kullanılmaktadır. Bu maddeler sayesinde özellikle partiküler bir sistemin geri dönüşümsüz agregasyonu önlenir (Cavalli, 1997; Schwarz ve Mehnert, 1997).

Liyofilizasyon işlemi liyoprotektan kullanılmadan da yapılabilir. Bu çalışmada hem liyoprotektansız hem de liyoprotektanlı olmak üzere 2 farklı liyofilizasyon işlemi gerçekleştirilmiş, işlem sonrası kütleler distile suda dağıtılmış ve partiküllerin büyüklükleri ve polidispersite indeksleri ölçülmüştür. Amaç,

- Sistemin suda en kısa sürede dağılmasını sağlayan ve işlem öncesi partikül büyüklüğü ve dağılımına benzer sonuçları veren liyoprotektanı saptamak,
- En uygun partikül boyutunu ve polidispersite indeksini veren liyoprotektan ve oranını bulmaktır.

Liyoprotektansız olarak yapılan liyofilizasyon işleminden sonra, sistem distile suda dağılmamış, birbirine yapışıp topaklanmıştır.

Liyoprotektan olarak mannitol ve trehaloz; KLN:Liyoprotektan oranı 1:0.1, 1:0.2, 1:0.4, 1:0.5, 1:0.6 olacak şekilde denenmiş ve liyofilizasyon sonrası elde edilen toz halindeki kütle 30g saf suda dağıtılarak, kullanılan liyoprotektanın partikül büyüklüğü ve dağılımı üzerine etkisi incelenmiştir. Liyofilizasyon işlemi 0,021 atm basıncında -55°C’ de 48 saat süresince gerçekleştirilmiştir.

Liyoprotektan olarak mannitol kullanıldığında ve KLN:Mannitol oranı 1:0.4, 1:0,5 ve 1:0,6 olduğunda su ile karıştırma sonrasında homojen bir dağılım elde edilememiştir. Bu yüzden KLN:Liyoprotektan oranı 1:0.1, 1:0.2 olan sistemlerle çalışmaya karar verilmiştir. Sistemlerin içerikleri Çizelge 3.7’ de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Hazırlanan formülasyonların içerikleri

Liyofilizasyona sokulan formülasyonda KLN:Liyoprotektan oranı				**Liyofilizasyon sonrası elde edilen formülasyonda KLN:Liyoprotektan oranı**			
1:0.1		**1:0.2**		**1:0.1**		**1:0.2**	
Yağ	10g	**Yağ**	10g	**Yağ**	10g	**Yağ**	10g
YEM	12g	**YEM**	12g	**YEM**	12g	**YEM**	12g
Y.YEM	3g	**Y.YEM**	3g	**Y.YEM**	3g	**Y.YEM**	3g
RM	2g	**RM**	2g	**RM**	2g	**RM**	2g
Mannitol	2,7g	**Mannitol**	5,4g	**Mannitol**	2,7g	**Mannitol**	5,4g
D.Su	ym 100g	**D.Su**	ym 100g	**%90,9 KLN + %9,1 Mannitol**		**%83,3 KLN + %16,7 Mannitol**	

3.2.3. Isıya duyarlı jel formülasyonunun hazırlanması ve karakterizasyonu

Bu çalışmada amaç, oda sıcaklığında burun damlası olarak kullanılabilecek, buruna damlatıldıktan sonra mukoza yüzeyinde hemen jelleşecek, mukoadezif özellikte olacak rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartikül içeren jel sistem geliştirmektir. Çalışmanın bu bölümünde katı lipit nanopartiküllerin mukoadezif özellik ve sıcaklığa bağlı jelleşme özelliğini değiştirmeyecek bir jel sistemi geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla ısıya duyarlı jelleşme özelliğine sahip olan poloksamerlerden 2 tanesi (Poloksamer 188, Poloksamer 407) ve sisteme mukoadezif özellik verebilmek için de non-iyonik ve adezif özellikte olan HPMC E5 polimeri seçilmiştir.

Polimer oranları ve jelleşme derecesinin belirlenmesi

Öncelikle Poloksamer 188' in ve Poloksamer 407' nin farklı oranlardaki (%5, %10, %11, %13 %15, %16.5 %17, %17.5, %20) sulu çözeltileri hazırlanmış ve jelleşme sıcaklıkları ölçülmüştür. Sulu çözelti, içinde bir balıkla ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üstüne yerleştirilmiş ve sıcaklık artışı 1°C/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Sıcaklık belirtilen hızda arttırılmış ve manyetik balığın (6x15 mm, PTFE) aksamaya başladığı nokta, jelleşmenin başladığı nokta olarak belirlenmiştir (Mahajan ve diğerleri, 2013). Çözeltinin burun mukoza sıcaklığında (30-34°C, ort. 32°C) jelleşip jelleşmediği saptanmıştır. Daha sonraki aşamada HPMC E5 polimeri, farklı oranlarda (%0.25, %0.5, %1, %2) kullanılarak poloksamer içeren karışımlara eklenmiş ve sistemlerin jelleşme sıcaklıkları yeniden ölçülmüştür.

Akış özelliği ve viskozitenin belirlenmesi

Çalışmamızda hazırlanan sistemin oda sıcaklığında akışkan olması, uygulama anında rahatça damlatılması, burun mukozasına temasta sıcaklığa bağlı jelleşmesi gerekmektedir. Bu nedenle

viskozite ölçümü önemli ve gereklidir. Viskozite ölçümleri 25°C ve 32°C' de Brookfield Programmable, DV-III Viskometre aletinde, spindle no:52 kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kayma hızına karşı kayma gerilimi ve viskozite grafikleri çizilmiştir. Sistemlerin non-lineer akışa uyması ve her noktada viskozitesinin farklı olması nedeniyle Power Law eşitliği, sistemin viskozite değerinin saptanmasında ve akış özelliğinin incelenmesinde kullanılmıştır. Bu eşitlik aşağıda belirtilmiştir (Eş. 3.2).

$$\eta = \boldsymbol{K\gamma^{n-1}}$$

$$\boldsymbol{ln}\eta = \boldsymbol{lnK} + (\boldsymbol{n} - \mathbf{1}).\boldsymbol{ln\gamma} \qquad (3.2)$$

γ = Kayma hızı (1/s)
η = Viskozite (mPa.s)
n = Power Law sabiti (Akış davranışı indeksi)
K = Akış yoğunluğu indeksi (mPa.s)

Eşitlikte yer alan sabit (n), nevtonian akış için 1, psödoplastik akış için 0-1 arasında olmaktadır.

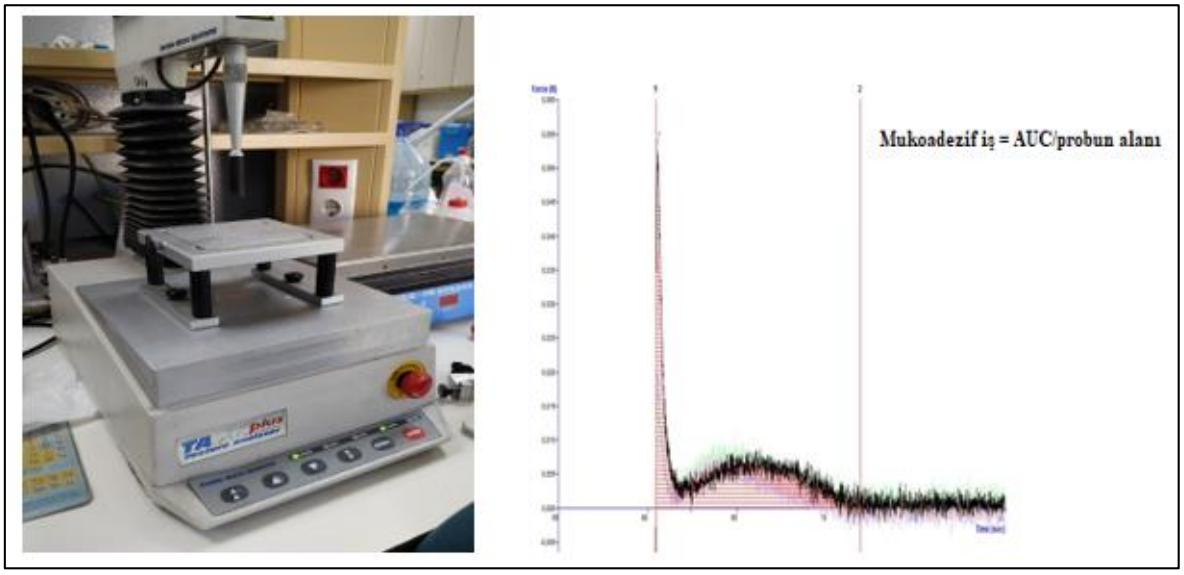
Bu çalışma, Poloksamer 407 + HPMC E5 (%17 + %0,25 ve %17 + %0,5) sistemleri ve katı lipit nanopartikül içeren jel sistemlerinde gerçekleştirilmiştir.

Mukoadezif kuvvetin belirlenmesi

Adeziflik, iki farklı yüzey arasındaki etkileşimi gösterir. İlk kompresyondaki kuvvet alanıdır. Probun yüzeyi ile jelin yüzeyi arasındaki çekme kuvvetini yenmek için gereken işi temsil etmektedir. Isıya duyarlı jel formülasyonlarının mekanik özelliklerinin incelenmesinde TA-XT Plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems, UK) cihazı kullanılmıştır. Mukoadezif kuvvetleri belirlenecek RM yüklü jel formülasyonundan sabit miktarda alınarak alet üzerinde bulunan tablaya konulmuştur. Mezbahadan temin edilen koyun burnu, veteriner yardımıyla çıkartılıp -80°C' de saklanmıştır. Deney başlamadan hemen önce çıkartılan burun mukozaları oda sıcaklığında YNS içinde bekletilmiştir. Mukozalar aletin probuna tutturulmuştur. Burun mukozası taşıyan prob, alt tablaya yerleştirilen jel sistemine bir baskı uygulamış ve ardından geri çekilmiştir. Geri çekilirken de adezyon grafiği oluşmuştur. Veriler, aletin kendisine ait program olan Texture Exponent 2.0.6.0. yazılım programı tarafından verilmiştir. Bu aletle çalışırken proba tutturulan doku, aletin

tablasında bulunan formülasyona temas ettirilir. Temastan sonra prob uzaklaşır ve doku ile formülasyonun tamamen ayrışmasına kadarki geçen sürede grafik oluşur. Bu grafikte eğri altında kalan alan dokuyu jelden ayırmak için gereken enerjiyi vermektedir. Bulunan iş, kullanılan yüzey alanına bölündüğünde mukoadezyon işi elde edilir (Eş. 3.3). TA-XT Plus Texture Analyzer aleti ve ölçüm sonucu elde edilen örnek grafik Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

$$Mukoadezyon\ işi = \frac{AUC\ (Eğri\ altı\ alan)}{\pi r^2\ (\ jel\ ile\ temas\ eden\ mukoza\ alanı)}\ x\ 100 \qquad (3.3)$$



Şekil 3.2. Texture Analyzer aleti ve mukoadezif güç elde grafiği

3.2.4. Sonuç formülasyonun hazırlanması ve karakterizasyonu

Etkin madde yüklü katı lipit nanopartikül süspansiyonu hazırlandıktan sonra mannitol kullanılarak liyofilize edilmiştir. Etkin madde yüklü liyofilize katı lipit nanopartiküller ile önceden hazırlanan ısıya duyarlı jel sistemleri oda sıcaklığında 300 rpm karıştırma hızı ve 60 dakikalık sürede manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve RM yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonu hazırlanmıştır.

Hazırlanan RM yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonunun jelleşme sıcaklığı, sadece jel formülasyonundan farklılık gösterebileceğinden, bu formülasyonda jelleşme sıcaklığı tekrar kontrol edilmiş ve polimer oranlarında değişikliğe gidilmek zorunda kalınmıştır. Sonuç formülasyonda;

- Partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli tespiti çalışması (Formülasyon 100 kat seyreltilmiş ve Bölüm 3.2.2' de belirtildiği şekilde yapılmıştır),
- Akış özelliği ve viskozitenin tespiti çalışması (Bölüm 3.2.3' de belirtildiği şekilde yapılmıştır),
- Mukoadezif kuvveti belirleme çalışmaları (Bölüm 3.2.3' de belirtildiği şekilde yapılmıştır),
- Partiküllerin SEM ile görüntülenmesi çalışması,
- İn-vitro salım çalışması,
- Ex-vivo geçiş çalışması,
- Stabilite çalışması yapılmıştır.

Formülasyonun SEM görüntüsü

Formülasyonun morfolojik özelliklerini, görüntülemek amacıyla SEM (yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu) cihazı kullanılmıştır. Ölçümler Dicle Üniversitesi DÜBTAM SEM Laboratuvarı' nda gerçekleştirilmiştir. SEM ile görüntüleme yapmak için formülasyonlar 10000 kat distile su ile seyreltilmiş, alüminyum folyo üzerine damlatılıp 24 saat süre boyunca oda sıcaklığında kurutulmuş ve grid üzerine çift taraflı karbon bant ile yapıştırılarak sabitlenmiştir. SEM' de ölçümler düşük vakum altında, 40000-100000 büyütme ile ve 10 kV' de yapılmıştır. Aynı görüntüleme çalışması, hem formülasyonlar arası hem de formülasyonların önceden ölçülen partikül büyüklüğü grafikleri ile kıyaslamasının yapılabilmesi için RM yüklü KLN süspansiyonu ve RM yüklü liyofilize KLN' de de yapılmıştır.

İn-vitro salım çalışması

İn-vitro salım ve ex-vivo geçiş çalışmalarında kullanılmak üzere 4 farklı formülasyon hazırlanmıştır. Her bir formülasyon, %2 oranında etkin madde içerecek şekilde hazırlanmıştır. Formülasyonların pH değerleri ölçülmüş olup; RM yüklü çözeltinin pH değeri 7,0, RM yüklü jelin pH değeri 7,03, RM içeren KLN süspansiyonunun pH değeri 7,01, RM yüklü liyofilize KLN içeren jel sisteminin pH değeri 7,03 olarak bulunmuştur. Hazırlanan formülasyonların içerikleri Çizelge 3.8' de belirtilmiştir.

Çizelge 3.8. İn-vitro ve ex-vivo çalışmalarda kullanılan formülasyonların içerikleri

%2 RM içeren çözelti		
Rasajilin mesilat		2 g
Distile su	ym	100 g

%2 RM içeren jel		
Poloksamer 407		15,5 g
HPMC E5		0,25 g
Rasajilin mesilat		2 g
Distile su	ym	100 g

%2 RM içeren KLN süspansiyonu		
Gelucire 50/13		10 g
Cremophor RH 40		12 g
Labrasol		3 g
Rasajilin mesilat		2 g
Distile su	ym	100 g

%2 RM yüklü liyofilize KLN içeren jel		
Poloksamer 407		15,5 g
HPMC E5		0,25 g
RM içeren liyofilize KLN *		32,4 g
Distile su	ym	100 g
*RM içeren liyofilize KLN **		
Gelucire 50/13		*10 g*
Cremophor RH 40		*12 g*
Labrasol		*3 g*
Rasajilin mesilat		*2 g*
Mannitol		*5,4 g*

RM yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonunda etkin maddenin diyaliz membrandan geçişinin incelenmesi için 16ml hacminde ve yüzey alanı 1.1 cm^2 olan Franz difüzyon hücreleri kullanılmıştır. Sistem enjektör yardımı ile alınarak verici odacığa aktarılmıştır. Verici odacığa konulan sistemde 40 mg etkin madde olacak şekilde ayarlama yapılmıştır. Bu miktar, yapılması planlanan hayvan deneylerine göre ayarlanmıştı. Sıçanların burun hacmi 50 µl' dir. Günlük doz miktarı 1mg olan RM' nin bu 50 µl içinde olması gerekmekteydi. Franz difüzyon hücresinde, membrana tamamen yayılacak (1,1cm^2) ve kapatacak minimum miktarın 2 ml olduğu belirlenmiştir. Bu yüzden verici odacığa konulacak formülasyon 2 ml olup 40 mg etkin madde içerecek şekilde bir ayarlamaya gidilmiştir.

Franz difüzyon hücresinde Cut-off değeri 12000 olan diyaliz membrandan geçiş incelenmiştir. Deney öncesi YNS' de 12 saat bekletilen diyaliz membran Franz difüzyon hücresine yerleştirilmiştir. Verici odacığa rasajilin mesilat içeren sistem yerleştirilmiş; alıcı odacığa ise pH 6,5 YNS eklenerek Franz hücreleri 32 °C' deki su banyosuna aktarılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında (15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 360, 480 dk.) 1-2 ml örnekler alınmış, alınan örnek hacmi yerine YNS eklenmiştir. Tüm geçiş çalışması boyunca sink koşulda çalışıldığı saptanmıştır. Örnekler gerekli seyreltmeler yapılarak UV spektrofotometresinde 265 nm' de analiz edilmiştir. Sonuçlar kalibrasyon denkleminde yerine konularak diyaliz membrandan geçen etkin madde miktarları belirlenmiştir. Gerekli istatistiksel hesaplamalar yapılmıştır. İn-vitro salım çalışması, kıyaslamanın yapılabilmesi için RM çözeltisi, RM yüklü jel, RM yüklü KLN süspansiyon formülasyonları kullanılarak da yapılmıştır.

Etkin maddenin yapay nazal sıvıdaki çözünürlüğü yaklaşık 92 mg/ml'dir. Franz difüzyon hücresinin hacmi 16 ml olup, vericiği odacığa konulan etkin maddenin tamamı alıcı odacığa geçse bile, doygunluk konsantrasyonunun çok altında kalacağından, sink koşulun sağlanacağı hesaplanarak belirlenmiştir.

Ex-vivo geçiş çalışması

Sığır mukozasının kullanım amacı, kolay elde edilebilir olması ve mukoza alanının büyük olmasına bağlı bolca doku elde edilmesidir. Literatürlerde hem sığır hem de koyun mukozası ile yapılan geçiş çalışmaları mevcuttur. Bu tarz çalışmalarda kullanılacak deney hayvanının ne olacağı hakkında bir standardizasyon bulunmamaktadır (Ahmed ve diğerleri, 2019; Khallaf ve diğerleri, 2020; Madane ve Mahajan, 2016; Menco, 1977; Tas ve diğerleri, 2006). Mezbahada hayvanların kesilmesinden sonraki 15 dakika içerisinde temin edilen sığır burunlarından, veteriner hekim eşliğinde mukozaları ayrılmıştır. Ayırma işlemi, burnun duvarından bir kesik ile mukozanın tamamen açığa çıkarılması ve dokunun zarar görmeden alınmasıyla olmaktadır. Alınan mukozalar, literatürlerde belirtildiği şekilde, temizlendikten sonra, yapay nazal sıvı içerisine konulmuş, deneyin yapılacağı zamana kadar -80°C derin dondurucuda saklanmıştır (Ali ve diğerleri, 2019; Huguet ve diğerleri, 2007; Thwaites ve diğerleri, 2018). Deney öncesi dondurucudan çıkarılan mukozalar yapay nazal sıvıda bekletildikten sonra uygun ölçülerde kesilerek Franz difüzyon hücresine yerleştirilmiştir. RM yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonu kullanılarak geçiş çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Verici odacığa konulan sistem, 40 mg etkin madde in vitro deneylerde bahsedilen sebep dâhilinde ayarlanmıştır. Bu ayarlamalar yapılırken sistemin dansite değeri göz önüne alınmıştır. Alıcı odacığa da pH 6,5 YNS eklenmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında (15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 360, 480 dk.) örnekler alınmış ve UV spektrofotometresinde 265 nm' de analiz edilmiş ve rasajilin mesilatın inek burun mukozadan geçişi incelenmiştir. İn-vitro ve in-vivo çalışmaların yapıldığı literatürlerde (Florence ve diğerleri, 2010; Vyas ve diğerleri, 2005; Fatouh ve diğerleri, 2017) burna uygulanan formülasyonların burunda kalış sürelerinin 4-8 saat arasında olduğu görülmüştür. Ayrıca burun mukozası kullanılarak yapılan bir in-vitro ve ex-vivo çalışmada (Patel ve diğerleri, 2013) da deney sürelerinin 8 saat olduğu saptanmıştır. Bu bilgilerden hareketle çalışmamızdaki ex-vivo deney süresi 8 saat olacak şekilde planlanmıştır. Çalışılan sıcaklık ise teorik bölümde belirtildiği gibi (Bölüm 3.2) 32°C olarak belirlenmiştir. Ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Aynı çalışma kıyaslamanın

yapılabilmesi için RM çözeltisi, RM yüklü jel ve RM yüklü KLN süspansiyon formülasyonları kullanılarak da yapılmıştır

Stabilite çalışması

Sonuç formülasyon üzerinde;

- 4°C',
- 25°C, %60 bağıl nem,
- 40°C, %75 bağıl nem

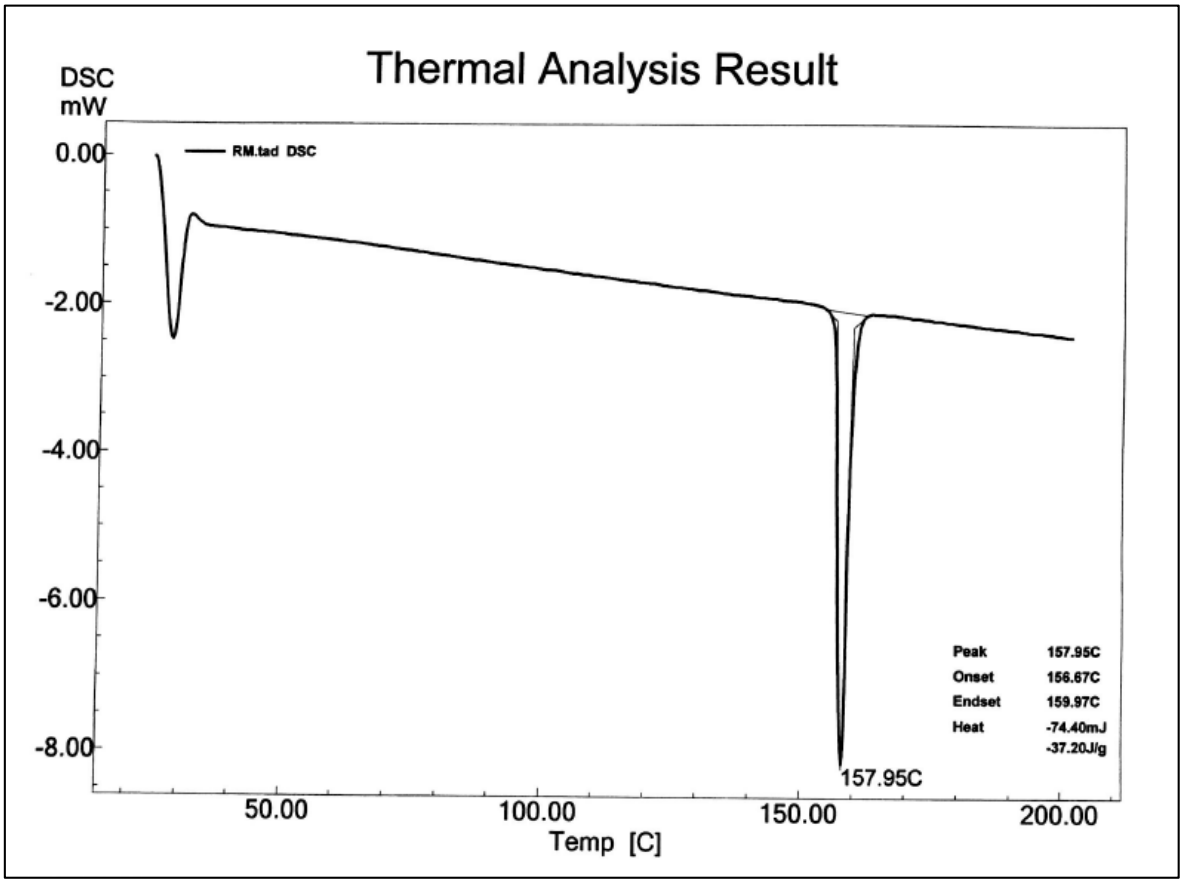
ortamlarında 15 ay süreyle bekletilecek şekilde planlanmıştır. Formülasyonların belirlenen zamanlardaki (0, 3, 6 ve 15. aylar) partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli ve viskozitesi tayin edilmiştir. Viskozite değerleri sadece başlangıç ve 15. ayda ölçülebilmiştir. Formülasyonların saklama koşullarına bağlı viskozite ve akış özelliklerinde herhangi bir değişimin olup olmadığı saptanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Önformülasyon Çalışmaları

Rasajilin mesilatın erime derecesi tayini

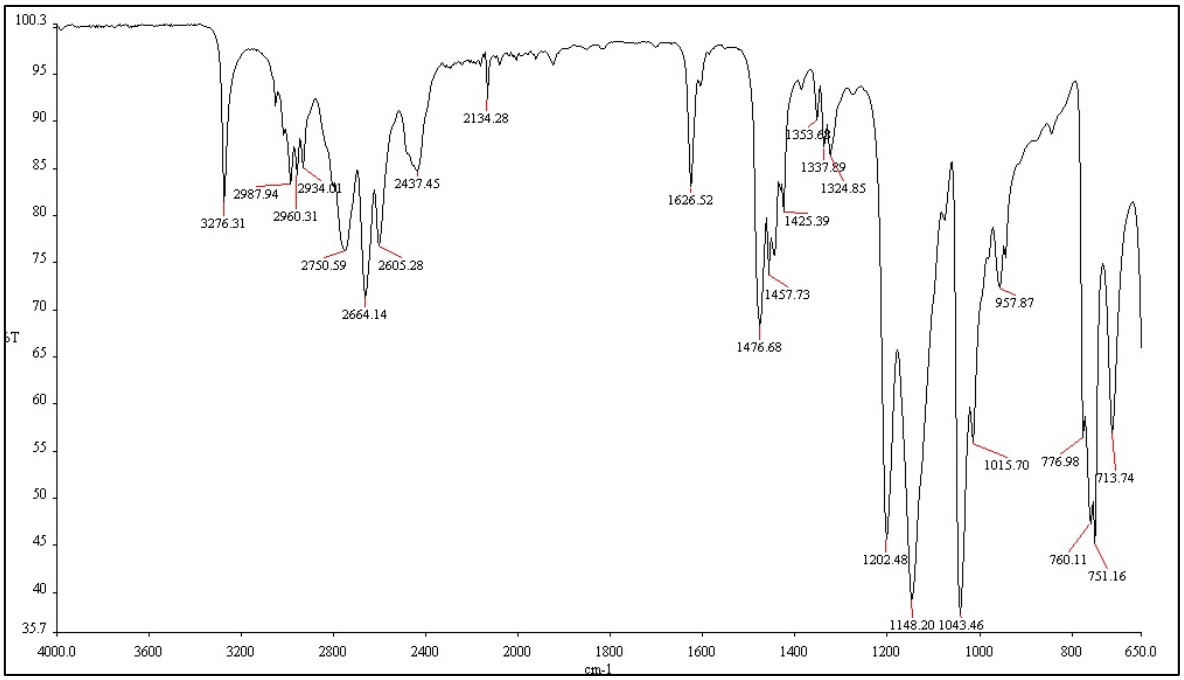
Rasajilin mesilatın erime derecesi tayini diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) aleti kullanılarak Bölüm 3.2.1' de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Rasajilin mesilatın DSC termogramı Şekil 4.1' de gösterilmiştir. Rasajilin mesilat 158°C' de endotermik pik vermiş olup bu pik, erime derecesini göstermektedir.



Şekil 4.1. Rasajilin mesilatın erime derecesi tayini

Rasajilin mesilatın FTIR analizi

Rasajilin mesilatın fourier transform infrared (FTIR) spektrumu, bölüm 3.2.1' de anlatıldığı gibi alınmış ve dalga sayısı cm^{-1} olarak değerlendirilmiştir. Spektrumu Şekil 4.2' de verilmiş, yapısında bulunan bağlar ise Çizelge 4.1' de belirtilmiştir.



Şekil 4.2. Rasajilin mesilata ait FTIR spektrumu

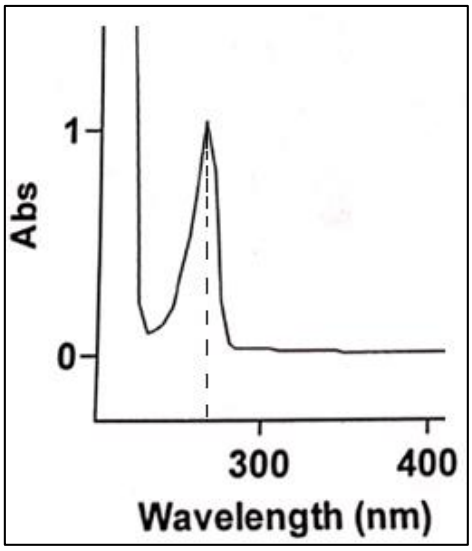
Çizelge 4.1. Rasajilin mesilatın yapısında bulunan bağlar

Rasajilin mesilatın FTIR Spektrumu	**Rasajilin mesilatın yapısında bulunan bağlar**
2960 cm^{-1}	Aromatik C-H
2750 cm^{-1}	NH
3276 cm^{-1}	O-H
1202 cm^{-1}	C-O

<u>Rasajilin mesilatın UV Spektrofotometresindeki dalga boyu taraması</u>

Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvısındaki maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu belirleme çalışmaları, Bölüm 3.2.1' de belirtildiği gibi yapılmıştır. Rasajilin mesilatın maksimum absorbans verdiği dalga boyunun (λ_{max}) 265 nm olduğu gözlenmiştir. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvı içindeki çözeltisinin spektrum grafiği Şekil 4.3' te gösterilmiştir.

Rasajilin mesilatın yanında, suda çözünebileceği düşünülen Labrasol ve Cremophor RH 40' ın da uv spektrofotometresinde maksimum absorbans gösterdiği noktalar belirlenmek istenmiştir. Bu maddelerin suda tam bir çözünme gerçekleştirmediği, dağıldığı belirlenmiştir. Bu sebeple uv spektrum ölçümleri yapılmamıştır.



Şekil 4.3. Rasajilin mesilat çözeltisinin pH 6,5 yapay nazal sıvısı içindeki spektrumu

Analitik yöntem validasyonu

Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvı ortamında yapılan miktar tayinine ait validasyon çalışmaları, UV Spektrofotometre aleti kullanılarak, Bölüm 3.2.1' de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Doğrusallık

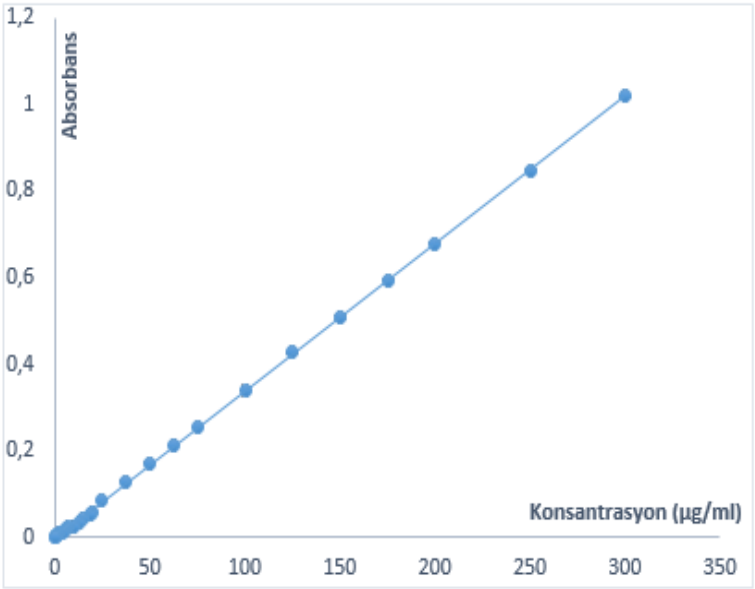
Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvı ortamında, 0,125 µg/ml – 300 µg/ml konsantrasyon aralığındaki çözeltileri hazırlanarak doğrusallık parametresi değerlendirilmiştir. 3 ayrı seri hazırlanan numuneler UV Spektrofotometrede incelenmiş, absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar bulunmuş, grafiğe geçirilerek doğru denklemi elde edilmiştir. Çizelge 4.2' de kalibrasyon verileri, Şekil 4.4' de kalibrasyon doğrusu gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Rasajilin mesilata ait kalibrasyon verileri

Konsantrasyon (µg/ml)	Absorbans 1	Absorbans 2	Absorbans 3	Ort. Absorbans	S.S	S.H	%B.S
300	1,0183	1,0195	1,0177	1,0185	0,0009	0,0005	0,088
250	0,8519	0,8463	0,8484	0,8488	0,0028	0,0016	0,329
200	0,6765	0,6798	0,6801	0,6788	0,0019	0,0011	0,279
175	0,5976	0,5942	0,5935	0,5951	0,0021	0,0012	0,352
150	0,5067	0,5147	0,5064	0,5092	0,0047	0,0027	0,923
125	0,4277	0,4248	0,4268	0,4264	0,0014	0,0008	0,328
100	0,3384	0,3385	0,3377	0,3382	0,0004	0,0002	0,118
75	0,2547	0,2542	0,255	0,2546	0,0004	0,0002	0,157
62,5	0,2135	0,2144	0,2115	0,2131	0,0014	0,0008	0,656
50	0,1702	0,1715	0,173	0,1715	0,0014	0,0008	0,816
37,5	0,1267	0,1319	0,128	0,1288	0,0027	0,0016	2,096
25	0,0862	0,0861	0,0863	0,0862	0,0001	0,0001	0,116
20	0,0564	0,0576	0,0577	0,0572	0,0007	0,0004	1,223

Çizelge 4.2. (devam) Rasajilin mesilata ait kalibrasyon verileri

Konsantrasyon (µg/ml)	Absorbans 1	Absorbans 2	Absorbans 3	Ort. Absorbans	S.S	S.H	%B.S
18,75	0,0535	0,0541	0,0532	0,0536	0,0004	0,0002	0,746
15	0,042	0,0426	0,0412	0,0419	0,0007	0,0004	1,67
12,5	0,0319	0,0323	0,0375	0,0339	0,0031	0,0018	9,144
10	0,0262	0,0229	0,0234	0,0241	0,0017	0,0010	7,053
7,5	0,0253	0,0253	0,026	0,0255	0,0004	0,0002	1,568
6,25	0,0168	0,0179	0,0185	0,0177	0,0008	0,0005	4,519
5	0,0147	0,0152	0,0156	0,0151	0,0004	0,0002	2,649
3,75	0,0092	0,0093	0,0098	0,0094	0,0003	0,0002	3,191
2,5	0,0087	0,0083	0,0093	0,0087	0,0005	0,0003	5,747
1,25	0,0064	0,0042	0,005	0,0052	0,0011	0,0006	21,153
1	0,0033	0,0033	0,0045	0,0037	0,0006	0,0004	16,216
0,75	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035	0	0	0
0,5	0,0028	0,0017	0,0013	0,0019	0,0007	0,0004	36,842
0,25	0,0021	0,0021	0,0021	0,0021	0	0	0
0,125	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0	0	0



Eğim	0,0034
Eğimin Std. Hatası	9.10^{-6}
Kesişim	-0,0024
Kesişimin Std. Hatası	0,0009
r^2	0,999
Regresyonun Std. Hatası	0,00396

Şekil 4.4. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvısındaki kalibrasyon doğrusu (n=3, ort ±ss)

Doğruluk ve geri elde

pH 6,5 yapay nazal sıvıda 80, 100 ve 120 µg/ml derişimlerinde hazırlanan rasajilin mesilat çözeltilerde kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde miktarları hesaplanmış ve gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirilmiştir. Değerler Çizelge 4.3' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvıdaki doğruluk ve geri elde sonuçları

80 µg/ml			**100 µg/ml**			**120 µg/ml**		
Absorbans	**Pratik Derişim (µg/ml)**	**% Geri Elde**	**Absorbans**	**Pratik Derişim (µg/ml)**	**% Geri Elde**	**Absorbans**	**Pratik Derişim (µg/ml)**	**% Geri Elde**
0,275	80,50	100,625	0,338	99	99	0,421	123,38	102,816
0,275	80,56	100,700	0,338	99,029	99,029	0,420	123,323	102,769
0,275	80,56	100,700	0,338	99,029	99,029	0,421	123,38	102,816
Ort. µg/ml	80,540		99,019			123,361		
Ort. % Geri elde	**100,675**		**99,019**			**102,800**		
Ort. % S.S	**0,043**		**0,016**			**0,027**		
Ort. % S.H	**0,025**		**0,009**			**0,015**		
Ort. % % B.S	**0,043**		**0,016**			**0,026**		

Kesinlik

Deney içi ve deneyler arası kesinlik olmak üzere iki farklı parametre incelenmiş ve gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirilmiştir.

Deney içi kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvıdaki stok çözeltisinden hareketle hazırlanan 100 µg/ml derişimindeki çözelti, UV spektrofotometrede arka arkaya 10 defa okunmuş ve konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar gerekli istatiksel parametrelerle değerlendirilmiştir. Çizelge 4.4' de deney içi kesinlik sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvıdaki deney içi kesinlik sonuçları

Örnek No	**Hesapla Bulunan Çözelti Konsantrasyonu (µg/ml)**
1	99,235
2	99,147
3	99,029
4	99,059
5	99,206
6	99,324
7	99,147
8	99,118
9	99,088
10	99,264
Ortalama	99,161
S.S	0,094
S.H	0,047
% B.S	0,095

Deneyler arası kesinlik (Tekrar elde edilebilirlik)

Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvıdaki farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri, birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3' er defa UV Spektrofotometrede okunmuştur. Elde edilen absorbanslara karşı gelen derişimlerin gerekli istatistiksel parametreleri hesaplanmıştır. Deneyler arası kesinliğe ait sonuçlar Çizelge 4.5' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvıdaki çözeltilerinin deneyler arası kesinlik sonuçları

Derişim (µg/ml)	1. Gün Abs.	2. Gün Abs.	3. Gün Abs.	Ortalama	S.S	S.H	% B.S
100	0,338	0,338	0,337	0,337	0,0004	0,00002	0,0002
75	0,254	0,256	0,255	0,255	0,001	0,00056	0,0005
50	0,171	0,170	0,172	0,171	0,001	0,00057	0,0006

Duyarlılık ve saptama sınırı

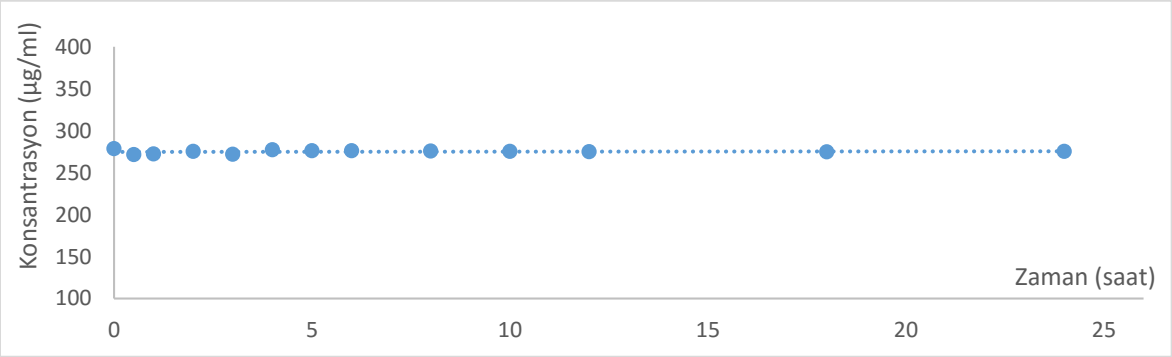
Geliştirilen analitik yöntemin duyarlılık sınırı (LOD) ve saptama sınırı (LOQ) hesaplanmıştır. Analitik yöntemin duyarlılık sınırı 13,482 µg/ml, saptama sınırı ise 44,941 µg/ml olarak bulunmuştur.

Rasajilin mesilat çözeltisinin stabilitesinin incelenmesi

Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvıdaki 275 µg/ml konsantrasyonunda olan çözeltileri Bölüm 3.2.1' de anlatılan stabilite çalışmalarında kullanılmıştır. Çözeltiler, 25 ve 80°C sıcaklıklarda 24 saat bekletilmiş ve stabiliteleri incelenmiştir. Numuneler alınmış ve her bir noktada ortalama absorbans, konsantrasyon ve % geri elde değerleri belirlenmiştir. UV pikleri her seferinde kontrol edilmiş, dalga boyunda herhangi bir değişim olmadığı ve pik şeklinin aynı kaldığı saptanmıştır. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvısındaki çözeltilerine ait stabilite sonuçları, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6, Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7' de belirtilmiştir. Verilere ait standart hata değerleri grafiğe geçirilmiştir ancak değerlerin çok küçük olması nedeniyle belirgin değildir.

Çizelge 4.6. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvıdaki çözeltisinin 25°C' deki stabilite sonuçları (n=3)

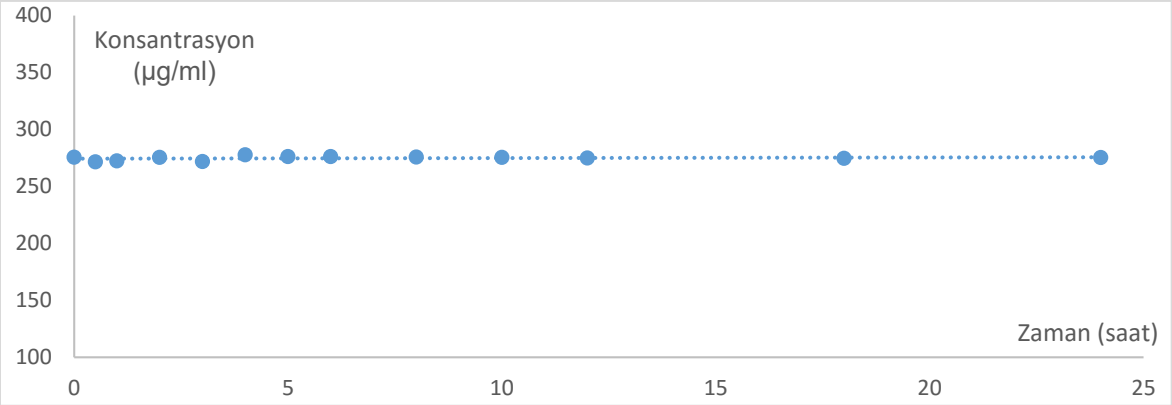
Zaman (sa)	Ortalama Konsantrasyon (µg/ml)	S.S	S.H	%BS	Ortalama % Geri Elde
0	278,412	0,0173	0,01	1,8663	100
0,5	271,344	0	0	0	97,461
1	272,255	0	0	0	97,788
2	275,324	0,0001	0	0,0185	98,890
3	271,726	0	0	0	97,598
4	277,177	0,0007	0,0004	0,0765	99,556
5	275,932	0,0001	0	0,0162	99,109
6	275,942	0,0002	0,0001	0,0282	99,112
8	275,667	0,0004	0,0002	0,0492	99,014
10	275,334	0	0	0	98,894
12	274,765	0	0	0	98,690
18	274,628	0,0004	0,0002	0,0445	98,640
24	275,157	0,0008	0,0004	0,0863	98,830



Şekil 4.5. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvıdaki çözeltisinin 25°C' deki stabilite grafiği

Çizelge 4.7. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvıdaki çözeltisinin 80°C' deki stabilite sonuçları (n=3)

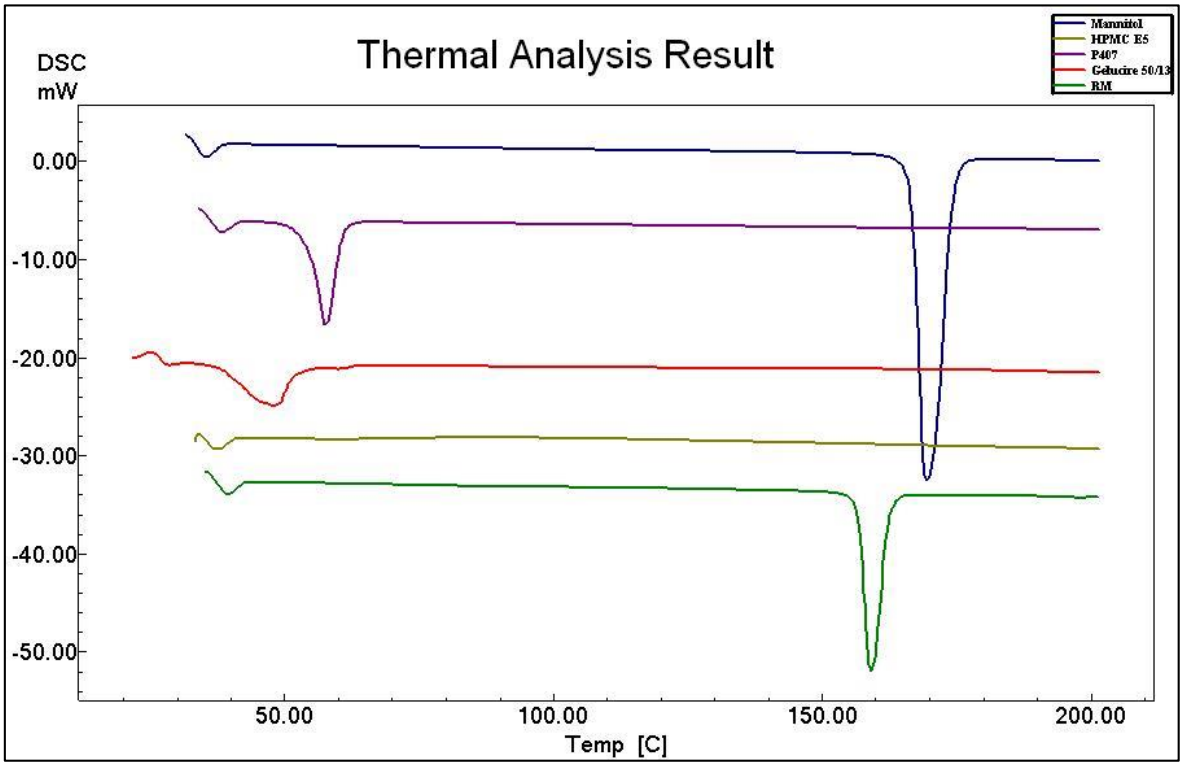
Zaman (sa)	Ortalama Konsantrasyon (µg/ml)	S.S	S.H	% B.S	Ortalama % Geri Elde
0	275,383	0,0007	0,0003	0,0747	100
0,5	271,314	0	0	0	98,522
1	272,285	0,0001	0	0,0124	98,875
2	275,334	0,0002	0,0001	0,0308	99,982
3	271,706	0	0	0	98,664
4	277,491	0,002	0,0011	0,2123	100,765
5	275,991	0,0002	0,0001	0,0268	100,220
6	275,942	0,0004	0,0002	0,0464	100,202
8	275,628	0,0004	0,0002	0,0431	100,089
10	275,304	0	0	0	99,971
12	274,736	0,0001	0	0,0185	99,765
18	274,520	0,0008	0,0004	0,0936	99,686
24	275,118	0,0016	0,0009	0,1798	99,903



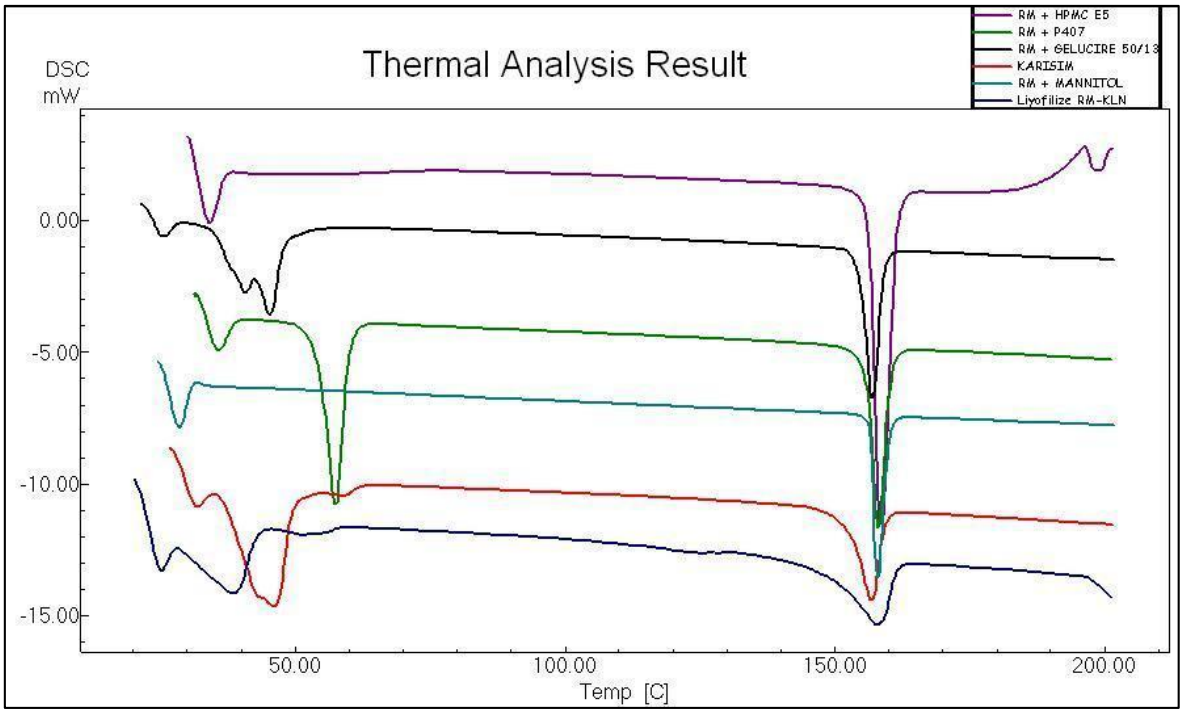
Şekil 4.6. Rasajilin mesilatın pH 6,5 yapay nazal sıvıdaki çözeltisinin 80°C' deki stabilite grafiği

<u>Etkin madde – Yardımcı madde etkileşimleri</u>

Deneyler bölüm 3.2.1' de anlatıldığı gibi yapılmış ve etkin madde ile formülasyonda kullanılan yardımcı maddeler arasında etkileşim olup olmadığı incelenmiştir. Deneyler sonucunda elde edilen termogramlar Şekil 4.7 ve Şekil 4.8' de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Rasajilin mesilat, Poloksamer 407, HPMC E5, Gelucire 50/13, Mannitol' e ait DSC termogramı



Şekil 4.8. RM-Gelucire 50/13, RM-Poloksamer 407, RM-HPMC E5, RM-Mannitol, tüm maddelerin fiziksel karışımı ve liyofilize RM-KLN' nin DSC termogramı

4.2. Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Gasco' nun patenti (Gasco, 1993) temel alınarak Bölüm 2.6.2' de bahsedilen ve Bölüm 3.2.2' de anlatılan modifiye yöntem ile Design Expert programı kullanılarak yapılan tam faktöriyel tasarım sonucunda F13, F35 ve F46 formülasyonları ile katı lipit nanopartikül oluşturulabilmiştir.

Standardizasyon çalışması

Bölüm 3.2.2' de anlatılan tam faktöriyel tasarım ve merkezi kompozit tasarım ile KLN' nin hazırlanması hususunda 2 farklı çalışma yürütülmüştür. Çalışmaların tümü F13, F35 ve F46 formülasyonlarında gerçekleştirilmiştir.

1) Soğutmanın oda sıcaklığında yapıldığı ve ultra turraxın kullanıldığı bu çalışmada formülasyonlara ait veriler Çizelge 4.8- Çizelge 4.10' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Karıştırma hızı ve süresinin F13 formülasyonu üzerine etkisi

Faktör 1	Faktör 2	Cevap 1	Cevap 2
A:Karistirma Hızı (rpm)	**B:Karistirma Süresi (sn)**	**Partikül Büyüklüğü (nm)**	**PDI**
7500	45	1966	0,92
5000	30	2665	0,996
3970	45	5266	0,977
7500	66	780	0,969
10000	60	1365	0,999
7500	24	2314	0,999
7500	45	2567	0,998
10000	30	2512	0,997
7500	45	4131	0,967
5000	60	1325	0,987
7500	45	3215	0,999
7500	45	1515	0,999
11040	45	1541	0,999

Çizelge 4.9. Karıştırma hızı ve süresinin F35 formülasyonu üzerine etkisi

Faktör 1	Faktör 2	Cevap 1	Cevap 2
A:Karistirma Hızı (rpm)	**B:Karistirma Süresi (sn)**	**Partikül Büyüklüğü (nm)**	**PDI**
7500	45	2465	0,999
5000	30	2526	0,998
3970	45	5266	0,999
7500	66	1354	0,969
10000	60	1846	0,999
7500	24	2520	0,999
7500	45	2814	0,999
10000	30	2716	0,997
7500	45	5146	0,999
5000	60	1572	0,987
7500	45	3413	0,999
7500	45	1849	0,999
11040	45	1745	0,999

Çizelge 4.10. Karıştırma hızı ve süresinin F46 formülasyonu üzerine etkisi

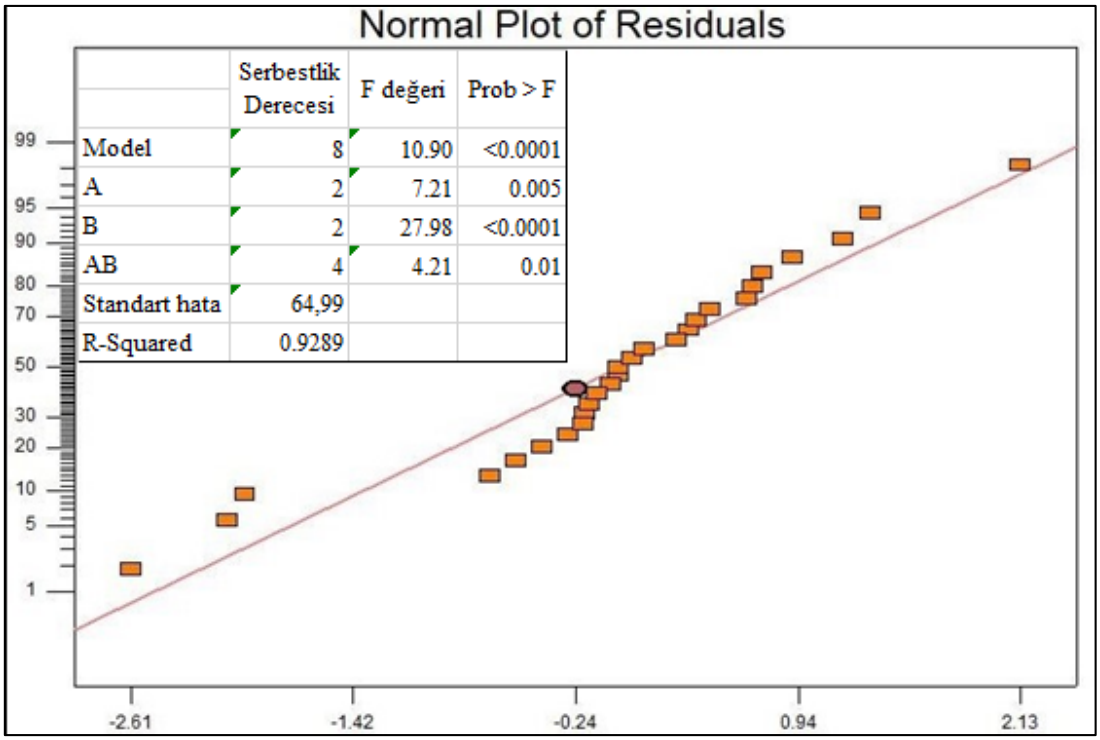
Faktör 1	Faktör 2	Cevap 1	Cevap 2
A:Karistirma Hızı (rpm)	**B:Karistirma Süresi (sn)**	**Partikül Büyüklüğü (nm)**	**PDI**
7500	45	2453	0,982
5000	30	3415	0,998
3970	45	8463	0,988
7500	66	2487	0,999
10000	60	1682	0,999
7500	24	2641	0,999
7500	45	2796	0,999
10000	30	2642	0,997
7500	45	5793	0,998
5000	60	3505	0,989
7500	45	3688	0,999
7500	45	1998	0,999
11040	45	1846	0,999

Deney sonucunda, partikül büyüklükleri ve polidispersite indekslerinin oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu yüzden zeta potansiyelleri ölçülmemiş, çalışmaya ultra-turrax kullanılmadan devam edilmiştir.

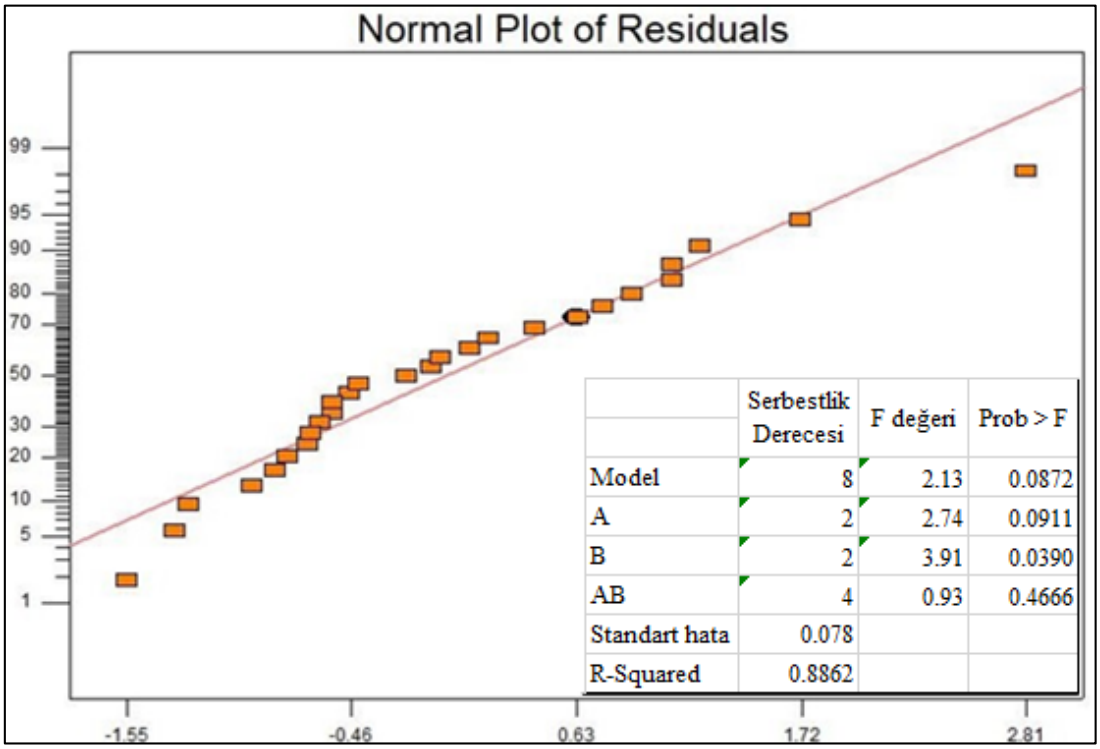
2) Bu çalışmada ise, hazırlanan katı lipit nanopartikül formülasyonları oda sıcaklığında (25°C) soğumaya bırakılmış; partiküllerin birbirine yapışmasını engellemek için belirli bir süre ve hızda karıştırma uygulanmıştır. Tam faktöriyel tasarım kullanılarak yapılan çalışmadaki veriler, Çizelge 4.11- Çizelge 4.13 ve Şekil 4.9 – Şekil 4.23' da gösterilmektedir. Bu çalışmada zeta potansiyel, cevap olarak kullanılmamasına rağmen ölçülmüş, veriler çizelgelere eklenmiştir. Görüldüğü üzere saptanan faktörler için zeta potansiyel değerlerinin cevap olarak bir belirleyiciliği yoktur.

Çizelge 4.11. Karıştırma hızı ve süresinin F13 formülasyonu üzerine etkisi

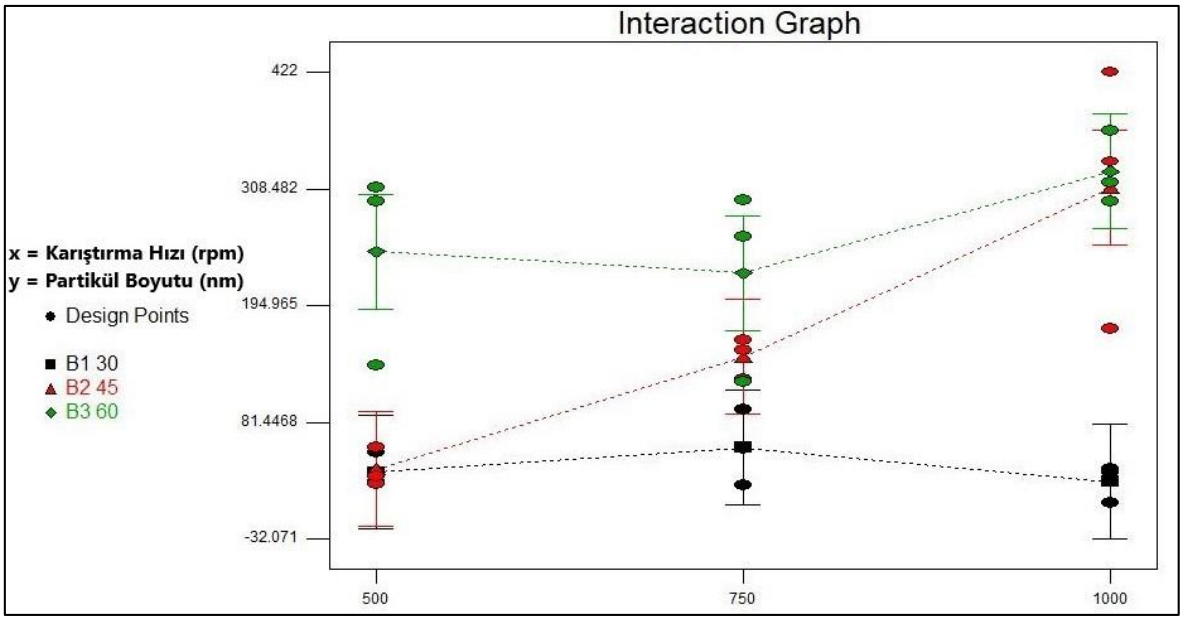
Faktör 1	**Faktör 2**	**Cevap 1**	**Cevap 2**	**Zeta Potansiyel (mV)**
A:Karıştırma Hızı (rpm)	**B:Karıştırma Süresi (dk)**	**Partikül Büyüklüğü (nm)**	**PDI**	
500	30	23	0,517	-0,043
1000	60	296	0,514	-0,038
1000	30	30	0,481	-0,041
750	60	297	0,546	-0,045
500	30	52	0,405	-0,054
1000	30	36	0,49	-0,042
750	60	262	0,518	-0,052
500	45	29	0,399	-0,032
750	30	56	0,392	-0,056
1000	60	315	0,499	-0,044
1000	30	32	0,478	-0,048
500	45	21	0,499	-0,047
1000	45	422	0,648	-0,034
750	45	161	0,341	-0,035
1000	60	365	0,611	-0,058
750	45	152	0,463	-0,052
1000	45	335	0,478	-0,051
1000	45	172	0,489	-0,045
500	30	24	0,547	-0,055
500	60	310	0,774	-0,053
500	60	137	0,495	-0,047
500	45	57	0,39	-0,052
750	60	121	0,452	-0,056
500	60	296	0,514	-0,046
750	45	123	0,349	-0,061
750	30	20	0,476	-0,033
750	30	94	0,415	-0,045



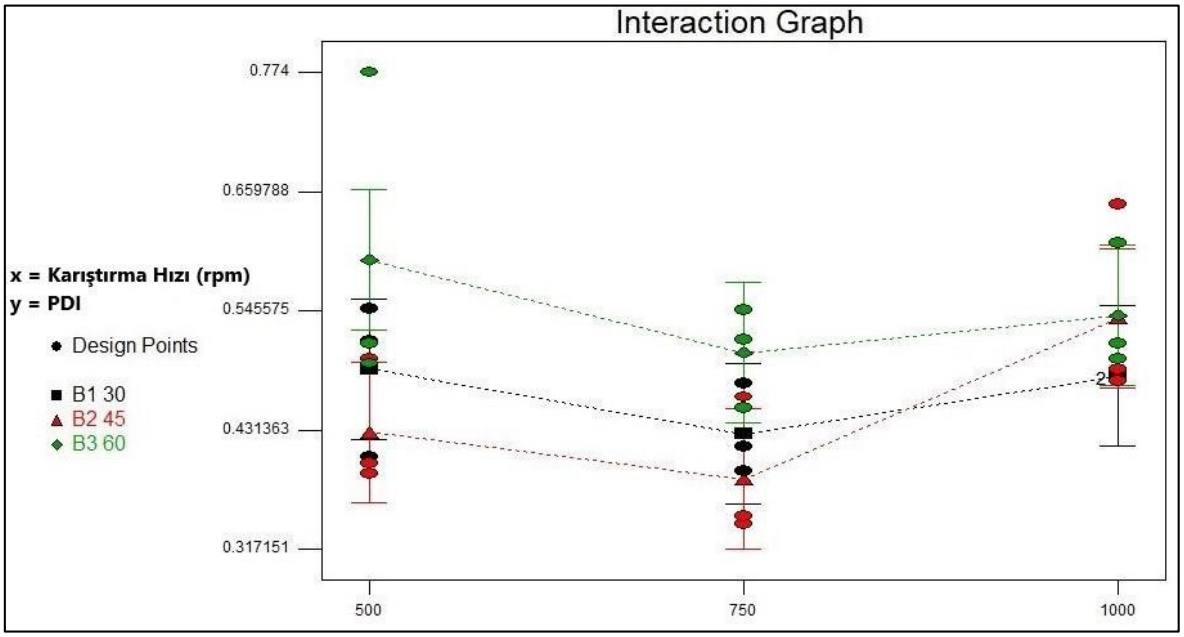
Şekil 4.9. F13 formülasyonunda tam faktöriyel tasarıma göre teorik ve pratikte olması beklenen – olan partikül boyutu



Şekil 4.10. F13 formülasyonunda tam faktöriyel tasarıma göre teorik ve pratikte olması beklenen – olan polidispersite indeksi

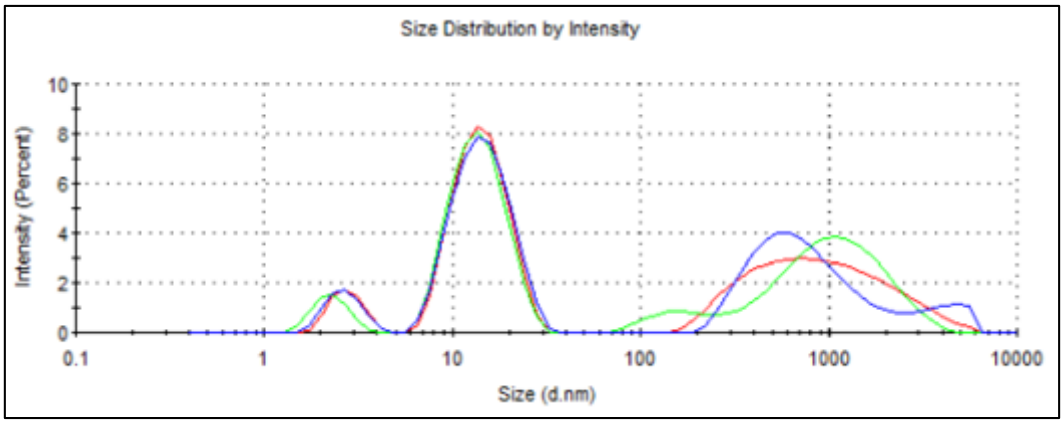


Şekil 4.11. F13 formülasyonundaki tam faktöriyel tasarıma göre karıştırma hızı ve süresinin partikül büyüklüğü üzerine etkisi



Şekil 4.12. F13 formülasyonundaki tam faktöriyel tasarıma göre karıştırma hızı ve süresinin polidispersite indeksi üzerine etkisi

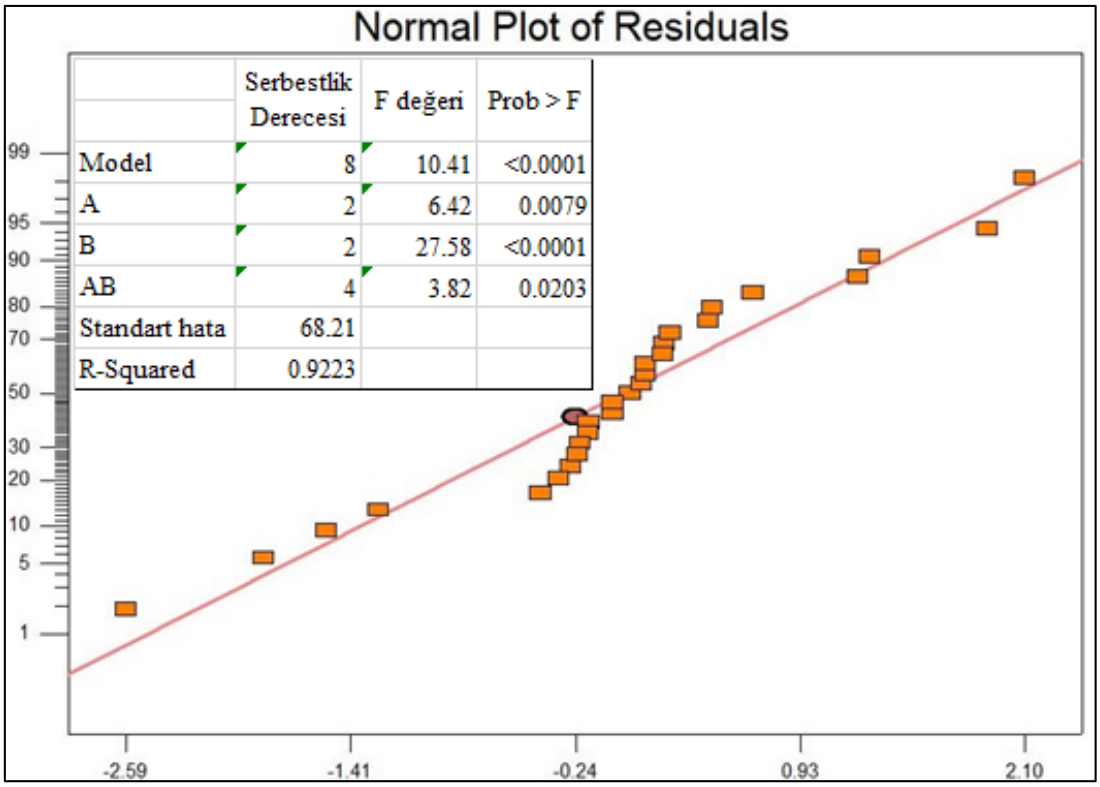
F13 formülasyonu için en iyi yöntemin 500 rpm karıştırma hızı ve 45 dakikalık karıştırma süresi olduğu belirlenmiştir. Bu koşullar altında hazırlanan formülasyonun partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ölçülmüştür. F13 formülasyonunda partikül boyutu 26,26 ± 2,888 nm, polidispersite indeksi 0,511 ± 0,034, zeta potansiyeli -0,037 ± 0,011 mV olarak bulunmuştur.



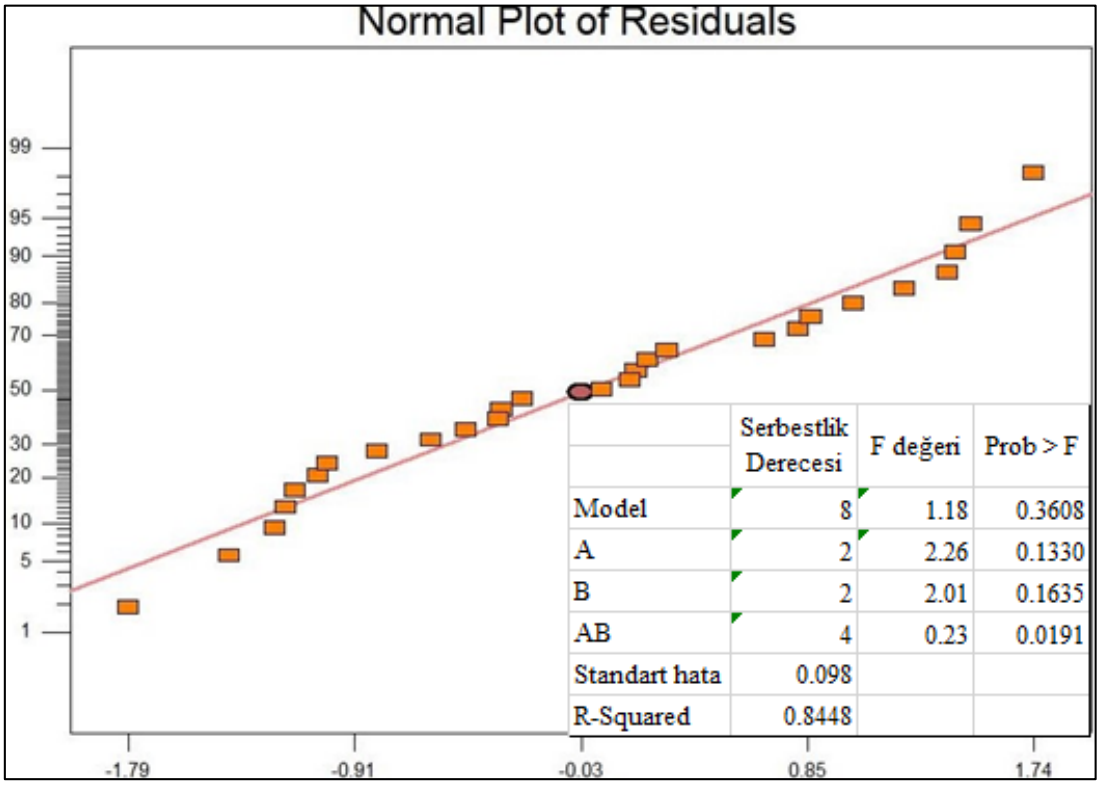
Şekil 4.13. F13 formülasyonuna ait partikül büyüklüğü ve dağılımı

Çizelge 4.12. Karıştırma hızı ve süresinin F35 formülasyonu üzerine etkisi

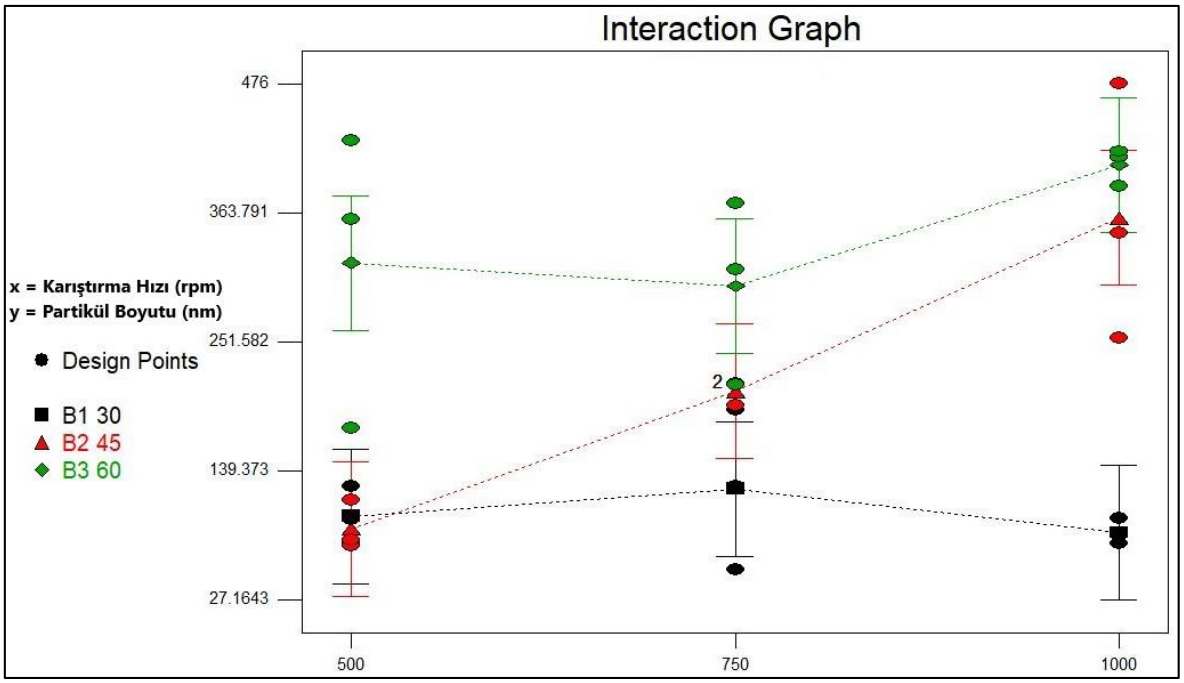
Faktör 1	**Faktör 2**	**Cevap 1**	**Cevap 2**	**Zeta Potansiyel (mV)**
A:Karıştırma Hızı (rpm)	**B:Karıştırma Süresi (dk)**	**Partikül Büyüklüğü (nm)**	**PDI**	
500	30	76	0,716	0,011
1000	60	358	0,664	0,015
1000	30	83	0,617	0,007
750	60	372	0,614	0,018
500	30	126	0,535	0,024
1000	30	76	0,535	0,005
750	60	314	0,659	0,010
500	45	79	0,583	0,043
750	30	126	0,444	0,004
1000	60	417	0,613	0,005
1000	30	98	0,534	0,012
500	45	74	0,716	0,023
1000	45	476	0,517	0,021
750	45	214	0,387	0,019
1000	60	412	0,656	0,021
750	45	215	0,598	0,016
1000	45	346	0,534	0,033
1000	45	255	0,698	0,021
500	30	97	0,648	0,001
500	60	426	0,799	0,006
500	60	176	0,516	0,015
500	45	114	0,512	0,004
750	60	214	0,495	0,012
500	60	387	0,814	0,013
750	45	196	0,512	0,020
750	30	53	0,547	0,015
750	30	192	0,594	0,014



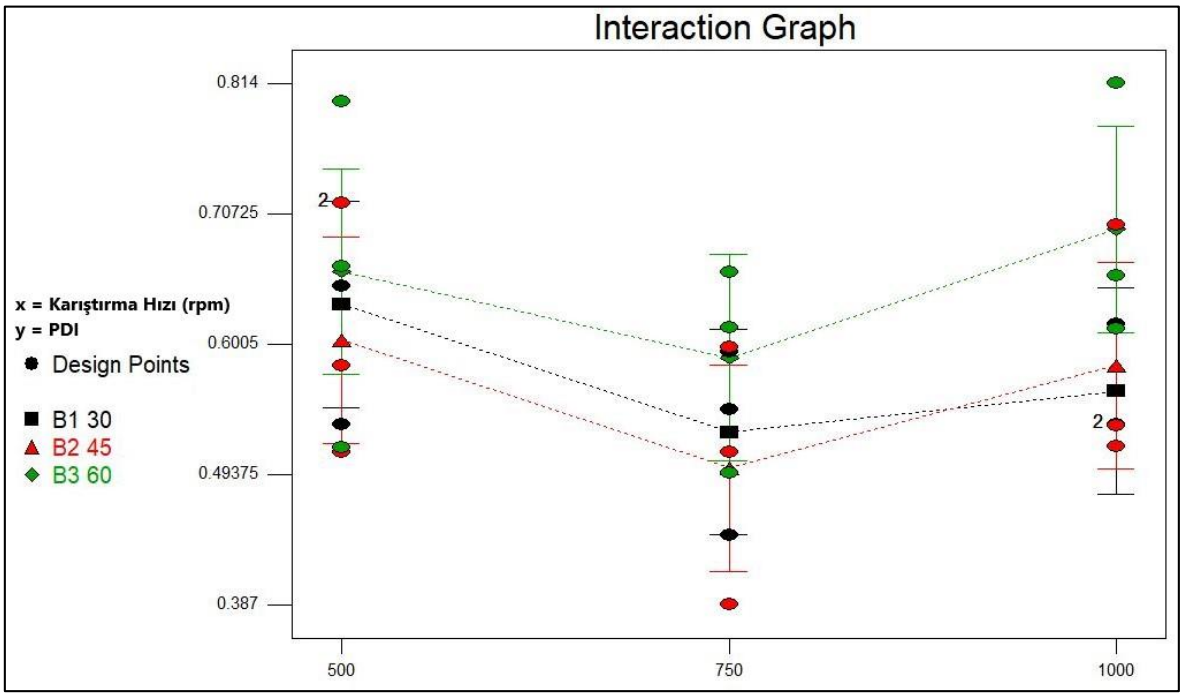
Şekil 4.14. F35 formülasyonunda tam faktöriyel tasarıma göre teorik ve pratikte olması beklenen – olan partikül boyutu



Şekil 4.15. F35 formülasyonunda tam faktöriyel tasarıma göre teorik ve pratikte olması beklenen – olan polidispersite indeksi



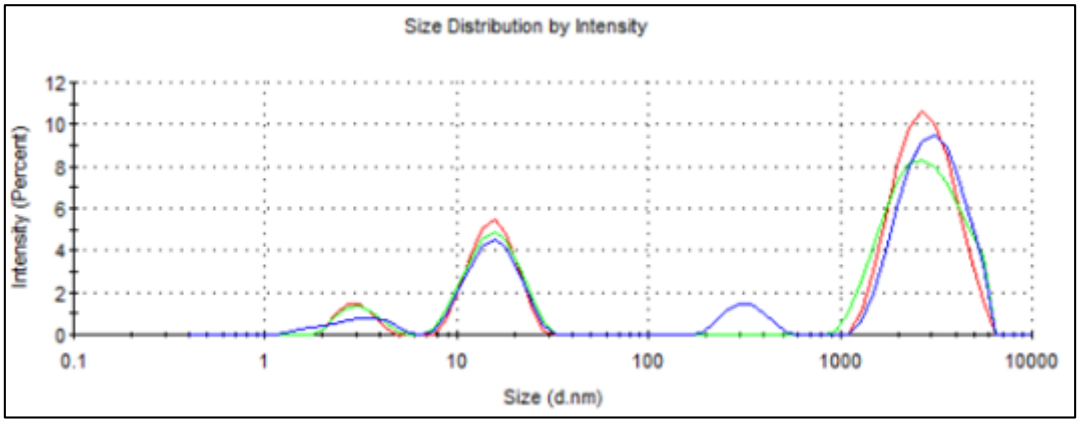
Şekil 4.16. F35 formülasyonundaki tam faktöriyel tasarıma göre karıştırma hızı ve süresinin partikül büyüklüğü üzerine etkisi



Şekil 4.17. F35 formülasyonundaki tam faktöriyel tasarıma göre karıştırma hızı ve süresinin polidispersite indeksi üzerine etkisi

F35 formülasyonu için en iyi yöntemin 500 rpm karıştırma hızı ve 45 dakikalık karıştırma süresi olduğu belirlenmiştir. Bu koşullar altında hazırlanan formülasyonun partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ölçülmüştür. F35 formülasyonunda

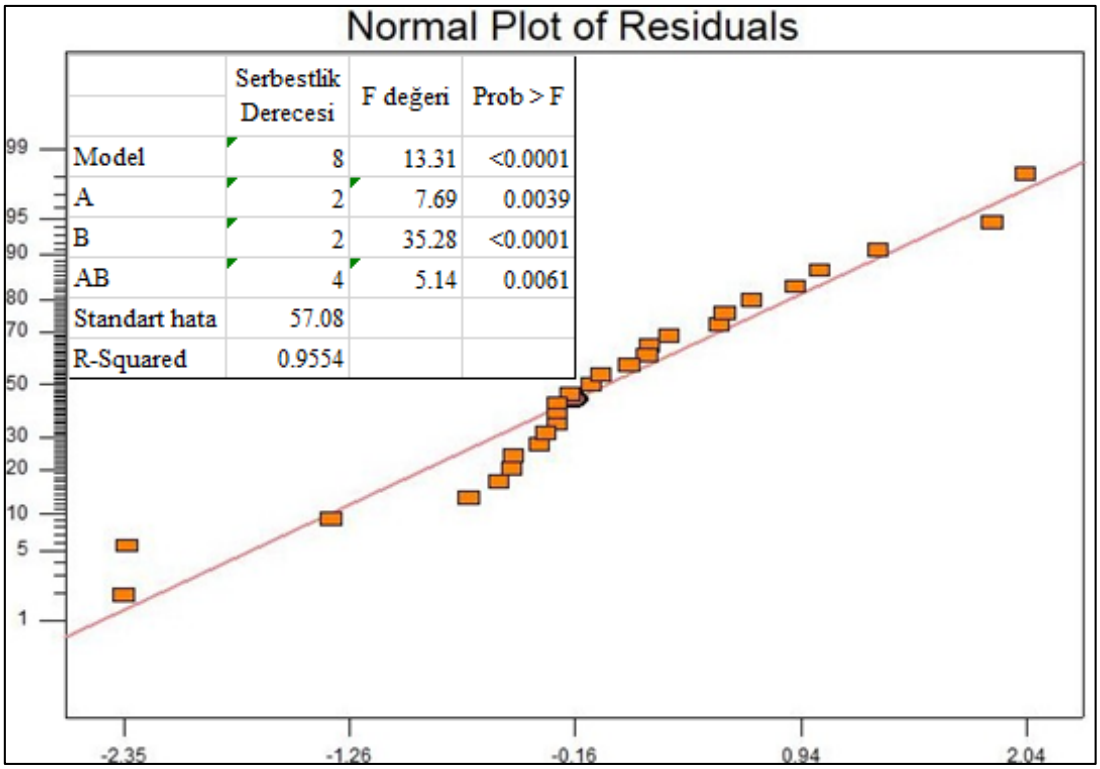
partikül boyutu 79,21 ± 4,261nm, polidispersite indeksi 0,605 ± 0,033, zeta potansiyeli 0,014 ± 0,007 mV olarak bulunmuştur.



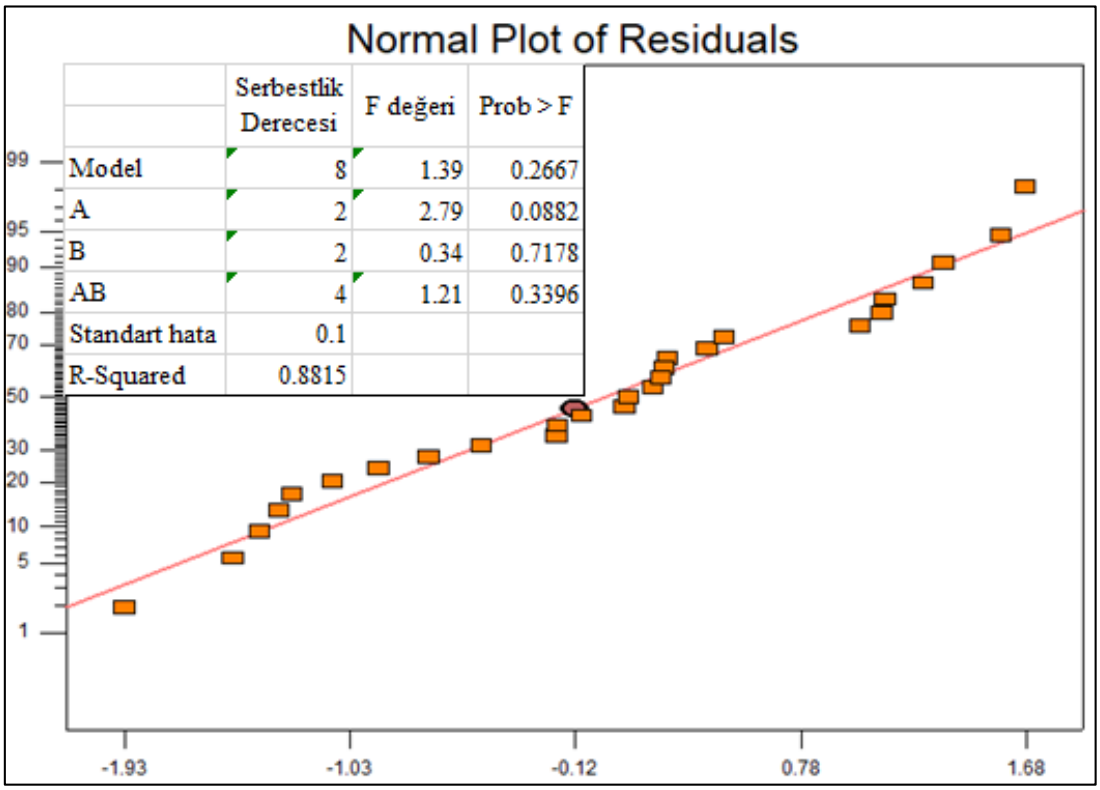
Şekil 4.18. F35 Formülasyonuna ait partikül büyüklüğü ve dağılımı

Çizelge 4.13. Karıştırma hızı ve süresinin F46 formülasyonu üzerine etkisi

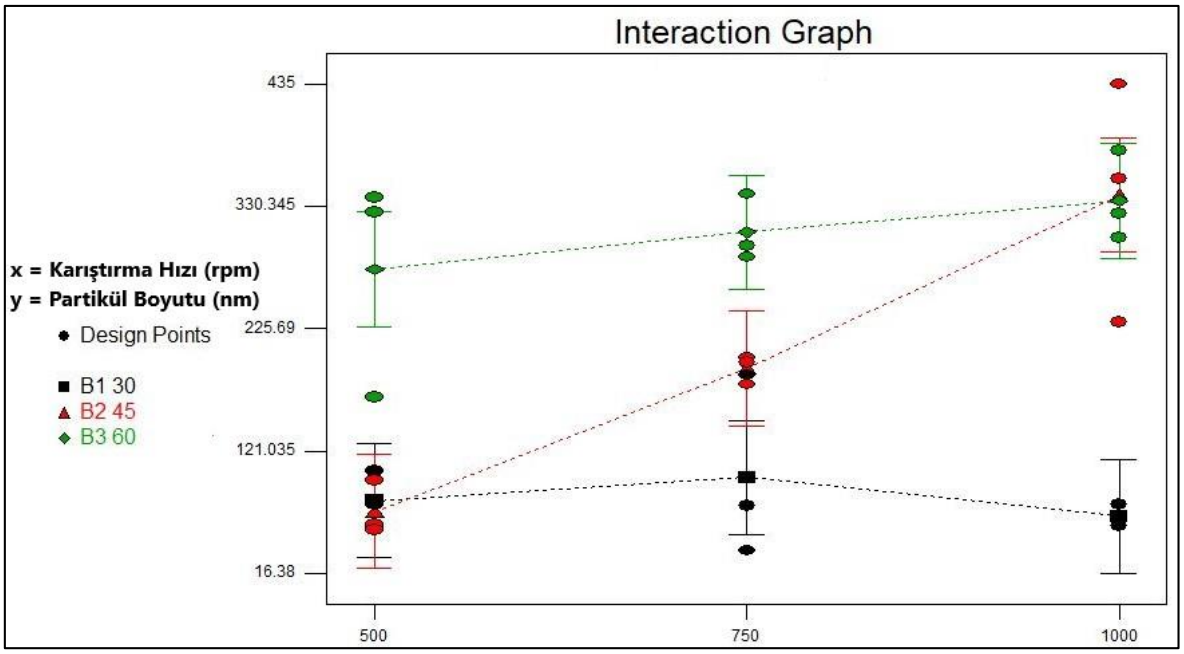
Faktör 1	**Faktör 2**	**Cevap 1**	**Cevap 2**	**Zeta Potansiyel (mV)**
A:Karıştırma Hızı (rpm)	**B:Karıştırma Süresi (dk)**	**Partikül Büyüklüğü (nm)**	**PDI**	
500	30	57	0,676	0,071
1000	60	325	0,634	0,064
1000	30	64	0,561	0,058
750	60	341	0,576	0,061
500	30	104	0,579	0,082
1000	30	57	0,587	0,075
750	60	297	0,556	0,086
500	45	54	0,515	0,043
750	30	74	0,416	0,057
1000	60	324	0,512	0,054
1000	30	75	0,512	0,068
500	45	58	0,623	0,057
1000	45	435	0,686	0,083
750	45	201	0,346	0,049
1000	60	378	0,654	0,054
750	45	197	0,645	0,053
1000	45	354	0,576	0,074
1000	45	23	0,763	0,066
500	30	75	0,754	0,055
500	60	338	0,781	0,059
500	60	167	0,535	0,046
500	45	96	0,456	0,065
750	60	287	0,478	0,061
500	60	304	0,741	0,072
750	45	178	0,526	0,054
750	30	36	0,512	0,059
750	30	186	0,632	0,073



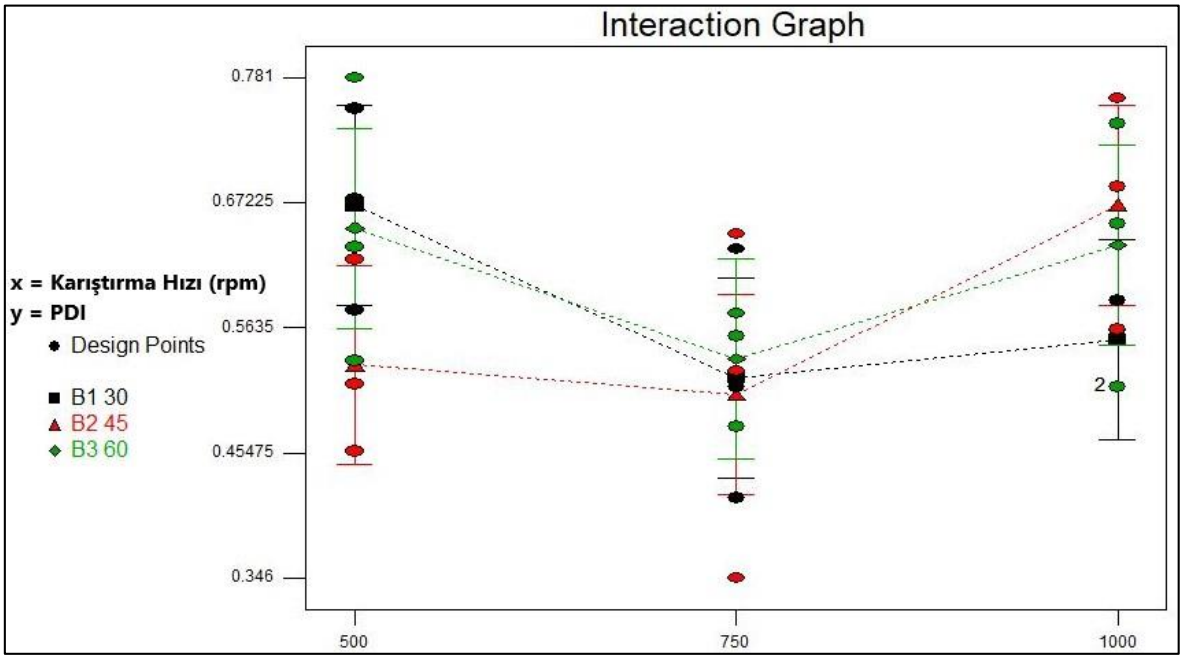
Şekil 4.19. F46 formülasyonunda tam faktöriyel tasarıma göre teorik ve pratikte olması beklenen – olan partikül boyutu



Şekil 4.20. F46 formülasyonunda tam faktöriyel tasarıma göre teorik ve pratikte olması beklenen – olan polidispersite indeksi

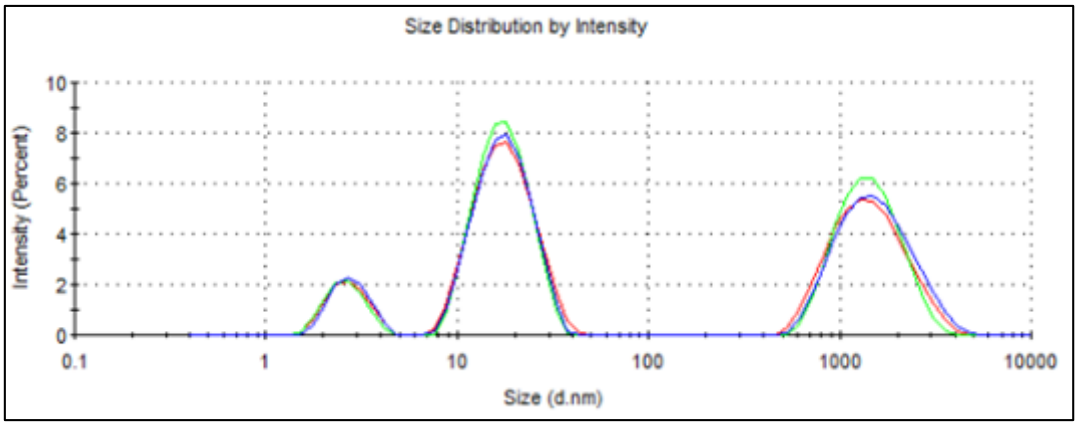


Şekil 4.21. F46 formülasyonundaki tam faktöriyel tasarıma göre karıştırma hızı ve süresinin partikül büyüklüğü üzerine etkisi



Şekil 4.22. F46 formülasyonundaki tam faktöriyel tasarıma göre karıştırma hızı ve süresinin polidispersite indeksi üzerine etkisi

F46 formülasyonu için en iyi yöntemin 500 rpm karıştırma hızı ve 45 dakikalık karıştırma süresi olduğu belirlenmiştir. Bu koşullar altında hazırlanan formülasyonun partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ölçülmüştür. F46 formülasyonunda partikül boyutu 34,67 ± 2,102 nm, polidispersite indeksi 0,687 ± 0,03, zeta potansiyeli 0,068 ± 0,022 mV olarak bulunmuştur.



Şekil 4.23. F46 Formülasyonuna ait partikül büyüklüğü ve dağılımı

Bu çalışmalar sonucunda, katı lipit nanopartiküller hazırlanırken oda sıcaklığında soğutma aşamasında 500 rpm karıştırma hızı ve 45 dk. karıştırma süresinin, en iyi partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksine sahip katı lipit nanopartikül üretimi için uygun olduğu belirlenmiştir. Bu koşullarda hazırlanan formülasyonların içerikleri, partikül büyüklükleri ve PDI değerleri Çizelge 4.14‘ de gösterilmektedir.

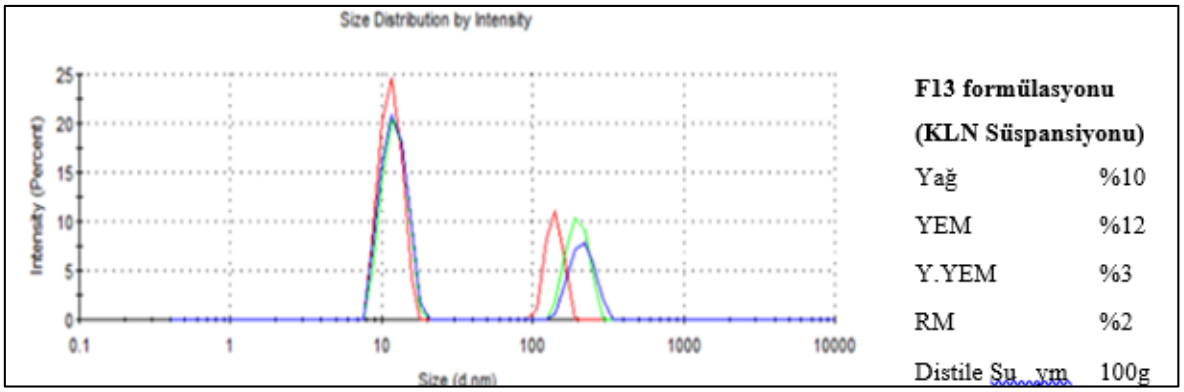
Çizelge 4.14. Standardizasyon işlemi sonucu hazırlanan KLN formülasyonlarının toplu olarak partikül büyüklüğü ve PDI değerleri (n=3, ort ± s.s)

Formülasyonlar ve İçerikleri	**Partikül Büyüklüğü (nm)**	**PDI**	**Zeta Potansiyel (mV)**
F13 (%10 Yağ, %3 Y.YEM, %12 YEM, %75 Su)	26,26 ± 2,888	0,511 ± 0,034	-0,037 ± 0,011
F35 (%10 Yağ, %3 Y.YEM, %15 YEM, %72 Su)	79,21 ± 4,261	0,605 ± 0,033	0,014 ± 0,007
F46 (%10 Yağ, %5 Y.YEM, %12 YEM, %73 Su)	34,67 ± 2,102	0,687 ± 0,03	0,068 ± 0,022

Bu aşamada formülasyonların partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksleri kıyaslanmıştır. Kullanılan yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde miktarları dikkate alınmıştır. Partikül boyutu ve dağılımı en düşük olan, yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde miktarları en az olan formülasyon *F13* ile çalışmaya devam edilmesine karar verilmiştir.

<u>RM yüklü KLN süspansiyonunun Partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksinin belirlenmesi</u>

Bu aşamada F13 formülasyonuna etkin madde yüklenmiş ve partikül büyüklüğü ile polidispersite indeksi yeniden ölçülmüştür. Bulgular Şekil 4.24’ de gösterilmektedir.



Şekil 4.24. Rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartikül formülasyonunun partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi.

Etkin madde yüklendikten sonra elde edilen formülasyonun partikül büyüklüğü 166,3 ± 53,51 nm, polidispersite indeksi 0,276 ± 0,069, zeta potansiyeli 0,111 ± 0,014 olarak bulunmuştur. Verilere göre KLN' lerin %73,4' ü 12,2 nm boyutunda, %26,6' sı ise 215,6 nm boyutundadır.

Yüzde enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi

Mikroemülsiyon yöntemi ile hazırlanan %2' lik rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartikül süspansiyon formülasyonlarında enkapsülasyon etkinliği çalışması, Bölüm 3.2.2' de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Çalışılan teknikle RM' nin KLN' lere yüklenme oranının %37,8 ± 0,596 olduğu ve geriye kalan RM' nin (%62,2) nanopartikül süspansiyonunun su fazında olduğu saptanmıştır.

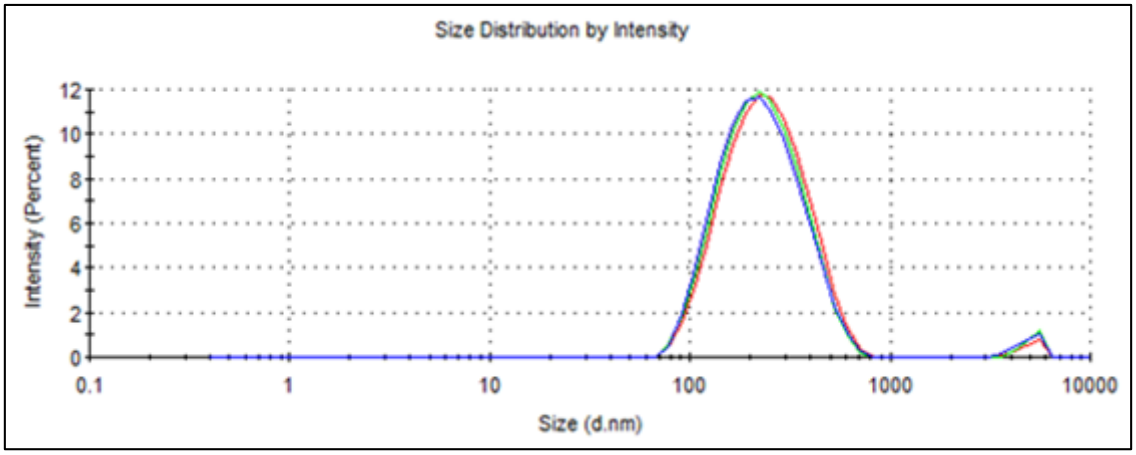
Liyofilizasyon işlemi

Etkin madde yüklenmiş KLN süspansiyonuna liyofilizasyon işlemi bölüm 3.2.2' de anlatıldığı gibi uygulanmıştır. Liyoprotektan olarak mannitol ve trehaloz denenmiştir. Trehaloz ve mannitol ile yapılan liyofilizasyon işlemi öncesi ve sonrası katı lipit nanopartiküllerin partikül büyüklükleri incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.15 ve Şekil 4.25' de gösterilmiştir. Liyofilizasyon işlemi sonrası formülasyonların partikül büyüklükleri ve polidispersite indeksleri göz önüne alındığında, mannitolün formülasyon için trehaloza göre partikül boyutu açısından daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Sonraki çalışmalarda liyoprotekran olarak mannitolün kullanılmasına karar verilmiştir. Liyofilize KLN' lerin hem suda hem de jel içine aktarıldığında dağılma süreleri yaklaşık 1 saat olarak belirlenmiştir. KLN:Mannitol (1:0.2) oranı ile liyofilize edilen formülasyon distile suda yaklaşık 30 dakikada dağılırken; KLN:Mannitol (1:0.1) oranı ile

liyofilize edilen formülasyon distile suda yaklaşık 50 dakikada dağılmıştır. Bu sebeple KLN:Mannitol (1:0.2) oranı ile formülasyona devam edilmesi kararlaştırılmıştır.

Çizelge 4.15. Katı lipit nanopartiküllerde liyofilizasyon işlemi öncesi ve sonrasına ait partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi sonuçları (n=3, ort. ± s.s)

Formülasyon	Partikül Büyüklüğü		Polidispersite İndeksi	
	Liyofilizasyon öncesi	Liyofilizasyon sonrası	Liyofilizasyon öncesi	Liyofilizasyon sonrası
A1 (KLN:Trehaloz 1:0,1)	166,3 ± 53,5	439,8 ± 9	0,276 ± 0,069	0,274 ± 0,110
A2 (KLN:Trehaloz 1:0.2)	166,3 ± 53,5	455,3 ± 14,4	0,276 ± 0,069	0,397 ± 0,005
A3 (KLN:Mannitol 1:0.1)	166,3 ± 53,5	183,1 ± 1,3	0,276 ± 0,069	0,301 ± 0,025
A4 (KLN:Mannitol 1:0.2)	166,3 ± 53,5	168,2 ± 3,6	0,276 ± 0,069	0,302 ± 0,014



Şekil 4.25. Rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartikül formülasyonunun mannitol ile (1:0.2) liyofilizasyonu sonucu elde edilen tozun partikül büyüklüğü dağılımı

4.3. Isıya Duyarlı Jel Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Burun damlası şeklinde kullanılacak olan; oda sıcaklığında uygun viskozitede olup, buruna damlatıldıktan sonra hemen jelleşecek ve mukozaya yapışacak, rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartikül içeren ısıya duyarlı jel taşıyıcı sistem geliştirilirken, Bölüm 3.2.3' de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır.

Polimer oranları ve jelleşme derecesinin belirlenmesi

Isıya duyarlı jel sistemi hazırlanırken, Poloksamer 188, 407 ve HPMC E5' in farklı oranlardaki çözeltilerinin karışımının jelleşme sıcaklıkları belirlenmiştir. Geliştirilen ısıya duyarlı jel formülasyonlarında yer alacak polimer ve bu polimerlerin oranlarının jelleşme sıcaklıklarına olan etkileri incelenmiştir. Hedef, jel sisteminin burun mukoza sıcaklığında jelleşecek olmasıdır.

Çalışma, bölüm 3.2.3' de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Poloksamer 188 çalışılan derişimlerde oda sıcaklığında sıvı halde iken burun mukoza sıcaklığında (30-34°C) jelleşmemiştir. Sıcaklık 45°C' ye çıkarıldığında bile jelleşme gözlenmemiştir. Bu nedenle bu polimerle çalışılmamıştır. Jelleşme sıcaklıklarına ait sonuçlar Çizelge 4.16 ve Çizelge 4.17' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.16. Farklı oranlardaki Poloksamer 188' nin jelleşme sıcaklıkları (n=3, ort. ± s.s)

%Poloksamer 188 Oranı	**Jelleşme Sıcaklığı**
5	45°C' ye kadar jelleşme saptanmadı.
10	45°C' ye kadar jelleşme saptanmadı.
11	45°C' ye kadar jelleşme saptanmadı.
13	45°C' ye kadar jelleşme saptanmadı.
15	45°C' ye kadar jelleşme saptanmadı.
16,50	45°C' ye kadar jelleşme saptanmadı.
17	45°C' ye kadar jelleşme saptanmadı.
17,50	45°C' ye kadar jelleşme saptanmadı.
20	45°C' ye kadar jelleşme saptanmadı.

Çizelge 4.17. Farklı oranlardaki Poloksamer 407' nin jelleşme sıcaklıkları (n=3, ort. ± s.s)

%Poloksamer 407 Oranı	**Jelleşme Sıcaklığı**
5	45°C' ye kadar jelleşme saptanmadı.
10	45°C' ye kadar jelleşme saptanmadı.
11	45°C' ye kadar jelleşme saptanmadı.
13	45°C' ye kadar jelleşme saptanmadı.
15	39°C ± 0,5°C
16,50	34°C ± 0,5°C
17	**32°C ± 0,5°C**
17,50	29°C ± 0,5°C
20	Oda sıcaklığında akıcı olmayan jel formunda.

Burun mukoza sıcaklığında poloksamer 407' nin %17 oranında jelleşme gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmalara poloksamer 407' nin %17' lik çözeltisi ile devam edilmiştir.

Bu çalışmada mukoadezif polimer olarak kullanılan HPMC E5 farklı oranlarda poloksamer 407 ile karıştırılarak oluşturulan sistemin jelleşme sıcaklığı yeniden belirlenmiştir. Sonuçlar, Çizelge 4.18' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.18. Polimer karışımlarının jelleşme sıcaklıkları (n=3, ort. ± s.s)

%Poloksamer 407	**%HPMC E5**	**Jelleşme Sıcaklığı**
17	-	32°C ± 0,5°C
17	**0,25**	**31°C ± 0,5°C**
17	**0,50**	**29°C ± 0,5°C**
17	1	28°C ± 0,5°C
17	2	27°C ± 0,5°C

Jelleşme sıcaklığı istenen sınırlar arasında olduğundan P407 %17 + HPMC E5 %0,25 kompozisyonu, KLN' leri taşıması için belirlenmiştir. Bununla beraber P407 %17 + HPMC E5 %0,5 içeren jel de hem viskozite hem de mukoadezif özellikleri açısından incelenmiştir.

Akış özellikleri ve viskozitenin belirlenmesi

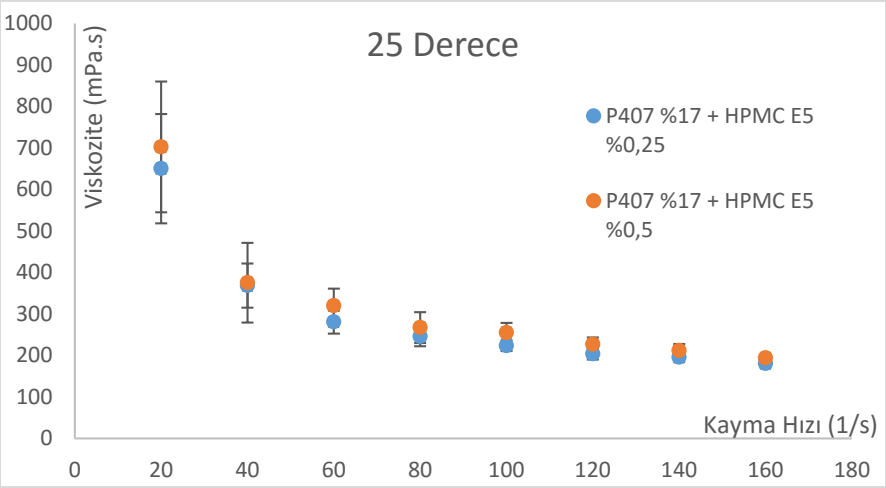
Burun mukozasına temasta jelleşmesi hedeflenen jellerin oda sıcaklığı (25°C) ve burun mukoza sıcaklığındaki (32°C) akış özellikleri ve viskoziteleri, Bölüm 3.2.3' de anlatıldığı şekilde incelenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.19 – Çizelge 4.21 ve Şekil 4.26 – Şekil 4.29' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.19. Formülasyonların 25°C' deki viskozite ölçümü (n=3, ort. ± s.s)

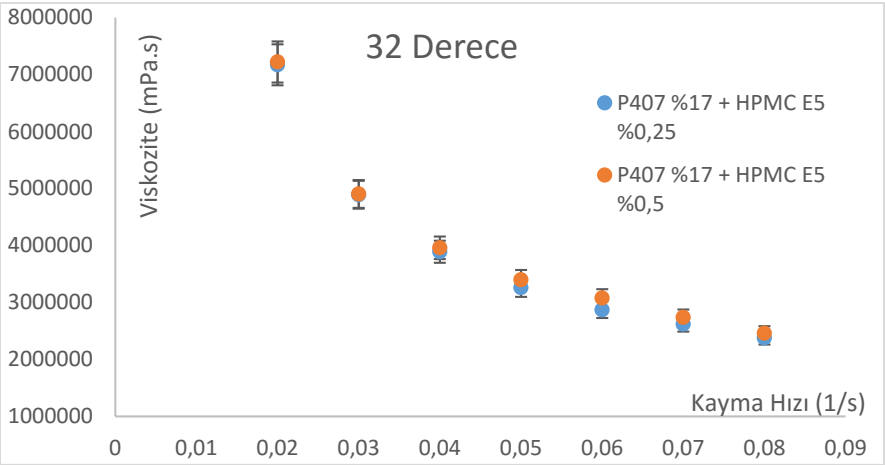
P407 + HPMC E5 (%17 + %0,25)		**P407 + HPMC E5 (%17 + %0,5)**	
Kayma gerilimi (N/m^2)	**Kayma hızı (1/s)**	**Kayma gerilimi (N/m^2)**	**Kayma hızı (1/s)**
13,003 ± 2,634	20	14,049 ± 3,149	20
14,735 ± 2,125	40	15,009 ± 3,844	40
16,842 ± 1,678	60	18,184 ± 2,476	60
19,655 ± 1,887	80	21,378 ± 2,980	80
22,351 ± 1,298	100	25,509 ± 2,361	100
24,438 ± 1,598	120	27,122 ± 1,968	120
27,378 ± 1,417	140	29,650 ± 2,221	140
28,888 ± 1,500	160	31,060 ± 1,429	160

Çizelge 4.20. Formülasyonların 32°C' deki viskozite ölçümü (n=3, ort. ± s.s)

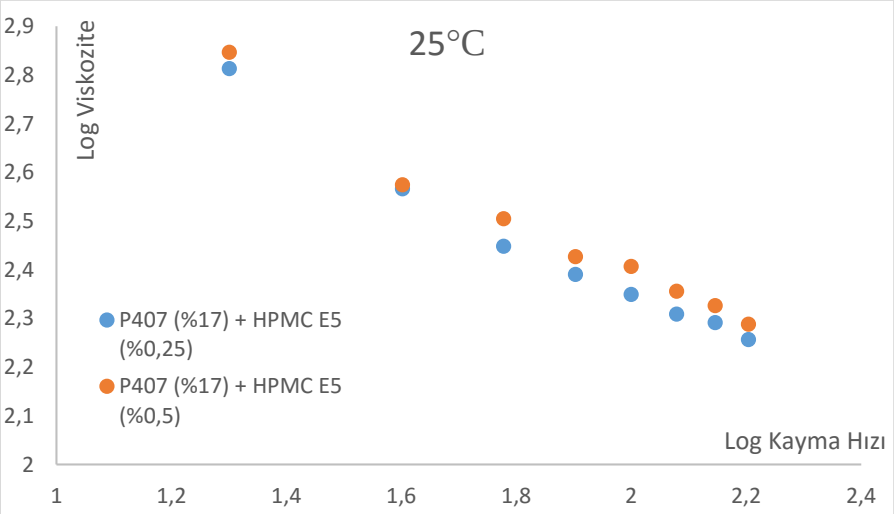
P407 + HPMC E5 (%17 + %0,25)		**P407 + HPMC E5 (%17 + %0,5)**	
Kayma gerilimi (N/m^2)	**Kayma hızı (1/s)**	**Kayma gerilimi (N/m^2)**	**Kayma hızı (1/s)**
143,335 ± 0	0,02	144,395 ± 0,115	0,02
146,648 ± 0,115	0,03	147,112 ± 0,199	0,03
155,859 ± 0	0,04	158,642 ± 0,199	0,04
162,883 ± 0,500	0,05	170,312 ± 0	0,05
172,631 ± 0,115	0,06	184,95 ± 0,115	0,06
183,095 ± 0	0,07	192,041 ± 0,278	0,07
190,872 ± 0	0,08	197,035 ± 0	0,08



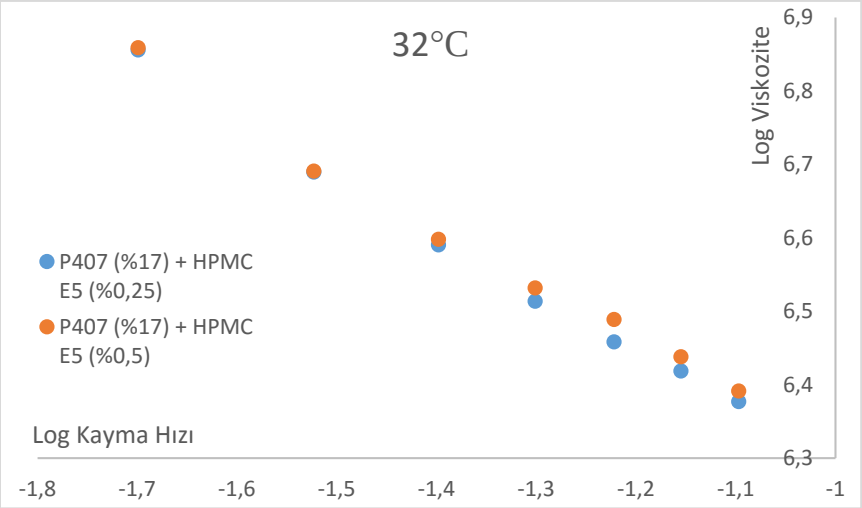
Şekil 4.26. Formülasyonların 25°C' deki kayma hızlarına karşılık viskozite grafiği (n=3, ort. ± s.s)



Şekil 4.27. Formülasyonların 32°C' deki kayma hızlarına karşılık viskozite grafiği (n=3, ort. ± s.s)



Şekil 4.28. P407 %17 + HPMC E5 %0,25 ve P407 %17 + HPMC E5 %0,5' in 25°C deki karışımlarına ait log kayma hızına karşılık log viskozite grafiği



Şekil 4.29. P407 %17 + HPMC E5 %0,25 ve P407 %17 + HPMC E5 %0,5' in 32°C deki karışımlarına ait log kayma hızına karşılık log viskozite grafiği

Çizelge 4.21. Formülasyonların K ve n değerleri

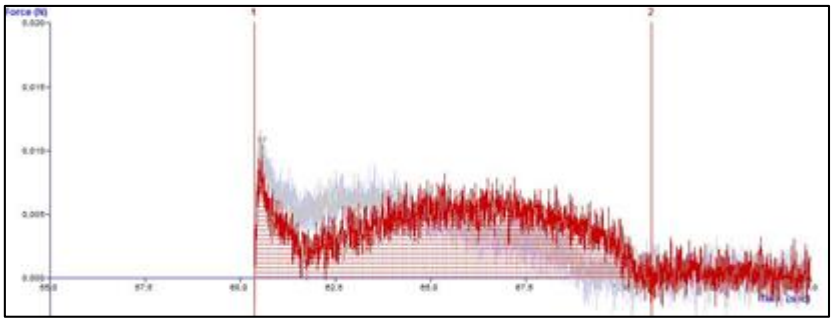
Sıcaklık	Formülasyonlar	K (mPa.s)	n	r^2
25 °C	P407 + HPMC E5 (%17 + %0,25)	3521,340	0,404	0,977
	P407 + HPMC E5 (%17 + %0,5)	3595,301	0,419	0,972
32 °C	P407 + HPMC E5 (%17 + %0,25)	$3,16x10^5$	0,212	0,995
	P407 + HPMC E5 (%17 + %0,5)	$3,64x10^5$	0,248	0,993

Mukoadezif kuvvetin belirlenmesi

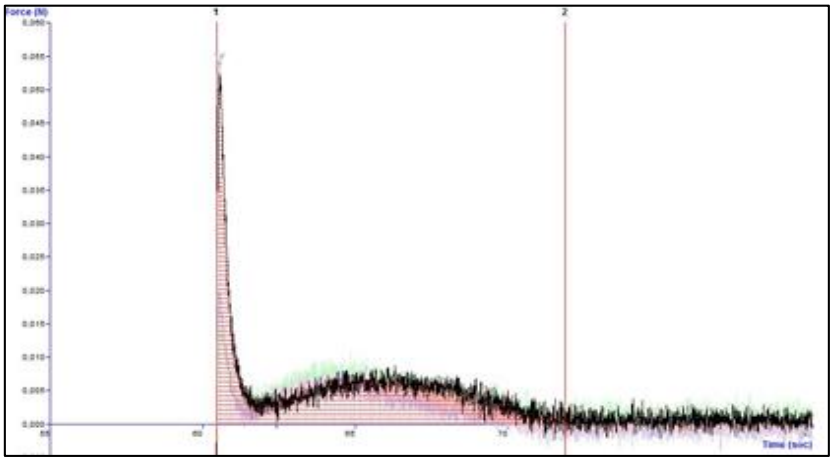
Hazırlanan jel formülasyonlarının mukoadezif kuvvetleri Bölüm 3.2.3' de anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. Sonuçlar, Çizelge 4.22, Çizelge 4.23 ve Şekil 4.30 – Şekil 4.33' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.22. Formülasyonların 25 °C' de mukoadezif kuvvetinin belirlenmesi (n=3)

	P407 %17 + HPMC E5 %0,25		P407 %17 + HPMC E5 %0,5	
25 °C	Alan = iş (N.mm)	Mukoadhezyon işi (mJ/cm^2)	Alan = iş (N.mm)	Mukoadhezyon işi (mJ/cm^2)
Ort.	0,041	0,031	0,059	0,044
S.S	0,003	0,001	0,007	0,004
S.H	0,001	0,001	0,004	0,002
%B.S	6,704	5,473	13,308	10,049



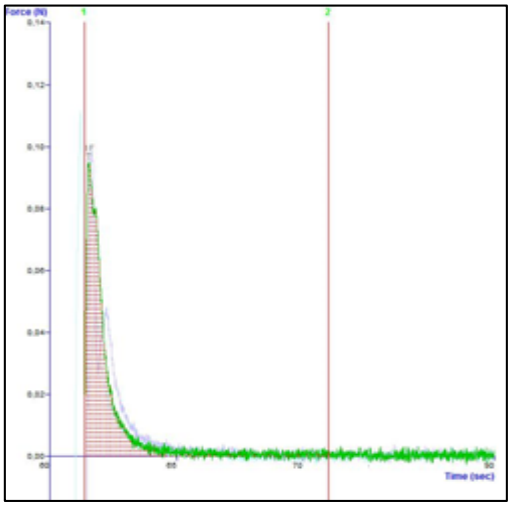
Şekil 4.30. P407 %17 + HPMC E5 %0,25’ in 25°C’ deki karışımına ait adezyon grafiği



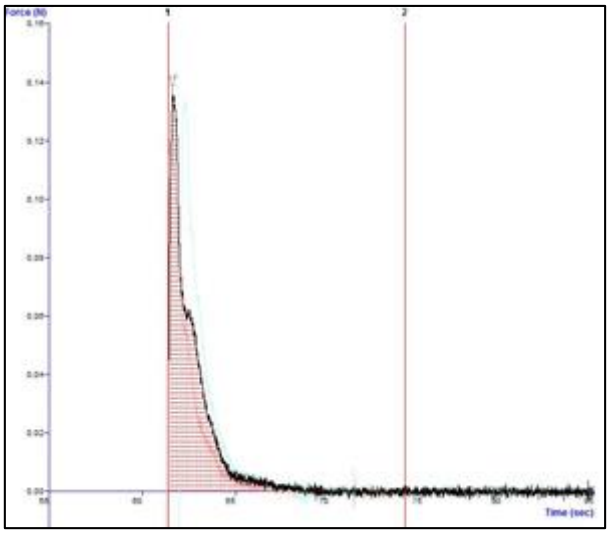
Şekil 4.31. P407 %17 + HPMC E5 %0,5’ in 25°C’ deki karışımına ait adezyon grafiği

Çizelge 4.23. Formülasyonların 32 °C’ de mukoadezif kuvvetinin belirlenmesi (n=3)

	P407 % 17 + HPMC E5 % 0,25		**P407 % 17 + HPMC E5 % 0,5**	
32 °C	**Alan = iş (N.mm)**	**Mukoadhezyon işi (mJ/cm^2)**	**Alan = iş (N.mm)**	**Mukoadhezyon işi (mJ/cm^2)**
Ort.	0,077	0,057	0,161	0,121
S.S	0,003	0,002	0,014	0,008
S.H	0,001	0,001	0,008	0,005
%B.S	4,014	4,014	8,846	7,222



Şekil 4.32. P407 %17 + HPMC E5 %0,25’ in 32°C’ deki karışımına ait adezyon grafiği



Şekil 4.33. P407 %17 + HPMC E5 %0,5' in 32°C' deki karışımına ait adezyon grafiği

4.4. Rasajilin Mesilat Yüklü Liyofilize KLN İçeren Jel Formülasyonunun Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Jelleşme sıcaklığının belirlenmesi

KLN' leri taşımasına karar verilen jel sistemine (P407 %17 + HPMC E5 %0,25), liyofilize edilmiş rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartiküller eklendikten sonra sistemin jelleşme sıcaklığı yeniden incelenmiştir. Daha önce belirlenen jel karışımına katı lipit nanopartiküller eklendiğinde, sistemin jelleşme sıcaklığının değiştiği ve sistemin oda sıcaklığında katı jel haline geldiği saptanmıştır. Bu sebeple RM yüklü KLN içeren jel sisteminde mukoadezif polimer oranı sabit tutulup poloksamer 407 oranı tekrardan belirlenmiştir. Çalışmalar bölüm 3.2.3' de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.24' de gösterilmiştir. Jelleşme sıcaklık değişimi göz önünde bulundurularak, kullanılacak poloksamer oranı %15,5 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.24. Rasajilin mesilat yüklü KLN içeren jel formülasyonunun jelleşme sıcaklığının incelenmesi (n=3, ort. ± s.s)

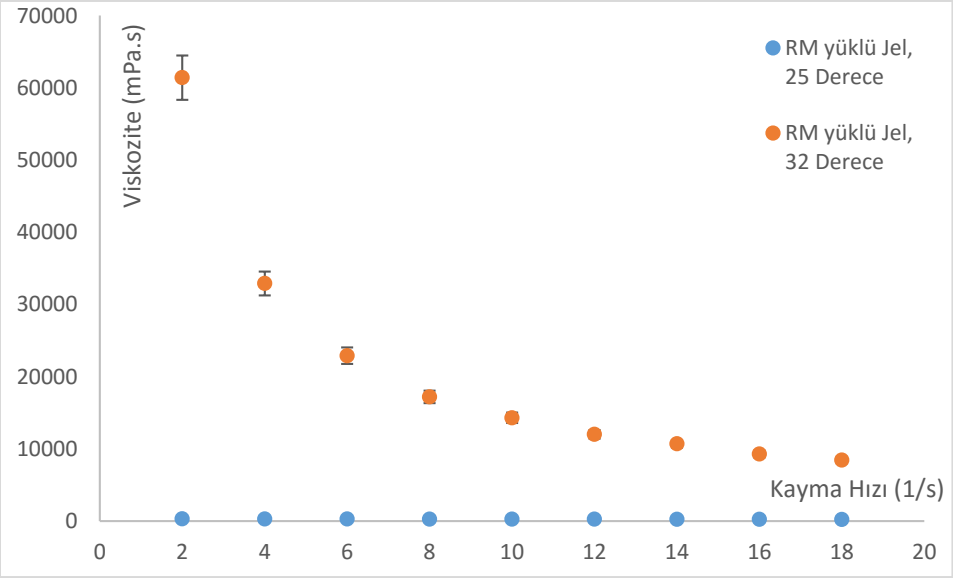
	%Poloksamer 407	%HPMC E5	Jelleşme Sıcaklığı
RM yüklü liyofilize KLN +	14,50	0,25	37°C ± 0,2°C
	15	0,25	34°C ± 0,3°C
	15,50	**0,25**	**31°C ± 0,2°C**
	16	0,25	27°C ± 0,2°C
	16,50	0,25	Oda sıcaklığında katı
	17	0,25	Oda sıcaklığında katı

Akış özellikleri ve viskozitenin belirlenmesi

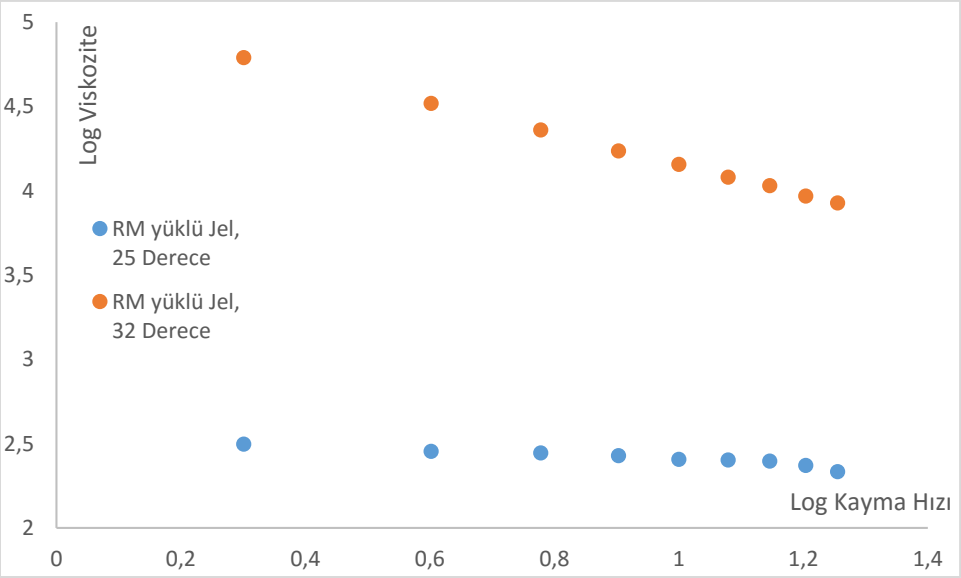
Polimer oranı düzenlendikten sonra, etkin madde yüklü formülasyonların (RM yüklü jel, RM yüklü liyofilize KLN içeren jel) oda sıcaklığı (25°C) ve burun mukoza sıcaklığındaki (32°C) akış özellikleri ve viskoziteleri açısından, Bölüm 3.2.3' de anlatıldığı şekilde incelenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.25 – Çizelge 4.27 ve Şekil 4.34 – Şekil 4.37' de verilmiştir

Çizelge 4.25. %2 RM içeren jel sisteminin 25°C ve 32°C' deki viskozite ölçümü (n=3, ort. ± s.s)

RM yüklü jel (P407 %15,5 + HPMC E5 %0,25) (25°C)		**RM yüklü jel (P407 %15,5 + HPMC E5 %0,25) (32°C)**	
Kayma gerilimi (N/m^2)	**Kayma hızı (1/s)**	**Kayma gerilimi (N/m^2)**	**Kayma hızı (1/s)**
0,626 ± 0,014	2	122,891 ± 0,161	2
1,136 ± 0,09	4	131,38 ± 0,120	4
1,667 ± 0,169	6	137,437 ± 0,111	6
2,139 ± 0,165	8	137,665 ± 0,201	8
2,545 ± 0,22	10	143,065 ± 0,121	10
3,024 ± 0,155	12	144,096 ± 0,110	12
3,479 ± 0	14	149,849 ± 0	14
3,747 ± 0,220	16	148,484 ± 0,201	16
3,870 ± 0,042	18	152,116 ± 0,611	18



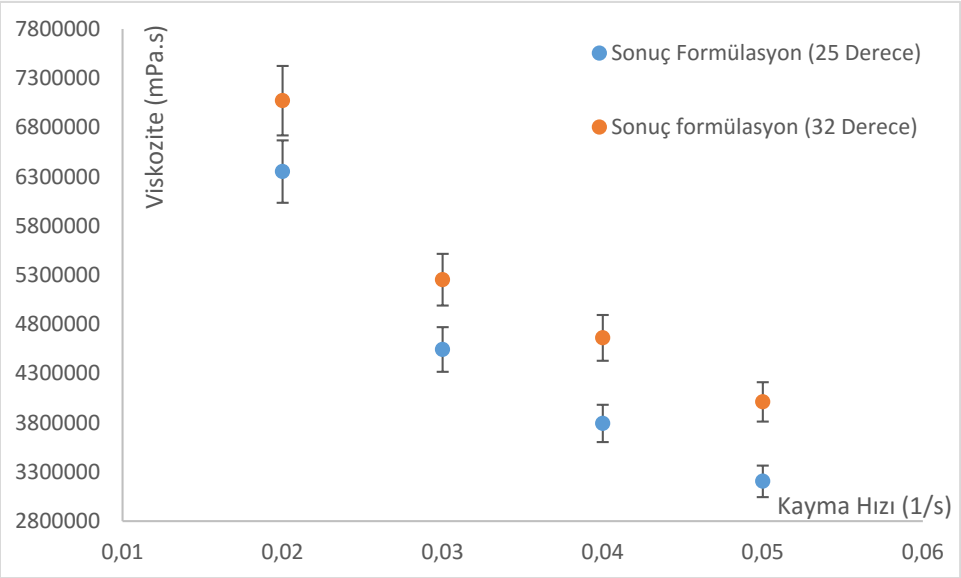
Şekil 4.34. RM-JEL sisteminin 25°C ve 32°C' deki kayma hızına karşılık viskozite grafiği



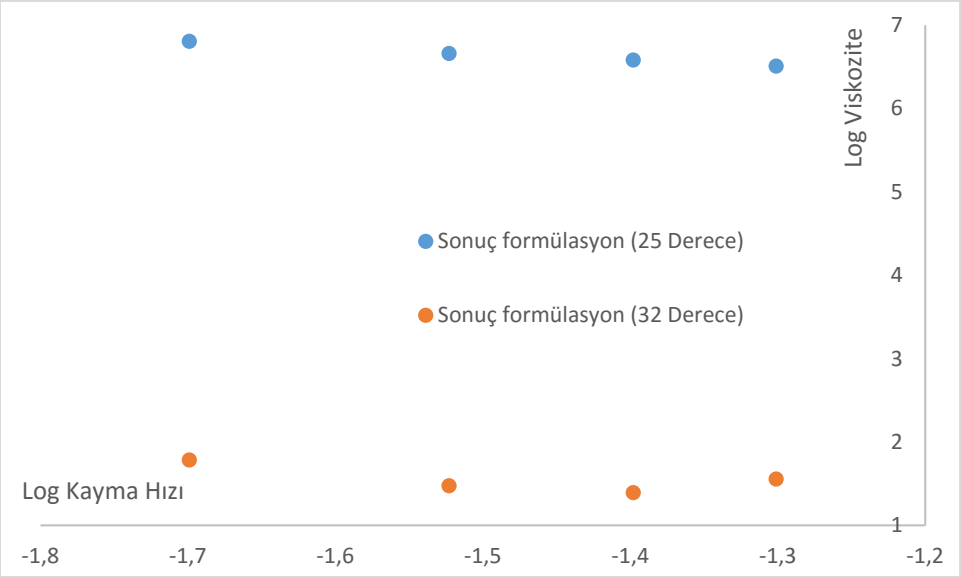
Şekil 4.35. RM-JEL sisteminin 25°C ve 32°C' deki log kayma hızına karşılık log viskozite grafiği

Çizelge 4.26. Rasajilin mesilat yüklü KLN içeren jel formülasyonunun 25°C ve 32°C' deki viskozite ölçümü (n=3, ort. ± s.s)

RM yüklü liyofilize KLN içeren Jel (Sonuç formülasyon) (25°C)		**RM yüklü liyofilize KLN içeren Jel (Sonuç formülasyon) (32°C)**	
Kayma gerilimi (N/m²)	**Kayma hızı (1/s)**	**Kayma gerilimi (N/m²)**	**Kayma hızı (1/s)**
127,002 ± 0,114	0,02	141,484 ± 1,15	0,02
136,294 ± 0,188	0,03	157,556 ± 1,26	0,03
151,659 ± 0,115	0,04	186,350 ± 1,66	0,04
160,184 ± 0,201	0,05	200,057 ± 1,98	0,05



Şekil 4.36. Rasajilin mesilat yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonunun 25°C ve 32°C' deki kayma hızına karşılık viskozite grafiği



Şekil 4.37. Rasajilin mesilat yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonuna ait 25°C ve 32°C' deki log kayma hızına karşılık log viskozite grafiği

Çizelge 4.27. Rasajilin mesilat yüklü formülasyonların 25°C ve 32°C' deki K ve n değerleri

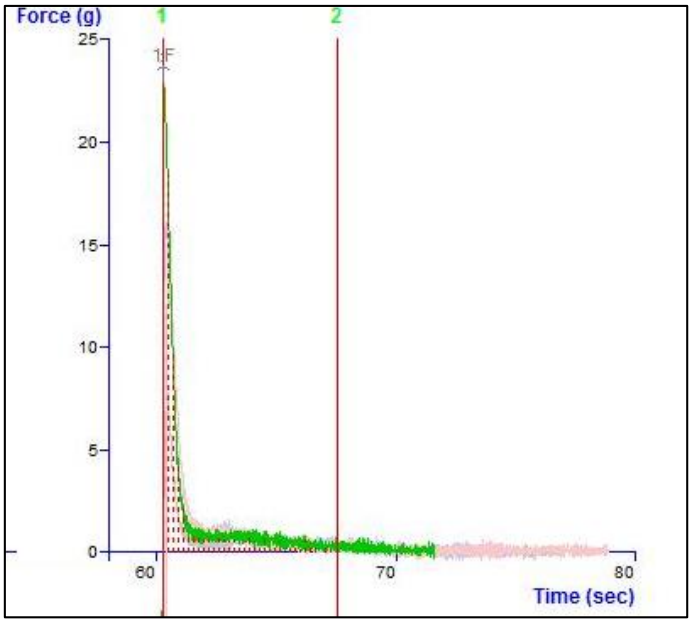
	Formülasyonlar	K (mPa.s)	n	r^2
25 °C	RM yüklü JEL (P407 %15,5 + HPMC E5 %0,25)	353,4	0,853	0,906
	RM yüklü KLN süspansiyonu	11699,5	0,243	0,989
	RM yüklü liyofilize KLN içeren Jel (P407 %15,5 + HPMC E5 %0,25)	348307,029	0,261	0,997
32 °C	RM yüklü JEL (P407 %15,5 + HPMC E5 %0,25)	114999,735	0,095	0,999
	RM yüklü KLN süspansiyonu	8562,7	0,511	0,951
	RM yüklü liyofilize KLN içeren Jel (P407 %15,5 + HPMC E5 %0,25)	654693,529	0,396	0,989

Mukoadezif gücün belirlenmesi

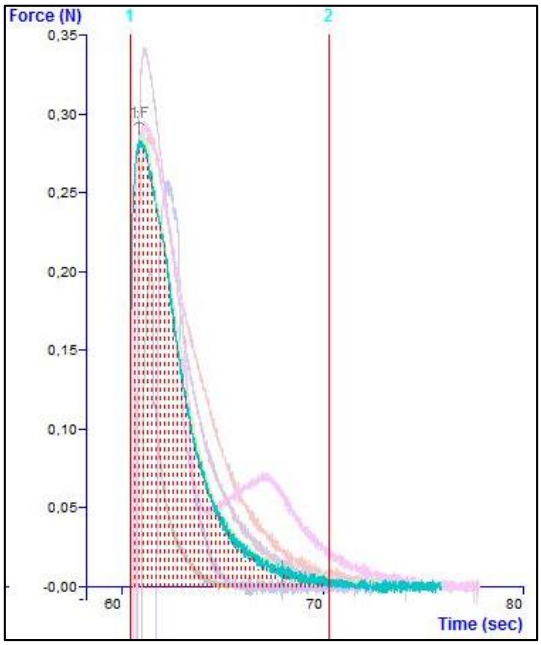
Etkin madde yüklü formülasyonlarda (RM yüklü jel ve RM yüklü liyofilize KLN içeren jel) mukoadezif kuvvet bölüm 3.2.3' de anlatıldığı gibi incelenmiştir. Sonuçlar, Çizelge 4.28, Çizelge 4.29 ve Şekil 4.38 – Şekil 4.41' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.28. Rasajilin mesilat yüklü formülasyonlarda 25 °C' de mukoadezif kuvvetinin belirlenmesi (n=3)

25 °C	RM yüklü jel (P407 %15,5 + HPMC E5 %0,25)		RM yüklü liyofilize KLN içeren jel (P407 %15,5 + HPMC E5 %0,25)	
	Alan = iş (N.mm)	Mukoadhezyon işi (mJ/cm^2)	Alan = iş (N.mm)	Mukoadhezyon işi (mJ/cm^2)
Ortalama	**0,033**	**0,025**	**0,476**	**0,357**
S.S	0,001	0,002	0,023	0,048
S.H	0,001	0,001	0,013	0,027
%B.S	3,03	8	4,832	13,445



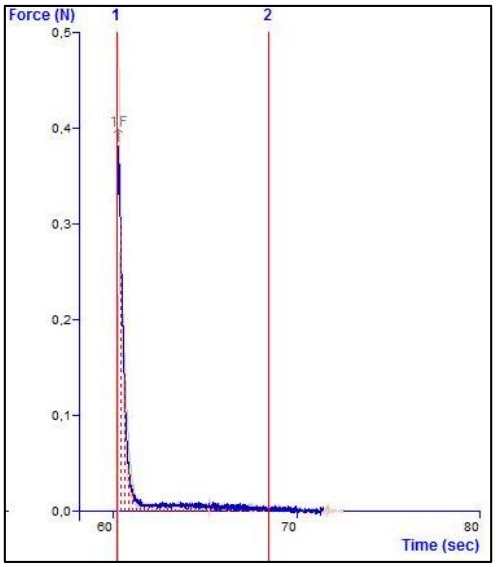
Şekil 4.38. Rasajilin mesilat yüklü jel formülasyonunun 25°C' deki adezyon grafiği



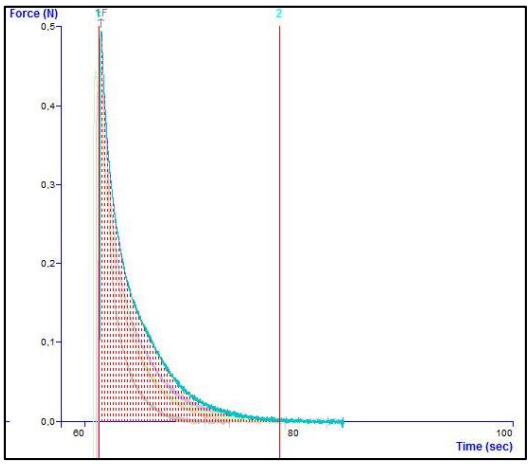
Şekil 4.39. Rasajilin mesilat yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonunun 25°C' deki adezyon grafiği

Çizelge 4.29. Rasajilin mesilat yüklü formülasyonlarda 32 °C' de mukoadezif kuvvetinin belirlenmesi (n=3)

32 °C	**RM yüklü jel (P407 %15,5 + HPMC E5 %0,25)**		**RM yüklü liyofilize KLN içeren jel (P407 %15,5 + HPMC E5 %0,25)**	
	Alan = iş (N.mm)	**Mukoadhezyon işi (mJ/cm^2)**	**Alan = iş (N.mm)**	**Mukoadhezyon işi (mJ/cm^2)**
Ortalama	**0,053**	**0,041**	**1,179**	**3,511**
S.S	0,004	0,003	0,084	0,381
S.H	0,002	0,002	0,048	0,217
%B.S	7,547	7,317	7,124	10,860



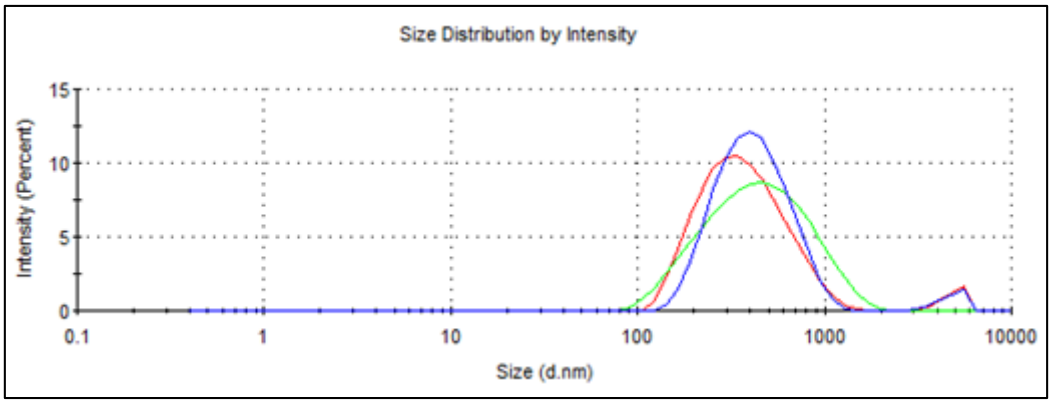
Şekil 4.40. Rasajilin mesilat yüklü jel formülasyonunun 32°C' deki adezyon grafiği



Şekil 4.41. Rasajilin mesilat yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonunun 32°C' deki adezyon grafiği

<u>Partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyelin belirlenmesi</u>

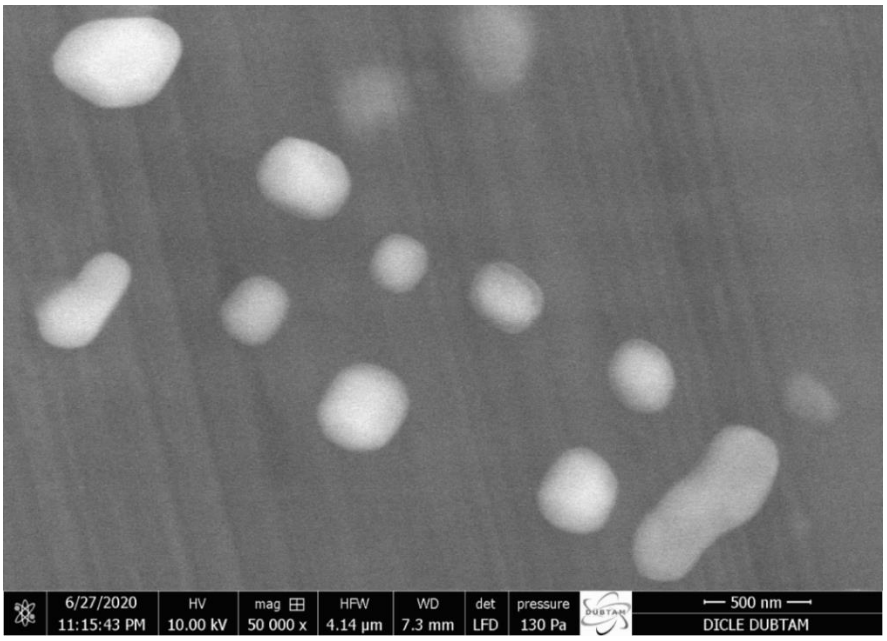
Hazırlanan RM yüklü liyofilize KLN içeren jel sisteminin partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi, sistem hazırlandıktan sonra 100 kat seyreltilerek bölüm 3.2.2' de anlatıldığı gibi ölçülmüştür. Partikül büyüklüğü 253 ± 16,59 nm, polidispersite indeksi 0,282 ± 0,02 zeta potansiyeli ise 0,126 ± 0,032 olarak bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 4.42' de verilmiştir.



Şekil 4.42. Rasajilin mesilat yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonunun partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi

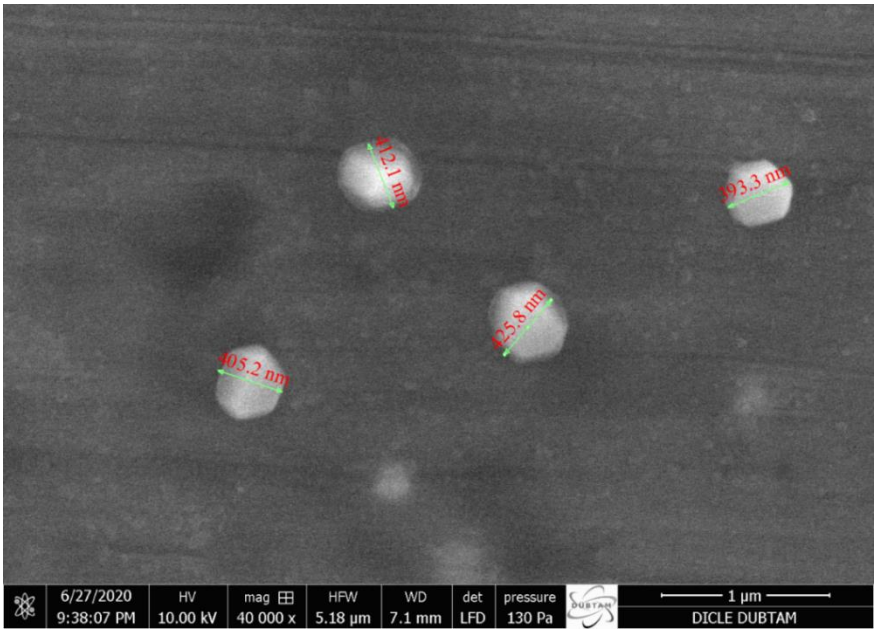
Formülasyonun SEM görüntüsü

Hazırlanan RM yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonlarının SEM görüntüleri alınmıştır. Çalışmalar bölüm 3.2.4' de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Resim 4.1' de henüz liyofilize edilmeden ve jel sistemine konulmadan görüntülenen RM yüklü KLN süspansiyon formülasyonunun görüntüsü verilmektedir (10000 kat seyreltilmiş).



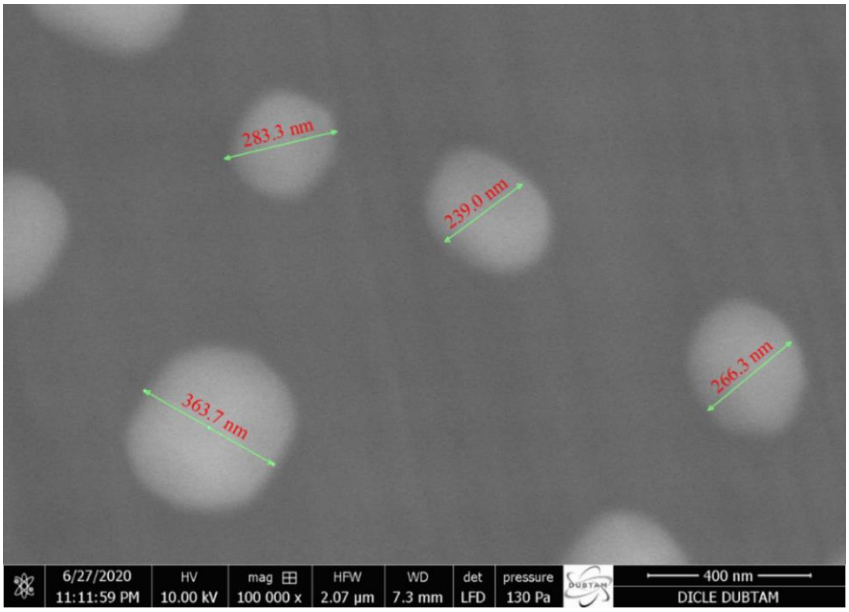
Resim 4 1. Rasajilin mesilat yüklü KLN süspansiyon formülasyonuna ait SEM görüntüsü

Hazırlanan RM yüklü KLN' ler liyofilize edildikten sonra distile suda dağıtılmış ve SEM görüntüleri alınmıştır. Resim 4.2' de bu formülasyona ait görüntüler verilmektedir.



Resim 4.2. Rasajilin mesilat yüklü liyofilize KLN sisteminin suda dağıtıldıktan sonraki SEM görüntüsü

RM yüklü liyofilize KLN' ler, ısıya duyarlı jel sistemine yüklenmiş ve son formülasyon elde edildikten sonraki SEM görüntülemesi yapılmıştır. Görüntüler resim 4.3' de verilmiştir.



Resim 4.3. Rasajilin mesilat yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonuna ait SEM görüntüleri

<u>İn-vitro salım çalışması</u>

Çalışma belirlenen formülasyonlarla (RM Çözeltisi, RM yüklü jel, RM yüklü KLN süspansiyonu, RM yüklü liyofilize KLN içeren jel) gerçekleştirilmiştir. Franz difüzyon

hücresi yöntemi ile Bölüm 3.2.4' de anlatıldığı şekilde, formülasyonlardan etkin maddenin salım profilleri incelenmiştir.

Hazırlanan formülasyonların içerikleri Şekil 3.8' de verilmişti. Salım çalışması sonucu elde edilen veriler ve salım profilleri, Çizelge 4.30 – Çizelge 4.33 ve Şekil 4.43' de gösterilmiştir. Formülasyonlar g/g olarak reçetelendirilmiştir.

Çizelge 4.30. Rasajilin mesilat çözeltisine ait in-vitro salım verileri (n=3, ort. ± s.s, 32°C)

Formülasyon	Zaman (sa)	Toplam mg	% Salım	mg/cm^2
RM ÇÖZELTİSİ	**0,25**	4,674 ± 0, 146	11,685 ± 0,298	4,249 ± 0,132
	0,5	5,659 ± 0,430	14,147 ± 0,879	5,144 ± 0,391
	0,75	7,79 ± 0,485	19,475 ± 0,99	7,082 ± 0,441
	1	10,036 ± 0,440	25,09 ± 0,899	9,124 ± 0,400
	2	17,471 ± 0,333	43,676 ± 0,679	15,882 ± 0,302
	3	20,749 ± 0,284	51,873 ± 0,580	18,863 ± 0,258
	4	24,385 ± 0,098	60,961 ± 0,200	22,168 ± 0,089
	6	28,675 ± 0,285	71,688 ± 0,582	26,068 ± 0,259
	8	33,775 ± 0,084	84,439 ± 0,172	30,705 ± 0,076

Çizelge 4.31. Rasajilin mesilat yüklü jel formülasyonuna ait in-vitro salım verileri (n=3, ort. ± s.s, 32°C)

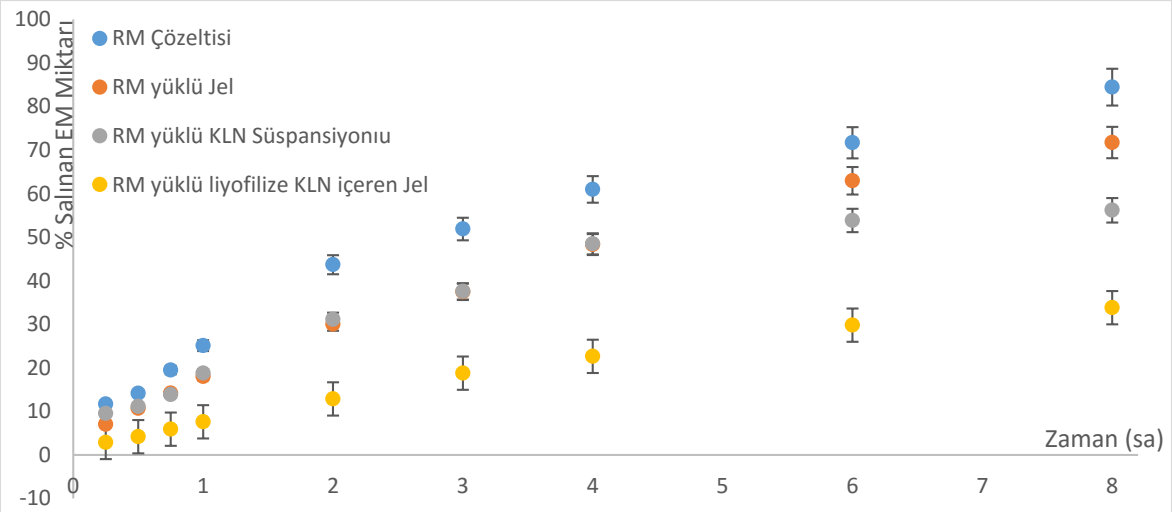
Formülasyon	Zaman (sa)	Toplam mg	% Salım	mg/cm^2
RM yüklü jel	**0,25**	2,808 ± 0,159	7,021 ± 0,325	2,553 ± 0,145
	0,5	4,273 ± 0,243	10,684 ± 0,498	3,885 ± 0,221
	0,75	5,666 ± 0,131	14,165 ± 0,268	5,151 ± 0,119
	1	7,204 ± 0,020	18,01 ± 0,041	6,549 ± 0,018
	2	12,005 ± 0,015	30,012 ± 0,031	10,913 ± 0,013
	3	14,975 ± 0,035	37,437 ± 0,072	13,613 ± 0,032
	4	19,319 ± 0,162	48,298 ± 0,330	17,562 ± 0,147
	6	25,177 ± 0,247	62,943 ±0,506	22,888 ± 0,225
	8	28,689 ± 0,358	71,724 ± 0,732	26,081 ± 0,326

Çizelge 4.32. Rasajilin mesilat yüklü KLN süspansiyonuna ait in-vitro salım verileri (n=3, ort. ± s.s, 32°C)

Formülasyon	Zaman (sa)	Toplam mg	% Salım	mg/cm^2
RM yüklü KLN süspansiyonu	**0,25**	3,81 ± 0,096	9,524 ± 0,197	3,463 ±0,088
	0,5	4,452 ± 0,106	11,131 ± 0,217	4,047 ± 0,096
	0,75	5,536 ± 0,101	13,842 ± 0,207	5,033 ± 0,092
	1	7,501 ± 0,183	18,753 ± 0,374	6,819 ± 0,166
	2	12,444 ± 0,170	31,111 ± 0,347	11,313 ± 0,154
	3	15,019 ± 0,093	37,549 ± 0,189	13,654 ± 0,084
	4	19,388 ± 0,481	48,471 ± 0,982	17,626 ± 0,437
	6	21,529 ± 0,514	53,824 ± 1,049	19,572 ± 0,467
	8	22,469 ± 0,563	56,174 ± 1,151	20,427 ± 0,512

Çizelge 4.33. Sonuç formülasyonuna ait in-vitro salım verileri (n=3, ort. ± s.s, 32°C)

Formülasyon	Zaman (sa)	Toplam mg	% Salım	mg/cm^2
Rm yüklü liyofilize KLN içeren jel (Sonuç Formülasyon)	**0,25**	1,147 ± 0,224	2,867 ± 0,457	1,043 ± 0,203
	0,5	1,673 ± 0,019	4,183 ± 0,039	1,521 ± 0,017
	0,75	2,359 ± 0,011	5,897 ± 0,022	2,144 ± 0,010
	1	3,04 ± 0,173	7,601 ± 0,354	2,764 ± 0,158
	2	5,147 ± 0,187	12,867 ± 0,382	4,679 ± 0,170
	3	7,511 ± 0,422	18,776 ± 0,861	6,827 ± 0,383
	4	9,049 ± 0,017	22,623 ± 0,035	8,226 ± 0,015
	6	11,921 ± 0,213	29,804 ± 0,436	10,838 ± 0,194
	8	13,518 ± 0,273	33,795 ± 0,558	12,289 ± 0,248



Şekil 4.43. Tüm formülasyonların 32°C' de zamana karşı % salınan RM grafiği

Grafiğe bakıldığında formülasyonların % salımları RM çözeltisi > RM yüklü jel > RM yüklü KLN süspansiyonu > RM yüklü liyofilize KLN içeren jel olacak şekildedir. Rasajilin mesilatın tam olarak çözünmüş halde bulunduğu sistemlerden çıkışının, diğer sistemlere göre daha kolay ve hızlı olduğu belirlenmiştir. Jelden (353,4 mPa.s) çıkışın, süspansiyona (11699,5 mPa.s) göre yüksek olmasının sebebi, formülasyonların viskoziteleri ile alakalı olduğu düşünülmektedir. RM yüklü jel formülasyonunun viskozitesi, RM yüklü KLN süspansiyonundan düşüktür. Bu durum, etkin maddenin hareketini ve jelden çıkışını kolaylaştırmaktadır.

Salım grafiklerinin birbiriyle karşılaştırılabilmesi ve her bir sistemin özellikleri hakkında bilgi verebilmesi için, salım verileri iki kinetik modele göre incelenmiş ve "x" ve "y" değerleri ilgili kinetik modele göre belirlenmiştir.

a) 0 derece kinetik modeli

x = saat veya x = saat

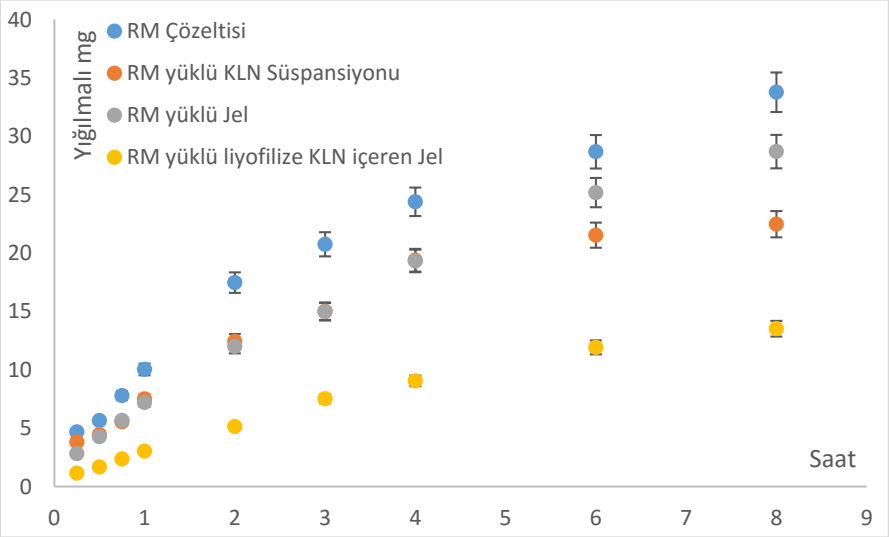
y = mg y = mg/cm^2

b) Matris kinetik modeli

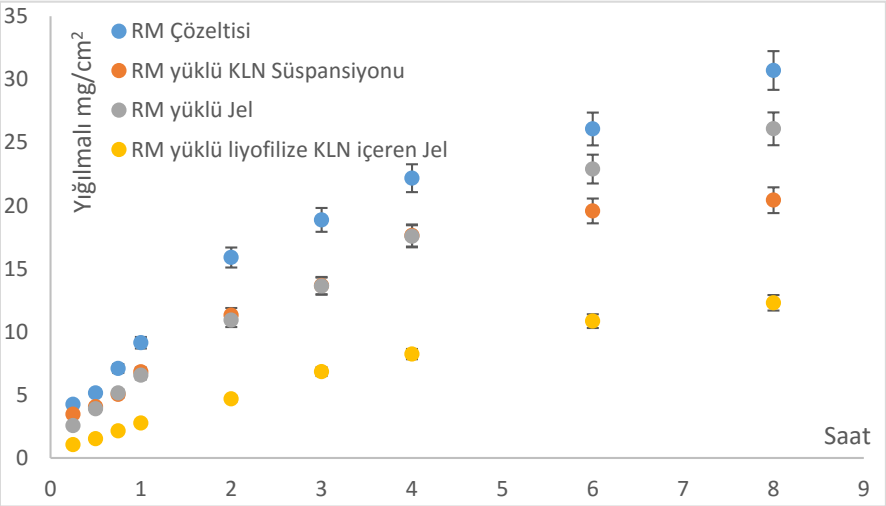
x = √saat

y = mg/cm^2

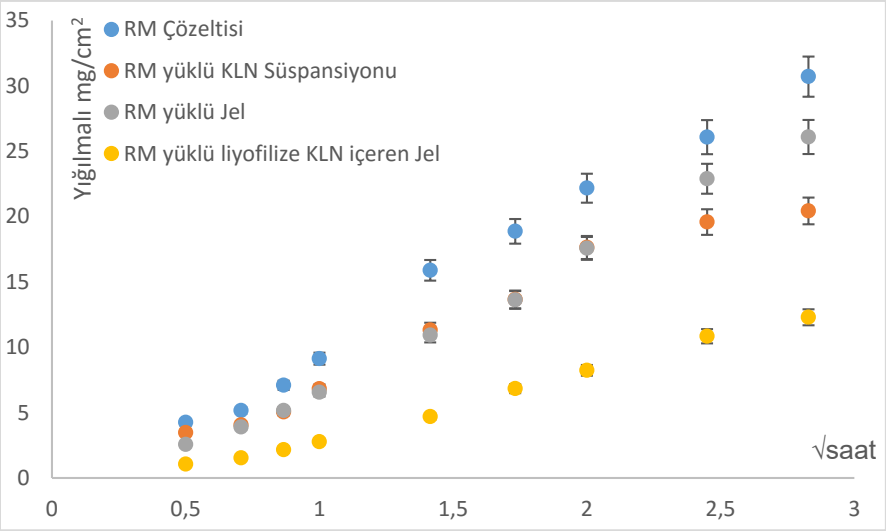
Bu modellere göre oluşturulan grafikler ve yapılan doğrusal regresyon analizi sonuçları Şekil 4.44 – Şekil 4.46 ve Çizelge 4.34'te gösterilmiştir.



Şekil 4.44. Formülasyonların zamana karşı yığılmalı mg grafiği



Şekil 4.45. Formülasyonların zamana karşı yığılmalı mg/cm^2 grafiği



Şekil 4.46. Formülasyonların zamanın kareköküne karşı yığılmalı mg/cm^2 grafiği

Çizelge 4.34. İncelenen formülasyonların regresyon analiz sonuçları

x = saat **y = mg (yığılmalı)**	**RM Çözeltisi**	**RM yüklü jel**	**RM yüklü KLN süspansiyonu**	**RM yüklü liyofilize KLN içeren jel**
Eğim (mg/saat) ± S.H	3,799 ± 0,363	3,424 ±0,210	2,618 ± 0,337	1,668 ± 0,110
Kesişim (mg) ± S.H	6,258 ± 1.384	3,644 ± 0,802	5,043 ± 1,284	1,427 ± 0,419
r^2	0,940	0,974	0,896	0,970
Regresyonun S.H.	2,778	1,611	2,578	0,842
x = saat **y = mg/cm^2 (yığılmalı)**	**RM Çözeltisi**	**RM yüklü jel**	**RM yüklü KLN süspansiyonu**	**RM yüklü liyofilize KLN içeren jel**
Eğim (mg/cm^2/saat) ± S.H	3,454 ± 0,330	3,113 ± 0,191	2,380 ± 0,306	1,516 ± 0,099
Kesişim (mg/cm^2) ± S.H	5,689 ± 1,258	3,313 ± 0,729	4,584 ± 1,167	1,297 ± 0,381
r^2	0,940	0,974	0,896	0,970
Regresyonun S.H	2,526	1,464	2,344	0,765
x = √saat **y = mg/cm^2 (yığılmalı)**	**RM Çözeltisi**	**RM yüklü jel**	**RM yüklü KLN süspansiyonu**	**RM yüklü liyofilize KLN içeren jel**
Eğim (mg/cm^2/√saat) ± S.H	11,848 ± 0,402	10,506 ± 0,273	8,271 ± 0,546	5,123 ± 0,150
Kesişim (mg/cm^2) ± S.H	-2,294 ± 0,676	-3,623 ± 0,459	-1,075 ± 0,919	-2,090 ± 0,253
r^2	0,992	0,995	0,970	0,994
Regresyonun S.H.	0,921	0,625	1,252	0,344

Çizelge 4.34'te r^2 değerleri göz önüne alındığında verileri en iyi tanımlayan matematiksel modelin matris kinetik modeli olduğu görülmektedir. Verileri tanımlayan bu kinetik modele ait eğim değerleri ve her bir sistemden 8. saatte salınan miktarlar ve % değerler incelendiğinde aşağıdaki gibi bir sıralama elde edilmiştir.

Rm çözeltisi > Rm yüklü jel > Rm yüklü KLN > RM yüklü liyofilize KLN içeren jel

Rasajilin mesilat çözeltisinin kullanıldığı çalışmada etkin maddenin kullanılma oranı %2 dir. Bu konsantrasyon yapay nazal sıvıdaki çözünürlüğünün (92 mg/ml) çok altındadır. Salım çalışması bu koşullarda, depoda etkin maddenin tümüyle çözündüğü ve salımda denge durumunda çalışılmayan bir durumda gerçekleştirilmiştir. Buradan hareketle Eşitlik 4.1 ile kullanılan diyaliz zarın RM' ye karşı gösterdiği geçirgenlik değeri hesaplanmıştır (Eş. 4.1), (Siepmann ve Siepmann, 2012).

$$M_t / M_\infty = 1- e^{-k.t}$$

$$\ln[1-(M_t / M_\infty)] = -k.t \qquad (4.1)$$

Mt = t anında zardan salım ortamına geçen RM miktarı (mg)

M_∞ = Verici odacıkta bulunan RM miktarı (40 mg)

M_t / M_∞ = Diyaliz zardan salım ortamına geçen fraksiyon

k = RM' nin diyaliz zardan geçiş hız sabiti (1/saat)

k = A.D.K / V.L

A = Diyaliz zarın alanı (1,1 cm^2)

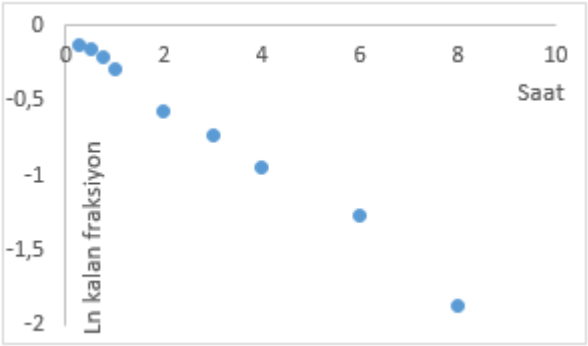
D = RM' nin diyaliz zardaki difüzyon katsayısı (cm^2/saat)

K = Zar/Verici odacıktaki RM çözeltisi arasındaki etkin madde partisyon katsayısı

V = Verici odacıktaki RM çözeltisinin hacmi (2 cm^3)

L = Diyaliz zarın kalınlığı (cm)

Bu eşitlikten hareketle Şekil 4.47 oluşturulmuş ve verilere doğrusal regresyon uygulanmış, diyaliz zarın RM' ye karşı gösterdiği geçirgenlik hesaplanmıştır.



k (1/saat)	-0,216 sa^{-1}
r^2	0,992
Regresyonun S.H	0,0548
Diyaliz zarın RM' ye geçirgenliği	0,393 cm/saat

Şekil 4.47. Rasajilin mesilat çözeltisinin zamana karşı ln kalan fraksiyon grafiği

RM yüklü jelin kullanıldığı çalışmada etkin madde %2 (g/g) derişiminde bulunmaktadır. Sistem etkin maddenin tümüyle çözündüğü berrak bir sistemdir. Salım çalışmasının yapıldığı sıcaklıkta (32°C) akıcı olmayan jel yapısına dönen bu sistem, homojen matris yapısındadır. Zaten bu nedenle veriler, matrisin kinetik modeline uymaktadır (Çizelge 4.35). Etkin maddenin jel sistemde tümüyle çözünmüş olması ve salımın düz bir yüzeyden sadece bir yöne doğru gerçekleşmesi nedeniyle aşağıdaki Higuchi eşitliği esas alınarak RM' nin jel içindeki difüzyon katsayısı hesaplanmıştır (Eş.4.2), (Higuchi, 1967).

$$Q = \frac{\sqrt{4.Co^2.D}}{\sqrt{\pi}} . \sqrt{t} \qquad (4.2)$$

Q = Diyaliz zardan geçen RM miktarı (mg/cm^2)
Co = Verici odacıktaki jel kütlesindeki RM derişimi (20,06 mg/cm^3)
D = RM' nin jel yapısındaki difüzyon katsayısı (cm^2/saat)
t = Saat

Birim alandan geçen RM miktarı (mg/cm^2) değeri ile √t anındaki doğrusal ilişkiyi gösteren bu eşitliğe göre yapılan doğrusal regresyon sonuçları Çizelge 4.35'te verilmiştir. Hesap sonucunda bulunan eğim (10,506 $mg/cm^2/\sqrt{saat}$), RM' nin bu sistemden çıkış hızını tanımlamaktadır.

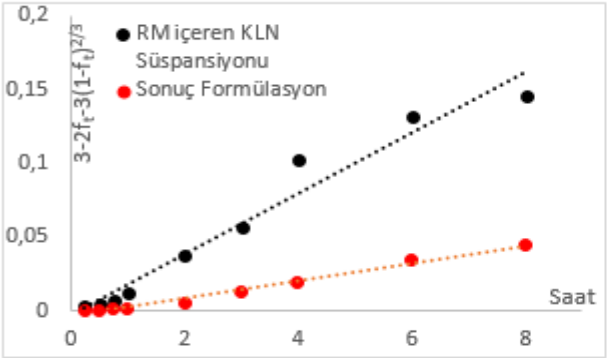
Bu eşitliğe göre eğim, $\frac{\sqrt{4.Co^2.D}}{\sqrt{\pi}}$ ' e eşittir. Buna göre gerekli hesaplar yapılmış ve RM' nin jel içindeki difüzyon katsayısı 5,185 cm^2/saat olarak bulunmuştur.

KLN süspansiyonu, RM' nin küresel lipit nanotanecikler içinde bulunduğu bir sistemdir. RM' nin bu küresel taneciklerden salım ortamına çıkışı, kürenin her yönünden gerçekleşir.

Bu taneciklerin aynı zamanda salımı yavaşlatan özellikte olduğu da görülmektedir. Küresel partiküler sistemlerde bu hususların göz önüne alınması gerektiği belirtildiği için veriler aşağıdaki eşitliğe göre de değerlendirilmiştir (Eş.4.3), (Cobby ve diğerleri, 1974; Higuchi, 1963). Çalışmamızda, küresel nanopartikül içermesi nedeniyle, bu durum hem KLN süspansiyonda hem de sonuç formülasyon için incelenmiştir. Veriler matris kinetik modelin yansıra bu eşitliğe göre de değerlendirilmiştir.

$$2(1-f_t) - 3(1-f_t)^{2/3} = Bt-1 \qquad (4.3)$$

Eşitlikte f_t, etkin maddenin salınan fraksiyonunu, B ise salım katsayısını ifade etmektedir. Bu eşitlik esas alınarak Şekil 4.48 oluşturulmuş ve verilere lineer regresyon uygulanmıştır.



	RM içeren KLN Süspansiyonu	Sonuç Formülasyon
B (eğim)	0,0206	0,00604
r^2	0,963	0,990
Regresyonun S.H	0,0118	0,00179

Şekil 4.48. Rasajilin mesilat yüklü KLN süspansiyon formülasyonu ve sonuç formülasyonuna uygulanan zamana karşı salınan fraksiyon grafiği

Verilerin bu eşitliğe uyum ölçütü ile Çizelge 4.34'te matris kinetiği uyum ölçütü karşılaştırılmış ve matris kinetik modelinin salım verilerini daha iyi tanımladığına karar verilmiştir.

<u>Ex-vivo geçiş çalışması</u>

Ex vivo geçiş çalışmaları, Bölüm 3.2.4' de anlatıldığı gibi yapılmıştır. RM çözeltisi, RM yüklü jel, RM yüklü KLN süspansiyonu ve RM yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonlarının inek burun mukozasından geçişi incelenmiştir. Geçiş çalışması sonuçları, Çizelge 4.35 – Çizelge 4.38 ve Şekil 4.49'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.35. Rasajilin mesilat çözeltisine ait ex vivo geçiş verileri (n=3, ort. ± s.s)

Formülasyon	Zaman (sa)	Toplam mg	% Geçiş	mg/cm^2
RM ÇÖZELTİSİ	**0,25**	5,914 ± 0,528	14,786 ± 1,079	5,376 ± 0,480
	0,5	7,331 ± 0,188	18,328 ± 0,384	6,664 ± 0,171
	0,75	8,688 ± 0,283	21,721 ± 0,579	7,898 ± 0,258
	1	10,156 ± 0,328	25,391 ± 0,669	9,233 ± 0,298
	2	15,261 ± 0,320	38,153 ± 0,654	13,873 ± 0,291
	3	18,755 ± 0,201	46,887 ± 0,411	17,05 ± 0,183
	4	21,656 ± 0,339	54,141 ± 0,692	19,687 ± 0,308
	6	26,685 ± 0,247	66,712 ± 0,504	24,259 ± 0,224
	8	29,589 ± 0,108	73,973 ± 0,222	26,899 ± 0,099

Çizelge 4.36. Rasajilin mesilat yüklü jel formülasyonuna ait ex vivo geçiş verileri (n=3, ort. ± s.s)

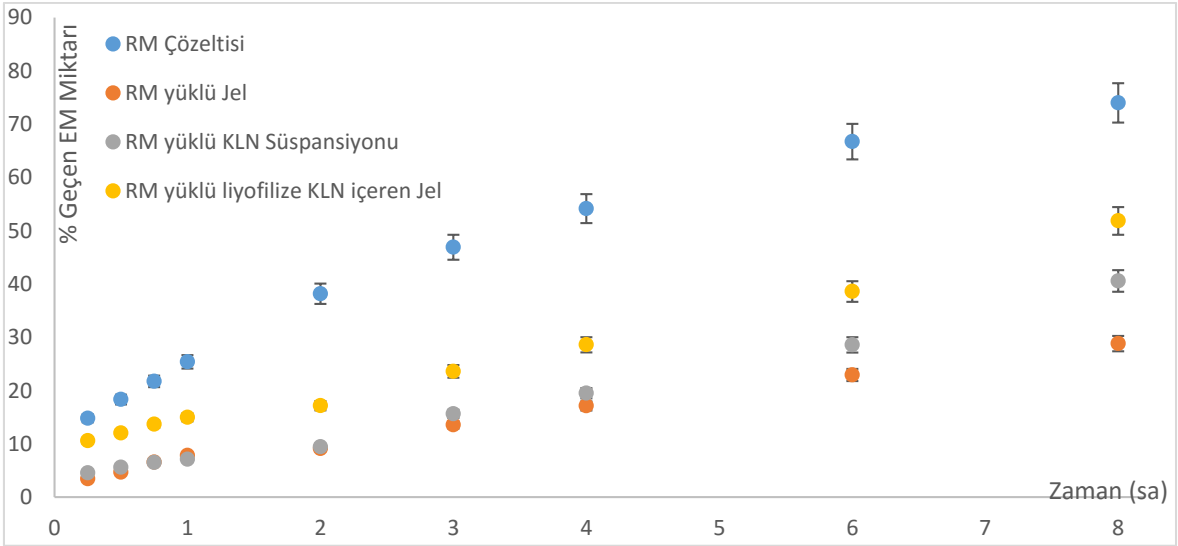
Formülasyon	Zaman (sa)	Toplam mg	% Geçiş	mg/cm^2
RM yüklü jel	**0,25**	1,372 ± 0,086	3,431 ± 0,176	1,247 ± 0,078
	0,5	1,863 ± 0,169	4,659 ± 0,346	1,694 ± 0,154
	0,75	2,628 ± 0,074	6,57 ± 0,151	2,389 ± 0,067
	1	3,125 ± 0,165	7,813 ± 0,765	2,841 ± 0,150
	2	3,649 ± 0,140	9,123 ± 0,312	3,317 ± 0,127
	3	5,419 ± 0,206	13,547 ± 0,448	4,926 ± 0,187
	4	6,85 ± 0,402	17,125 ± 0,870	6,227 ± 0,366
	6	9,168 ± 0,857	22,921 ± 1,800	8,335 ± 0,779
	8	11,522 ± 0,891	28,806 ± 1,851	10,474 ± 0,810

Çizelge 4.37. Rasajilin mesilat yüklü KLN süspansiyonuna ait ex vivo geçiş verileri (n=3, ort. ± s.s)

Formülasyon	Zaman (sa)	Toplam mg	% Geçiş	mg/cm^2
RM yüklü KLN süspansiyonu	**0,25**	1,821 ± 0,038	4,552 ± 0,079	1,655 ± 0,035
	0,5	2,233 ± 0,024	5,584 ± 0,049	2,03 ± 0,022
	0,75	2,595 ± 0,096	6,488 ± 0,197	2,359 ± 0,088
	1	2,836 ± 0,086	7,091 ± 0,177	2,578 ± 0,079
	2	3,777 ± 0,365	9,444 ± 0,746	3,434 ± 0,332
	3	6,251 ± 0,088	15,626 ± 0,181	5,682 ± 0,080
	4	7,812 ± 0,111	19,501 ± 0,228	7,091 ± 0,101
	6	11,428 ± 0,816	28,571 ± 1,666	10,389 ± 0,742
	8	16,225 ± 0,224	40,564 ± 0,458	14,75 ± 0,204

Çizelge 4.38. Rasajilin mesilat yüklü liyofilize KLN içeren jel formülasyonuna ait ex vivo geçiş verileri (n=3, ort. ± s.s)

Formülasyon	Zaman (sa)	Toplam mg	% Geçiş	mg/cm^2
RM yüklü liyofilize KLN içeren jel (Sonuç Formülasyon)	**0,25**	4,228 ± 0,546	10,57 ± 1,115	3,843 ± 0,496
	0,5	4,807 ± 0,553	12,0175 ± 1,129	4,37 ± 0,503
	0,75	5,47 ± 0,496	13,676 ± 1,012	4,973 ± 0,451
	1	5,983 ± 0,578	14,959 ± 1,180	5,439 ± 0,525
	2	6,864 ± 0,155	17,16 ± 0,316	6,24 ± 0,141
	3	9,44 ± 0,361	23,6 ± 0,738	8,581 ± 0,328
	4	11,437 ± 0,529	28,592 ± 1,080	10,397 ± 0,481
	6	15,437 ± 0,339	38,594 ± 0,692	14,034 ± 0,308
	8	20,735 ± 0,089	51,839 ± 0,182	18,85 ± 0,081



Şekil 4.49. Tüm formülasyonların 32°C' de zamana karşı RM için burun mukozasından geçiş grafiği

Grafik incelendiğinde, 8. saat sonunda RM çözeltisi > RM yüklü liyofilize KLN içeren jel > RM yüklü KLN süspansiyonu > RM yüklü jel olarak etkin madde geçiş yüzdesi sıralaması yapılmaktadır. Lipofilikliğin artışına bağlı taşıyıcı sistem ve ilaç moleküllerinin membrana ilgisinin arttığı ve buna bağlı lipit yapıların mukozaya karşı permeabilitelerinin arttığı bilinmektedir (Van De Waterbeemd ve diğerleri, 2001). Sonuç formülasyonun in-vitro salımı ile ex-vivo geçişi kıyaslandığında, lipofilitenin, etkin maddenin mukozadan geçişi üzerine olumlu etkisi görülmektedir. Ayrıca, RM yüklü KLN süspansiyonunun, RM yüklü jele göre daha yüksek oranda etkin madde geçişine olanak vermesinin de lipofiliklik artışı ile alakalı olduğu düşünülmektedir.

RM' nin burun mukozasından geçişinin incelendiği çalışmadan elde edilen veriler, aşağıdaki eşittik dikkate alınarak değerlendirilmiştir (Eş.4.4), (Birnie, 2008).

$$\mathbf{M/S} = \frac{D.K.Cd}{h} t \qquad (4.4)$$

M = Mukozadan geçen RM miktarı (mg)

S = Geçişin gerçekleştiği zarın yüzey alanı (1,1 cm^2)

M/S = Mukozanın birim alanından geçen RM miktarı (mg/cm^2)

D = RM' nin mukoza içindeki difüzyon katsayısı (cm^2/saat)

K = RM' nin mukoza ile verici odacık arasındaki partisyon katsayısı

Cd = RM' nin verici odacıktaki sistem içindeki konsantrasyonu (20mg/cm^3)

h = Zarın kalınlığı (mukoza kalınlığı, cm)

D.K/h = Permeabilite (cm/saat)

t = saat

Bu eşitliğe göre zaman ile mukozadan geçen RM miktarı arasında lineer bir ilişki bulunmaktadır. Veriler bu eşitliğe göre değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun eğimi (mg/cm^2/saat), $\frac{D.K.Cd}{h}$ oranına eşit olmaktadır. Cd değeri bilindiğine göre, RM için mukozanın permeabilitesi (P, cm/saat) "D.K/h" oranına eşit olacaktır.

Eşitlik 4.4' den hareketle bulunan eğim değeri, akı (J, mg/cm^2/saat) değeri olarak da bilinmektedir. Hesaplar sonucunda bulunan değerler Çizelge 4.39'da verilmiştir.

Çizelge 4.39. Formülasyonlara ait akı ve permeabilite değerleri

	RM Çözeltisi	**RM yüklü jel**	**RM yüklü KLN süspansiyonu**	**RM yüklü liyofilize KLN içeren jel**
Permeabilite (P, cm/saat)	142,6x10^{-3}	58,4x10^{-3}	82,6x10^{-3}	93,6x10^{-3}
Akı (J, mg/cm^2/saat)	2,852	1,168	1,651	1,872
r^2	0,956	0,993	0,990	0,992
Regresyonun S.H	1,761	0,280	0,482	0,478

Biyolojik zarlardan geçiş çalışması sırasında "gecikme süresi" denen bir durumla karşılaşılabilir. Bu durum çalışmamızda saptanmamıştır.

Stabilite çalışması

Stabilite testleri, Bölüm 3.2.4' de anlatıldığı gibi yapılmıştır. 12 ay planlanan stabilite çalışmaları, Covid-19 pandemi süreci nedeni ile 15 aya çıkmıştır. Rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartikül içeren ısıya duyarlı jel formülasyonlarının farklı saklama koşullarındaki partikül büyüklüğü ve dağılımı hesaplanmış, viskoziteleri ve zeta potansiyelleri ölçülmüştür. Stabilite sonuçları Çizelge 4.40– Çizelge 4.44 ve Şekil 4.50 – Şekil 4.52'de verilmiştir. 40 derecede saklanan formülasyon 15 ay sonunda tamamen kuruduğu için viskozitesi ölçülememiştir.

Çizelge 4.40. Formülasyonun +4°C deki partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli değişimleri

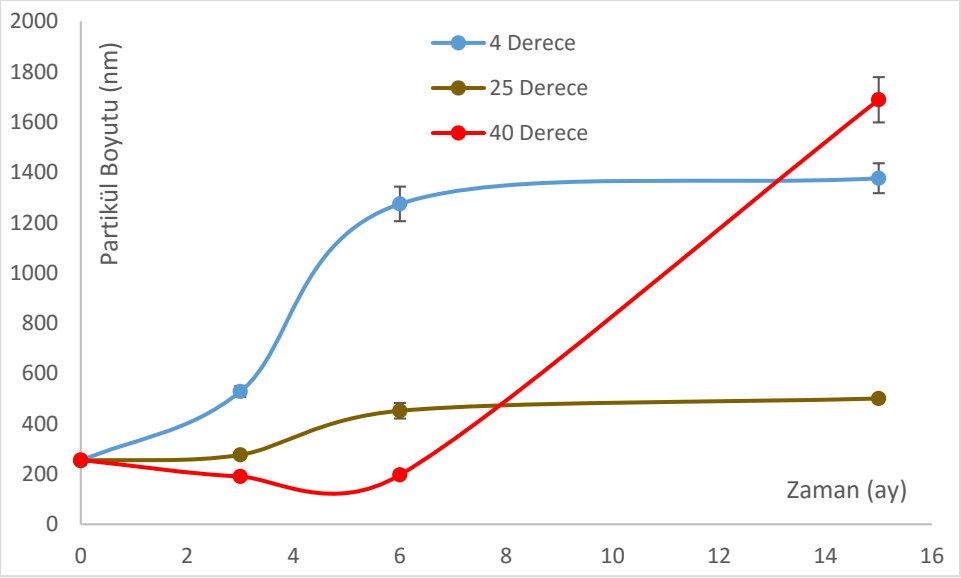
Zaman (ay)	Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	253 ± 16,59	0,282 ± 0,02	0,111 ± 0,014
3	528 ± 21,12	0,390 ± 0,046	0,097 ± 0,009
6	1274 ± 68,79	0,331 ± 0,152	0,073 ± 0,027
15	1376 ± 59,48	0,213 ± 0,066	0,071 ± 0,022

Çizelge 4.41. Formülasyonun +25°C ve %60 bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli değişimleri

Zaman (ay)	Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	253 ± 16,59	0,282 ± 0,02	0,111 ± 0,014
3	276 ± 4,041	0,267 ± 0,016	0,089 ± 0,017
6	451,5 ± 30,81	0,310 ± 0,010	0,067 ± 0,021
15	500,3 ± 10,30	0,382 ± 0,052	0,066 ± 0,023

Çizelge 4.42. Formülasyonun +40°C ve %75 bağıl nem ortamındaki partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli değişimleri

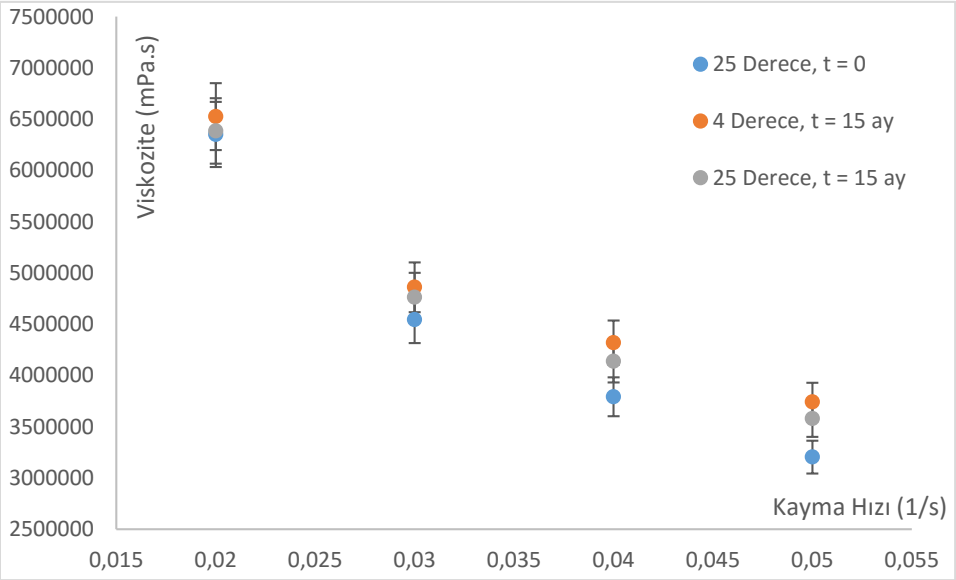
Zaman (ay)	Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	253 ± 16,59	0,282 ± 0,02	0,111 ± 0,014
3	190,5 ± 1,65	0,326 ± 0,014	0,094 ± 0,015
6	196,6 ± 12,49	0,27 ± 0,016	0,092 ± 0,021
15	1668 ± 89,93	0,686 ± 0,315	0,065 ± 0,024



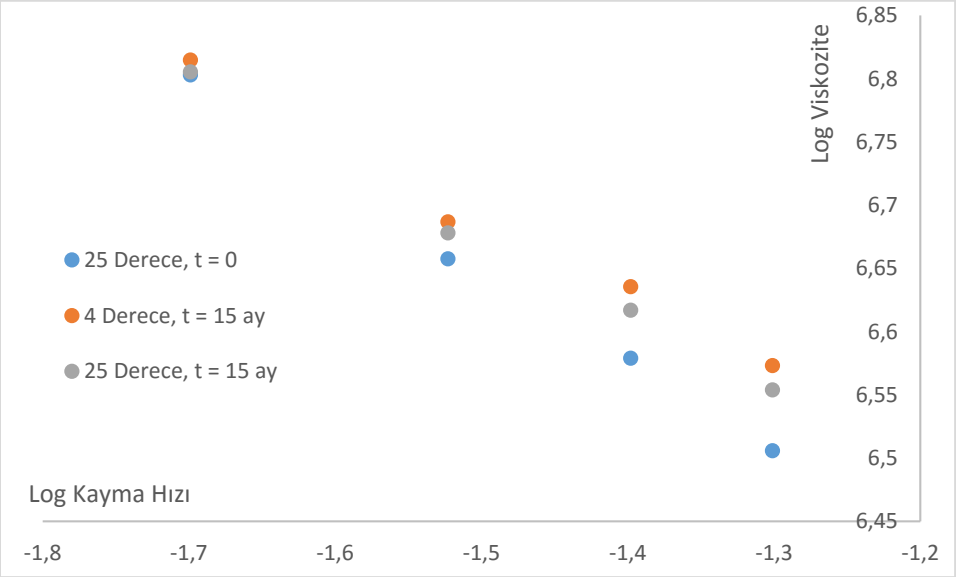
Şekil 4.50. Zamana ve sıcaklığa bağlı, formülasyonlarda görülen partikül büyüklüğü değişimi (n=3, ort. ± s.s)

Çizelge 4.43. 15 ay sonunda saklanma koşullarına bağlı formülasyonlarda görülen akış özellikleri değişimi (25°C, n=3, ort. ± s.s)

4°C' de saklanan formülasyon		**25°C' de saklanan formülasyon**	
Kayma gerilimi (N/m^2)	Kayma hızı (1/s)	Kayma gerilimi (N/m^2)	Kayma hızı (1/s)
130,480 ± 0,226	0,02	127,691 ± 0,556	0,02
145,789 ± 1,867	0,03	142,876 ± 0,744	0,03
172,759 ± 0,468	0,04	165,514 ± 0,435	0,04
187,044 ± 0,643	0,05	178,967 ± 0,427	0,05



Şekil 4.51. 15. ay sonunda saklanma koşullarına bağlı sonuç formülasyonda görülen kayma hızına karşılık viskozite değişimi (25°C, n=3, ort. ± s.s)



Şekil 4.52. 15. Ay sonunda saklanma koşullarına bağlı sonuç formülasyonda görülen log kayma hızına karşılık log viskozite değişimi (25°C, n=3, ort. ± ss)

Çizelge 4.44. 15 ay sonunda farklı sıcaklıklarda saklanan formülasyonların 25°C' deki K ve n değerleri

	K	**n**	**r^2**
Başlangıç t = 0	348307,029	0,261	0,997
4°C, t = 15	629285,698	0,407	0,989
25°C, t = 15	552624,622	0,378	0,994
40°C, t = 15	Ölçülemedi	Ölçülemedi	Ölçülemedi

5. TARTIŞMA

Bu bölümde, formülasyon hazırlanırken yapılan deneysel çalışmalar değerlendirilmiş; sonuç formülasyonun eldesi için gerçekleştirilen önformülasyon ve formülasyon çalışmaları tartışılmıştır.

5.1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Rasajilin mesilatın erime derecesi tayini

Erime derecesi, maddeye özgü bir özellik olup saflık göstergesidir. Saf olan maddeler erime derecesinde tek bir endotermik pik verir. Merck indeksinde rasajilin mesilatın erime derecesi 155°C - 158°C arasında olarak belirtilmiştir (Merck Index). Rasajilin mesilatın DSC termogramlarının incelendiği çalışmalarda ise bu etkin maddenin erime derecesi 156°C - 158°C arasında belirlenmiştir (Bali ve diğerleri, 2020; Kanwar ve diğerleri, 2019; Kunasekaran ve Kannan, 2015). Çalışmamızdan elde edilen veriler, literatür verileri ile benzerdir.

Rasajilin mesilatın FTIR analizi

FTIR analizi maddeye gönderilen ışının, madde tarafından absorblanması ve bunun sonucunda maddenin moleküler yapısı ve bileşenlerinin aydınlatılması esasına dayanır. Belirlenen absorbsiyon bantları, maddenin tanınmasında kullanılır. FTIR spektrumunda x ekseni dalga sayısını gösterirken, y ekseni % geçirgenlik değerini göstermektedir. Spektrumda 1500-3000 cm^{-1} dalga sayısı arası fonksiyonel bölgeyi, 1500 cm^{-1}' den küçük bölge ise parmak izi denilen incelenen maddeye özgü bölgesini göstermektedir (Silverstein ve Bassler, 1962).

Rasajilin mesilatın FTIR incelemesi gerçekleştirilen bir çalışmada 2934 cm^{-1}' de aromatik C-H, 3219 cm^{-1}' de O-H, 1157 cm^{-1}' de ise C-O bağları gözlenmiştir (Kunasekaran ve Kannan, 2015). Çalışmamızdan elde edilen veriler ile literatür verileri benzerdir. Bu durum bize etkin maddemizin saf rasajilin mesilat olduğunu göstermekte ve molekülün yapısı hakkında bilgi vermektedir.

Rasajilin mesilatın UV spektrofotometresinde dalga boyu taraması

Rasajilin mesilatın analizinde değişik teknikler mevcuttur. Bunlardan sıklıkla kullanılanları HPLC, UV ve LC-MS/MS gibi yöntemlerdir (Janapareddi ve Kandhula, 2019; Kunasekaran ve Kannan, 2015; Ma ve diğerleri, 2008; Pingili ve diğerleri, 2016; Song ve diğerleri, 2008a). Bahsedilen literatürdeki tayinler HPLC kullanılarak pH 6,8' de ve 265 nm' de gerçekleştirilmiştir. Rasajilin mesilat çözeltisinin pH 7' de uv analizinin yapıldığı bir başka çalışmada ise maksimum absorbans verdiği dalga boyu 271 nm olarak belirtilmiştir (Bukka ve Karwa, 2010).

Uygulama bölgesindeki biyolojik sıvının pH' sı, maddenin analizinin yapılması açısından önemlidir. Formülasyonumuzun burundan uygulanacağı ve bu bölgeden geçiş tayininin yapılacağı belirtilmiştir. Nazal uygulama ile yapılan salım çalışmalarında burun pH' sı dikkate alınmalıdır. Literatürlerde farklı şekillerde hazırlanan yapay nazal sıvılarına rastlanılmaktadır. Ketorolak trometamin yüklü in-situ jel sistemlerinin hazırlandığı bir çalışmada yapay burun sıvısı pH 7,4 olacak şekilde hazırlanmıştır (Li ve diğerleri, 2014). Budesonidin nano misellere yüklendiği bir çalışmada ise yapay nazal sıvı pH 6,5' de hazırlanmıştır (Maiti ve diğerleri, 2014). Amantadinin poloksamer 407, kitosan ve CMC den oluşan jel sistemine yüklenerek burun spreyinin hazırlandığı bir çalışmada yapay nazal sıvısı pH 6,8' de hazırlanmıştır (Lungare ve diğerleri, 2016). Ropirinolün PLGA, trimetilkitosan ve dipalmitoilfosfatidilkolinle hazırlanan jel sistemine yüklenip nazal uygulanmasının gerçekleştirildiği bir çalışmada yapay burun sıvısı pH 6,5' de hazırlanmıştır. Çalışmamızda kullanılan yapay nazal sıvı pH 6,5 olacak şekilde hazırlanmış ve rasajilin mesilatın bu çözeltide maksimum absorbans verdiği dalga boyu 265 nm olarak belirlenmiştir.

Analitik yöntem validasyonu

Rasajilin mesilatın miktar tayini yönteminin güvenilirlik ve doğruluğunu göstermek amacıyla validasyon çalışmaları yapılmıştır. Analitik yöntem validasyonu, analiz yöntemlerinin amacına uygun olduğunun gösterilmesi için yapılan işlemlerdir.

Doğrusallık, deney bulgularının (test sonuçları) örnekteki madde konsantrasyonu (referans) ile belirli oranda uyumlu olma durumudur. Bu uyum, in-vitro, ex-vivo ve in-vivo çalışmalarından elde edilecek madde miktarlarının belirlenmesi açısından önemlidir. Belirli

konsantrasyonlarda hazırlanan etkin madde çözeltilerinden okunan absorbanslar grafiğe geçirilir ve korelasyon katsayısı hesaplanır. Her bir ölçüm noktasında en az 3 ölçüm yapılmalıdır. Elde edilen eğrideki noktaların alt ve üst değerleri sapma olarak belirtilir. Korelasyon katsayısı (r^2) değeri doğrusallığın göstergesidir. Bu değer 1' e yaklaştıkça uyum artmaktadır (Peters ve Maurer, 2002). Bu çalışmadan elde edilen veriler, derişimlerin istenilen doğrulukta okunabileceğini göstermektedir.

Analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere olan yakınlığına doğruluk denir. %100 geri kazanıma karşılık gelen bir konsantrasyon, numuneyi içeren bir çözelti ile karşılaştırıldığında bu yanıtın yüzdesine ise geri elde denir. Geri elde çalışmaları ile yöntemin doğruluğu gösterilir. Genellikle etkin maddenin 3 farklı konsantrasyonu hazırlanır ve bu konsantrasyonda 3' er ölçüm gerçekleştirilir. Geri elde %98-102 arasında değişirken; yüzde bağıl standart sapma %2' den küçük olmalıdır (Huber, 2007). Çalışmamızdan elde edilen veriler, kullanılan yöntemdeki derişimlerin istenen doğrulukta okunabileceğini göstermektedir.

Kesinlik, analitik yöntemde art arda yapılan ölçümler arasındaki yakınlık derecesidir. Normal koşullarda analitik yöntemin tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirliğini göstermektedir. Tekrarlanabilirlik çalışmalarında aynı konsantrasyonda hazırlanan en az 10 farklı etkin madde çözeltileri incelenir. Tekrar elde edilebilirlik çalışmalarında ise 3 gün süresince 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan etkin madde çözeltileri incelenir. Sonuçlara göre yüzde bağıl standart sapmalar %2' den küçük olmalıdır. Biyolojik sıvılarda çalışırken bu oran %15-20' lere çıkabilmektedir (Shah ve diğerleri, 1992). Çalışmamızdan elde edilen veriler, numuneyi içeren örneklerin istenen kesinlikte okunabileceğini göstermektedir.

Çok düşük konsantrasyonlarda çalışılması gereken durumlarda numunenin vereceği sinyal ile boş numuneden gelen sinyal ayrımının yapılabilmesi önemlidir. Duyarlılık sınırı (LOD) etkin maddenin deney koşullarında belirlendiği fakat kantitatif sınırlar içine girmeyen en düşük miktarıdır. Saptama sınırı (LOQ) ise etkin maddenin kesin ve doğru olarak miktarının belirlenebildiği en düşük miktardır. Sinyal/Gürültü oranı LOD için 3,3 iken, LOQ için 10 dur. Grafikten elde edilen standart sapma değeri eğime bölünür ve belirlenen sinyal/gürültü oranları ile çarpılarak hesaplanırlar (ICH Expert Working Group, 2005).

Stabilite çalışmaları, kullanılan etkin maddenin deney ve analiz süresince stabil olarak kaldığının belirlenmesi açısından gerçekleştirilir. Rasajilin mesilat çözeltisinin farklı sıcaklıklarda stabilitesi incelenmiş, herhangi bir problemle karşılaşılmamıştır.

Geçimlilik çalışmalarından birisi de DSC analizidir. Bu analizde formülasyona giren etkin madde ve yardımcı maddelerin, tek tek ve karışımları değerlendirilir. Olası bir etkileşim sonucunda etkilenen maddenin erime derecesi değişiklik gösterir. Bu durum, maddenin fizikokimyasal özelliklerinin değiştiğinin göstergesidir (Gore ve diğerleri, 2011; Kanwar ve diğerleri, 2019). Rasajilin mesilatın yanında formülasyona eklenen yardımcı maddelerin tek tek ve rasajilin mesilat ile olan fiziksel karışımlarında DSC analizi gerçekleştirilmiş ve etkin maddeye ait erime derecesinin değişmediği, maddelerin fizikokimyasal özelliklerinin korunduğu gözlenmiştir. Liyofilize edilen rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartiküllere gerçekleştirilen DSC çalışmasında ise etkin maddeye ait pik gözlenmiştir. Bu durum, etkin maddenin tamamının çözünmediğinin, heterojen matris yapıda bir sistem hazırlandığının ve katı lipit nanopartiküller oluşturulurken soğutma aşamasında, etkin maddenin re-kristalize olduğunun göstergesidir (Aji-Alex ve diğerleri, 2011; Fang ve diğerleri, 2008; Zimmermann ve diğerleri, 2005).

5.2. Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonu Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Katı lipit nanopartiküller nano boyuttaki katı lipit taneciklerdir. Kolloidal taneciklere göre ilaç hedefleme olanağı, yüksek oranda ilaç yüklenmesi, hidrofilik ve lipofilik etkin maddelerin birlikte yüklenebilmesi, biyo uyumlu olması gibi avantajları bulunmaktadır (Müller, 2000). Yüksek basınçlı homojenizasyon, emülsifikasyon-çözücü uçurma, çözücü enjeksiyon, ultrasonikasyon, membran kontraktör ve mikroemülsiyon yöntemleri ile hazırlanabilirler (Mehnert ve Mader, 2001). Bu çalışma hazırlanırken Gasco' nun patenti temel alınmış, bu patentte belirtilen mikroemülsiyon yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır (Gasco, 1993). Gasco' nun patentinde yer alan 13 farklı formülasyonda katı yağ olarak stearik asit, miristik asit, dekanoik asit, palmitik asit, laurik asit; yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde olarak da tween 20, span 40, span 60, span 80 ve sodyum taurodeoksikolat kullanmıştır. Bu maddeler ve mikroemülsiyon yöntemi kullanılarak hazırlanan katı lipit nanopartiküllerin partikül boyutları 142 – 420 nm, polidispersite indeksleri ise 0,239 – 0,667 arasında bulmuştur.

Formülasyon geliştirme aşamasında tüm etkileşimlerin incelenip zaman ve deney sayısı açısından tasarrufa gidilmesi hem zaman hem de maliyet açısından önemlidir. Bu sebeple deney tasarımı önemli rol oynamaktadır (Grangeia ve diğerleri, 2020). Gasco' nun patentinde belirttiği katı lipit nanopartikül oluşumunda kullanılan bileşenlerin oranları temel alınarak yapılan çalışmalarda deney tasarımı kullanılmış olup, tam faktöriyel tasarımdan faydalanılmıştır. Belirlenen madde oranlarında katı lipit nanopartikül oluşturabilen formülasyonlar seçilmiştir.

Standardizasyon işlemi, formülasyonun her seferki üretiminde aynı standartlarda olması için gereklidir. Belirlenen formülasyonların standardizasyonu için farklı yöntemler kullanılmıştır. Sıcak halde elde edilen mikroemülsiyon sistemi, belirli bir karıştırma hızı ve süresinde ultra-turraxtan geçirildiğinde küresel ve nano boyutta katı lipit nanopartiküllerin elde edildiği belirtilmiştir (Ahlin ve diğerleri, 1998; Cengiz ve diğerleri, 2006). Bu yöntemle hazırlanan formülasyonlar incelendiğinde, yüksek hızda karışan damlacıkların, sisteme verilen aşırı enerjiden ötürü birbirine yapıştığı ve birlikte katılaşarak sistemin partikül büyüklüğünü arttırdığı düşünülmektedir. Farklı literatürlerde de bu sorunla karşılaşılmıştır (Dingler ve diğerleri, 1999; Severino ve diğerleri, 2012; Yadav ve diğerleri, 2013).

Oda sıcaklığında soğutulmaya bırakılan mikroemülsiyon sistemleri belirli rpm ve sürelerde karıştırıldığında damlacıkların birbirine yapışmasını engellendiği ve damlacıkların katılaşarak nano boyutta partikülleri oluşturduğu belirtilmiştir (Agbo ve diğerleri, 2016; Triplett ve Rathman, 2008). Tam faktöriyel tasarım kullanılarak yapılan çalışmada hazırlanan formülasyonlar oda sıcaklığında belirtilen karıştırma hızı ve süresince soğumaya bırakılmıştır. Oluşan katı lipit nanopartikül emülsiyonlarının partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli açısından değerlendirilmiştir. 500 rpm karıştırma hızı, 45 dakika karıştırma süresinin en uygun katı lipit nanopartiküllerin elde edilmesinde uygun olduğu belirlenmiştir.

Kullanılan yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde miktarları incelendiğinde, artan miktarlara bağlı toksisitenin de arttığı bilinmektedir (Heydenreich, 2003; Pizzol ve diğerleri, 2014; Schöler ve diğerleri, 2001). Bu çalışmada partikül boyutu ve dağılımının en küçük, yüzey etkin madde - yardımcı yüzey etkin madde oranının en düşük olduğu formülasyon seçilmiştir. Seçilen formülasyonda katı yağ olarak Gelucire 50/13 (%10), yüzey etkin madde olarak Cremophor RH40 (%12), yardımcı yüzey etkin madde olarak Labrasol

(%3) kullanılmıştır. Oluşturulan katı lipit nanopartiküllerin partikül boyutu ve polidispersite indeksi, patentte belirtilen limitler içerisindedir.

Hidrofilik etkin maddelerin hidrofobik bir sisteme yüklenmesi zor bir durumdur. Katı lipit nanopartiküllerin üstünlüklerinden biri de buna olanak sağlamasıdır (Almeida ve Souto, 2007; Eloy ve diğerleri, 2014; Li ve diğerleri, 2017). Katı yağ olarak stearik asidin kullanıldığı, mikroemülsiyon yöntemiyle rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartiküllerin hazırlandığı bir çalışmada formülasyonun partikül boyutu 160,12 – 210,45 nm arasında bulunmuştur (Kunasekaran ve Krishnamoorthy, 2016). Yağ olarak stearik asit, yöntem olarak mikroemülsiyon yönteminin kullanıldığı bir başka çalışmada ise, rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartiküllerin boyutları 169 nm olarak belirtilmiştir (Kunasekaran ve Krishnamoorthy, 2015). Çalışmamızdan elde edilen bulgular, literatür verileri ile benzerdir.

Enkapsülasyon, ilaç moleküllerinin taşıyıcı sisteme yüklenmesi durumudur. Bu durum, etkin maddenin etki bölgesine istenen miktarda, fiziksel ve kimyasal stabilitesini koruyarak taşınmasını sağlamaktadır (Song ve diğerleri, 2008b). Çözücü uçurma yöntemiyle siprofloksasin hidroklorür yüklü katı lipit nanopartiküllerin hazırlandığı bir çalışmada enkapsülasyon etkinliği %34 oranında bulunmuştur (Shah ve diğerleri, 2012). Çifte emülsiyon-çözücü uçurma yöntemiyle zidovudin yüklü katı lipit nanopartiküllerin hazırlandığı bir çalışmada ise enkapsülasyon etkinliği %27 olarak bulunmuştur (Singh ve diğerleri, 2010). Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemiyle rasajilin mesilatın yüklü katı lipit nanopartiküllerin hazırlandığı bir çalışmada ise, geliştirilen 2 farklı formülasyonun enkapsülasyon etkinlikleri sırasıyla %73,75 ve %76,24 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada artan yağ miktarına bağlı etkin madde yükleme oranının da arttığından bahsedilmiştir. (Kunasekaran ve Krishnamoorthy, 2016). Bu çalışmada belirlenen enkapsülasyon etkinliği, literatürde bahsedilen sınırlar arasındadır. Ancak belirlenen enkapsülasyon etkinliğinin, rasajilin mesilatın katı lipide yüklendiği diğer çalışmalardan daha az olmasının sebebi; kullanılan katı yağ, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin maddelerin farklı olmasından ötürü olduğu düşünülmektedir. Çifte emülsiyon-çözücü uçurma ve ultrasonikasyon yöntemleri ile hazırlanan zidovudin yüklü katı lipit nanopartiküllere gerçekleştirilen iki farklı çalışmada, farklı katı yağ ve farklı yardımcı maddelerin kullanılmasına bağlı enkapsülasyon etkinlikleri birbirinden 2 kat farklı bulunmuştur (Cavalcanti ve diğerleri, 2018; Purvin ve diğerleri, 2014). Bu bilgiler, bulgumuzu desteklemektedir.

Liyofilizasyon işlemi, katı lipit nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal stabilitelerini korumak ve arttırmak için önemlidir. Ancak bu işlemin, lipit partiküllerin boyutunu ve dağılımını değiştirebileceği bilinmektedir (Abdelwahed, 2015; Santos ve Ferreira, 2007; Seyfoddin ve diğerleri, 2010). Liyofilizasyon işlemi sonucunda partiküllerin birbirine yapışmasını engellemek için formülasyona liyoprotektan maddelerin eklenmesi gerekir. Liyoprotektan maddeler tek başlarına ya da bir başka liyoprotektan ile birlikte kullanılabilirler (Schwarz ve Mehnert, 1997). Sorbitol, mannitol, trehaloz, glikoz, polivinilprolidon gibi maddeler liyoprotektan olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bu maddeler, lipit taneciklerin birbirine yapışmasını engeller, suyun osmotik aktivitesini azaltır, sistemin stabilitesini arttırır ve sistemlerin liyofilizasyon işleminden sonra suda tekrar dağıtılabilmesini kolaylaştırır. Liyoprotektanlar bu özelliklerini en verimli olarak %5-15 oranında kullanıldığında göstermektedir (Cavalli ve diğerleri, 1997; Madden ve diğerleri, 1985; Schwarz ve Mehnert, 1997; Shulkin ve diğerleri, 1984). Bu çalışmada liyoprotektan olarak %2,7 - %16,2 oran aralığında trehaloz ve mannitol denenmiştir. Oran arttırılmaya çalışılmış ancak formülasyonlarda çözünürlük problemleri ortaya çıkmıştır. Çözünürlük sorunu ile karşılaşılmadan kullanılabilen en yüksek liyoprotektan oranı %5,4 olarak belirlenmiştir. Liyofilize edilen formülasyonun suda dağılma süresinin kısa olması beklenir. Çalışmamızda bu dağılma süresinin normalden daha uzun bulunmuştur. Bunun sebebinin kullanılan liyoprotektan miktarının az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Farklı liyoprotektanlarla hazırlanan formülasyonlar partikül boyutu ve polidispersite indeksi açısından kıyaslanmıştır. Lipit partiküllerin yapışmasını engelleyerek, formülasyonu daha düşük partikül büyüklüğü ve daha düşük dağılımda tutan mannitolün, trehaloza göre daha etkili bir liyoprotektan olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$).

5.3. Isıya Duyarlı Jel Formülasyonunun Hazırlanması

Bu çalışmada ısıya duyarlı jel sistemi hazırlanırken, oda sıcaklığında (25°C) damlatma/püskürtme şeklinde uygulanabilecek uygun viskoziteye sahip, burunla temasında burun mukoza sıcaklığına (32°C) gelip jelleşerek mukozaya yapışabilecek bir sistem olması hedeflenmiştir.

Polimer çözeltilerinin bazıları ısıya duyarlı jelleşme göstermektedir. Bu polimerler arasında jelatin, kollajen, agar, pektin, selüloz, karragen, amilopektin, poloksamer ve türevleri bulunmaktadır. Bu polimerlerden en çok poloksamerler ve türevleri kullanılmaktadır.

Yapılarındaki blok kopolimerler sayesinde ısı değişimine bağlı jelleşme göstermektedirler (Shelke ve diğerleri, 2016).

Poloksamer 407' nin kullanıldığı bir çalışmada, %18 oranında polimer içeren çözeltinin yaklaşık 32°C' de jelleştiği gözlenmiştir (Pereira ve diğerleri, 2013). İn situ nazal jel hazırlanan bir çalışmada da poloksamer 407 oranı %18 olarak belirlenmiş ve mukoadezif özellik göstermesi için karbopol 974p eklenerek jelleşme sıcaklıkları belirlenmiştir (Altuntas ve Yener, 2017). Diğer çalışmalarda da ısıya duyarlı jelleşen bir sistem hazırlanırken %18 oranında poloksamer 407 kullanılmış ve yaklaşık 32°C' de jelleştiği belirtilmiştir (Fakhari ve diğerleri, 2017; Giuliano ve diğerleri, 2018). Bu çalışmada poloksamer 188 ve poloksamer 407' nin farklı oranlarda çözeltileri hazırlanmış, artan ısıya bağlı jelleşme sıcaklıkları incelenmiştir. Poloksamer 407, %17 oranında burun mukoza sıcaklığında jelleşme gösterirken, poloksamer 188' in incelenen oranlarında jelleşme göstermediği saptanmıştır. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, literatür verileri ile benzerdir.

Hazırlanan jel sistemine başka bir polimer eklenmesi, jelleşme sıcaklığını değiştirebilir. Poloksamer 188, poloksamer 407, HPMC E5 ve HPMC E50 ile yapılan bir çalışmada latonoprost yüklü in situ jel hazırlanmıştır. Poloksamer 407 oranı sabit tutularak sisteme farklı oranlarda HPMC E5 eklenmiş, jelleşme sıcaklığı ve adezif güç değişimi gözlenmiştir (Khattab ve diğerleri, 2019). Çalışmamızda da sabit oranda tutulan poloksamer 407' ye eklenen farklı oranlardaki HPMC E5, sistemin jelleşme sıcaklığını değiştirmiştir.

Formülasyonların akış özelliği ve viskozitesi, sistemin uygulanabilirliği, stabilitesi ve biyoyararlanımı açısından önemlidir (Tamburic ve Craig, 1995). Hazırlanan sistemlerin oda sıcaklığı ve burun mukoza sıcaklığındaki akış özellikleri ve viskoziteleri incelenmiştir. Hazırlanan sistemlerin (P407 (%17) + HPMC E5 (%0,25) ve P407 (%17) + HPMC E5 (%0,5)) 25°C ve 32°C sıcaklıklardaki kayma gerilimlerine karşılık kayma hızları belirlenmiş, viskozite-kayma hızı reogramları çizilmiştir. Çizilen bu grafiklere göre formülasyonların, her iki sıcaklıkta da artan kayma hızlarına bağlı viskozitelerinin azaldığı gözlenmiştir.

Psödoplastik akış gösteren sistemlerde sabit viskoziteden bahsedilemez. Bu yüzden formülasyonların viskozite değerlerini hesaplayabilmek için Ostwald de Waele eşitliği kullanılır (Girardo ve diğerleri, 2007; Singh ve diğerleri, 2015). Eşitlikle elde edilen n

değerlerine bakıldığında bu değerinin her iki formülasyon için de 1 den küçük olduğu görülmektedir. Bu durum, formülasyonların karıştırıldıkça viskozitelerinin azaldığının göstergesidir. Her iki formülasyon da hem 25°C hem 32°C' de kayma incelmesi özelliği göstermiştir. Formülasyonların viskozite değerleri incelenmiş 32°C' deki viskozitenin, 25°C' den daha büyük olduğu belirlenmiştir. Bu durum formülasyonların jelleşme gösterdiğini ve buna bağlı viskozitelerinin artışını açıklamaktadır. Ayrıca formülasyonlar arasında kıyaslama yapılması gerekirse, viskoziteleri açısından 25°C' de anlamlı fark bulunmazken ($p > 0,05$), 32°C' de anlamlı fark vardır ($p < 0,05$). Hazırlanacak formülasyonun oda sıcaklığında uygun viskozitede olması ve sprey ya da damlalık ile buruna püskürtülebilmesi istenmektedir. Bu yüzden oda ve burun sıcaklığında uygun viskozitelerde olması gerekmektedir. Bulgular incelendiğinde P407 (%17) + HPMC E5 (%0,25) içeren formülasyonun oda sıcaklığında daha akışkan bir yapıda olduğu gözlenmiş, çalışmalara bu formülasyon ile devam edilmiştir.

Mukoadezyon, uygulama bölgesindeki kalıcılık açısından önemlidir. Karbomerler, kitosanlar, aljinatlar ve selüloz türevleri en çok kullanılan mukoadezif polimerlerdir. Burun mukozasına uygulanan jelin, mukozaya tutunabilmesi ve orada kalabilmesi için mukoadezyon işinin yüksek olması istenir (Ahuja ve diğerleri, 2008; Smart, 2005). Katı yağ olarak monostearin ve ATO 888 kullanılan, 2-metoksiestradiol yüklü katı lipit nanopartiküllerin hazırlandığı bir çalışmada PLGA-PEG içeren ısıya duyarlı mukoadezif jel sistemi hazırlanmış, mukoadezyon gücü koyun burun mukozasında ölçülmüştür. Artan polimer oranına bağlı olarak sistemin mukoadezyon gücünün arttığı belirtilmiştir (Guo ve diğerleri, 2011). Sumatriptan yüklü ısıya duyarlı mukoadezif jel sisteminin hazırlandığı bir çalışmada sabit poloksamer 407 oranına karşılık artan karbopol 934P miktarına bağlı sistemin mukoadezif gücünde artış gözlenmiştir (Majithiya ve diğerleri, 2006). Kitosan ve aljinatın kullanıldığı bir başka çalışmada ise sabit aljinat oranına karşılık artan kitosan miktarı, sistemin mukoadezyon gücünü arttırmıştır (Gavini ve diğerleri, 2005). Mukoadezif polimer olarak HPMC E5' nin kullanıldığı ziprasidon yüklü oral mukoadezif mikrokürelerde (Deshmukh ve diğerleri, 2012), bağırsağa uygulanmak üzere, probiyotik bir bakteri olan Bacillus coagulans' ın yüklendiği mikrokürelerde (Alli, 2011), betametazon sodyum fosfat yüklü oral yamalarda (Priya ve diğerleri, 2011) da benzer sonuçlara rastlanmıştır. 25°C ve 32°C' de gerçekleştirilen mukoadezif gücün belirlenmesi çalışmasında formülasyonlar arasında mukoadezif güç açısından fark gözlenmiş, HPMC E5 miktarı arttıkça mukoadezyon gücünün arttığı belirlenmiştir ($p < 0,05$).

5.4. Sonuç Formülasyon Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Nazal uygulama, ilaç moleküllerinin beyne hedeflenmesi açısından önemlidir. Ancak mukosilier akıştan ötürü formülasyonların burunda kalış süreleri kısadır. Bu süreyi uzatmak için mukoadezif jeller hazırlanmaktadır (Khan ve diğerleri, 2017; Majithiya ve diğerleri, 2006). Bu sayede formülasyonların burunda kalış süreleri artmakta ve ilaç moleküllerinin beyne geçişi kolaylaşmaktadır (Abouhussein ve diğerleri, 2018; Jain ve diğerleri, 2016; Nazar ve diğerleri, 2011).

Katı lipit nanopartiküller, lipit yapıları ve nano boyutları sayesinde ilaç moleküllerinin beyne hedeflendirilmesinde sıklıkla kullanılan taşıyıcı sistemlerdir (Fatouh ve diğerleri, 2017; Singh ve diğerleri, 2012; Youssef ve diğerleri, 2018).

Literatürde bu iki sistemin birleştirildiği ve tek bir formülasyon olarak hazırlandığı çalışmalar az da olsa bulunmaktadır. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemiyle hazırlanan alendronat sodyum yüklü katı lipit nanopartiküller, poloksamer 188 ve poloksamer 407 ile hazırlanan ısıya duyarlı mukoadezif jel sistemleriyle birleştirilerek subkutan olarak uygulanmıştır (Das ve diğerleri, 2020). Oftalmik uygulanmak üzere mikroemülsiyon-ultrasonikasyon yöntemiyle hazırlanan Resina Draconis ekstresi yüklü katı lipit nanopartiküller, poloksamer 407 ve poloksamer 188 ile hazırlanan ısıya duyarlı jel sistemi ile birleştirilmiştir (Hao ve diğerleri, 2014). Vajinal uygulanmak üzere, Gelucire 50/13, Precirol ATO5, Tween 80 ve kollifor kullanılarak çözücü uçurma-ultrasonikasyon yöntemi ile lulikonazol yüklü katı lipit nanopartiküller hazırlanmıştır. Bu sistem karbopol 940 ile hazırlanan ısıya duyarlı mukoadezif jel sistemiyle birleştirilmiştir (Firdaus ve diğerleri, 2020).

Çalışmamızda RM yüklü KLN süspansiyonunun, liyofilize edilmeden süspansiyon halindeyken jel sistemine dönüştürülmesi denenmiştir. Buradaki amaç, süspansiyondaki suyun uçurulmadan doğrudan polimer çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmasıdır. Isıya duyarlı polimerler hazırlanırken, ortam sıcaklığı önemlidir. Çözeltiyi oluşturan bileşen miktarındaki küçük bir değişiklik, jelleşme derecesini değiştirebilir. Rasajilin mesilat yüklü KLN süspansiyonu ile polimer çözeltisi hazırlanmak istenmiştir. Ancak polimerlerin sistem içinde bulunabilecek su miktarında dağılmadığı, sistemin katılaştığı belirlenmiştir. Bu

yüzden etkin madde yüklü KLN süspansiyonunun önce liyofilize edilmesi, ardından hazırlanan polimer çözeltisine eklenmesine karar verilmiştir.

Bu bilgilere dayanarak çalışmamızda 2 farklı formülasyon hazırlanmıştır. Bunlar rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartikül süspansiyonu ve ısıya duyarlı mukoadezif jel sistemidir. Rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartiküller liyofilize edilerek ısıya duyarlı mukoadezif jel sistemine eklenmiş ve rasajilin mesilat yüklü liyofilize katı lipit nanopartikül içeren jel formülasyonu elde edilmiştir. Bu formülasyon ile kan-beyin bariyerini geçmenin mümkün olduğu düşünülmüştür (Abbott ve diğerleri, 2010; Pardridge, 1983, 2007).

Hazırlanan ısıya duyarlı mukoadezif jel sistemlerine eklenen katı maddelerin sistemin jelleşme sıcaklığını değiştirdiği bilinmektedir. Stearik asit, lipoid E80 ve tween 80 in kullanıldığı bir çalışmada mikroemülsiyon yöntemi ile katı lipit nanopartiküller hazırlanmıştır. Poloksamer 407 ile hazırlanan ısıya duyarlı adezif jel sistemine önceden hazırlan katı lipit nanopartiküller eklenmeden önce ve eklendikten sonra jelleşme sıcaklığı ölçülmüştür. Sisteme katı lipit nanopartiküllerin eklenmesi, jelleşme sıcaklığını düşürmüştür (Dorraj ve Moghimi, 2015). Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemiyle irinotesan yüklü katı lipit nanopartiküller trikaprin, span 20 ve tween 80 kullanılarak hazırlanmıştır. Aynı çalışmada poloksamer 407 ve poloksamer 188 ile ısıya duyarlı adezif jel sistemi hazırlanmıştır. Hazırlanan katı lipit nanopartiküllerin jel sistemlerine ilavesiyle birlikte sistemin jelleşme sıcaklığı düşmüştür (Din ve diğerleri, 2017). Bu durum çalışmamızda da gözlenmiş olup, sebebinin sisteme eklenen liyofilize katı lipit nanopartiküllerin, jel sistemindeki kopolimerlerin hidrofobikliğini güçlendirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Burun mukoza sıcaklığı 30°C – 34°C arasında değişmektedir. Bu değişim nefes alıp vermeye bağlı soğuk havanın girişi ve sıcak havanın çıkışından ötürüdür (Cole, 1953; Lindemann ve diğerleri, 2002; Walker ve diğerleri, 1961). Daha önce de belirtildiği gibi, çalışmamızda burun sıcaklığını ortalama 32°C olarak kabul etmiştik. Hazırlanan ısıya duyarlı mukoadezif jel sistemine yüklenen liyofilize katı lipit nanopartiküller, sistemin jelleşme sıcaklığını değiştirdiğinden, poloksamer 407 oranında düzenlemeye gidilmiştir. Rasajilin mesilat yüklü liyofilize katı lipit nanopartikül içeren jel formülasyonunun jelleşme sıcaklığı 32°C olacak şekilde ayarlanmıştır.

Akış özelliği ve viskozitenin öneminden daha önce bahsedilmişti. Nazal yoldan uygulanacak preparatların oda sıcaklığında akışkan olması, sistemin uygulanması esnasında buruna püskürtülebilmesi açısından önemli olup; burun mukozası ile temasta sıcaklık farkından ötürü jelleşip viskozitesinin artması istenmektedir. Bu sayede formülasyon burun mukozasında uzun süre kalabilmekte, etkin maddenin geçişine yardımcı olabilmektedir (Charlton ve diğerleri, 2007a; Minn ve diğerleri, 2002). Çalışmamızda rasajilin mesilat yüklü liyofilize katı lipit nanopartikül içeren jel formülasyonunun akış özelliği hem oda sıcaklığı hem de burun mukoza sıcaklığında belirlenmiş, reogramları çizilmiştir. Rasajilin mesilat yüklü jel, rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartikül süspansiyonu ve rasajilin mesilat yüklü liyofilize katı lipit nanopartikül içeren jel formülasyonu psödoplastik akış gösterdiğinden, viskozite değerlerini hesaplayabilmek için Ostwald de Waele eşitliği kullanılmıştır. Eşitlikle elde edilen n değerlerine bakıldığında bu değerin formülasyonlar için 1 den küçük bulunmuştur. Bu durum, formülasyonların karıştırıldıkça viskozitelerinin azaldığını göstermektedir. Formülasyonlar her iki sıcaklıkta da kayma incelmesi özelliği göstermiştir.

Mukoadezyondan daha önce bahsedilmişti. Nazal mukozadan ilaç moleküllerinin absorbsiyonu, mukoza ile temasa bağlıdır. Mukosilier klirensten dolayı formülasyonların tutunma süreleri kısalmakta, istenen etkinlik sağlanamamaktadır. Mukoadezif sistemler sayesinde formülasyonların burunda kalış süreleri arttırılabilir, istenen etkinlik sağlanılabilir (Charlton ve diğerleri, 2007b; Minn ve diğerleri, 2002). Rasajilin mesilat yüklü jel, rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartikül süspansiyonu ve rasajilin mesilat yüklü liyofilize katı lipit nanopartikül içeren jel formülasyonunda gerçekleştirilen mukoadezif kuvvetin belirlenmesi çalışmaları sonucunda 25°C ve 32°C' de formülasyonlar arasında anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0,05$). Rasajilin mesilat yüklü liyofilize katı lipit nanopartikül içeren jel formülasyonu beklendiği gibi yüksek mukoadezyon göstermektedir.

SEM ölçümleri, partiküllerin morfolojik özelliklerini görmek açısından önemlidir. Gerekirse formülasyon seyreltilerek jel içindeki katı lipit nanopartiküllere ait SEM ölçümünün yapılması mümkündür (Din ve diğerleri, 2017; Dorraj ve Moghimi, 2015; Guo ve diğerleri, 2011).

Rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartikül süspansiyonunun SEM görüntüleri incelendiğinde, partikül büyüklüğü aralığının geniş olduğu, partikül büyüklüğü dağılımının

kötü olduğu belirlenmiştir. Malvern zetasizer ile elde edilen partikül büyüklüğü ve dağılımı grafiğinde gözlenen iki başlı pik dağılımı, SEM görüntülerinde gözlenen bu durumu doğrulamaktadır.

Rasajilin mesilat yüklü liyofilize katı lipit nanopartikül sisteminin suda dağıtıldıktan sonraki SEM görüntüleri ile partikül büyüklüğü ve dağılımı grafiği kıyaslanmıştır. Literatürde, katı lipit nanopartiküllere yüksek enerji verildiğinde, lipit kabuğun eridiği bildirilmiştir (Guimarães ve Ré, 2011). Çalışmamızda anlaşıldığı gibi daha küçük boyutlu partiküller mevcuttur. Buralara odaklanma yapılmaya çalışılmış ancak partiküller, verilen yüksek enerji nedeniyle erimeye başladığından, erime olmadan büyütme yapılabilen en büyük ölçekte incelenmek durumunda kalınmıştır. Dağılım grafiği incelendiğinde ikinci pik, rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartikül süspansiyonuna göre küçülmüş ancak hala mevcuttur. Partiküllerin görüntüleri ve boyutları bu durumu doğrulamaktadır.

Rasajilin mesilat yüklü liyofilize katı lipit nanopartikül içeren jel sisteminin görüntüleri, partikül büyüklüğü ve dağılım grafiği ile kıyaslanmıştır. Sonuç formülasyonun grafiğine bakıldığında yine iki farklı pik görülmektedir. 100000 kat büyütme ile lipit partiküllerin yüksek büyütme ölçeğinden ötürü erimeye başlamadan görüntüleri yakalanmaya çalışılmıştır. Ölçümlerle elde edilen partikül büyüklükleri, malvern zetasizer ile elde edilen ölçümlerle uyumlu bulunmuştur.

Katı lipit nanopartiküllerden etkin maddenin salımı için çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Bunlar arasında Franz difüzyon yöntemi (Andrade ve diğerleri, 2014; Baig ve diğerleri, 2016; Bhaskar ve diğerleri, 2008, 2009; Souto ve Muller, 2007; Souto ve diğerleri, 2004; Suresh ve diğerleri, 2007; Teeranachaideekul ve diğerleri, 2007; Venkateswarlu ve Manjunath, 2004), diyaliz torba yöntemi (Reddy ve diğerleri, 2006; Vivek ve diğerleri, 2007), sürekli akış sağlanan difüzyon hücreleri (Farboud ve diğerleri, 2011), çok bölmeli döner hücre yöntemi (Ugazio ve diğerleri, 2002) bulunmaktadır. Franz difüzyon hücrelerinin kullanıldığı çalışmalarda cut-off değeri 12000 – 14000 olan diyaliz membranlar kullanılmıştır. Çalışmamızda Franz difüzyon yöntemiyle birlikte cut-off değeri 12000 olan diyaliz membran kullanılmıştır. Bu membranı kullanma amacımız etkin madde geçişinin zar nedeni ile engellenmesini önlemektir. Burun mukozası taklit edildiğinden deney, pH' sı 6,5 olan yapay nazal sıvı kullanılarak 32°C sıcaklıkta yürütülmüştür.

Rasajilin mesilat çözeltisi, rasajilin mesilat yüklü jel, rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartikül süspansiyonu ve rasajilin mesilat yüklü liyofilize katı lipit nanopartikül içeren jel formülasyonlarında Franz difüzyon hücresi yöntemi ile in-vitro salım çalışması yapılmıştır. Zamana karşı yığılmalı mg, yığılmalı mg/cm^2; zamanın kareköküne karşı yığılmalı mg/cm^2 grafikleri çizilmiş ve formülasyonlar tek tek ve bir arada değerlendirilmiştir. Bu tip sistemlerde genel olarak sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi ve bazen de Korsmeyer-Peppas modelleri incelenir Sistem hem jel hem de katı lipit nanopartikül içermektedir. Küresel taneciklerden her yöne doğru etkin madde çıkışının yanında geciktirilmiş salım ve jele bağlı tek yönlü difüzyon birlikte değerlendirilmelidir (Kesharwani ve diğerleri, 2016; Souto ve Muller, 2007). Tüm bunlar dikkate alındığında formülasyonları en iyi ifade eden kinetik modelin matris kinetik modeli olduğu belirlenmiştir.

Her bir formülasyonun % salınan miktarları incelendiğinde rasajilin mesilat çözeltisi > rasajilin mesilat yüklü jel > rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartikül süspansiyonu > rasajilin mesilat yüklü liyofilize katı lipit nanopartikül içeren jel gibi bir sıralama elde edilmiştir. Bu sıralamaya göre viskozitenin, salım hızını etkilediği düşünülmüş ve literatür verileri ile bu bulgu doğrulanmıştır (Abdel-Mottaleb ve diğerleri, 2010; Welin-Berger ve diğerleri, 2001; Yang ve diğerleri, 2011).

Burun mukozasına uygulanan jellerin in-vitro kontrolü dışında etkin maddenin mukozadan geçişinin incelendiği çokça çalışma mevcuttur. Bu amaçla çalışmamızda Franz difüzyon hücresi kullanılmıştır. Mukoza olarak literatürlerde koyun, keçi, inek mukozaları ile yapılan çalışmalar mevcuttur (Abdelbary ve Tadros, 2013; Ahmed ve diğerleri, 2019; Sridhar ve diğerleri, 2018). Fikir birliğine varılan bir zar olmadığından çalışmamızda inek burun mukozası kullanılmıştır. Sıcaklık ve pH, burun taklidi için önemlidir. Bu sebeplerle ex-vivo çalışması Franz difüzyon hücresi yöntemi ile 32°C sıcaklıkta ve pH' sı 6,5 olan yapay nazal sıvı kullanılarak rasajilin mesilat çözeltisi, rasajilin mesilat yüklü jel, rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartikül süspansiyonu ve rasajilin mesilat yüklü liyofilize katı lipit nanopartikül içeren jel formülasyonlarında gerçekleştirilmiştir.

Mukozanın ilgili moleküle geçirgenliğinin hesaplanması önemlidir. Bu, in-vivo deneylerde rasajilin mesilatın mukozadan geçip geçmeyeceği hakkında bilgi verir. Gerçekleştirilen ex-vivo çalışma sonucunda formülasyonların permeabilite ve akı değerleri belirlenmiştir.

Formülasyonların permeabilite ve akı değerleri istatistiksel olarak kıyaslanmış, aralarında anlamlı fark olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). İkili kıyaslama yapıldığında, rasajilin mesilat yüklü katı lipit nanopartikül süspansiyonu ile rasajilin mesilat yüklü liyofilize katı lipit nanopartikül içeren jel sistemi arasında permeabilite ve akı açısından fark olmadığı belirlenmiştir ($p > 0,05$).

Lipofilikliğin artışına bağlı taşıyıcı sistem ve ilaç moleküllerinin membran permeabilitelerinin arttığı bilinmektedir (Van De Waterbeemd ve diğerleri, 2001). Katı lipit nanopartiküllerin yapısındaki yağ, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin maddelerin, etkin maddenin dokulara geçişini kolaylaştırdığı bilinmektedir (Chavan ve diğerleri, 2013; Chirio ve diğerleri, 2014; Liu ve diğerleri, 2011). Karaciğer ilk geçiş etkisine uğrayan agomelatin etkin maddesinin katı lipit nanopartiküllere yüklendiği bir çalışmada hazırlanan formülasyon, piyasa preparatı ile kıyaslanmış ve piyasa preparatına göre katı lipit nanopartikül formülasyonlarının çok daha yüksek oranlarda beyne geçişinin gözlendiği belirtilmiştir (Fatouh ve diğerleri, 2017). Budesonit etkin maddesinin katı lipit nanopartiküllere yüklendiği bir başka çalışmada, hazırlanan katı lipit nanopartikül süspansiyon formülasyonları sprey olarak kullanılmıştır. Koyun burun mukozası kullanılarak gerçekleştirilen difüzyon çalışmasında hazırlanan katı lipit nanopartikül spreyi ile piyasa preparatı kıyaslanmıştır. Katı lipit nanopartikül içeren nazal spreyin, piyasa preparatına göre 3-4 kat daha fazla geçirgenlik gösterdiği bulunmuştur. Bu durumun katı lipit nanopartiküllerin küçük partikül boyutlu olmasından, mukoadezif özellik göstermesinden ve artan permeabilitesinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Chavan ve diğerleri, 2013). Çalışmamızda sonuç formülasyonumuzun salımı in-vitro deneylerde 8. saatte %33,8 iken ex-vivo deneylerde bu değer %51,8' e çıkmıştır. Hazırladığımız formülasyonun mukozadan geçişi, diyaliz membrandan geçişe göre, 8 saatin sonunda %57 oranında artmıştır. Benzer sonuç, akı değerleri için de geçerlidir. Diyaliz membrandan geçiş çalışmaları ve mukoza permeabilite çalışmalarında tüm verilerin göz önüne alındığı akı değerlerinin kıyaslanması en doğru bilimsel sonucu verecektir. Hazırladığımız formülasyonda etkin maddenin mukozadan geçişi (1,872 $mg/cm^2/sa$), diyaliz membrana göre (1,516 $mg/cm^2/sa$) % 23,5 artmıştır. Bu artış, yukarıda bahsedilen ve örneklerle desteklenen KLN' lerin mukozadan geçişi arttırdığı yönündeki bilgileri doğrulamaktadır. Ayrıca mukozadan geçiş çalışmaları sırasında sistemimizin mukoadezif olması, formülasyonumuzun mukoza ile olan etkileşiminin diyaliz membrana göre çok daha iyi olduğunun göstergesi de olabilir. Bu etkileşim, geçişi olumlu yönde etkilemektedir.

Mukoadezif jellerin, diğer kontrollü salım yapan ilaç taşıyıcı sistemlere göre;

- Etkin maddeyi seçici olarak istenilen bölgede tutabilme,
- Mukoza ile temasından ötürü birim zamanda, birim alandan geçen etkin madde miktarını arttırmak gibi avantajları bulunmaktadır (Boddupalli ve diğerleri 2010).

Rasajilin mesilat yüklü liyofilize KLN içeren jel sisteminin mukoadezif gücü (0,357 mJ/cm^2), rasajilin mesilat içeren jel formülasyonuna (0,025 mJ/cm^2) göre 14 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu durum, mukoza ile sistem arasındaki etkileşimin artışına bağlı olarak, etkin maddenin mukozadan difüzyonunun daha yüksek oranda olmasını kolaylaştırmıştır. Katı lipit nanopartiküllerin etkin maddelerin mukozadan geçişini arttırdığı bilinmektedir. Çalışmamızda etkin madde yüklenmiş jel kullanıldığında bulunan akı değeri (1,168 $mg/cm^2/sa$) ile ex-vivo çalışma sırasında bulunan akı değeri (1,872 $mg/cm^2/sa$) arasındaki %60' lık artış, literatür bilgisini bu yönde doğrulamaktadır. Sonuç olarak, KLN' lerin lipidik yapısı, mukozadan geçişi arttırmaktadır. Mukoadezif bir sistem ile beraber verilen KLN' lerin hem etki bölgesiyle etkileşimi artmakta, hem de lipit yapılarından ötürü etkin maddenin geçişini kolaylaştırmaktadır (Punitha ve Girish, 2010).

Stabilite çalışmalarının formülasyon geliştirilirken yapılması gerekmektedir. Bu çalışmalar farklı şekillerde, farklı sürelerde ve farklı koşullarda gerçekleştirilebilir (Bikkad ve diğerleri, 2014; Carlotti ve diğerleri, 2009; Freitas ve Müller, 1999; Liu ve diğerleri, 2008). Literatürde katı lipit nanopartiküllerin stabilitesi genellikle kısa süreli, tek bir saklama koşulunda, tek bir parametre ile incelenmiştir (Del Pozo-Rodríguez ve diğerleri, 2009; Frias ve diğerleri, 2016; Howard ve diğerleri, 2012; Khalil ve diğerleri, 2013). Çalışmamızda hazırlanan formülasyonun stabilitesini temel olarak tanımlayan partikül büyüklüğü ve dağılımının yanında viskozite parametresi de bulunmaktadır. Formülasyonun stabilitesi takip edilirken bu parametreler 15 ay süreyle ve 3 farklı saklama koşullarında değerlendirilmiştir.

Rasajilin mesilat yüklü liyofilize katı lipit nanopartikül içeren jel formülasyonunda stabilite çalışması yapılırken partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyeli ölçülmüş; 0. ay ve 15. aydaki kayma hızı ve kayma gerilimi değerleri incelenerek akış özellikleri ve viskoziteleri belirlenmiştir. Partikül büyüklükleri açısından bakıldığında başlangıç partikül boyutuna göre formülasyonlardan 4°C ve 40°C' de saklanan formülasyonun stabil olmadığı gözlenmiştir. 25°C' de saklanan formülasyonun aylara göre partikül boyutundaki artış, diğer

formülasyonlara göre daha az olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada 25°C' de saklanan katı lipit nanopartiküllerin, 4°C ve 40°C' de saklanan katı lipit nanopartiküllere göre, partikül büyümesi açısından daha stabil olduğu gösterilmiştir (Öztürk ve diğerleri, 2020). Bu bilgi, çalışmamızı doğrulamaktadır.

Zeta potansiyel, dağılım sistemlerinin fiziksel stabilitesini etkileyen önemli bir parametredir. Yapılan çalışmalar, zeta potansiyelin formülasyonun seyreltilmesi ile birlikte değiştiğini göstermiştir (Medrzycka, 1991; Pugh, 2017). Ayrıca non-iyonik maddeler olan Labrasol ve Cremophor RH40 ile hazırlanan KLN' lerdle gerçekleştirilen bir çalışmada, KLN' lerin zeta potansiyelleri 0 ile -3 mV arasında bulunmuştur (Aljaeid ve Hosny, 2016). Çalışmamızda formülasyonların zeta potansiyelleri hem formülasyon üretildikten sonraki aşamalarda, hem de belirlenen saklama koşullarında her bir ölçüm aralığında incelenmiş, zeta potansiyelin 0' a yakın olduğu saptanmıştır. Bu durumun, hem bidistile su ile seyreltmenin etkisinden hem de non-iyonik maddelerin kullanımdan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Farklı saklama koşullarında tutulan formülasyonların viskozite değerlerini hesaplayabilmek için Ostwald de Waele eşitliği kullanılmıştır. Eşitlikle elde edilen n değerleri incelenmiş olup, 4°C ve 25°C' de bekleyen formülasyonlar için bu değerin 1 den küçük olduğu görülmektedir. Formülasyonlar kayma incelmesi özelliği göstermektedir. Sistemler karıştırıldığında viskoziteleri azalmaktadır.

Stabilite çalışmaları için kullanılan ambalaj tıpa - kapak sistemli bir şişedir. Stabilite çalışmaları sonucunda formülasyonlarda başlangıca göre viskozite değerlerinin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca 40°C' de bekletilen formülasyon tamamen katı hale gelmiş ve formülasyonun viskozitesi ölçülememiştir. Jel sistemlerde artan viskozitenin tek nedeni suyun buharlaşmasıdır. Gözlenen bu durumun saklama ambalajının yetersiz olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Hava kaçırmayan püskürtülebilen özel bir sistemle stabilite çalışmalarının yapılmasının faydalı olduğu düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Tez çalışması sonucunda, Parkinson hastalığı tedavisinde kullanılmak üzere rasajilin mesilat yüklü liyofilize katı lipit nanopartikül içeren jel sistemi geliştirilmiştir. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

- ✓ Katı lipit nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan yöntemin, sistemin uygun partikül boyutuna sahip bir süspansiyon oluşturması için önemli olduğu gözlenmiş, sisteme verilen fazla enerjinin partiküllerin yapışmasında rol oynadığı gözlenmiştir.
- ✓ Mikroemülsiyon yönteminde göre oluşturulan lipit damlacıkların soğutularak katı lipit nanopartiküllere dönüştürülmesinde, karıştırma hızı ve süresinin önemli olduğu belirlenmiştir.
- ✓ Liyofilizasyon işleminde kullanılan liyoprotektanların, partikül büyüklüğü ve dağılımı üzerine etkili olduğu gözlenmiştir.
- ✓ Sıcaklığa bağlı jelleşen formülasyonlarda, formülasyondaki polimer yüzdelerinin viskozite, mukoadezyon gücü ve jelleşme sıcaklığındaki etkisi belirlenmiştir.
- ✓ Sonuç formülasyona ait SEM görüntülerinde nanometre boyutunda küresel partiküller elde edildiği gözlenmiştir.
- ✓ İlaç şekline göre rasajilin mesilat permeabilitesinin değiştiği ve ilaç şekline göre rasajilin mesilat moleküllerinin salımının değiştiği sonucuna varılmıştır.
- ✓ Bu özellikteki bir ilaç şeklinin rahat uygulanabilmesi için, suyun buharlaşmasını engelleyecek bir kap/kap sisteminin kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.
- ✓ Hazırlanan sistemden rasajilin mesilatın mukozadan geçebildiği ve bu yolla beyne ulaşabileceği sonucuna varılmıştır. Bunun hayvan deneyleri ile kanıtlanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., and Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 13-25.

Abdelbary, G. A. and Tadros, M. I. (2013). Brain targeting of olanzapine via intranasal delivery of core–shell difunctional block copolymer mixed nanomicellar carriers: in vitro characterization, ex vivo estimation of nasal toxicity and in vivo biodistribution studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 452(1-2), 300-310.

Abdel-Mottaleb, M. M., Neumann, D., and Lamprecht, A. (2010). In vitro drug release mechanism from lipid nanocapsules (LNC). *International Journal of Pharmaceutics*, 390(2), 208-213.

Abdelwahed, W. (2015). Lyophilization of solid lipid nanoparticles for brain targeting. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(10), 381-385.

Abouhussein, D. M. N., Khattab, A., Bayoumi, N. A., Mahmoud, A. F., and Sakr, T. M. (2018). Brain targeted rivastigmine mucoadhesive thermosensitive In situ gel: Optimization, in vitro evaluation, radiolabeling, in vivo pharmacokinetics and biodistribution. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 43, 129-140.

Agbo, C., Umeyor, C., Kenechukwu, F., Ogbonna, J., Chime, S., Lovelyn, C., and Attama, A. (2016). Formulation design, in vitro characterizations and anti-malarial investigations of artemether and lumefantrine-entrapped solid lipid microparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 42(10), 1708-1721.

Ahlin, P., Kristl, J., and Smid-Korbar, J. (1998). Optimization of procedure parameters and physical stability of solid lipid nanoparticles in dispersions. *ACTA Pharmaceutica Sinica*, 48(4), 259-267.

Ahmad, I., Pandit, J., Sultana, Y., Mishra, A. K., Hazari, P. P., and Aqil, M. (2019). Optimization by design of etoposide loaded solid lipid nanoparticles for ocular delivery: Characterization, pharmacokinetic and deposition study. *Materials Science and Engineering: C Materials for Biological Applications*, 100, 959-970.

Ahmed, T. A., El-Say, K. M., Ahmed, O. A., and Aljaeid, B. M. (2019). Superiority of TPGS-loaded micelles in the brain delivery of vinpocetine via administration of thermosensitive intranasal gel. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 5555-5567.

Ahuja, A., Khar, R. K., and Ali, J. (2008). Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 23(5), 489-515.

Aji-Alex, M. R., Chacko, A. J., Jose, S., and Souto, E. B. (2011). Lopinavir loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for intestinal lymphatic targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(1-2), 11-18.

Ali, A., Wahlgren, M., Rembratt-Svensson, B., Daftani, A., Falkman, P., Wollmer, P., and Engblom, J. (2019). Dehydration affects drug transport over nasal mucosa. *Drug Delivery*, 26(1), 831-840.

Aljaeid, B. M., and Hosny, K. M. (2016). Miconazole-loaded solid lipid nanoparticles: formulation and evaluation of a novel formula with high bioavailability and antifungal activity. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 441-447.

Alli, S. M. (2011). Formulation and evaluation of Bacillus coagulans-loaded hypromellose mucoadhesive microspheres. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 619-629.

Almeida, A. J. and Souto, E. (2007). Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(6), 478-490.

Altuntas, E., and Yener, G. (2017). Formulation and Evaluation of Thermoreversible In Situ Nasal Gels Containing Mometasone Furoate for Allergic Rhinitis. *AAPS PharmSciTech*, 18(7), 2673-2682.

Andrade, L. M., De Fatima Reis, C., Maione-Silva, L., Anjos, J. L., Alonso, A., Serpa, R. C., and Taveira, S. F. (2014). Impact of lipid dynamic behavior on physical stability, in vitro release and skin permeation of genistein-loaded lipid nanoparticles. E*uropean Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88(1), 40-47.

Arora, P., Sharma, S., and Garg, S. (2002). Permeability issues in nasal drug delivery. *Drug Discovery Today*, 7(18), 967-975.

Aslan, N. (2007). Application of response surface methodology and central composite rotatable design for modeling the influence of some operating variables of a Multi-Gravity Separator for coal cleaning. *Fuel*, 86(5-6), 769-776.

Attama, A. A., Reichl, S., and Muller-Goymann, C. C. (2008). Diclofenac sodium delivery to the eye: in vitro evaluation of novel solid lipid nanoparticle formulation using human cornea construct. *International Journal of Pharmaceutics*, 355(1-2), 307-313.

Baig, M. S., Ahad, A., Aslam, M., Imam, S. S., Aqil, M., and Ali, A. (2016). Application of Box-Behnken design for preparation of levofloxacin-loaded stearic acid solid lipid nanoparticles for ocular delivery: Optimization, in vitro release, ocular tolerance, and antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 258-270.

Bali, N. R., Shinde, M. P., Rathod, S. B., and Salve, P. S. (2020). Enhanced transdermal permeation of rasagiline mesylate nanoparticles: design, optimization, and effect of binary combinations of solvent systems across biological membrane. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 1-16.

Ban, C., Jo, M., Park, Y. H., Kim, J. H., Han, J. Y., Lee, K. W., and Choi, Y. J. (2020). Enhancing the oral bioavailability of curcumin using solid lipid nanoparticles. *Food Chemistry*, 302, 125328.

Bhalerao, A. V., Lonkar, S. L., Deshkar, S. S., Shirolkar, S. V., and Deshpande, A. D. (2009). Nasal Mucoadhesive in situ Gel of Ondansetron Hydrochloride. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(6), 711-713.

Bhandwalkar, M. J., and Avachat, A. M. (2013). Thermoreversible nasal in situ gel of venlafaxine hydrochloride: formulation, characterization, and pharmacodynamic evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 14(1), 101-110.

Bhaskar, K., Krishna M., C., Lingam, M., Prabhakar R., V., Venkateswarlu, V., and Madhusudan R., Y. (2008). Development of nitrendipine controlled release formulations based on SLN and NLC for topical delivery: in vitro and ex vivo characterization. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34(7), 719-725.

Bhaskar, K., Krishna Mohan, C., Lingam, M., Jagan Mohan, S., Venkateswarlu, V., Madhusudan Rao, Y., and Ravichandran, V. (2009). Development of SLN and NLC enriched hydrogels for transdermal delivery of nitrendipine: in vitro and in vivo characteristics. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35(1), 98-113.

Bikkad, M. L., Nathani, A. H., Mandlik, S. K., Shrotriya, S. N., and Ranpise, N. S. (2014). Halobetasol propionate-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for skin targeting by topical delivery. *Journal of Liposome Research*, 24(2), 113-123.

Birnie, C. R. (2008). Physical pharmacy. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 72(4), 1-2.

Bodmeier, R., Wang, J., and Bhagwatwar, H. (1992). Process and formulation variables in the preparation of wax microparticles by a melt dispersion technique. II. W/O/W multiple emulsion technique for water-soluble drugs. *Journal of Microencapsulation*, 9(1), 99-107.

Bodor, N., and Buchwald, P. (2003). Brain-targeted drug delivery: Experiences to date. *American Journal of Drug Delivery*, 1(1), 13-26.

Boonme, P., Souto, E. B., Wuttisantikul, N., Jongjit, T., and Pichayakorn, W. (2013). Influence of lipids on the properties of solid lipid nanoparticles from microemulsion technique. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(7), 820-824.

Bruschi, M. L., Borghi-Pangoni, F. B., Junqueira, M. V., and de Souza-Ferreira, S. B. (2017). Nanostructured therapeutic systems with bioadhesive and thermoresponsive properties. In *Nanostructures for Novel Therapy*, pp. 313-342. Elsevier: Amsterdam.

Bukka, R., and Karwa, P. (2010). UV spectrophotometric method for the determination of Rasageline Mesylate in bulk and pharmaceutical formulations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 5(1), 5-7.

Caddeo, C., Manconi, M., Valenti, D., Maccioni, A., Fadda, A., and Sinico, C. (2012). The role of Labrasol in the enhancement of the cutaneous bioavailability of minoxidil in phospholipid vesicles. *Research Journal of Pharmacy and Technolgy*, 5(12), 1915-1921.

Carlotti, M. E., Sapino, S., Peira, E., Gallarate, M., and Ugazio, E. (2009). On the photodegradation of dithranol in different topical formulations: Use of SLN to increase the stability of the drug. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 30(10), 1517-1524.

Castile, J., Cheng, Y. H., Simmons, B., Perelman, M., Smith, A., and Watts, P. (2013). Development of in vitro models to demonstrate the ability of PecSys(R), an in situ nasal gelling technology, to reduce nasal run-off and drip. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(5), 816-824.

Cavalcanti, S. M. T., Nunes, C., Costa Lima, S. A., Soares-Sobrinho, J. L., and Reis, S. (2018). Optimization of nanostructured lipid carriers for Zidovudine delivery using a microwave-assisted production method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 122, 22-30.

Cavalli, R. (1997). Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 148(1), 47-54.

Cavalli, R., Caputo, O., Carlotti, M. E., Trotta, M., Scarnecchia, C., and Gasco, M. R. (1997). Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 148(1), 47-54.

Cengiz, E., Wissing, S. A., Muller, R. H., and Yazan, Y. (2006). Sunblocking efficiency of various TiO(2)-loaded solid lipid nanoparticle formulations(1). *International Journal of Cosmetic Science*, 28(5), 371-378.

Chahine, L., and Stern, M. (2011). Rasagiline in Parkinson's disease. *International Review of Neurobiology*, 100(1), 151-168.

Charcosset, C., El-Harati, A., and Fessi, H. (2005). Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor. *Journal of Controlled Release*, 108(1), 112-120.

Charlton, S., Davis, S. S., and Illum, L. (2007a). Evaluation of bioadhesive polymers as delivery systems for nose to brain delivery: in vitro characterisation studies. *Journal of Controlled Release*, 118(2), 225-234.

Charlton, S., Jones, N. S., Davis, S. S., and Illum, L. (2007b). Distribution and clearance of bioadhesive formulations from the olfactory region in man: effect of polymer type and nasal delivery device. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(3-4), 295-302.

Chattopadhyay, P., Shekunov, B. Y., Yim, D., Cipolla, D., Boyd, B., and Farr, S. (2007). Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(6), 444-453.

Chaturvedi, M., Kumar, M., and Pathak, K. (2011). A review on mucoadhesive polymer used in nasal drug delivery system. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(4), 215-222.

Chavan, S. S., Ingle, S. G., and Vavia, P. R. (2013). Preparation and characterization of solid lipid nanoparticle-based nasal spray of budesonide. *Drug Delivery and Translational Research*, 3(5), 402-408.

Chen, J. J., and Ly, A. V. (2006). Rasagiline: A second-generation monoamine oxidase type-B inhibitor for the treatment of Parkinson’s disease. Amer*ican Journal of Health-System Pharmacy*, 63(10), 915-928.

Chirio, D., Gallarate, M., Peira, E., Battaglia, L., Muntoni, E., Riganti, C., and Schiffer, D. (2014). Positive-charged solid lipid nanoparticles as paclitaxel drug delivery system in glioblastoma treatment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88(3), 746-758.

Cho, H. J., Balakrishnan, P., Park, E. K., Song, K. W., Hong, S. S., Jang, T. Y., and Kim, D. D. (2011). Poloxamer/cyclodextrin/chitosan-based thermoreversible gel for intranasal delivery of fexofenadine hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(2), 681-691.

Choi, H. G., Jung, J. H., Ryu, J. M., Yoon, S. J., Oh, Y. K., and Kim, C. K. (1998). Development of in situ-gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository. *International Journal of Pharmaceutics*, 165(1), 33-44.

Cobby, J., Mayersohn, M., and Walker, G. C. (1974). Influence of shape factors on kinetics of drug release from matrix tablets I: Theoretical. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63(5), 725-732.

Cole, P. (1953). Some aspects of temperature, moisture and heat relationships in the upper respiratory tract. *The Journal of Laryngology and Otology*, 67(8), 449-456.

Crowe, T. P., Greenlee, M. H. W., Kanthasamy, A. G., and Hsu, W. H. (2018). Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sciences*, 195, 44-52.

Cunha, S., Amaral, M. H., Lobo, J. M. S., and Silva, A. C. (2017). Lipid Nanoparticles for Nasal/Intranasal Drug Delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 34(3), 257-282.

Das, T., Venkatesh, M. P., Pramod Kumar, T. M., and Koland, M. (2020). SLN based alendronate in situ gel as an implantable drug delivery system – A full factorial design approach. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 55, 101415.

Das-Neves, J., and Bahia, M. F. (2006). Gels as vaginal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 318(1-2), 1-14.

Date, A. A., Vador, N., Jagtap, A., and Nagarsenker, M. S. (2011). Lipid nanocarriers (GeluPearl) containing amphiphilic lipid Gelucire 50/13 as a novel stabilizer: fabrication, characterization and evaluation for oral drug delivery. *Nanotechnology*, 22(27), 275102.

Deguchi, Y., Nozawa, K., Yamada, S., Yokoyama, Y., and Kimura, R. (1997). Quantitative evaluation of brain distribution and blood-brain barrier efflux transport of probenecid in rats by microdialysis: possible involvement of the monocarboxylic acid transport system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280(2), 551-560.

Del Pozo-Rodríguez, A., Solinís, M. A., Gascón, A. R., and Pedraz, J. L. (2009). Short-and long-term stability study of lyophilized solid lipid nanoparticles for gene therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(2), 181-189.

Deli, M. A. (2009). Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(4), 892-910.

Deng, H., Wang, P., and Jankovic, J. (2018). The genetics of Parkinson disease. *Ageing Research Reviews*, 42, 72-85.

Deshmukh, T., Deshmukh, V., Jadhav, P., Kasat, K., and Patil, R. (2012). Formulation and evaluation of mucoadhesive microspheres of ziprasidone hydrochloride for oral controlled release. *Journal of Current Pharma Research*, 2(2), 497.

Din, F. U., Choi, J. Y., Kim, D. W., Mustapha, O., Kim, D. S., Thapa, R. K., and Choi, H. G. (2017). Irinotecan-encapsulated double-reverse thermosensitive nanocarrier system for rectal administration. *Drug Delivery*, 24(1), 502-510.

Dingler, A., Blum, R. P., Niehus, H., Muller, R. H., and Gohla, S. (1999). Solid lipid nanoparticles (SLN/Lipopearls)-a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. *Journal of Microencapsulation*, 16(6), 751-767.

Dorraj, G., and Moghimi, H. R. (2015). Preparation of SLN-containing thermoresponsive in-situ forming gel as a controlled nanoparticle delivery system and investigating its rheological, thermal and erosion behavior. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 14(2), 347-358.

Eloy, J. O., Claro de Souza, M., Petrilli, R., Barcellos, J. P., Lee, R. J., and Marchetti, J. M. (2014). Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 345-363.

Erdo, F., Bors, L. A., Farkas, D., Bajza, A., and Gizurarson, S. (2018). Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain Research Bulletin*, 143, 155-170.

Fadda, P., Monduzzi, M., Caboi, F., Piras, S., and Lazzari, P. (2013). Solid lipid nanoparticle preparation by a warm microemulsion based process: influence of microemulsion microstructure. *International Journal of Pharmaceutics*, 446(1-2), 166-175.

Fakhari, A., Corcoran, M., and Schwarz, A. (2017). Thermogelling properties of purified poloxamer 407. *Heliyon*, 3(8), e00390.

Fang, J. Y., Fang, C. L., Liu, C. H., and Su, Y. H. (2008). Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(2), 633-640.

Farboud, E. S., Nasrollahi, S. A., and Tabbakhi, Z. (2011). Novel formulation and evaluation of a Q10-loaded solid lipid nanoparticle cream: in vitro and in vivo studies. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 611-617.

Fatouh, A. M., Elshafeey, A. H., and Abdelbary, A. (2017). Intranasal agomelatine solid lipid nanoparticles to enhance brain delivery: formulation, optimization and in vivo pharmacokinetics. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 1815-1825.

Fernandez, M., Barcia, E., Fernandez-Carballido, A., Garcia, L., Slowing, K., Negro, S. (2012). Controlled release of rasagiline mesylate promotes neuroprotection in a rotenone-induced advanced model of Parkinson's disease. Internaıonal Journal of Pharmaceutics, 438, 266-278.

Firdaus, S., Hassan, N., Mirza, M. A., Ara, T., El-Serehy, H. A., Al-Misned, F. A., and Iqbal, Z. (2020). FbD directed fabrication and investigation of luliconazole based SLN gel for the amelioration of candidal vulvovaginitis: a 2 T (thermosensitive & transvaginal) approach. *Saudi Journal of Biological Sciences*.

Florence, K., Manisha, L., Kumar, A. B., Ankur, K., Kumar, A. M. (2010). Intranasal clobazam delivery in the treatment of status epilepticus. *Pharmaceutical Technology*, 100(2), 692-703.

Freitas, C., and Müller, R. H. (1998). Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, 168(2), 221-229.

Freitas, C., and Müller, R. H. (1999). Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN™) and crystallinity of the lipid phase. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 47(2), 125-132.

Frias, I., Neves, A. R., Pinheiro, M., and Reis, S. (2016). Design, development, and characterization of lipid nanocarriers-based epigallocatechin gallate delivery system for preventive and therapeutic supplementation. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 3519-3528.

Galgatte, U. C., Kumbhar, A. B., and Chaudhari, P. D. (2014). Development of in situ gel for nasal delivery: design, optimization, in vitro and in vivo evaluation. *Drug Delivery*, 21(1), 62-73.

Gartziandia, O., Egusquiaguirre, S. P., Bianco, J., Pedraz, J. L., Igartua, M., Hernandez, R. M., and Beloqui, A. (2016). Nanoparticle transport across in vitro olfactory cell monolayers. *International Journal of Pharmaceutics*, 499(1-2), 81-89.

Gasco, M., Priano, L., and Zara, G. P. (2009). Chapter 10 - Solid lipid nanoparticles and microemulsions for drug delivery: The CNS. *Progress in Brain Research*, 180(1), 181-192.

Gasco. M. (1993). *Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution*. US Patent No: US5250236A.

Gastaldi, L., Battaglia, L., Peira, E., Chirio, D., Muntoni, E., Solazzi, I., and Dosio, F. (2014). Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: current state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87(3), 433-444.

Gavini, E., Rassu, G., Sanna, V., Cossu, M., and Giunchedi, P. (2005). Mucoadhesive microspheres for nasal administration of an antiemetic drug, metoclopramide: in-vitro/ex-vivo studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(3), 287-294.

Genina, N., Janben, E. M., Breitennach, A., Breitkreutz, J., Sandler, N. (2013). Evaluation of different substrates for inkjet printing of rasagiline mesylate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85, 1075-1083.

Ghersi-Egea, J. F., Leninger-Muller, B., Suleman, G., Siest, G., and Minn, A. (1994). Localization of drug-metabolizing enzyme activities to blood-brain interfaces and circumventricular organs. *Journal of Neurochemistry*, 62(3), 1089-1096.

Girardo, S., Cingolani, R., and Pisignano, D. (2007). Microfluidic rheology of non-Newtonian liquids. *Analytical Chemistry*, 79(15), 5856-5861.

Giuliano, E., Paolino, D., Fresta, M., and Cosco, D. (2018). Mucosal applications of poloxamer 407-based hydrogels: An overview. *Pharmaceutics*, 10(3), 159.

Golden, P. L., and Pollack, G. M. (1998). Rationale for influx enhancement versus efflux blockade to increase drug exposure to the brain. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 19(4), 263-272.

Goldstein, G. W., and Betz, A. L. (1986). The blood-brain barrier. *Scientific American*, 255(3), 74-83.

Gore, V., Manojkumar, B., Sonawane, S., Kokane, D., and Tank, S. (2011). *Polymorphic form of rasagiline mesylate*. US Patent No: US20110263719A1.

Gould, R. F. (1975). Pro-drugs as novel drug delivery systems. *American Chemical Society*, 14, 1-6.

Grabovac, V., Guggi, D., and Bernkop-Schnurch, A. (2005). Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11), 1713-1723.

Grangeia, H. B., Silva, C., Simoes, S. P., and Reis, M. S. (2020). Quality by design in pharmaceutical manufacturing: A systematic review of current status, challenges and future perspectives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 147, 19-37.

Guay, D. R. (2006). Rasagiline (TVP-1012): A new selective monoamine oxidase inhibitor for Parkinson's disease. *The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy*, 4(4), 330-346.

Guidotti, G., Brambilla, L., and Rossi, D. (2017). Cell-penetrating peptides: From basic research to clinics. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(4), 406-424.

Guimarães, K. L., and Ré, M. I. (2011). Lipid nanoparticles as carriers for cosmetic ingredients: The first (SLN) and the second generation (NLC). *Nanocosmetics and Nanomedicines*, 101-122.

Guo, X., Cui, F., Xing, Y., Mei, Q., and Zhang, Z. (2011). Investigation of a new injectable thermosensitive hydrogel loading solid lipid nanoparticles. *Pharmazie*, 66(12), 948-952.

Hägerström, H. (2003). Polymer gels as pharmaceutical dosage forms: rheological performance and physicochemical interactions at the gel-mucus interface for formulations intended for mucosal drug delivery. *Acta Universitatis Upsaliensis*, 293, 1-76.

Hägerström, H., and Edsman, K. (2003). Limitations of the rheological mucoadhesion method: The effect of the choice of conditions and the rheological synergism parameter. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(5), 349-357.

Han, H. K., and Amidon, G. L. (2000). Targeted prodrug design to optimize drug delivery. *AAPS Pharm Sciences*, 2(1), E6.

Hao, J., Wang, X., Bi, Y., Teng, Y., Wang, J., Li, F., and Liu, J. (2014). Fabrication of a composite system combining solid lipid nanoparticles and thermosensitive hydrogel for challenging ophthalmic drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 114, 111-120.

Harbaugh, R. E., Saunders, R. L., and Reeder, R. F. (1988). Use of Implantable Pumps for Central Nervous System Drug Infusions to Treat Neurological Disease. *Neurosurgery*, 23(6), 693-698.

Harms, M., and Müller-Goymann, C. C. (2011). Solid lipid nanoparticles for drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 21(1), 89-99.

Hazzah, H. A., Farid, R. M., Nasra, M. M. A., Hazzah, W. A., El-Massik, M. A., and Abdallah, O. Y. (2015). Gelucire-based nanoparticles for curcumin targeting to oral mucosa: preparation, characterization, and antimicrobial activity assessment. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(11), 3913-3924.

Heydenreich, A. (2003). Preparation and purification of cationic solid lipid nanospheres-effects on particle size, physical stability and cell toxicity. *International Journal of Pharmaceutics*, 254(1), 83-87.

Higuchi, T. (1963). Mechanism of sustained-action medication. theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52(12), 1145-1149.

Higuchi, W. I. (1967). Diffusional Models Useful in Biopharmaceutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56(3), 315-324.

Howard, M. D., Lu, X., Jay, M., and Dziubla, T. D. (2012). Optimization of the lyophilization process for long-term stability of solid–lipid nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 38(10), 1270-1279.

Huang, Y., Leobandung, W., Foss, A., and Peppas, N. A. (2000). Molecular aspects of muco- and bioadhesion: tethered structures and site-specific surfaces. *Journal of Controlled Release*, 65(1-2), 63-71.

Huber, L. (2007). Validation and qualification in analytical laboratories: *CRC Press*, 1-288.

Huguet, A., Le Normand, L., Fauquant, J., Kaeffer, B., and Le Huërou-Luron, I. (2007). Influence of bovine colostrum on restoration of intestinal mucosa in weaned piglets. *Livestock Science*, 108(1-3), 20-22,

Hussain, A. A. (1998). Intranasal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 29(1-2), 39-49.

ICH Expert Working Group. (2005). *ICH Harmonised Tripartite Guideline – Validation of analytical procedures: Text and methodology – Q2(R1)*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1-13.

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

Jain, D. S., Bajaj, A. N., Athawale, R. B., Shikhande, S. S., Pandey, A., Goel, P. N., and Raut, P. (2016). Thermosensitive PLA based nanodispersion for targeting brain tumor via intranasal route. *Materials Science and Engineering: C Materials for Biological Applications*, 63, 411-421.

Janapareddi, K., and Kandhula, A. (2019). Development and Ex vivo evaluation of Rasagiline Mesylate mucoadhesive microemulsion for intranasal delivery using Box-Behnken design. *International Journal of Bio-Pharma Research*, 8(3), 2514-2522.

Jannin, V., Blas, L., Chevrier, S., Miolane, C., Demarne, F., and Spitzer, D. (2018). Evaluation of the digestibility of solid lipid nanoparticles of glyceryl dibehenate produced by two techniques: Ultrasonication and spray-flash evaporation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 111, 91-95.

Jenning, V., Thunemann, A. F., and Gohla, S. H. (2000). Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *International Journal of Pharmaceutics*, 199(2), 167-177.

Kanwar, N., Bhandari, R., Kuhad, A., and Sinha, V. R. (2019). Polycaprolactone-based neurotherapeutic delivery of rasagiline targeting behavioral and biochemical deficits in Parkinson's disease. *Drug Delivery and Translational Research*, 9(5), 891-905.

Kapoor, M., Cloyd, J. C., and Siegel, R. A. (2016). A review of intranasal formulations for the treatment of seizure emergencies. *Journal of Controlled Release*, 237, 147-159.

Kaur, I. P., Bhandari, R., Bhandari, S., and Kakkar, V. (2008). Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. *Journal of Controlled Release*, 127(2), 97-109.

Kesharwani, R., Sachan, A., Singh, S., and Patel, D. (2016). Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticle (SLN) based topical gel of etoricoxib. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(10), 124-131.

Khalil, R. M., Abd El-Bary, A., Kassem, M. A., Ghorab, M. M., and Ahmed, M. B. (2013). Solid lipid nanoparticles for topical delivery of meloxicam: Development and in vitro characterization. *European Scientific Journal*, 9(21), 779-798.

Khallaf, R. A., Aboud, H. M., and Sayed, O. M. (2020). Surface modified niosomes of olanzapine for brain targeting via nasal route; preparation, optimization, and in vivo evaluation. *Journal of Liposome Research*, 30(2), 163-173.

Khan, A. R., Liu, M., Khan, M. W., and Zhai, G. (2017). Progress in brain targeting drug delivery system by nasal route. *Journal of Controlled Release*, 268, 364-389.

Khataee, A. R., Fathinia, M., Aber, S., and Zarei, M. (2010). Optimization of photocatalytic treatment of dye solution on supported TiO2 nanoparticles by central composite design: intermediates identification. *Journal of Hazardous Materials*, 181(1-3), 886-897.

Khattab, A., Marzok, S., and Ibrahim, M. (2019). Development of optimized mucoadhesive thermosensitive pluronic based in situ gel for controlled delivery of Latanoprost: Antiglaucoma efficacy and stability approaches. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53, 101134.

Khodadadian, A., Hemmati-Dinarvand, M., Kalantary-Charvadeh, A., Ghobadi, A., and Mazaheri, M. (2018). Candidate biomarkers for Parkinson's disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 104, 699-704.

Krewson, C. E., Klarman, M. L., and Saltzman, W. M. (1995). Distribution of nerve growth factor following direct delivery to brain interstitium. *Brain Research*, 680(1-2), 196-206.

Krogh, A. (1946). The active and passive exchanges of inorganic ions through the surfaces of living cells and through living membranes generally. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 133(871), 140-200.

Kumar, R., Singh, A., Sharma, K., Dhasmana, D., Garg, N., and Siril, P. F. (2020). Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of Fenofibrate and Nabumetone loaded solid lipid nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C Materials for Biological Applications*, 106, 110184.

Kunasekaran, V., and Kannan, K. (2015). Compatibility studies of rasagiline mesylate with selected excipients for an effective solid lipid nanoparticles formulation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7, 73-80.

Kunasekaran, V., and Krishnamoorthy, K. (2015). Experimental design for the optimization of nanoscale solid lipid particles containing rasagiline mesylate. *Journal of Young Pharmacists*, 7(4), 285-295.

Kunasekaran, V., and Krishnamoorthy, K. (2016). Formulation and evaluation of nanoscale solid lipid particles containing a hydrophilic drug-rasagiline mesylate. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6, 44-50.

Lecht, S., Haroutiunian, S., Hoffman, A., and Lazarovici, P. (2007). Rasagiline - a novel MAO B inhibitor in Parkinson's disease therapy. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 3(3), 467-474.

Lee, A. and Gilbert, R. M. (2016). Epidemiology of Parkinson Disease. *Neurologic Clinics*, 34(4), 955-965.

Lee, J. W., Park, J. H., and Robinson, J. R. (2000). Bioadhesive-based dosage forms: the next generation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(7), 850-866.

Li, C., Li, C., Liu, Z., Li, Q., Yan, X., Liu, Y., and Lu, W. (2014). Enhancement in bioavailability of ketorolac tromethamine via intranasal in situ hydrogel based on poloxamer 407 and carrageenan. *International Journal of Pharmaceutics*, 474(1-2), 123-133.

Li, Q., Cai, T., Huang, Y., Xia, X., Cole, S. P. C., and Cai, Y. (2017). A Review of the Structure, Preparation, and Application of NLCs, PNPs, and PLNs. *Nanomaterials*, 7(6), 122.

Lin, C. Y., Hsieh, H. Y., Chen, C. M., Wu, S. R., Tsai, C. H., Huang, C. Y., and Liu, H. L. (2016). Non-invasive, neuron-specific gene therapy by focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening in Parkinson's disease mouse model. *Journal of Controlled Release*, 235, 72-81.

Lindemann, J., Leiacker, R., Rettinger, G., and Keck, T. (2002). Nasal mucosal temperature during respiration. *Clinical Otolaryngology*, 27(3), 135-139.

Lindgren, M., Hallbrink, M., Prochiantz, A., and Langel, U. (2000). Cell-penetrating peptides. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21(3), 99-103.

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., and Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1), 3-26.

Liu, W., Hu, M., Liu, W., Xue, C., Xu, H., and Yang, X. (2008). Investigation of the carbopol gel of solid lipid nanoparticles for the transdermal iontophoretic delivery of triamcinolone acetonide acetate. *International Journal of Pharmaceutics*, 364(1), 135-141.

Liu, Z., Zhang, X., Wu, H., Li, J., Shu, L., Liu, R., and Li, N. (2011). Preparation and evaluation of solid lipid nanoparticles of baicalin for ocular drug delivery system in vitro and in vivo. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 37(4), 475-481.

Lochhead, J. J., and Thorne, R. G. (2012). Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(7), 614-628.

Lunati, A., Lesage, S., and Brice, A. (2018). The genetic landscape of Parkinson's disease. *Revue Neurologique*, 174(9), 628-643.

Lungare, S., Bowen, J., and Badhan, R. (2016). Development and Evaluation of a Novel Intranasal Spray for the Delivery of Amantadine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(3), 1209-1220.

Lyytinen, J., Kaakkola, S., Ahtila, S., Tuomainen, P., and Teravainen, H. (1997). Simultaneous MAO-B and COMT inhibition in L-Dopa-treated patients with Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 12(4), 497-505.

Ma, J., Chen, X., Duan, X., Deng, P., Wang, H., and Zhong, D. (2008). Validated LC-MS/MS method for quantitative determination of rasagiline in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 873(2), 203-208.

Madane, R. G., and Mahajan, H. S. (2016). Curcumin-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for nasal administration: design, characterization, and in vivo study. *Drug Delivery*, 23(4), 1326-1334.

Madden, T. D., Bally, M. B., Hope, M. J., Cullis, P. R., Schieren, H. P., and Janoff, A. S. (1985). Protection of large unilamellar vesicles by trehalose during dehydration: retention of vesicle contents. *Biochimica et Biophysica Acta*, 817(1), 67-74.

Mahajan, H. S., Tyagi, V. K., Patil, R. R., and Dusunge, S. B. (2013). Thiolated xyloglucan: Synthesis, characterization and evaluation as mucoadhesive in situ gelling agent. *Carbohydrate Polymers*, 91(2), 618-625.

Maherally, Z., Fillmore, H. L., Tan, S. L., Tan, S. F., Jassam, S. A., Quack, F. I., and Pilkington, G. J. (2018). Real-time acquisition of transendothelial electrical resistance in an all-human, in vitro, 3-dimensional, blood-brain barrier model exemplifies tight-junction integrity. *FASEB Journal*, 32(1), 168-182.

Maiti, S., Chakravorty, A., and Chowdhury, M. (2014). Gellan co-polysaccharide micellar solution of budesonide for allergic anti-rhinitis: an in vitro appraisal. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, 241-246.

Majithiya, R. J., Ghosh, P. K., Umrethia, M. L., and Murthy, R. S. (2006). Thermoreversible-mucoadhesive gel for nasal delivery of sumatriptan. *AAPS PharmSciTech*, 7(3), 67.

Mansuri, S., Kesharwani, P., Jain, K., Tekade, R. K., and Jain, N. K. (2016). Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *Reactive and Functional Polymers*, 100, 151-172.

Mao, S. R., Wang, Y. Z., Ji, H. Y., and Bi, D. Z. (2003). Preparation of solid lipid nanoparticles by microemulsion technique. *ACTA Pharmaceutica Sinica*, 38(8), 624-626.

Marttin, E., Schipper, N. G. M., Verhoef, J. C., and Merkus, F. W. H. M. (1998). Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 29(1-2), 13-38.

Mathiowitz, E., and Chickering, D. E. (1999). Definitions, mechanisms and theories of bioadhesion. E. Mathiowitz, D. E. Chickering, and C. M. Lehr (Eds.), In *Bioadhesive drug delivery systems: Fundamentals, novel approaches*, pp. 1-10. New York: Marcel Dekker.

Medrzycka, K. B. (1991). The effect of particle concentration on zeta potential in extremely dilute solution. *Colloid and polimer science*, 269, 85-90.

Mehmood, Y. (2015). Brain targeting drug delivery system: A review. *International Journal of Basic Medical Sciences and Pharmacy*, 5, 32.

Mehnert, W., and Mader, K. (2001). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(2-3), 165-196.

Mei, Z., Chen, H., Weng, T., Yang, Y., and Yang, X. (2003). Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 56(2), 189-196.

Meloun, M., Ferenčíková, Z., and Vrána, A. (2010). Thermodynamic dissociation constants of rasagiline by the nonlinear regression and factor analysis of multiwavelength spectrophotometric pH titration data. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 55(8), 2707-2713.

Menco, B. P. M. (1977). A qualitative and quantitative investigation of olfactory and nasal respiratory mucosal surfaces of cow and sheep based on various ultrastructural and biochemical methods. *Common Agricultural University, Wageningen*. 77(13), 1-157.

Meng, K., Chen, D., Yang, F., Zhang, A., Tao, Y., Qu, W., and Xie, S. (2020). Intracellular delivery, accumulation, and discrepancy in antibacterial activity of four enrofloxacin-loaded fatty acid solid lipid nanoparticles. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 194, 111196.

Menzel, C., Jelkmann, M., Laffleur, F., and Bernkop-Schnurch, A. (2017). Nasal drug delivery: Design of a novel mucoadhesive and in situ gelling polymer. *International Journal of Pharmaceutics*, 517(1-2), 196-202.

Millay, R. H., Klein, M. L., Shults, W. T., Dahlborg, S. A., and Neuwelt, E. A. (1986). Maculopathy associated with combination chemotherapy and osmotic opening of the blood-brain barrier. *American Journal of Ophthalmology*, 102(5), 626-632.

Minn, A., Leclerc, S., Heydel, J. M., Minn, A. L., Denizcot, C., Cattarelli, M., and Gradinaru, D. (2002). Drug transport into the mammalian brain: the nasal pathway and its specific metabolic barrier. *Journal of Drug Targeting*, 10(4), 285-296.

Mishra, V., Bansal, K. K., Verma, A., Yadav, N., Thakur, S., Sudhakar, K., and Rosenholm, J. M. (2018). Solid lipid nanoparticles: Emerging colloidal nano drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 10(4), 10040191.

Miyazaki, S., Takeuchi, S., Yokouchi, C., and Takada, M. (1984). Pluronic F-127 gels as a vehicle for topical administration of anticancer agents. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 32(10), 4205-4208.

Mohammadi-Samani, S., Zojaji, S., and Entezar-Almahdi, E. (2018). Piroxicam loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery: Preparation, characterization and in vitro permeation assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 47, 427-433.

Mukherjee, S., Ray, S., and Thakur, R. S. (2009). Solid lipid nanoparticles: A modern formulation approach in drug delivery system. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(4), 349-358.

Mulsa, N., Sanghvi, G., Purohit, P., Sheth, N., Vaishnav, D. (2013). Development of the UV spectrophotometric method of phenytoin sodium in api and stress degradation studies. Inventi Rapid: Pharm Analysis and Quality Assurance, 1(5).

Müller, R. (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), 161-177.

Muller, T. (2014). Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of rasagiline mesylate for Parkinson's disease. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 10(10), 1423-1432.

Nazar, H., Fatouros, D. G., van der Merwe, S. M., Bouropoulos, N., Avgouropoulos, G., Tsibouklis, J., and Roldo, M. (2011). Thermosensitive hydrogels for nasal drug delivery: the formulation and characterisation of systems based on N-trimethyl chitosan chloride. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(2), 225-232.

Numanoğlu, U. (2006). Characterization of solid lipid nanoparticles (SLNTM) and their pharmaceutical and COSMETIC APPLICAtions. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 35(3), 211-235.

Olanow, C. W., Agid, Y., Mizuno, Y., Albanese, A., Bonuccelli, U., Damier, P., and Stocchi, F. (2004). Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: Current Controversies. *Movement Disorders*, 19(9), 997-1005.

Oldfield, V., Keating, G. M., and Perry, C. M. (2007). Rasagiline: A review of its use in the management of Parkinson's disease. *Drugs*, 67(12), 1725-1747.

Öztürk, A. A., Yenilmez, E., Arslan, R., Şenel, B., and Yazan, Y. (2020). Dexketoprofen trometamol loaded solid lipid nanoparticles (SLNs): Formulation, in vitro and in vivo evaluation. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 24, 82-99.

Pandey, R., Sharma, S., and Khuller, G. K. (2005). Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy. *Tuberculosis*, 85(5-6), 415-420.

Panigrahi, K. C., Patra, C. N., Jena, G. K., Ghose, D., Jena, J., Panda, S. K., and Sahu, M. (2018). Gelucire: A versatile polymer for modified release drug delivery system. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 102-108.

Pardridge, W. M. (1983). Brain metabolism: A perspective from the blood-brain barrier. *Physiological Reviews*, 63(4), 1481-1535.

Pardridge, W. M. (2002). Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(2), 131-139.

Pardridge, W. M. (2007). Blood-brain barrier delivery. *Drug Discovery Today*, 12(1-2), 54-61.

Patel, P. R., Mulgund, S., V. (2013). Development and validation of a spectrophotometric method for estimation of rasagiline mesylate in bulk and tablet dosage form. *International Journal of Drug Development and Research*, 5(3), 174-177.

Patel, B. R., Patel, M. R., Bhatt, K. K., Patel, G. B. (2013). Formulation consideration and characterization of microemulsion drug delivery system for transnasal administration of carbamazepine. *Bulletin of Faculty of Pharmacy Cairo University*, 51(2), 243-253.

Paulsson, M. (2001). Controlled release gel formulation for mucosal drug delivery. *ACTA Universitatis Upsaliensin Uppasla*, 7, 9-21.

Pereira, G. G., Dimer, F. A., Guterres, S. S., Kechinski, C. P., Granada, J. E., and Cardozo, N. S. M. (2013). Formulation and characterization of poloxamer 407®: thermoreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. *Quimica Nova*, 36(8), 1121-1125.

Peskin, T. B. (2010). *Rasagiline formulations of improved content uniformity*. US Patent No: US20060188581A1.

Peters, F. T., and Maurer, H. H. (2002). Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – A review. *Accreditation and Quality Assurance*, 7(11), 441-449.

Pingili, R., Vemulapalli, S., Mullapudi, S. S., Nuthakki, S., Pendyala, S., and Kilaru, N. (2016). Pharmacokinetic interaction study between flavanones (hesperetin, naringenin) and rasagiline mesylate in wistar rats. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 42(7), 1110-1117.

Pizzol, C. D., Filippin-Monteiro, F. B., Restrepo, J. A., Pittella, F., Silva, A. H., Alves de Souza, P., and Creczynski-Pasa, T. B. (2014). Influence of surfactant and lipid type on the physicochemical properties and biocompatibility of solid lipid nanoparticles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(8), 8581-8596.

Pooja, D., Tunki, L., Kulhari, H., Reddy, B. B., and Sistla, R. (2016). Optimization of solid lipid nanoparticles prepared by a single emulsification-solvent evaporation method. *Data in Brief*, 6, 15-19.

Priya, S., Rathnanand, M., Nayanabhirama, U., Ongole, R., Sumanth, K. N., and Joshi, U. (2011). Preparation and evaluation of buccal mucoadhesive patch of betamethasone sodium phosphate for the treatment of oral submucous fibrosis. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3(6), 56-65.

Prokai-Tatrai, K., and Prokai, L. (2011). Prodrug design for brain delivery of small- and medium-sized neuropeptides. *Methods in Molecular Biology*, 789, 313-336.

Pugh, D. (2017). The danger of dilution when measuring water based pharmaceutical suspensions and how nanoflex overcomes these obstacles. *American Journal of Advanced Drug Delivery*, 5(2), 83-91.

Purvin, S., Vuddanda, P. R., Singh, S. K., Jain, A., and Singh, S. (2014). Pharmacokinetic and tissue distribution study of solid lipid nanoparticles of zidovudine in rats. *Journal of Nanotechnology*, 2014, 1-7.

Rabey, J. M., Sagi, I., Huberman, M., Melamed, E., Korczyn, A., Giladi, N., and Berecz, G. (2000). Rasagiline mesylate, a new MAO-B inhibitor for the treatment of Parkinson's disease: A double-blind study as adjunctive therapy to levodopa. *Clinical Neuropharmacology*, 23(6), 324-330.

Rao, M., Agrawal, D. K., and Shirsath, C. (2017). Thermoreversible mucoadhesive in situ nasal gel for treatment of Parkinson's disease. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(1), 142-150.

Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Jarvinen, T., and Savolainen, J. (2008a). Prodrugs: Design and clinical applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(3), 255-270.

Rautio, J., Laine, K., Gynther, M., and Savolainen, J. (2008b). Prodrug approaches for CNS delivery. *The AAPS Journal*, 10(1), 92-102.

Ravi, H., and Baskaran, V. (2015). Biodegradable chitosan-glycolipid hybrid nanogels: A novel approach to encapsulate fucoxanthin for improved stability and bioavailability. *Food Hydrocolloids*, 43, 717-725.

Ravi, P. R., Aditya, N., Patil, S., and Cherian, L. (2015). Nasal in-situ gels for delivery of rasagiline mesylate: improvement in bioavailability and brain localization. *Drug Delivery*, 22(7), 903-910.

Redasani, V. K., and Bari, S. B. (2015). *Prodrug design - Perspectives, approaches and applications in medicinal chemistry*. Boston: Academic Press, 7-20.

Reddy, L. H., Vivek, K., Bakshi, N., and Murthy, R. S. (2006). Tamoxifen citrate loaded solid lipid nanoparticles (SLN): preparation, characterization, in vitro drug release, and pharmacokinetic evaluation. *Pharmaceutical Development and Technology*, 11(2), 167-177.

Reich, S. G., and Savitt, J. M. (2019). Parkinson's disease. *Medical Clinics of North America*, 103(2), 337-350.

Riederer, P., and Laux, G. (2011). MAO-inhibitors in Parkinson's disease. *Experimental Neurobiology*, 20(1), 1-17.

Sadeque, A. J., Wandel, C., He, H., Shah, S., and Wood, A. J. (2000). Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibition. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 68(3), 231-237.

Santos, D., and Ferreira, D. (2007). Oral delivery of drugs by means of lipid nanoparticles. *Minerva Biotecnologica*, 19(1), 1-5.

Savolainen, J., Edwards, J. E., Morgan, M. E., McNamara, P. J., and Anderson, B. D. (2002). Effects of a P-glycoprotein inhibitor on brain and plasma concentrations of anti-human immunodeficiency virus drugs administered in combination in rats. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 30(5), 479-482.

Schöler, N., Olbrich, C., Tabatt, K., Müller, R. H., Hahn, H., and Liesenfeld, O. (2001). Surfactant, but not the size of solid lipid nanoparticles (SLN) influences viability and cytokine production of macrophages. *International Journal of Pharmaceutics*, 221(1-2), 57-67.

Schubert, M. (2003). Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles – evaluation of the method and process parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55(1), 125-131.

Schwarz, C., and Mehnert, W. (1997). Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*, 157(2), 171-179.

Schwarz, C., Mehnert, W., Lucks, J. S., and Müller, R. H. (1994). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *Journal of Controlled Release*, 30(1), 83-96.

Severino, P., Santana, M. H., and Souto, E. B. (2012). Optimizing SLN and NLC by 22 full factorial design: Effect of homogenization technique. Ma*terials Science and Engineering: C*, 32(6), 1375-1379.

Seyfoddin, A., Shaw, J., and Al-Kassas, R. (2010). Solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery. *Drug Delivery*, 17(7), 467-489.

Shah, M., Agrawal, Y. K., Garala, K., and Ramkishan, A. (2012). Solid lipid nanoparticles of a water soluble drug, ciprofloxacin hydrochloride. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(5), 434-442.

Shah, R. M., Malherbe, F., Eldridge, D., Palombo, E. A., and Harding, I. H. (2014). Physicochemical characterization of solid lipid nanoparticles (SLNs) prepared by a novel microemulsion technique. *Journal of Colloid and Interface Science*, 428, 286-294.

Shah, V. P., Midha, K. K., Dighe, S., McGilveray, I. J., Skelly, J. P., Yacobi, A., and Spector, S. (1992). Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81(3), 309-312.

Sharma, S., Lohan, S., Murthy, R. S. R. (2014). Formulation and characterization of intranasal mucoadhesive nanoparticulates and thermo-reversible gel of levodopa for brain delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 40(7), 869-878.

Shelke, S., Shahi, S., Jalalpure, S., and Dhamecha, D. (2016). Poloxamer 407-based intranasal thermoreversible gel of zolmitriptan-loaded nanoethosomes: formulation, optimization, evaluation and permeation studies. *Journal of Liposome Research*, 26(4), 313-323.

Shulkin, P. M., Seltzer, S. E., Davis, M. A., and Adams, D. F. (1984). Lyophilized liposomes: a new method for long-term vesicular storage. *Journal of Microencapsulation*, 1(1), 73-80.

Siepmann, J., and Siepmann, F. (2012). Modeling of diffusion controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 351-362.

Silverstein, R. M., and Bassler, G. C. (1962). Spectrometric identification of organic compounds. *Journal of Chemical Education*, 39(11), 546.

Singh, A. P., Saraf, S. K., and Saraf, S. A. (2012). SLN approach for nose-to-brain delivery of alprazolam. *Drug Delivery and Translational Research*, 2(6), 498-507.

Singh, S., Dobhal, A. K., Jain, A., Pandit, J. K., and Chakraborty, S. (2010). Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles of a water soluble drug: Zidovudine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58(5), 650-655.

Singh, V. K., Pandey, P. M., Agarwal, T., Kumar, D., Banerjee, I., Anis, A., and Pal, K. (2015). Development of soy lecithin based novel self-assembled emulsion hydrogels. Journal of the *Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 55, 250-263.

Singhal, M., Serna, C., Dhaval, K., Kalia, Y. N. (2021). Effect of continious and multi – phasic current profiles on the iontophoretic transport of pramipexole, rasagiline and huperzine a: depicting temporal variation and biodistribution in the skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 599, 120445.

Smart, J. D. (2005). The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11), 1556-1568.

Song, M., Wang, L., Zhao, H., Hang, T., Wen, A., Yang, L., and Jia, L. (2008a). Rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry: assay development, validation and application to a human pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 875(2), 515-521.

Song, X., Zhao, Y., Hou, S., Xu, F., Zhao, R., He, J., and Chen, Q. (2008b). Dual agents loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(2), 445-453.

Souto, E. B., and Muller, R. H. (2007). Rheological and in vitro release behaviour of clotrimazole-containing aqueous SLN dispersions and commercial creams. *Pharmazie*, 62(7), 505-509.

Souto, E. B., Wissing, S. A., Barbosa, C. M., and Muller, R. H. (2004). Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 278(1), 71-77.

Sridhar, V., Wairkar, S., Gaud, R., Bajaj, A., and Meshram, P. (2018). Brain targeted delivery of mucoadhesive thermosensitive nasal gel of selegiline hydrochloride for treatment of Parkinson's disease. *Journal of Drug Targeting*, 26(2), 150-161.

Srinivasan, B., and Kolli, A. R. (2019). Transepithelial/Transendothelial Electrical Resistance (TEER) to measure the integrity of blood-brain barrier. In *Blood-brain barrier*, pp. 99-114. New York: Springer Nature.

Stella, V. (1975). Pro-drugs: An overview and definition. T. Higuchi, and V. Stella (Eds.), In *Pro-drugs as novel drug delivery systems*, pp. 1-115. New York: American Chemical Society.

Suresh, G., Manjunath, K., Venkateswarlu, V., and Satyanarayana, V. (2007). Preparation, characterization, and in vitro and in vivo evaluation of lovastatin solid lipid nanoparticles. *AAPS PharmSciTech*, 8(1), 24.

Suzuki, H., Terasaki, T., and Sugiyama, Y. (1997). Role of efflux transport across the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier on the disposition of xenobiotics in the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 25(2-3), 257-285.

Tabakman, R., Lecht, S., and Lazarovici, P. (2004). Neuroprotection by monoamine oxidase b inhibitors: A therapeutic strategy for Parkinson's disease?. *BioEssays*, 26(1), 80-90.

Tabatt, K., Sameti, M., Olbrich, C., Muller, R. H., and Lehr, C. M. (2004). Effect of cationic lipid and matrix lipid composition on solid lipid nanoparticle-mediated gene transfer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(2), 155-162.

Talati, R., Reinhart, K., Baker, W., White, C. M., and Coleman, C. I. (2009). Pharmacologic treatment of advanced Parkinson's disease: A meta-analysis of COMT inhibitors and MAO-B inhibitors. *Parkinsonism and Related Disorders*, 15(7), 500-505.

Tamburic, S., and Craig, D. Q. M. (1995). An investigation into the rheological, dielectric and mucoadhesive properties of poly(acrylic acid) gel systems. *Journal of Controlled Release*, 37(1-2), 59-68.

Tas, C., Ozkan, C. K., Savaser, A., Ozkan, Y., Tasdemir, U., and Altunay, H. (2006). Nasal absorption of metoclopramide from different Carbopol 981 based formulations: In vitro, ex vivo and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 64(2), 246-254.

Taylor, E. M. (2002). The impact of efflux transporters in the brain on the development of drugs for CNS disorders. *Clinical Pharmacokinetics*, 41(2), 81-92.

Teeranachaideekul, V., Souto, E. B., Junyaprasert, V. B., and Muller, R. H. (2007). Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q(10) - development, physicochemical characterization and in vitro release studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67(1), 141-148.

Thebault, J. J., Guillaume, M., and Levy, R. (2004). Tolerability, safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of rasagiline: A potent, selective, and irreversible monoamine oxidase type B inhibitor. *Pharmacotherapy*, 24(10), 1295-1305.

Thwaites, R. S., Jarvis, H. C., Singh, N., Jha, A., Pritchard, A., Fan, H., and Hansel, T. T. (2018). Absorption of nasal and bronchial fluids: Precision sampling of the human respiratory mucosa and laboratory processing of samples. *Journal of Visualized Experiments*, (131), 56413.

Triplett, M. D., and Rathman, J. F. (2008). Optimization of β-carotene loaded solid lipid nanoparticles preparation using a high shear homogenization technique. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(3), 601-614.

Trombino, S., Russo, R., Mellace, S., Varano, G. E. P., Laganà, A. S., Marcucci, F., and Cassano, R. (2019). Solid lipid nanoparticles made of trehalose monooleate for cyclosporin-A topic release. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 49, 563-569.

Tuğcu-Demiröz F. (2017). Development of in-situ poloxamer-chitosan hydrogels for vaginal drug delivery of benzydamine hydrochloride: Textural, mucoadhesive and in vitro release properties. *Marmara Pharmaeutical Journal*, 21(4), 762-770.

Tung, N. T., Vu, V. D., and Nguyen, P. L. (2019). DoE-based development, physicochemical characterization, and pharmacological evaluation of a topical hydrogel containing betamethasone dipropionate microemulsion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181, 480-488.

Ugazio, E., Cavalli, R., and Gasco, M. R. (2002). Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*, 241(2), 341-344.

Ugwoke, M. I., Agu, R. U., Verbeke, N., and Kinget, R. (2005). Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11), 1640-1665.

Ugwoke, M. I., Verbeke, N., and Kinget, R. (2001). The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(1), 3-21.

Van De Waterbeemd, H., Smith, D. A., Beaumont, K., and Walker, D. K. (2001). Property-based design: optimization of drug absorption and pharmacokinetics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(9), 1313-1333.

Venkateswarlu, V., and Manjunath, K. (2004). Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 95(3), 627-638.

Vivek, K., Reddy, H., and Murthy, R. S. (2007). Investigations of the effect of the lipid matrix on drug entrapment, in vitro release, and physical stability of olanzapine-loaded solid lipid nanoparticles. *AAPS PharmSciTech*, 8(4), E83.

Vyas, K. T., Babbar, A. K., Sharma, R. K., Singh, S., Misra, A. (2005). Intranasal mucoadhesive microemulsions of clonazepam: preliminary studies on brain targeting. Journal of Pharmaceutical Sciences, 95(3), 570-580.

Walker, J. E., Wells, R. E. J., and Merrill, E. W. (1961). Heat and water exchange in the respiratory tract. *The American Journal of Medicine*, 30(2), 259-267.

Wang, Z. Y., Sreenivasmurthy, S. G., Song, J. X., Liu, J. Y., and Li, M. (2019). Strategies for brain-targeting liposomal delivery of small hydrophobic molecules in the treatment of neurodegenerative diseases. *Drug Discovery Today*, 24(2), 595-605.

Watelet, J. B., and Van Cauwenberge, P. (1999). Applied anatomy and physiology of the nose and paranasal sinuses. *Allergy*, 54, 14-25.

Weinreb, O., Amit, T., Riederer, P., Youdim, M. B. H., and Mandel, S. A. (2011). Neuroprotective profile of the multitarget drug rasagiline in Parkinson's disease. *International Review of Neurobiology*, 100, 127-149.

Welin-Berger, K., Neelissen, J. A., and Bergenstahl, B. (2001). The effect of rheological behaviour of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(3), 309-318.

Westphal, M., Ram, Z., Riddle, V., Hilt, D., and Bortey, E. (2006). Gliadel® wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial. *ACTA Neurochirurgica*, 148(3), 269-275.

Williams-Gray, C. H., and Worth, P. F. (2016). Parkinson's disease. *Medicine*, 44(9), 542-546.

Wissing, S. A., Kayser, O., and Muller, R. H. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(9), 1257-1272.

Wohlfart, S., Gelperina, S., and Kreuter, J. (2012). Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 264-273.

Woodley, J. (2001). Bioadhesion: New possibilities for drug administration?. *Clinical Pharmacokinetics*, 40(2), 77-84.

Xia, Q., Hao, X., Lu, Y., Xu, W., Wei, H., Ma, Q., and Gu, N. (2008). Production of drug-loaded lipid nanoparticles based on phase behaviors of special hot microemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 313-314, 27-30.

Yadav, N., Khatak, S., and Sara, U. V. (2013). Solid lipid nanoparticles- A review. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 5, 8-18.

Yan, Q., Matheson, C., Sun, J., Radeke, M. J., Feinstein, S. C., and Miller, J. A. (1994). Distribution of intracerebral ventricularly administered neurotrophins in rat brain and its correlation with trk receptor expression. *Experimental Neurobiology*, 127(1), 23-36.

Yang, R., Gao, R., Li, F., He, H., and Tang, X. (2011). The influence of lipid characteristics on the formation, in vitro release, and in vivo absorption of protein-loaded SLN prepared by the double emulsion process. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 37(2), 139-148.

Youssef, N., Kassem, A. A., Farid, R. M., Ismail, F. A., El-Massik, M. A. E., and Boraie, N. A. (2018). A novel nasal almotriptan loaded solid lipid nanoparticles in mucoadhesive in situ gel formulation for brain targeting: Preparation, characterization and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 548(1), 609-624.

Zaki, N. M., Awad, G. A., Mortada, N. D., and Abd Elhady, S. S. (2007). Enhanced bioavailability of metoclopramide HCl by intranasal administration of a mucoadhesive in situ gel with modulated rheological and mucociliary transport properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(4-5), 296-307.

Zeng, L., Xin, X., and Zhang, Y. (2017). Development and characterization of promising Cremophor EL-stabilized o/w nanoemulsions containing short-chain alcohols as a cosurfactant. *RSC Advances*, 7(32), 19815-19827.

Zhou, Y., Peng, Z., Seven, E. S., and Leblanc, R. M. (2018). Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 270, 290-303.

Zimmermann, E. (2001). Electrolyte- and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions in artificial gastrointestinal media. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 52(2), 203-210.

Zimmermann, E., Souto, E. B., and Müller, R. H. (2005). Physicochemical investigations on the structure of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLNTM) by means of DSC and 1H NMR. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(7), 508-513.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TOKSOY, Mahmut Ozan

Uyruğu : T.C.

Eğitim Derecesi	**Eğitim Birimi**	**Mezuniyet Tarihi**
Doktora	Eczacılık / Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2014
Lise	Kuleli Askeri Lisesi	2008

İş Deneyimi

Yıl	**Yer**	**Görev**
2018 - devam ediyor	Dicle Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2015 - 2018	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2014 - 2014	Medibafra Hastanesi	Eczacı

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Toksoy, M. O., Tugcu-Demiröz, F. ve Tirnaksiz, F. (2013). Evaluation of rheological and textural properties of toothpastes. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(3), 135.

Toksoy, M. O., Tırnaksız, F. F. (2021). Katı lipit nanopartiküller ve beyne özgü ilaç taşıyıcı sistem olarak uygulamaları. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 45(2), doi: 10.33483/jfpau.855788.

Uluslararası Sempozyum, Kongre veya Konferans Bildirileri

Toksoy, M. O., Akkuş-Arslan, Ş. ve Tırnaksız, F. (2016). *Resveratrol Nanoemulsion for Dermal Application: Formulation and Skin Permeation.* 18th International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS), September 18-21, Antalya.

Toksoy, M. O., Tugcu-Demiröz, F. ve Tirnaksiz, F. (2015). *Evaluation of rheological and textural properties of toothpastes*. 1st Gazı Pharmaceutical Technology Symposium (GPSS), November 12-15, Antalya.

Toksoy, M. O., Tugcu-Demiröz, F. ve Tirnaksiz, F. (2018). *Rasagiline Mesylate Loaded In-situ Gel Formulations for Targeting to the Brain via Intranasal Route 1: Development and In-vitro Characterization of Formulations*. 19th International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS), September 17-19, Antalya.

Hobiler

Spor Yapmak, Fotoğraf Çekmek, Kitap Okumak, Müzik Dinlemek

GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..