



**İBUPROFEN YÜKLÜ POLİMERİK
NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI
VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Kalbalayi NAMAZOV

Eskişehir 2022

**İBUPROFEN YÜKLÜ POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN
HAZIRLANMASI VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Kalbalayi NAMAZOV

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gülsel YURTDAS KIRIMLIOĞLU

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Haziran 2022

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Kalbalayi Namazov'un "İbuprofen Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve *İn Vitro* Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 23/06/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Gülsel YURTDAS KIRIMLIOĞLU	
Üye	: Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ	
Üye	: Doç. Dr. N. Başaran MUTLU AĞARDAN	

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ÖZET

İBUPROFEN YÜKLÜ POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE *İN VITRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Kalbalayi NAMAZOV

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2022

Danışman: Doç. Dr. Gülsel YURTDAS KIRIMLIOĞLU

İbuprofen (İBU) dünya genelinde en yaygın kullanılan non steroidal antienflamatuvar (NSAİ) ilaçlardan biri olarak tanımlanmaktadır. İBU iltihabi proseslerde, kronik veya akut ağrılarda, aynı zamanda ateş düşürücü olarak hem çocuklarda hem de yetişkin insanlarda sıkça kullanılmaktadır. NSAİ ilaçların, gastrointestinal sistem (GİS) içerisinde duodenum ve mide üzerine yaptıkları olumsuz etkiler uzun zamandan beri bilinmekte olup, günümüzde de bu konuda çalışmalar devam etmektedir. GİS'in mikrobiyolojik ve fizyolojik yapısı dikkate alındığında oral yol için, hazırlanmış dozaj şeklinin zarar görmeden kolonda hedeflendiği bölgeye ulaşması ve etkin maddeyi salması birçok zorluk içermektedir. Bu tez çalışmasında, kolonda oluşabilecek yaraların iyileştirilmesini sağlayabilmek amacı ile kolona yönelik, İBU'nun Eudragit® S 100 ve farklı molekül ağırlıklı (10000, 45000, 80000) polikaprolakton (PCL) polimerleri kullanılarak nanoçöktürme yöntemiyle polimerik nanopartiküller hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların, *in vitro* özellikleri detaylı olarak incelenmiş ve yapılan analiz sonuçları değerlendirilmiştir. Hazırlanan formülasyonların, kolon pH'sında etkin maddeyi saldığı ve yapılan hücre kültürü deneyleri sonucunda hazırlanan formülasyonların İBU'dan daha yüksek IC₅₀ değerleri verdiği ve yara iyileştirici etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: İbuprofen, Polimerik nanopartikül, Nanoçöktürme, Polikaprolakton, Kolona hedefleme.

ABSTRACT

PREPARATION AND *IN VITRO* EVALUATION OF IBUPROFEN LOADED POLYMERIC NANOPARTICLES

Kalbalayi NAMAZOV

Department of Pharmaceutical Technology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2022

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gülsel YURTDAS KIRIMLIOGLU

Ibuprofen (IBU) is one of the most widely used nonsteroidal anti-inflammatory (NSAI) active substances worldwide. IBU is frequently used in anti inflammatory processes, chronic or acute pain, as well as as an antipyretic in both children and adults. The negative effects of NSAIDs on the duodenum and stomach in the gastrointestinal tract (GIS) have been known for a long time, and studies are still ongoing on this subject. Considering the microbiological and physiological structure of the GIS, there are many difficulties for the dosage form prepared for the oral route to reach the targeted area in the colon without being damaged and to release the active substance. In this thesis, polymeric nanoparticles were prepared by nanoprecipitation method by using Eudragit® S 100 of IBU and polycaprolactone (PCL) polymers with different molecular weights (10000, 45000, 80000) for the colon in order to heal the wounds that may occur in the colon. The *in vitro* properties of the prepared formulations were examined in detail and the results of the analysis were evaluated. it was concluded that the prepared formulations released the active substance at pH of the colon and the prepared formulations had a wound-healing effect on the cell culture.

Keywords: Ibuprofen, Polymeric nanoparticles, Nanoprecipitation, Polycaprolactone, Colon targeting.

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu uzun ve zorlu yolda her zaman değerli zamanını ayırarak tüm sorularımı büyük bir ilgi ve sabırla yanıtlayan, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen, değerli bilgilerini benimle paylaşan, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve sonuçlanmasında desteğini ve ilgisini benden esirgemeyen, bilgilendirmeleri ve yönlendirmeleri ile çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren ve bana verdiği değerli bilgilerden meslek hayatımda da her zaman faydalanacağımı düşündüğüm ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum çok kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Gülsel YURTDAŞ KIRIMLIOĞLU'na teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmam aşamasında sitotoksiste çalışmasının gerçekleştirilmesinde göstermiş olduğu yardımdan dolayı Dr. Bio. Şennur GÖRGÜLÜ'e ve FT-IR ve NMR analizlerinin gerçekleştirilmesinde vermiş olduğu destekten dolayı Öğr. Gör. Serkan LEVENT'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca göstermiş oldukları anlayış ve yardımlarından dolayı, Farmasötik Teknoloji Bölümü'nün tüm hocalarına ve üyelerine teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamda kullandığım etkin maddenin temininde gösterdikleri yardımdan ötürü Drogan İlaç'a ayrıca teşekkürlerimi sunuyorum.

Eskişehir'deki yaşamım süresince göstermiş oldukları her türlü destekten dolayı Eskişehir Azerbaycanlılar Derneği'ne teşekkürlerimi sunuyorum.

Ve son olarak çalışmam boyunca uzakta olmalarına rağmen sevgilerini her zaman hissettiğim, beni bu günlere sevgi ve saygı ile yetiştirerek getiren maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Kalbalayi NAMAZOV

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

Kalbalayi NAMAZOV

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	2
2.1. İbuprofen	2
2.1.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri	2
2.1.2. İbuprofenin farmakolojik özellikleri	2
2.1.3. İbuprofenin miktar tayini yöntemleri.....	5
2.1.4. İbuprofen içeren ticari preparatlar	6
2.2. Kolona ilaç taşınması	9
2.2.1. Kolonun yapısı ve fizyolojisi.....	12
2.2.2. Kolona hedefleme amacıyla tasarlanan dozaj şekilleri	13
2.2.2.1. <i>pH'ya Duyarlı Sistemler</i>	14
2.3. Polimerik Nanopartiküller (PNP)	14
2.3.1. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanma yöntemleri	15
2.3.1.1. <i>Emülsifikasyon - çözücü buharlaştırma yöntemi</i>	16
2.3.1.2. <i>Faz ayrımı (Koaservasyon)</i>	17
2.3.1.3. <i>Nanoçöktürme yöntemi</i>	18
2.3.1.4. <i>Emülsifikasyon-çözücü difüzyonu</i>	19
2.3.1.5. <i>Emülsifikasyon-ters tuzla çöktürme</i>	20
2.3.1.6. <i>Mikroaktışkan teknolojisi</i>	20

	Sayfa
2.3.1.7. Elektroegirme	21
2.3.1.8. Püskürterek kurutma	21
2.3.1.9. Diyaliz yöntemi	22
2.3.1.10. Süperkritik sıvı teknolojisi	23
2.3.2. Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu	23
2.3.2.1. Parçacık büyüklüğü	23
2.3.2.2. Zeta potansiyel	24
2.3.2.3. Parçacık şekli ve yüzey özellikleri	24
2.3.2.4. pH analizi	25
2.3.2.5. Yüklenme etkinliği	25
2.3.2.6. Katı hal analizleri	25
2.3.2.6.1. NMR Analizi	25
2.3.2.6.2. FTIR Analizi	26
2.3.2.6.3. Termal Analiz.....	26
2.3.2.7. İn vitro salım.....	26
2.3.3. Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan polimerler.....	26
2.3.3.1. Çalışmamızda kullanılan polimerler.....	27
2.3.3.1.1. Polikaprolakton.....	27
2.3.3.1.2. Eudragit ® S 100.....	29
2.3.4. Polimerik nanopartiküllerin üstünlükleri.....	30
3. GEREÇLER.....	31
2.1. Kullanılan maddeler.....	31
2.2. Kullanılan Cihazlar.....	33
4. YÖNTEMLER.....	35
4.1. İbuprofen İle Yapılan Çalışmalar.....	35
4.1.1. Parçacık şekli ve yüzey özellikleri.....	35
4.1.2. Termal analiz.....	35
4.1.3. Infrared (FT-IR) analizi.....	35
4.1.4. Nükleer manyetik rezonans (NMR) analizi.....	35
4.1.5. İBU'nun yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile miktar tayini ve validasyon çalışmaları.....	36
4.1.5.1. Doğrusallık.....	36

	<u>Sayfa</u>
4.1.5.2. Doğruluk.....	37
4.1.5.3. Kesinlik.....	37
4.1.5.4. Duyarlılık.....	38
4.1.5.5. Seçicilik.....	38
4.1.6. Çalışma şartlarında kararlılık.....	39
4.1.6.1. Formülasyon hazırlama koşullarındaki kararlılık.....	39
4.1.6.2. Etkin madde miktar tayini analizi için örnek hazırlama koşullarındaki kararlılık.....	39
4.1.6.3. İn vitro salım ortamı koşullarındaki kararlılık.....	39
4.2. Polimerik Nanopartikül Formülasyonu Çalışmaları.....	39
4.2.1. Polimerik nanopartikül formülasyonu geliştirme Çalışmaları.....	39
4.2.2. Polimerik nanopartikül formülasyonu geliştirmede karakterizasyon çalışmaları.....	41
4.2.1.2. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı.....	41
4.2.2.2. Zeta potansiyel.....	41
4.2.3. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması	41
4.3. Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu.....	44
4.3.1. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı.....	44
4.3.2. Zeta potansiyel.....	44
4.3.3. Enkapsülasyon etkinliği (% EE.....	44
4.3.4. Termal analiz.....	44
4.3.5. FT-IR analizi.....	45
4.3.6. Nükleer manyetik rezonans (NMR) analizi.....	45
4.4. İn vitro salım.....	45
4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	46
4.5.1. Malzeme sterilizasyonu.....	46
4.5.2. Hücrelerin besiyerlerinin hazırlanması.....	47
4.5.3. Stok aktivasyonu.....	47

	<u>Sayfa</u>
4.5.4. Hücrelerin pasajlanması ve stoklanması.....	47
4.5.5. MTT yöntemi.....	48
4.5.6. Yara iyileştirici etki deneyi.....	50
5. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	51
5.1. İbuprofen İle Yapılan Çalışmalar.....	51
5.1.1. Parçacık şekli ve yüzey özellikleri.....	51
5.1.2. Termal analiz.....	51
5.1.3. FT-IR analizi.....	52
5.1.4. ¹ H-NMR analizi.....	53
5.1.5. İBU'nun yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile miktar tayini ve validasyon çalışmaları.....	54
5.1.5.1. Doğrusallık.....	54
5.1.5.2. Doğruluk.....	57
5.1.6.3. Kesinlik.....	58
5.1.6.4. Duyarlılık.....	60
5.1.6.5. Seçicilik.....	60
5.1.6. Çalışma şartlarında kararlılık.....	68
5.1.6.1. Formülasyon hazırlama koşullarındaki kararlılık.....	68
5.1.6.2. Etkin madde miktar tayini analizi için örnek hazırlama koşullarındaki kararlılık.....	69
5.1.6.3. İn vitro salım ortamı koşullarındaki kararlılık.....	69
5.2. Polimerik Nanopartikül Formülasyonu Çalışmaları.....	69
5.2.1. Polimerik nanopartikül formülasyonu geliştirme çalışmaları.....	69
5.2.2.1. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı.....	70
5.2.2.2. Zeta potansiyel.....	71
5.2.2. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması.....	72
5.3. Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu.....	72
5.3.1. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı.....	72

	<u>Sayfa</u>
5.3.2. Zeta potansiyel.....	74
5.3.3. Enkapsülasyon etkinliği (% EE).....	75
5.3.4. Termal analiz.....	76
5.3.5. FT-IR analizi.....	80
5.3.6. ¹ H-NMR analizi.....	85
5.4. <i>İn vitro</i> salım çalışmaları.....	89
5.5. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	93
5.5.1. MTT testi.....	93
5.5.2. Yara iyileştirici etki deneyi.....	102
6. SONUÇ.....	105
KAYNAKÇA.....	107
EK	
Poster Bildiriler	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. İbuprofen içeren ticari preparatlar	7
Tablo 2.2. Gİ kanaldan ilaçların geçiş süreleri ve pH'sı.....	11
Tablo 2.3. Enterik kaplama için kullanılan bazı polimerler ve duyarlı oldukları pH değerleri	15
Tablo 2.4. İlaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması için kullanılan polimerler	27
Tablo 4.1. HPLC Analiz koşulları.....	36
Tablo 4.2. Polimerik nanopartikül formülasyonu geliştirme çalışmaları.....	40
Tablo 4.3. Optimum İBU içeren PNP formülasyonları bileşenleri ve hazırlama koşulları	42
Tablo 4.4. Optimum plasebo PNP formülasyonları bileşenleri ve hazırlama koşulları ..	42
Tablo 5.1. Seri 1 HPLC sonuçları ve değerlendirilmesi	54
Tablo 5.2. Seri 2 HPLC sonuçları ve değerlendirilmesi	55
Tablo 5.3. Seri 3 HPLC sonuçları ve değerlendirilmesi	55
Tablo 5.4. Doğrusallık hesabı için 3 seriden elde edilen ortalama Alan/Rt değerleri ...	56
Tablo 5.5. 20 µg/mL konsantrasyon için doğruluk çalışması	57
Tablo 5.6. 50 µg/mL konsantrasyon için doğruluk çalışması	57
Tablo 5.7. 80 µg/mL konsantrasyon için doğruluk çalışması	58
Tablo 5.8. Üç farklı konsantrasyonda tekrar edilebilirlik çalışması	58
Tablo 5.9. Üç farklı konsantrasyonda tekrar edilebilirlik çalışması 2.	59
Tablo 5.10. Üç farklı konsantrasyonda tekrar edilebilirlik çalışması 3.	59
Tablo 5.11. İBU'nun gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları	60
Tablo 5.12. Polimerik nanopartikül formülasyonu geliştirme çalışmalarında hazırlanan formülasyonların.....	70

Tablo 5.13. Polimerik nanopartikül formülasyonu geliştirme çalışmalarında hazırlanan formülasyonların.....	71
Tablo 5.14. Optimum İBU içeren PNP formülasyonlarının PB ve dağılımı değerleri ..	73
Tablo 5.15. Optimum plasebo PNP formülasyonlarının PB ve dağılımı değerleri.....	73
Tablo 5.16. Optimum İBU içeren PNP formülasyonlarının ZP değerleri.....	74
Tablo 5.17. Optimum plasebo PNP formülasyonlarının ZP değerleri	74
Tablo 5.18. Hazırlanan İBU içeren optimum PNP formülasyonlarının % EE değerleri	76
Tablo 5.19. İBU ve İBU içeren PNP formülasyonlarına ait <i>in vitro</i> salım verileri.....	90
Tablo 5.20. CCD-19Lu hücrelerinde İBU 'nun MTT analizi sonucu % canlılık değerleri	94
Tablo 5.21. CCD-19Lu hücrelerinde F1 ve P1 formülasyonlarının MTT analizi sonucu % canlılık değerleri.....	94
Tablo 5.22. CCD-19Lu hücrelerinde F2 ve P2 formülasyonlarının MTT analizi sonucu % canlılık değerleri.....	95
Tablo 5.23. CCD-19Lu hücrelerinde F3 ve P3 formülasyonlarının MTT analizi sonucu % canlılık değerleri.....	95
Tablo 5.24. CCD-19Lu hücrelerinde F4 ve P4 formülasyonlarının MTT analizi sonucu % canlılık değerleri.....	96
Tablo 5.25. Formülasyonların CCD-19Lu hücreleri için IC ₅₀ değerleri	97
Tablo 5.26. hTERT-HPNE hücrelerinde İBU'nun MTT analizi sonucu % canlılık değerleri.....	98
Tablo 5.27. hTERT-HPNE hücrelerinde F1 ve P1 formülasyonlarının MTT analizi sonucu % canlılık değerleri	98
Tablo 5.28. hTERT-HPNE hücrelerinde F2 ve P2 formülasyonlarının MTT analizi sonucu % canlılık değerleri	99
Tablo 5.29. hTERT-HPNE hücrelerinde F3 ve P3 formülasyonlarının MTT analizi sonucu % canlılık değerleri	99

Tablo 5.30. hTERT-HPNE hücrelerinde F4 ve P4 formülasyonlarının MTT analizi sonucu % canlılık değerleri	100
--	-----

Tablo 5.31. Formülasyonların hTERT-HPNE hücreleri için IC ⁵⁰ değerleri.....	101
---	-----



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. İbuprofenin açık formülü.....	2
Şekil 2.2. Oral uygulama ile çeşitli dozaj şekillerinden etkin madde salım profilleri....	10
Şekil 2.3. Kolonun fizyolojik yapısı.....	12
Şekil 2.4. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması amacıyla kullanılan farklı tekniklerin sistematik görünümü	16
Şekil 2.5. Emülsifikasyon - çözücü buharlaştırma yönteminin çizimsel gösterimi.....	17
Şekil 2.6. Emülsifikasyon-çözücü difüzyon tekniğinin çizimsel gösterimi	19
Şekil 2.7. Diyaliz yöntemi ile nanopartikül oluşumunun şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.8. Eudragit® S 100'ün kimyasal yapısı.....	29
Şekil 4.1. Nanoçöktürme yöntemi ile nanopartikül oluşumunun şematik gösterimi.....	43
Şekil 4.2. <i>İn vitro</i> salım çalışmasına ilişkin deney fotoğrafı	46
Şekil 5.1. İBU'ya ait SEM görüntüsü.....	51
Şekil 5.2. İBU'nun termal analizine ait termogram.....	52
Şekil 5.3. İBU'ya ait FT-IR spektrumu	53
Şekil 5.4. İBU'ya ait ¹ H-NMR spektrumu.....	53
Şekil 5.5. İBU'ya ait doğrusallık grafiği	56
Şekil 5.6. İBU'nun asetonitrildeki çözeltisine ait kromatogramı	61
Şekil 5.7. Mobil faz'a ait kromatogram (a), % 50 asetonitril'e ait kromatogram (b), İBU'nun asetondaki.....	62
Şekil 5.8. İBU'nun pH 1.2'deki çözeltisine ait kromatogram (e), pH 1.2'e ait kromatogram (f), İBU'nun.....	63
Şekil 5.9. İBU'nun pH 7.4'deki çözeltisine ait kromatogram (i), pH 7.4'e ait kromatogram (j)	64
Şekil 5.10. F1, P1, F2 ve P2 formülasyonlarına ait kromatogramlar	65

Şekil 5.11. F3, P3, F4 ve P4 formülasyonlarına ait kromatogramlar	66
Şekil 5.12. F5, P5, F6 ve P6 formülasyonlarına ait kromatogramlar	67
Şekil 5.13. F7 ve P7 formülasyonlarına ait kromatogramlar.....	68
Şekil 5.14. İBU (a), F1 (b), P1 (c), F2 (d) ve P2 (e)'ye ait DSC termogramları	77
Şekil 5.15. İBU (a), F3 (f), P3 (g), F4 (h) ve P4 (i)'e ait DSC termogramları	78
Şekil 5.16. İBU (a), F5 (j), P5 (k), F6 (l) ve P6 (m)'ya ait DSC termogramları	79
Şekil 5.17. İBU (a), F7 (n) ve P7(p)'ye ait DSC termogramları	80
Şekil 5.18. İBU (a), F1 (b), P1 (c), F2 (d) ve P2 (e)'ye ait FT-IR spektrumları	81
Şekil 5.19. İBU (a), F3 (f), P3 (g), F4 (h) ve P4 (i)'e ait FT-IR spektrumları.....	82
Şekil 5.20. İBU (a), F5 (j), P5 (k), F6 (l) ve P6 (m)'ya ait FT-IR spektrumları.....	83
Şekil 5.21. İBU (a), F7 (n) ve P7(p)'ye ait FT-IR spektrumları.....	84
Şekil 5.22. İBU (a), F1 (b), P1 (c), F2 (d) ve P2 (e)'ye ait ¹ H-NMR spektrumları	86
Şekil 5.23. İBU (a), F3 (f), P3 (g), F4 (h) ve P4 (i)'e ait ¹ H-NMR spektrumları	87
Şekil 5.24. İBU (a), F5 (j), P5 (k), F6 (l) ve P6 (m)'ya ait ¹ H-NMR spektrumları	88
Şekil 5.25. İBU (a), F7 (n) ve P7(p)'ye ait ¹ H-NMR spektrumları	89
Şekil 5.26. GİS'in farklı pH'larında İBU ve İBU içeren PNP formülasyonlarına ilişkin <i>in vitro</i> salım profilleri	91
Şekil 5.27. İBU ve İBU içeren PNP formülasyonlarına ilişkin <i>in vitro</i> salım profilleri (GİS simülasyonu) (A:72 saat, B: 24 saat) (0-2 saat pH 1.2, 2-5 saat pH 6.8, 5-72 saat pH 7.4).....	92
Şekil 5.28. CCD-19Lu hücrelerinde İBU ve İBU yüklü formülasyonların MTT analizi sonucu % canlılık.....	96
Şekil 5.29. CCD-19Lu hücrelerinde plasebo formülasyonların MTT analizi sonucu % canlılık.....	97
Şekil 5.30. hTERT-HPNE hücrelerinde İBU ve İBU yüklü formülasyonların MTT analizi sonucu % canlılık.....	100

Şekil 5.31. hTERT-HPNE hücrelerinde plasebo formülasyonların MTT analizi sonucu % canlılık.....	101
Şekil 5.32. Kontrol, İBU ve İBU içeren PNP formülasyonlarının yara iyi edici etkisinin incelenmesine ilişkin 0. saat, 12. saat ve 24. saate ilişkin mikroskop görüntüleri.....	103
Şekil 5.33. Kontrol grubu ve plasebo PNP formülasyonlarının yara iyi edici etkisinin incelenmesine ilişkin 0. saat, 12. saat ve 24. saate ilişkin mikroskop görüntüleri.....	104

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AC	: Aseton
AEM	: Analitik elektron mikroskop
AFM	: Atomik kuvvet elektron mikroskop
ATCC	: Hücre Kültür Besiyeri
COX	: Siklooksijenaz
DCM	: Diklorometan
DMF	: Dimetilformamit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DMEM	: Hücre Kültür Besiyeri
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
dk	: Dakika
EE	: Enkapsülasyon Etkinliği
FBS	: Fötal Dana Serum
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Analizi
Gİ	: Gastrointestinal
GİS	: Gastrointestinal sistem
¹ H-NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Analizleri
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Kılavuzu
İBU	: İbuprofen
İTS	: İlaç Taşıyıcı Sistem
LC-MC	: Sıvı kromatografi-kütle spektrometri
LOD	: Saptama Sınırı
LOQ	: Miktar Tayini Sınırı
NP	: Nanopartiküller
NSAİİ	: Non steroidal antienflamatuvar ilaçlar
PB	: Parçacık Boyutu
PBS	: Fosfat tamponu
PNP	: Polimerik nanopartiküller

PCL	: Polikaprolakton
PG	: Prostaglandin
PLGA	: Poli laktik- <i>ko</i> - glikolik asit
rhEGF	: İnsan epidermal büyüme fakötrü
<i>S.aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	: Taramalı elektron mikroskop
SH	: Standart Hata
SC-CO ₂	: Süper Kritik Karbondioksit
TEM	: Geçirimli elektron mikroskop
UPLC	: Ultra performanslı sıvı kromatografisi
YEM	: Yüzey etkin madde
ZP	: Zeta Potansiyel

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İbuprofen (İBU) dünya genelinde en yaygın kullanılan non-steroidal antienflamatuvar (NSAİ) ilaçlardan biri olarak tanımlanmaktadır. İBU iltihabi proseslerde, kronik veya akut ağrılarda, aynı zamanda ateş düşürücü olarak hem çocuklarda hem de yetişkin insanlarda sıkça kullanılmaktadır. NSAİ ilaçların kullanımı, gastrointestinal sistem (GİS) içerisinde duodenum ve mide üzerine olumsuz etkiler yaptıkları uzun zamandan beri bilinmektedir. Günümüzde de bu konu üzerine çalışmalar devam etmektedir.

Kolona hedeflenmiş ilaç taşıyıcı sistemlerde oral yol çok tercih edilen ve en uygun yol olsa da aynı zamanda başka yollar da kullanılmaktadır. İntrarektal uygulama kolona ilaç hedeflemeye en kısa yoldur. Buna rağmen intrarektal uygulamada kolonun proksimal kısmına ulaşmak daha zordur ve hastalar için de rahatsız edici olabilmektedir.

Oral yoldan uygulama birçok etkin maddenin vücuda verilmesi için en fazla tercih edilen ve en geniş uygulama alanına sahip yoldur. Ancak oral uygulamada her zaman istenilen terapötik sonuç sağlanamamaktadır. Bunun nedeni, oral yoldan uygulanan bazı dozaj formlarının mide asidi ve gastrointestinal (Gİ) kanal enzimlerine karşı duyarlı olmalarıdır. GİS'in mikrobiyolojik ve fizyolojik yapısı dikkate alındığında oral yol için, hazırlanmış dozaj şeklinin herhangi bir zarara uğramadan kolonda hedeflendiği bölgeye ulaşması ve aktif maddeyi salması birçok zorluk içermektedir. Kolona özgü ilaç taşıyıcı sistemler geliştirirken, Gİ kanalın farklı bölümlerinde farklı pH değerleri olduğu göz önüne alınmaktadır. Bu amaçla yapılan en başarılı proses, etkin maddenin yüksek pH'ya duyarlı polimerle kaplanmasıdır. Kolona yönelik kaplamada pratik, basit ve maliyetinin düşük olması nedeni ile polimer olarak Eudragit® yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda, nanoçöktürme yöntemi ile Eudragit® S100 (ES 100) ve Polikaprolakton (PCL) polimeri kullanılarak, kolonda oluşabilecek yaraların iyileştirilmesine yardımcı olmak amacı ile kolona hedefli antienflamatuvar etkin madde içeren nanoboyutlu polimerik nanopartiküllerin (PNP) hazırlanması ve *in vitro* karakterizasyon çalışmalarının yapılması planlanmıştır.

Kolona yönelik olarak oral yoldan güvenle uygulanabilecek, etkin maddenin kolona taşınmasını sağlayabilecek güvenilir ve etkin formülasyonların hazırlanması ve karakterizasyonunun ardından hücre kültürü ve yara iyileştirici etki çalışmaları da yapılması planlanmıştır.

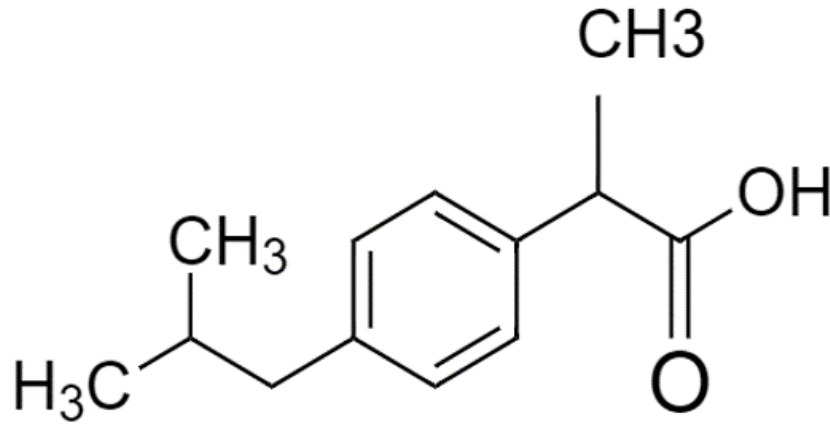
2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. İbuprofen

İbuprofen (İBU) propiyonik asitten türetilen NSAİ bir ilaçtır (Filippa ve Gasull, 2013). Kimyasal okunuşu α -Metil-4-(izobutil) fenilasetik asit, ($\pm$)-2-(4-izobutilfenil) propanoik asit şeklinde olan İBU'nun (Kahraman 2016), yan etkileri aspirin ile karşılaştırıldığında daha az olduğu için, aspirine alternatif olarak gösterilen propiyonik asit türevlerinin ilk üyesidir (Bushra vd., 2010).

2.1.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri

Molekül ağırlığı 206.28 g/mol olan İBU'nun, kapalı formülü $C_{13}H_{18}O_2$ şeklinde gösterilmektedir. Kimyasal okunuşu ise 2-(p-izobutil) fenil propanoik asit şeklindedir. İBU rasemik karışımdır ve molekül yapısında bulunan kiral merkezden dolayı iki farklı enantiyomeri bulunmaktadır. Bu enantiyomerler, R- ve S- diye isimlendirilmektedir (Kahraman 2016). Literatürde İBU'nun erime derecesi $75-77^{\circ}C$ olarak yer almaktadır (http-1). İBU'nun açık formülü Şekil 2.1' de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. İbuprofenin açık formülü (http-2)

2.1.2. İbuprofenin farmakolojik özellikleri

NSAİ ilaçlara; antienflamatuvar, antipiretik ve analjezik etki gösteren ilaçlar dahildir (Kahraman 2016).

İBU dünya genelinde en yaygın kullanılan NSAİ ilaçlardan biridir (Rainsford 2009). Günümüzde de iltihabi proseslerde, kronik veya akut ağrılarda, aynı zamanda ateş düşürücü olarak hem çocuklarda hem de yetişkin insanlarda İBU içeren preparatlar sıkça kullanılmaktadır (Alkan, 2019).

İBU sentezinden önceki yıllarda, romatoid artrit tedavisinde kortikosteroidlerin kullanılması ciddi sorunlar yaratmaktaydı ve aynı zamanda diğer NSAİ ilaçların kullanılması durumunda, mide kanaması gibi yan etkiler görülmekteydi. Bu etkilerin İBU da daha az olması onun dünya genelinde kolayca kabul edilmesinde başlıca neden olmuştur (Busson, 1986).

İBU, insanlarda antienflamatuvar etkili bir ilaç olarak 1969'da İngiltere'de (Rainsford 2009), 1974'te ise Amerika Birleşik Devletleri'nde tanıtılmaya başlanmıştır. İBU uygulanırken rasemat olarak uygulanmakta fakat farmakolojik etkisinden sadece S-formunun sorumlu olduğu bilinmektedir (Augusti vd., 2005).

İBU'nun klinik ortamda yapılan ilk deneyleri, Edinburgh Kuzey Genel Hastanesi Romatizmal Hastalıklar Birimi'nden Dr. Tom Chalmers tarafından gerçekleştirilmiştir. Kendisi romatoid artrit şikayetleri olan, altı hasta üzerinde deneylerini gerçekleştirmiştir. İBU'nun ilk klinik denemelerinde, hastalara 600-900 mg/gün ilaç verilmiş olup, hastaların birkaçında gaitada gizli kan olduğu görülmüştür. Fakat bu değerler, antienflamatuvar dozda aspirin kullanan hastalarda gözlenenden oldukça düşük oranda bulunmuştur (Rainsford, 1999).

İBU'nun *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*)'a karşı bakterisidal ve bakteriyostatik etkileri bilinmektedir. Çeşitli bilim insanları tarafından, metisiline dirençli *S.aureus* enfeksiyonlarının oluşturduğu hastalıkların tedavisinde İBU'nun denendiği bildirilmiştir. İBU'nun emilimi oral yoldan verildiğinde daha hızlı gerçekleşmektedir. Oral yolla alındıktan 1-2 saat sonra doruk serum konsantrasyonlarına ulaşmaktadır (Bushra ve Aslam, 2010).

İBU oral yolla alındıktan sonra, ilacın % 80'i bağırsaklar esas olmakla GI kanaldan emilmektedir. İlaç karaciğerde metabolize edilir ve metabolitlerinin büyük kısmı idrarla atılırken, % 10'u değişmeden kalır (Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd., 2020).

İBU'nun plazma albüminine bağlanması, sıklıkla verildiği doza bağlıdır. Yapılan araştırmalar incelediğinde, ilacın 600 mg ve üzeri dozlarda hastalara verildiğinde, ilacın

plazma albüminine bağlanmasında önemli derecede artış görülmüştür. İBU alındıktan sonra konjugatların çok az kısmı değişmeden idrarla atılmaktadır. Böbrek fonksiyonlarına bağlı olarak konjugatların atılımı farklılık gösterebilir ve böbrek hastalığı olan insanlarda konjugatların birikimi meydana gelmektedir. İBU'nun emilim kinetiğinin değişmesine neden olan diğer faktörler ise, kistik fibrozlar, karaciğer hastalıkları ve akciğer hastalıkları örnek gösterilmektedir. Yapılan deneylerden alınan sonuçlar, İBU'nun anne sütüne geçme miktarının çok az olduğunu göstermiştir (Davies, 2012).

İBU farklı ağrı tiplerinde etkili en güçlü prostaglandin (PG) sentezi inhibitörüdür. İBU'nun farmakolojik aktivitesinin çoğunu S⁺ enantiyomeri taşımaktadır ve aynı zamanda siklooksijenaz (COX) enzimleri olan COX1 ve COX2 aktivitesindeki rolü üstlenmektedir. Oral uygulamalarda İBU sitokrom P450 enzim sistemi genlerinden olan CYP2C9 yoluyla karaciğerde oksidatif metabolizmaya uğradıktan sonra, glukuronid-konjugat metaboliti şeklinde idrar yolu ile vücuttan atılmaktadır (Shin vd., 2017).

İBU hafif ağrıları ve ateşi olan 20 ila 45 yaş aralığındaki hastaların tedavisinde 200-400 mg doz olmak şartıyla her 4-6 saat aralığında 3 günden fazla olmayacak şekilde kullanılmaktadır. Artritli hastalarda ise hastalığın ağırlık derecesine göre 300-800 mg olmakla günde 3-4 kez uygulanmaktadır ve bu tedavi süresi 10 günden fazla devam etmemelidir. Çocukların tedavisinde ise İBU genellikle 6 aydan 12 yaşa kadar olan çocuklarda ateş ve ağrı tedavisi için, çocuğun kilosu hesaplanmakla, 6 ila 8 saat aralığında 5-10 mg/kg olmak şartıyla uygulanmaktadır. Günlük maksimum doz ise, 40 mg/kg'dan fazla olmamalıdır (Bashyal, 2018).

İBU kullanımında görmede bozukluk, renklerin belirlenmesinde karışıklık gibi yan etkiler görülürse, ilacın kullanılması sonlandırılmalı ve hasta doktor kontrolünden geçmelidir. Emziren annelerde ve hamileliğin 1. ve 2. trimesterinde İBU'nun kullanımı, yarar/risk ilişkisi belirlendikten sonra olmalıdır (Kızılelma, 2019).

NSAİ ilaçların, GİS içerisinde duodenum ve mide üzerine yaptıkları olumsuz etkiler uzun zamandan beri bilinmekte olup, günümüzde de bu konuda çalışmalar devam etmektedir. GİS'in diğer bölümlerine NSAİ ilaçların etkisi genellikle vaka sunumları olarak değerlendirilmekte olup patogenezi ve tedavisi ile ilgili kesin bir görüş ortaya konulmamıştır. Dispeptik yakınmalar başta olmak üzere GİS ile ilgili her türlü semptom, NSAİ ilaçların kullanımı ile ilişkili olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda NSAİ ilaç kullanan hastaların %10-20'sinde dispeptik yakınmalar oluşabileceği görülmüştür. NSAİ

ilaçların uzun süre kullanılmasını gerektiren romatoid artrit gibi hastalıkların tedavisi sırasında, dispeptik yakınmalar nedeniyle hastaların %5-15'inde ilacın kesildiği görülmektedir (Eminler vd., 2014).

İBU, kusması ve ateşi olan çocuklarda antipiretik olarak kullanıldığında, üst GİS mukozasında hafif ülserler ve derin erozyona kadar geniş spektrumda hasarlar verebilmektedir. Mukozal hastalık riskini artıran faktörlere, ilacın sık ve yüksek dozlarda verilmesi ve aynı zamanda aç alınması örnek gösterilebilmektedir (Canan, 2018).

2.1.3. İbuprofenin miktar tayini yöntemleri

Analitik yöntem validasyonunun başlıca amacı, yöntemin sonuçta planlanmış amaca uygun olduğunu göstermek, güvenilirliğini ve doğruluğunu verilerle kanıtlamaktır.

İBU'nun miktar tayininde, ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC) (Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd., 2020), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), UV-görünür bölge absorpsiyon spektrofotometrisi, sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS) (Kızılelma, 2019) ve gaz kromatografisi (Jalbani vd., 2020) gibi çeşitli analitik yöntemlerin kullanıldığı bildirilmiştir.

İBU'nun tayininde HPLC yöntemi çok önemli yer tutmaktadır. Thakkar ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, pankreas kanserine önlemeye yönelik olarak geliştirilen İBU yüklü katı lipid nanopartiküllerde (NP) İBU miktar tayini, asetonitril ve %1 orto-fosforik asit (60:40) içeren mobil faz bileşimi ve fotodiyot dizi dedektörü kullanılarak 220 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir (Thakkar vd., 2015).

Yapılan diğer bir çalışmada İBU'nun PLGA polimerine yüklenmesi ile hazırlanan NP'lerinin kolona ilaç taşıyıcı sistem olarak tasarlanması planlanmıştır. Yüklenme etkinliği, *in situ* permeabilite ve *in vivo* deneylerde İBU miktar tayini, 225 nm dalgaboyunda floresan dedektör kullanılarak HPLC ile gerçekleştirilmiştir (Lozoya vd., 2018).

Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd.'lerinin gerçekleştirdiği bir çalışmada ise, heksaklorosiklotrifosfazen/ oktaklorosiklotetrafosfazen ile çapraz bağlı İBU yüklü polifosfazen mikrokürelerinin sentezlendiği çalışmada, İBU'nun miktar tayini UPLC

kullanılarak 225 nm dalga boyunda fotodiyot dizi dedektörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Yurtdaş-Kırımlioğlu vd., 2021).

İBU yüklü Eudragit® RS 100 ve oktadesilamin ile modifiye edilmiş PLGA NP'lerinin apoptoz üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmada ULPC yöntemi ile 250 nm dalga boyunda fotodiyot dizi dedektörü kullanılarak İBU'nun miktar tayini yapılmıştır (Yurtdaş-Kırımlioğlu vd., 2020).

Tablet formlarında İBU'nun kantitatif analizinin fourier dönüşümlü kızıl ötesi (FT-IR) spektroskopisi ile gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Matkovic vd., 2005).

Yeni bir kinetik spektrofotometrik yöntem ile farmasötik formülasyonlarda ve insan serumunda İBU miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Verimli, ucuz ve fazla sayıda örneğin analizi için uygun olan bu yöntemde analiz süresinin kısa olması ve oda sıcaklığında yapılabilmesi yöntemin üstünlükleri arasındadır (Mitić vd., 2008).

Yapılan diğer bir çalışmada ise insan idrarında İBU'nun tayini için ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi ile birleştirilerek, mikro ekstraksiyon ve emülsifikasyona bağlı verimli, hızlı ve basit olan yöntem geliştirilmiştir (Magiera ve Gülmez, 2014).

2.1.4. İbuprofen içeren ticari preparatlar

İBU içeren ticari preparatlar **Tablo 2.1**'de sunulmuştur. Görüldüğü üzere İBU farklı yaş gruplarında kullanılmak üzere, farklı farmasötik şekillerde piyasada mevcuttur.

Tablo 2.1. İbuprofen içeren ticari preparatlar (http-3)

Preparat İsmi	Firma İsmi	Farmasötik Şekli	Kullanım Amacı
Advil®	GlaxoSmithKline aTüketici Sağlığı A.Ş.	Liqui-gel kapsul	Eklemlerdeki romatizmal apseli hastalıkların (osteoartrit, romatoid artrit, ve ankilozan spondilit) belirtileri ve oluşturduğu zararların tedavisi, gut hastalığında görülen eklemde oluşan irini, akut kas-iskelet ağrılarının hafifletilmesi, cerrahi operasyon sonrası yaranabilecek ağrı, adet döneminde görülen ağrılarının tedavisi (primer dismenore)
Apiorks®	Bilim İlaç San. Ve Tic. A.Ş.	200 mg İBU içeren tablet	Nezle ve grip zamanı oluşan burun tıkanıklığı, ateş, baş ağrısı, vücut ağrıları ve akciğerde oluşan ağrılar
Apiorks®	Bilim İlaç San. Ve Tic. A.Ş.	100 mg/5ml İBU içeren süspansiyon	Yaşı 6 aydan büyük çocuklarda çıkan ateşin düşürülmesi, hafif ağrılarının giderilmesi, çocuklukta oluşan romatizmal eklem hastalığı (juvenil artrit) belirtilerinin tedavisi.
Artril®	Sanofi Aventis	% 5 İBU içeren jel	Eklemlerdeki romatizmal apseli hastalıkların (osteoartrit, romatoid artrit, ve ankilozan spondilit) belirtileri ve oluşturduğu zararların tedavisi
Artril®	Sanofi Aventis	400 mg İBU içeren tablet 600 mg İBU içeren tablet	Eklemlerdeki romatizmal apseli hastalıkların (osteoartrit, romatoid artrit, ve ankilozan spondilit) belirtileri ve oluşturduğu zararların tedavisi, gut hastalığında görülen eklemde oluşan irini, akut kas-iskelet ağrılarının hafifletilmesi, cerrahi operasyon sonrası yaranabilecek ağrı, adet döneminde görülen ağrılarının tedavisi (primer dismenore)
Balafen®	Adeka İlaç San. ve Tic. A.Ş.	100 mg/5ml İBU içeren süspansiyon	Yaşı 6 aydan büyük çocuklarda çıkan ateşin düşürülmesi, hafif ağrılarının giderilmesi, çocuklukta oluşan romatizmal eklem

Tablo 2.1.(devamı)

				hastalığı (juvenil artrit) belirtilerinin tedavisi.
Berkofen®	Berko İlaç ve Kimya San. A.Ş.	400 mg İBU içeren saşe		Eklemlerdeki romatizmal apseli hastalıkların (osteoartrit, romatoid artrit, ve ankilozan spondilit) belirtileri ve oluşturduğu zararların tedavisi, gut hastalığında görülen eklemde oluşan irini, akut kas-iskelet ağrılarının hafifletilmesi, cerrahi operasyon sonrası yaranabilecek ağrı, adet döneminde görülen ağrılarının tedavisi (primer dismenore)
Bikaramin®	Bikar İlaç San. ve Tic. Ltd. Şti.	100 mg/5ml İBU içeren şurup		Nezle ve grip zamanı oluşan burun tıkanıklığı, ateş, burun akıntısı, baş ağrısı, vücut ağrılarının tedavisinde kullanılır.
Biophen®	Sandoz İlaç San. ve Tic. A.Ş.	400 mg İBU içeren draje		Eklemlerdeki romatizmal apseli hastalıkların (osteoartrit, romatoid artrit, ve ankilozan spondilit) belirtileri ve oluşturduğu zararların tedavisi, gut hastalığında görülen eklemde oluşan irini, akut kas-iskelet ağrılarının hafifletilmesi, cerrahi operasyon sonrası yaranabilecek ağrı, adet döneminde görülen ağrılarının tedavisi (primer dismenore)
Brufen®	Liva İlaç San. ve Tic. A.Ş.	200 mg İBU içeren tablet		Grip, soğuk algınlığı ve sinüzit zamanı oluşan burun tıkanıklığı, baş ağrısı, ateş, vücut ağrıları ve akciğer ağrıları
Brufen®	Abbott Laboratuvarları İhr.İth. ve Tic. Şti.	600 mg İBU içeren tablet.		Eklemlerdeki romatizmal apseli hastalıkların (osteoartrit, romatoid artrit, ve ankilozan spondilit) belirtileri ve oluşturduğu zararların tedavisi, gut hastalığında görülen eklemde oluşan irini, akut kas-iskelet
	Abbott Laboratuvarları İhr.İth. ve Tic. Şti.	400 mg İBU içeren draje		

Tablo 2.1.(devamı)

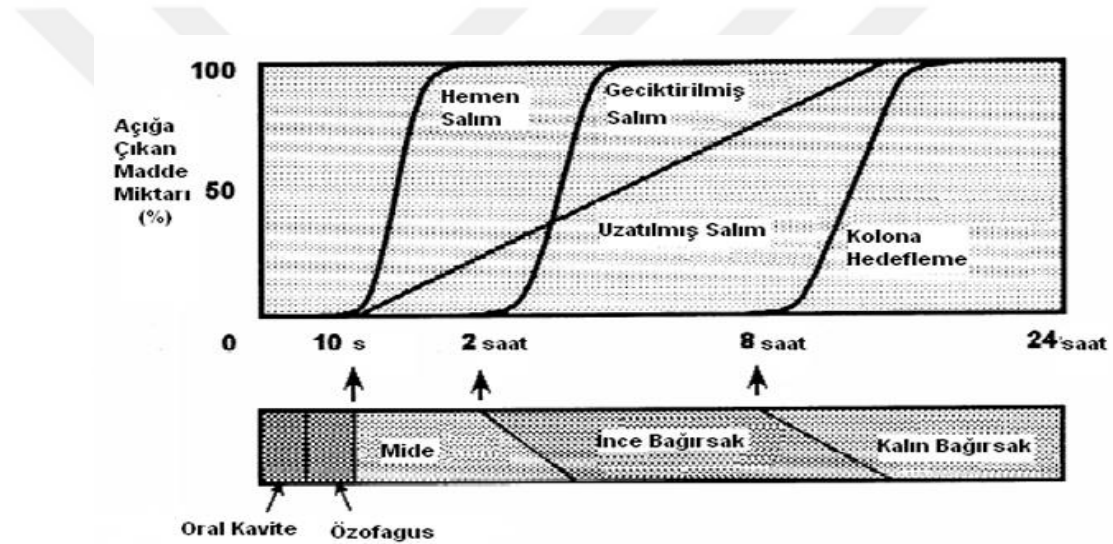
Brufen Retard®	Abbott Laboratuvarları İhr.İth. ve Tic. Şti.	800 mg İBU içeren yavaş salımlı tablet	ağrıların hafifleştirilmesi, cerrahi operasyon sonrası yaranabilecek ağrı, adet döneminde görülen ağrıların tedavisi (primer dismenore)
Bruprex®	Generica İlaç San. ve Tic. A.Ş.	200 mg/5ml İBU içeren süspansiyon	Yaşı 6 aydan büyük çocuklarda çıkan ateşin düşürülmesi, hafif ağrıların giderilmesi, çocuklukta oluşan romatizmal eklem hastalığı (juvenil artrit) belirtilerinin tedavisi.
Brus®	RDC İlaç Araştırma ve Geliştirme San. A.Ş.	100 mg/5ml İBU içeren süspansiyon	Yaşı 6 aydan büyük çocuklarda çıkan ateşin düşürülmesi, hafif ağrıların giderilmesi, çocuklukta oluşan romatizmal eklem hastalığı (juvenil artrit) belirtilerinin tedavisi.
Corelar®	Vem İlaç San. Ve Tic. Ltd. Şti.	10 mg/2 ml İBU içeren İ.V. infüzyonluk çözelti	<i>Duktus arteriozus</i> 'un açık kalmasına neden olan vücuttaki doğal kimyasalların (prostaglandinlerin) üretimini önleyerek, <i>duktus arteriozus</i> 'un kapanmasını sağlar.
İbu-Baby®	Berko İlaç ve Kimya San. A.Ş.	60 mg İBU içeren supozituar	Vücutta orta ve hafif derecede oluşan ağrıların tedavisi (diş, boğaz ve kulakta görülen ağrılar, diş çıkarken oluşan ağrılar, burkulmalar zamanı oluşan ağrılar vb.) ve vücutta çıkan ateşin düşürülmesi.
Sonfex®	Centurion Pharma İlaç ve San.Tic. Ltd. Şti.	400 mg/4 ml İBU içeren İ.V. infüzyonluk çözelti	Vücutta orta ve hafif derecede oluşan ağrıların tedavisinde, opioid analjeziklerle birlikte ileri ve orta dereceli ağrıların tedavisinde, vücutta çıkan ateşin tedavisinde.

2.2. Kolona İlaç Taşınması

Dozaj formlarının farmasötik teknoloji alanında yapılan tasarımlarının en önemli amaçlarından biri, terapötik amaçla kullanılacak etkin maddelerin insan vücudunda maksimum etkiyi göstereceği bölgede salınmasını sağlamaktır. Böylece farmakolojik etkinin maksimum olduğu bölgeye hedeflenen dozaj formları ile etkin maddenin biyolojik

etkinliği ve sistemik absorpsiyonunu artırılarak, vücutta oluşacak yan etkileri azaltılmaktadır (Şengel-Türk ve Hasçıçek, 2006).

Oral yoldan uygulanan ve belirlenen bölgelere özđü ilaç taşıyıcı sistemlere yönelik çalışmalar son yıllarda artmıştır. Oral yoldan uygulama birçok etkin maddenin vücuda verilmesi için en fazla tercih edilen ve en geniş uygulama alanına sahip yoldur. Ancak oral uygulamada her zaman istenilen terapötik sonuç sağlanamamaktadır. Bunun nedeni, oral yoldan uygulanan bazı dozaj formlarının mide asidi ve Gİ kanalındaki enzimlerine karşı duyarlı olmalarıdır (Şengel-Türk ve Hasçıçek, 2006). Oral uygulamanın ardından çeşitli dozaj şekillerinden etkin madde salım profilleri Şekil 2.2’de sunulmuştur.



Şekil 2.2. Oral uygulama ile çeşitli dozaj şekillerinden etkin madde salım profilleri (Şengel-Türk ve Hasçıçek, 2006)

Crohn hastalığı, kolon kanseri, ülseratif kolit, amebiyoz, kolon patolojilerinin lokal yolla tedavisi, peptit ve protein yapılı ilaçların sistemik verilmesi gibi farklı bağırsak hastalıklarının lokal yolla tedavisinde kolon içine hedeflenen ilaç taşıyıcı sistemler tercih edilir. Kolona hedeflenen ilaç taşıyıcı sistemler, kolona giden yolda ilacı koruyabilmeli, biyoaktif ajanın hiçbirini bozulmamalı, ilaç salımı ve absorpsiyon midede ve ince bağırsakta gerçekleşmemelidir. Sindirim enzimlerinin yoğunluğu ve daha az çeşitliliği ve aynı zamanda ince bağırsakla kıyaslandığında kolon mukozasının karşılaştırmalı proteolitik aktivitesinin çok daha az olması nedeni ile bazı farmasötik ajanlar ve protein-

peptit yapılı ilaçlar için kolonun uygun bir absorpsiyon alanı olduğu düşünülmektedir (Philip ve Philip, 2010).

Kolorektal kanserin yüksek yaygınlığı nedeniyle, dünyada yılda 1.3 milyon insana kolorektal kanser teşhisi konulmakta ve bu kanser türünün dünyadaki en ölümcül üçüncü kanser türü olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, ülseratif kolit, inflamatuvar bağırsak hastalığı, kolorektal kanser ve Crohn hastalığında uzun süreli tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır. Kolona özel hazırlanmış ilaç taşıyıcı sistemler, hastalık olan bölgelerde doğrudan tedaviyi hedeflemekte ve aynı zamanda ilacın karaciğerde metabolizasyonunu önleyerek terapötik etkinliğini arttırmaktadır (Belali vd., 2019).

Sistemik yan etkilerde azalma ve iltihaplı bölgede daha yüksek lokalize ilaç konsantrasyonunun sağlanması kolona ilaç verilmesinin üstünlükleri arasındadır. Aynı zamanda çoğu durumda, verilen ilaç bozulmadan hedeflenen bölgeye ulaştığı için daha düşük dozlarda kullanılabilir. Örneğin kolon kanseri, huzursuz bağırsak sendromu, ülseratif kolit gibi hastalıklarda sistemik birçok yan etkiden kaçınılırken, ilgili bölgeye ilaç taşınması ile düşük dozda ve daha yüksek verimli tedaviye ulaşılmaktadır (Fassihi vd., 2019).

Gİ kanaldan ilaçların geçiş süreleri ve bazı bölümlerin pH'sı **Tablo 2.2'**de sunulmuştur. İlaç şekillerinin midede kalış süresi yiyeceklerle birlikte alındığında, genellikle artış göstermektedir. Bu süre bazen on iki saate kadar çıkabilmektedir. Depresyon midenin boşalmasını yavaşlatırken, stres artırmaktadır. Aynı zamanda kalori değeri, ozmolarite ve asit değerindeki artış da midenin boşalma süresini yavaşlatan faktörlerdendir (Tugcu-Demiröz ve AcarTürk, 2002).

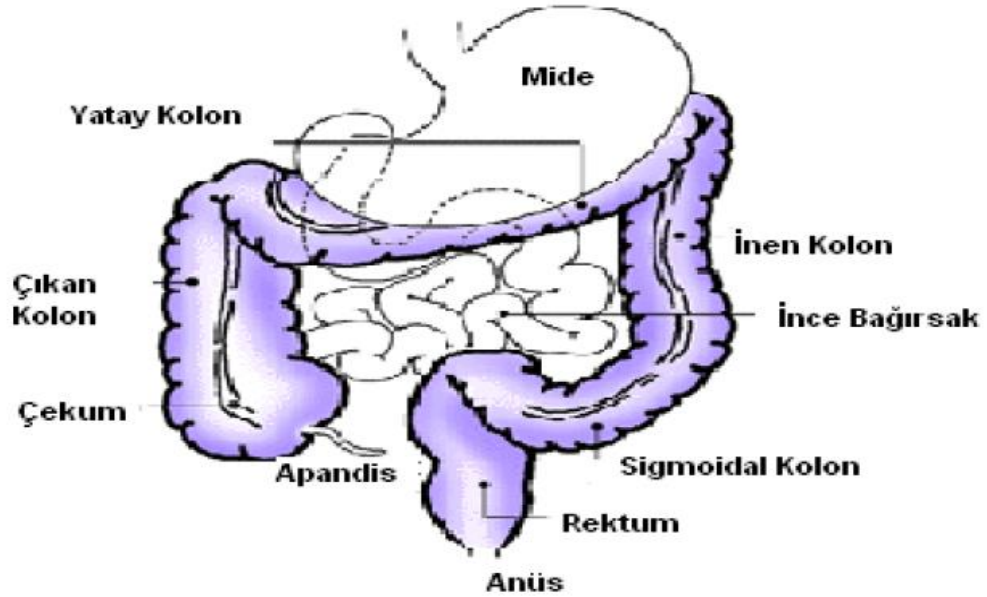
Tablo 2.2. *Gİ kanaldan ilaçların geçiş süreleri ve pH'sı (Tugcu-Demiröz ve AcarTürk, 2002)*

	pH	Geçiş Süresi(saat)
Mide	1.5	>3
Duedonum	5-6.1	3-4
Jejunum	6-7	3-4
İleum	7-8	3-4
Kolon	5.5-7	20-30
Rektum	7	-

2.2.1. Kolonun yapısı ve fizyolojisi

İnsan GİS'i, mide, ince bağırsak ve kolon olmakla birlikte birçok farklı bölümden oluşmaktadır. GİS epitel, kriptalar ve villuslardan oluşan sayısız kıvrımları olan geniş yüzey alanına sahip tek bir hücre tabakasından oluşmaktadır (Fassihi vd., 2019).

Kolon, GİS'in en alt bölgesidir ve mide ile anüs arasındaki bölümdür. İleumun son bölümünden başlayarak anüse kadar uzanmaktadır. Kolonun uzunluğu 1.7 metre, ortalama çapı ise 5 cm'dir. Apandis, çekum, çıkan kolon, yatay kolon, inen kolon, sigmoid kolon, rektum ve anal kanal olmak üzere farklı bölümlerden oluşmaktadır. İnce bağırsaktan farklı olarak kalın bağırsakta çıkıntılar ve kıvrım olmadığı için yüzey alanı küçüktür ve sindirim enzimi salgılamamaktadır (Şengel-Türk ve Hasçıçek, 2006) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kolonun fizyolojik yapısı (Şengel-Türk ve Hasçıçek, 2006)

Mide boş olduğu zaman pH 1-2 arası değişirken, yemek yedikten sonra bu değer artış gösterir. Proksimal ince bağırsakta pH yaklaşık 6.5, distal ince bağırsakta ise yaklaşık 7.5'tir. İleumdan kolona doğru pH düşüş göstererek, çekumdaki pH değeri yaklaşık 6.4'tür. Bazı insanlarda çıkan kolondaki pH değeri 5.7'e kadar düşerken, yatay kolonda 6.6, inen kolonda ise yaklaşık 7.0'dir (Philip ve Philip, 2010).

Kolon anaerobik bir ortamdır ve mikrobiyotasının esas anaerobik bakterilerden oluşan karmaşık ve yoğun topluluktur. Mide ve ince bağırsakla karşılaştırıldığında, kolon bağırsak içeriğinin gramı başına 10^{11} 'e kadar bakteriden oluşan büyük bir popülasyon barındırmaktadır (Wahlgren vd., 2019).

Kalın bağırsağın başlıca görevleri, bağırsak sekresyonunun absorplanmayan kısmı, selüloz, bakteriler ve atılan epitel hücreleri gibi sindirilmeyen materyalleri ayırmak, elektrolitleri ve suyu geri absorplamaktır. Böylece çekum ve çıkan kolonda olan sıvı-yarı katı haldeki bağırsak içeriği zamanla pekişmekte ve inen kolonda vücuttan atılana kadar depolanmaktadır (Şengel-Türk ve Haşçıçek, 2006).

2.2.2. Kolona hedefleme amacıyla tasarlanan dozaj şekilleri

Kolona hedeflenmiş ilaç taşıyıcı sistemlerde oral yol çok tercih edilen ve en uygun yol olsa da, aynı zamanda başka yollar da kullanılmaktadır. İntrarektal uygulama kolona ilaç hedeflemede en kısa yoldur. Buna rağmen intrarektal uygulamada kolonun proksimal kısmına ulaşmak daha zordur ve hastalar için de rahatsız edici olabilmektedir. Ülseratif kolitin tedavisinde, kortikosteroidlerden olan prednizolon ve hidrokortizon gibi ilaçlar intrarektal olarak uygulanmaktadır (Philip ve Philip, 2010).

GİS'in mikrobiyolojik ve fizyolojik yapısı dikkate alındığında oral yol için, hazırlanmış dozaj şeklinin herhangi bir zarara uğramadan kolonda hedeflendiği bölgeye ulaşması ve aktif maddeyi salması birçok zorluk içermektedir. Bu zorluklar göz önünde bulundurularak farklı bir çok yaklaşım geliştirilmiştir (Şengel-Türk ve Haşçıçek, 2006). Bunlar;

1. Mikroflora aktivasyonuna dayanan sistemler

❖ Ön ilaç tasarımı

- Siklodekstrin konjugatları
- Glikozit konjugatları
- Glukuronit konjugatları
- Peptit konjugatları
- Azo konjugatları
- Dekstran konjugatları
- Amino Asit konjugatları

- ❖ Matriks şeklindeki sistemler
- ❖ Biyoparçalanan polimerle hazırlanan sistemler
 - Polisakkaritler
 - Azopolimerler
- 2. Zaman ve pH kontrollü sistemler
- 3. Zaman kontrollü sistemler
 - ❖ Membran sistemler
 - ❖ Şişen sistemler
 - ❖ Osmotik sistemler
- 4. pH'ya duyarlı sistemler
- 5. Basınç kontrollü sistemler

2.2.2.1. *pH'ya duyarlı sistemler*

Gİ kanalın pH değeri midede asidiktir. İnce bağırsaklarda ve kolonda ise pH artış göstermektedir. Kolona özgü ilaç taşıyıcı sistemler geliştirirken, Gİ kanalın farklı bölümlerinde farklı pH değerleri olduğu göz önüne alınmaktadır. Bu amaçla yapılan en başarılı proses, etkin maddenin yüksek pH'ya duyarlı polimerle kaplanmasıdır. Kolona yönelik kaplamada pratik, basit ve maliyetinin düşük olması nedeni ile polimer olarak Eudragit® yaygın olarak kullanılmaktadır. En çok Eudragit® -S ve Eudragit® -L bu amaçla kullanılmaktadır (Şengel-Türk ve Hasçıçek, 2006). Enterik kaplama amacıyla kullanılan bazı polimerler ve duyarlı oldukları pH değerleri **Tablo 2.3**'te sunulmuştur.

2.3. Polimerik Nanopartiküller (PNP)

NP'ler, boyutları 1-1000 nm aralığında olan katı koloidal parçacıklar olarak bilinmektedir (Mora vd., 2010). Hazırlanma yöntemine göre NP'ler, nanokapsüller ve nanoküreler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Mohanraj ve Chen, 2007). Nanokapsüller, dıştan bir polimerik membranla çevrili olup iç kısmı çekirdekten oluşan etkin maddenin hapsedildiği nanoveziküler sistemler olarak tanımlanmaktadır. Etkin madde nanokapsül içerisindeki boşlukta sıvı, katı veya moleküler dispersiyon halinde bulunabilmektedir. Hazırlanmasında kullanılan hammaddelere ve hazırlanma yöntemine göre nanokapsüller lipofilik veya hidrofobik olabilmektedir (Mora vd., 2010).

Tablo 2.3. Enterik kaplama için kullanılan bazı polimerler ve duyarlı oldukları pH değerleri (Şengel-Türk ve Hasçıçek, 2006)

Polimer	Duyarlı olduğu pH değeri
Eudragit® S100	7.0
Eudragit® L100	6.0
Eudragit® L-30D	5.6
Eudragit® L100-55	5.5
Eudragit® FS 30D	6.8
Polivinil asetat ftalat	5.0
Selüloz asetat ftalat	5.0
Selüloz asetat trimelliat	4.8
Hidroksipropil metilselüloz ftalat 55	5.4
Hidroksipropil metilselüloz ftalat 50	5.2
Hidroksipropil metilselüloz ftalat	4.5-4.8

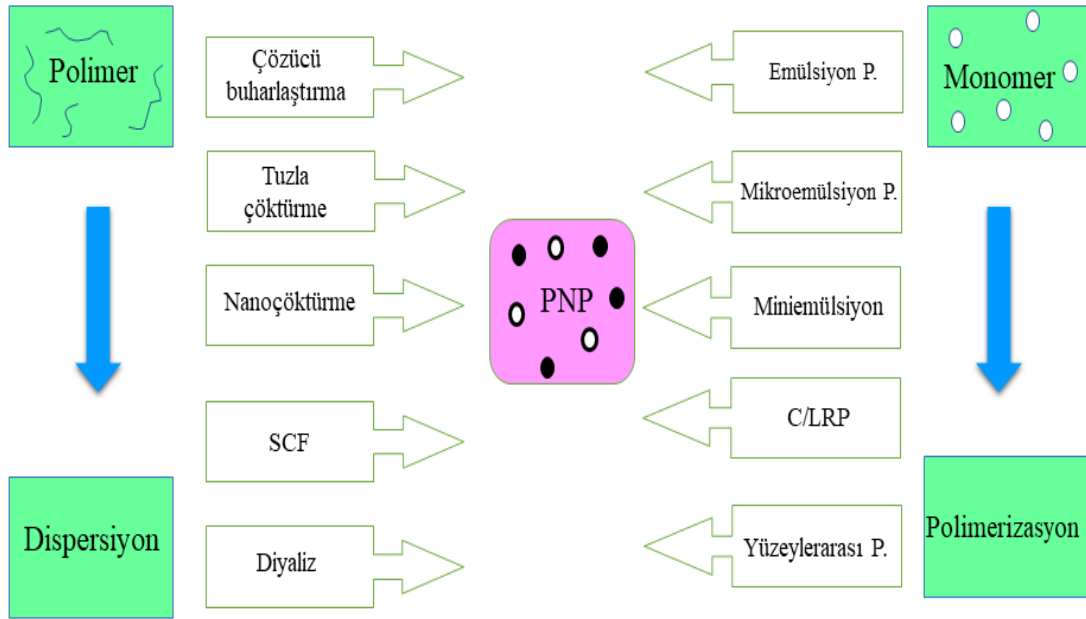
1950-1960 yılları arası eczacılık alanında çok hızlı ilerlemelerin kaydedildiği yıllar olarak bilinmektedir. Bu yıllarda kontrollü ve geciktirilmiş salım bilim insanları arasında büyük ilgi doğurmuştur. Bu alanda ilk araştırma yapanlardan biri İsviçre Federal Teknoloji Enstitüsü'nde Prof. Peter Paul Speiser olmuştur (Kreuter 2007). NP bazlı ilaç taşıyıcı sistemler, diğer taşıyıcı sistemlere göre birçok üstünlüğe sahiptir. Örneğin diğer sistemlerin ulaşamadığı tedavi olunması gereken hedef bölgelere veya organlara NP bazlı sistemler kolaylıkla ulaşabilmektedir (Anselmo vd., 2016).

2.3.1. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanma yöntemleri

PNP'lerin farklı hazırlama yöntemleri mevcuttur. Aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya metodolojiler dahil olmak üzere, laboratuvar ölçeğinde PNP'lerin üretilmesi için çeşitli yöntemler belirtilmiştir. Emülsiyon polimerizasyonu, çökeltme polimerizasyonu ve arayüzey polimerizasyonu dahil olmak üzere aşağıdan yukarıya prosesler, monomerlerden hareketle polimer sentezini kapsamaktadır. Çalışmamızda, nanoçöktürme ile NP'ler hazırlandığı için bu tekniklere ismen değinilmiştir (Yurtdaş-Kırımlıoğlu 2014; Yurtdaş- Kırımlıoğlu vd., 2016).

Aynı zamanda PNP'ler nanoçöktürme (çözücü yer değiştirme), faz ayırma (koaservasyon), emülsiyon çözücü buharlaştırma (tek veya çok fazlı emülsiyonlar), emülsifikasyon-çözücü difüzyonu, mikroakışkan teknolojisi, elektrosprey, püskürterek

kurutma, tuzla çöktürme, diyaliz ve süper kritik karbondioksit (SC-CO₂) dahil olmak üzere yukarıdan aşağıya süreçlerde önceden sentezlenmiş polimer matrisi kullanılarak doğrudan üretilmektedir (Rao ve Geckeler, 2011; Yurtdaş- Kırımlıoğlu, 2014; Yurtdaş- Kırımlıoğlu, 2019; Operti vd., 2021; Merkel vd., 2010) (**Şekil 2.4**).



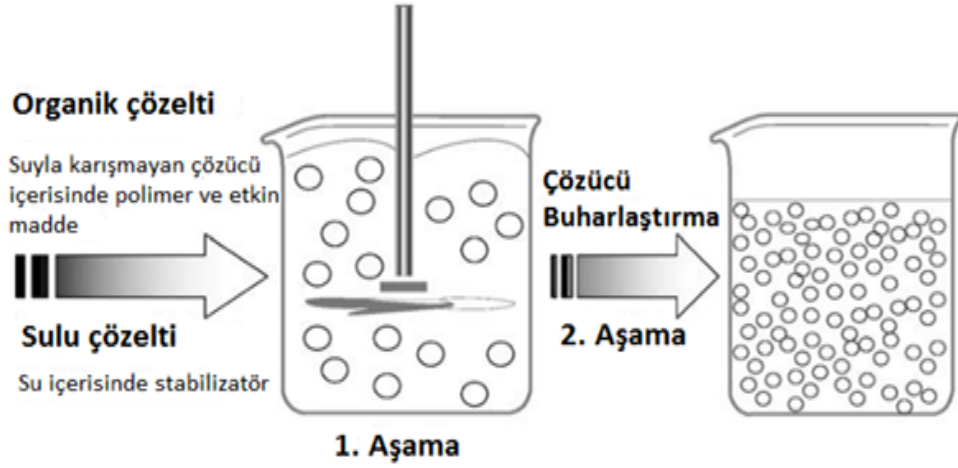
Şekil 2.4. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması amacıyla kullanılan farklı tekniklerin sistematik görünümü (P: Polimerizasyon, C/LRP: Kontrollü Radikal Polimerizasyon, SCF: Süperkritik Sıvı Teknolojisi) (Rao ve Geckeler, 2011)

2.3.1.1. Emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yöntemi

Emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yöntemi PNP hazırlama yöntemleri arasında, en sık kullanılanlardan biridir (Miladi vd., 2014). Geleneksel yöntemde emülsiyonların oluşturulması için iki esas strateji olan, tek emülsiyon oluşturulması (örnek olarak su içerisinde yağ s/y) ve çoklu emülsiyon oluşturulması (örnek olarak yağ içerisinde su içerisinde yağ y/s/y) kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde ultrasonikasyon ya da homojenizasyondan sonra manyetik karıştırıcının yardımı ile oda sıcaklığında sürekli olarak karıştırılarak, çözücünün buharlaştırılması sağlanmaktadır (Rao ve Geckeler, 2011).

Çözücü buharlaştırma yöntemi ne kadar basit bir yöntem olarak görülse de zaman alan bir yöntem olup, buharlaştırma işlemi sırasında oluşabilecek birleşme nedeniyle

hazırlanan ürünün parçacık büyüklüğü (PB) ve şeklinde değişiklikler meydana gelebilmektedir (Rao ve Geckeler, 2011). (Şekil 2.5)



Şekil 2.5. Emülsifikasyon - çözücü buharlaştırma yönteminin çizimsel gösterimi (Çobanoğlu, 2018)

2.3.1.2. Faz ayrımı (Koaservasyon)

Koaservasyon, mikrometre boyutunda biyoparçaları polimer ile etkin maddenin kaplanmasına yönelik formülasyonların hazırlanmasına odaklanan bir PNP hazırlama yöntemidir. Bu işlem, koaservant fazı içeren polimer ve süpernatant faz dahil olmak üzere iki sıvı faz ayrımı oluşturmaktadır. Polimer-polimer etkileşimi, sıcaklık değişimi, antisolvan veya tuz eklenmesi sonucu koaservasyon oluşmaktadır. Bu yöntemin esas prensibi, polimer çözünürlüğünün organik fazda azalması sonucu, polimerce zengin fazın yani koaservatın oluşmasıdır (Müderrişoğlu ve Çomoğlu, 2010).

Polimer çözeltisi içerisinde çözünen/dağılan etkin madde koaservat ile kaplanır. Koaservasyonun gerçekleşme süreci; polimer çözeltisinin faz ayrımı, koaservatın etkin madde parçacıklarına adsorpsiyonu ve mikrokürelerin sıvıya daldırılarak sertleştirilmesi olmak üzere 3 adımda gerçekleşmektedir (Makadia ve Siegel, 2011).

Belirli bir denge durumu olmadığından dolayı değişkenler, mikropartikül kinetiğinin kontrolü için önem arz etmektedir. Sertleştirme sıcaklığı ve zamanı, polimer konsantrasyonu bu değişkenlere örnek gösterilebilmektedir (Müderrişoğlu ve Çomoğlu, 2010).

2.3.1.3. Nanoçöktürme yöntemi

Bu yöntem “çözücü yer değiştirme” yöntemi olarak da isimlendirilmektedir. Nanoçöktürme yönteminin esas prensibi, lipofilik olan çözültiden su ile karışabilen yarı polar olan çözücünün yer değiştirmesi ile, polimerin yüzeyler arasında toplanmasına esaslanmaktadır (Yurtdaş- Kırmılioğlu, 2019; Rao ve Geckeler, 2011).

Nanoçöktürme yönteminde polimer (doğal, sentetik ve yarı sentetik), polimer çözücüsü ve polimer için non-solvan olacak şekilde üç temel bileşen bulunmaktadır. Polimer çözücüsü olarak su ile kolayca karışabilen ve buharlaştırılabilen aseton, hekzan, etanol vb. organik çözücüler seçilmektedir (Rao ve Geckeler, 2011).

Yaygın olarak poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), polilaktik asit (PLA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve selüloz türevleri gibi önceden oluşturulmuş dar tekdüze dağılıma sahip polimerler kullanılarak nanoçöktürme yöntemi ile PNP’ler hazırlanmaktadır (Yurtdaş- Kırmılioğlu, 2019; Nagavarma vd., 2012).

Bu yöntemin başarılı olması ve parçacıkların fizikokimyasal özellikleri organik fazın sulu faz içerisine eklenme koşullarına bağlıdır. Sulu fazın karıştırılma hızı, organik fazın enjeksiyon hızı, organik fazı ekleme yöntemi ve organik fazın sulu faza olan değeri bu koşullara örnek gösterilmektedir (Blouza vd., 2006).

NP oluşumu için ek enerji kullanımına gerek olmaması, düşük enerji ile çalışılabilmesi, yöntemi uygulamak için çok fazla ekipmana gerek duyulmaması ve hassas bir yöntem olması nanoçöktürme yönteminin üstünlüklerine örnek gösterilebilmektedir (Müderrisoğlu ve Çomoğlu, 2010).

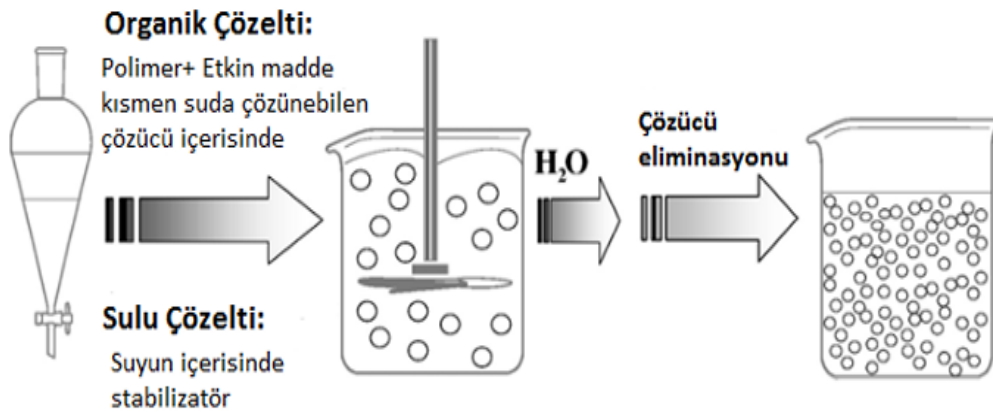
Ortama antisolvan veya çözücü ekleyerek aynı zamanda konsantrasyonu değiştirerek parçacık oluşumunu etkilemek mümkündür. Nanoçöktürme yönteminde, çözücü buharlaştırma yönteminden farklı olarak uçucu olmayan dimetilformamit (DMF), dimetilsülfoksit (DMSO) gibi çözücüler de kullanılabilir. Ancak polimerin çözücüye afinitesi yüksek olduğu durumlarda, ortamdan çözücünün uzaklaştırılması zorlaşabilmektedir (Schubert vd., 2011).

Nanoçöktürme yönteminde yüzey etkin madde kullanılmasının gerekli olmamasına karşın, koloidal NP süspansiyonun kararlılığını sağlamak amacı ile yüzey etkin maddeler kullanılabilir. PB, yüzey etkin maddenin konsantrasyonu ve tipinden etkilenmektedir (Kandilli, 2019).

2.3.1.4. Emülsifikasyon-çözücü difüzyonu

Emülsifikasyon-çözücü difüzyon yönteminde, her iki sıvı fazın başlangıçta olan termodinamik dengesini koruyabilmek amacıyla enkapsüle edici polimer, suda kısmen çözünebilen propilen karbonat gibi bir çözücü içerisinde çözündürüldükten sonra su ile doyurulmaktadır. Aslında, NP'lerin oluşumunu sağlamak amacıyla polimerin çökmesi için, organik çözücü kısmen su ile veya aksi halde başka herhangi bir organik çözücü ile karıştırılarak, ardından seyreltme yapmak amacıyla daha fazla su eklenerek dispers fazın çözücüsünün difüzyonunun sağlanması gerekir. Bu işlemlerin ardından su-polimer doymuş çözücü fazı polimer-yağ oranına göre dış faza çözücü difüzyonuna ve nanosüngerlerin, nanoküreciklerin ya da nanokapsüllerin oluşmasına neden olan, stabilizatör içeren sulu çözelti içinde emülsifiye edilmektedir (Çobanoğlu, 2018).

Bu yöntemin, basitliği, genellikle % 70 oranda yüksek enkapsülasyon etkinliğine (EE) sahip olması, seriler arası tekrarlanabilirlik düzeyinin yüksek oluşu, homojenizasyon gerektirmemesi ve ölçek kolaylığı gibi üstünlükleri mevcuttur. Yöntemin üstünlüklerinin yanı sıra sakıncaları da bulunmaktadır. Bu sakıncalardan biri, süspansiyondan uzaklaştırılması gereken yüksek miktardaki su ile emülsifikasyon sırasında suda çözünmüş etkin maddenin doymuş sulu dış faza sızması ve bunun sonucu olarak EE'nin azalması örnek olarak gösterilebilmektedir (Reis vd., 2006). (Şekil 2.6)



Şekil 2.6. Emülsifikasyon-çözücü difüzyon tekniğinin çizimsel gösterimi (Çobanoğlu, 2018)

2.3.1.5. Emülsifikasyon-tuzla çöktürme

Bu yöntemin esası, tuzla çöktürme etkisinden yararlanılarak suyla karışabilen çözücü fazının sulu çözeltiden ayrılmasına dayanmaktadır. Tuzla çöktürme prosedürü çözücü/emülsifikasyon difüzyonunun bir değişmesi olarak da düşünülebilir (Reis vd., 2006).

Emülsifikasyon-tuzla çöktürme yönteminde, ilaç ve polimer çözeltisi AC gibi su ile tamamen karışabilen bir çözücü içerisinde çözündürülerek, kolloidal stabilizan (polivinil pirolidon), tuzla çöktürücü ajan olan magnezyum asetat, kalsiyum klorür, magnezyum klorür gibi elektrolitler ya da sakkaroz içeren sulu ortama mekanik karıştırma uygulanarak eklenir. Ortama su ilave edilmesi sonucunda emülsiyonun seyreltilmesi ile tuzla çöktürmenin ters etkisi oluşmaktadır bu da emülsiyondaki damlacıklarda çözünmüş halde olan polimerin çöktürülmesine sebebiyet vermektedir (Yurtdaş- Kırımlıoğlu, 2014; Toktaş, 2016).

Emülsifikasyon-tuzla çöktürme yönteminin üstünlüğü, protein tipindeki maddelerin enkapsülasyonu sırasında oluşan gerilimi düşürmesidir (Toktaş, 2016). Bu yöntemle üretim yaparken, kullanılan elektrolitin konsantrasyonu ve cinsi, karıştırma oranı, organik fazdaki polimer konsantrasyonu, sulu fazdaki stabilizatörün cinsi, iç/dış fazın oranı gibi parametreler oluşturulacak son ürünü etkilemektedir. Yöntemde sıcaklık uygulanmadığından, sıcaklıktan etkilenen etkin madde veya yardımcı maddelerin enkapsülasyonunda da bu yöntem kullanılabilir. NP'lerin yıkama prosesinin ayrıntılı ve uzun olması, uygulamanın pahalı olması yöntemin sakıncaları arasında yer almaktadır (Müderrişoğlu ve Çomoğlu, 2010).

2.3.1.6. Mikroakışkan teknoloji

Akışkanların mikrometre boyutundaki kanallarda hareketi, mikroakışkanlar olarak tanımlanmaktadır. Nanolitre akışlarını manipüle etme özelliklerinden dolayı, geleneksel yöntemlere alternatif bir yöntem olarak nano/mikropartiküllerin hazırlanması için kullanılmaktadır. Geleneksel yöntemlerden farklı olarak, mikroakışkan cihazda parçacık hazırlama işlemi en aza indirgendiği için reaktiflerin daha az tüketilmesine sebep olmaktadır. Aynı zamanda, mikroakışkan yaklaşımlar, PNP'lerin sürekli sentezini mümkün hale getirmektedir. Diğer geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında

mikroakışkan teknolojisi, insan vücudunda biyolojik olarak parçalanabilir mikropartiküllerden salınmış biyomoleküler ilaçların (protein terapötiklerinin) biyoaktivitesini korumaktadır. PB'nin kontrol edilmesi ve tekdüze dağılımlı parçacık üretimi, aynı zamanda ucuz, basit olması, seri üretim için uygun olması gibi özellikleri yöntemin avantajlarından (Cesur, 2021).

2.3.1.7. Elektroğirme

Elektroğirme yöntemi geçen yüzyılın başlarında 1902 yılında bulunmuş, fakat bu yöntemin uygulanabilirliği ve üstünlükleri 1990'ların ortalarına doğru fark edilmiştir. Bu teknik, basit ve düşük maliyetli olmasından dolayı son yıllarda daha fazla tercih edilmektedir (Zhang ve Yu, 2014).

Elektroğirme tekniği başlıca olarak yüksek elektrostatik kuvvetlere bağlıdır. Bu yöntemin üstünlüğü, herhangi bir işlem basamağı işlemi gerektirmemesi, sadece polimeri çözebilen ve nanoparçacıkları dağıtabilen bir çözücüye ihtiyaç duymasındır. Akış hızı, çözelti viskozitesi, çalışma mesafesi, elektriksel alan yoğunluğu, polimer konsantrasyonu ve havanın nemi gibi faktörler elektroğirme sürecini etkileyen parametreler arasında yer almaktadır (Akdere ve Schneiders, 2021).

2.3.1.8. Püskürterek kurutma

Püskürterek kurutma, kontrollü boyut ve aynı zamanda küresel morfolojiye sahip parçacıkların hazırlanmasını sağlayan ucuz, tek adımlı sürekli ve ölçeklenebilir bir yöntemdir. Püskürterek kurutma yönteminde çapraz bağlayıcının eklenmesine gerek duyulmamaktadır. Püskürterek kurutma ile NP sistemleri hazırlanırken, besleme pompasının hızı, nozul boyutu, basınçlı hava akış hızı ve giriş sıcaklığı gibi parametreler PB'yi etkilemektedir (Yurtdaş- Kırımlıoğlu ve Öztürk, 2020).

Farmasötik teknoloji alanında kullanılan diğer kurutma yöntemleriyle karşılaştırıldığında, püskürterek kurutma yöntemi emülsiyon, çözelti, dispersiyonları doğrudan ayarlanabilir bir şekle, boyuta, gözenekliliğe, yoğunluğa ve kimyasal terkibe sahip katı parçacıklara dönüştürme yeteneğine sahiptir (Atasoy-Koca, 2019).

2.3.1.10. Süperkritik sıvı teknolojisi

Süperkritik sıvı teknolojisi yardımı ile çözücülerin kalıntısı olmadan ve saflık oranı yüksek olan PNP üretimi yapılmaktadır (Nagavarma vd., 2012).

NP üretimi için süperkritik sıvı kullanılmasının iki temel kuralı geliştirilmiştir: Süperkritik çözeltinin seri bir şekilde genleşmesi (RESS) ve çözücüde süperkritik çözeltinin seri bir şekilde genleşmesi (RESOLV). RESS ve RESOLV teknolojilerinde su, karbon monoksit, amonyak gibi süperkritik sıvı kullanılmasına rağmen, karşılaşılan en büyük engel PNP üretiminde kullanılan polimerlerin süperkritik sıvılarda hiç çözünmemesi ya da az çözünmesidir (Rao ve Geckeler, 2011).

2.3.2. Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu

2.3.2.1. Parçacık büyüklüğü (PB)

NP sistemlerinde en önemli karakterizasyon parametrelerinden biri PB ve dağılımıdır. Bu parametreler, NP'lerin hedefleme yeteneği, biyolojik etkinliği, *in vivo* dağılımı ve toksisitesi hakkında önemli bilgiler vermektedir. Bunlara ek olarak, bu parametreler NP'lerin etkin madde yüklenme etkinliği, ilaç salımı ve kararlılığını etkilemektedir (Mohanraj ve Chen., 2006).

PB'nin ilaç salımı üzerine etkisi büyüktür. Büyük parçacıklar fazla miktarda aktif maddenin hapsedilmesine ve yavaş bir şekilde dağılmasına sebep olurken, boyutça ufak olan parçacıklar daha büyük yüzey alanına sahip oldukları için, etkin maddenin büyük kısmı parçacık yüzeyinde veya yüzeye yakın bir yerde yer almaktadır. Böylelikle bu durum etkin maddenin hızlı bir şekilde salımına neden olmaktadır (Mohanraj ve Chen., 2006).

PNP'lerin PB'sini tayin etmek için genellikle foton korelasyon spektroskopisi (PCS) veya diğer tanımları ile yarı-elastik ışık saçılımı ve dinamik lazer saçılımı yöntemi kullanılmaktadır (Haskell, 2006). PCS yöntemi ile çalışırken boyutu büyük olan parçacıkların bu yöntemle belirlenememesi, karşılaşılabilecek en büyük sorunlardan biridir (Malmsten, 2002a).

2.3.2.2. Zeta potansiyel (ZP)

NP'lerin yüzey yükü özelliklerini belirlemek için, NP'lerin ZP'si ölçülmektedir. ZP parçacıkların dağıtılmış oldukları ortamdan ve bileşiminden etkilenmekte ve parçacıkların elektriksel potansiyelini yansıtmaktadır. Aynı zamanda yüklü etkin maddenin parçacık yüzeyine absorbe veya enkapsüle olup olmadığının belirlenmesinde de ZP kullanılmaktadır (Mohanraj ve Chen., 2006).

2.3.2.3. Parçacık şekli ve yüzey özellikleri

PNP'lerin morfolojik yapılarını belirlemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Galindo-Rodríguez vd., 2005), geçirimli elektron mikroskobu (TEM) (Sun vd., 2004), atomik kuvvet elektron mikroskobu (AFM) (Sun vd., 2006) gibi yüksek çözünürlüklü mikroskoplar kullanılarak morfolojik yapıları ve aynı zamanda analitik elektron mikroskobu (AEM) kullanılarak kimyasal özellikleri de belirlenmektedir (Sun vd., 2006).

İntravenöz uygulandığında NP'ler immün sistem tarafından rahatlıkla tanınarak dolaşım sisteminden fagositler yardımıyla temizlenmektedir. NP'lerin boyutunun yanı sıra yüzeylerinin hidrofobik özellikte olması da proteinler (opsonin) başta olmakla absorplanan kan bileşenlerinin miktarını tayin etmektedir. NP ile fagosit arasındaki köprü görevini, opsoninlerin NP'lerin yüzeyine bağlanması olarak bilinen opsonizasyon görmektedir. Yüzeyi modifiye edilmemiş konvensiyonel NP'ler hızlı bir şekilde kan dolaşımından opsonize olarak yüksek oranda mononükleer fagositik sistem (dalak, kemik iliği, akciğer, karaciğer) makrofajları yardımıyla uzaklaştırılmaktadır (Mohanraj ve Chen., 2006).

NP'lerin yüzeyinin polimerler veya hidrofilik yüzey etkin madde (YEM) ile kaplanması, aynı zamanda NP'lerin hidrofilik segmentler taşıyan biyoparçaları kopolimerler (Tween® 80, polietilen glikol(PEG)) kullanılarak formülasyonu gibi değişiklikler yapılarak yüzey özelliklerini iyileştirmek mümkündür (Calvo vd., 2001; Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd., 2022; Yurtdaş-Kırımlıoğlu ve Görgülü, 2021; Yurtdaş-Kırımlıoğlu, Görgülü vd., 2020).

2.3.2.4. pH analizi

pH, vücutta olan parçalanabilen polimerlerin hidrolizinde oluşan farklılıkları, polimerin yapısından ve oluşturduğu monomerlerden bağımsız olarak ortaya çıkaran en önemli parametredir. Polimerler hem enzimatik hem de kimyasal bozunmaya maruz kalmaktadır. Polimerlerin kimyasal ve enzimatik olarak bozunmasında pH dikkate alınmalıdır. Çünkü pH enzimlerin aktivitesini belirleyen en önemli etmenlerden biridir (Malmsten, 2002b).

2.3.2.5. Yükleme etkinliği

İyi hazırlanmış NP sistemi yüksek oranda aktif madde yükleme kapasitesine sahip olmalıdır. Bu yolla uygulama için gerekli olan matris materyalin kullanım oranı azalmış olacaktır. Etkin madde yüklenmesi iki yöntemle gerçekleştirilebilmektedir. Bunlardan birincisi NP hazırlandıktan sonra doygun etkin madde çözeltisi ile taşıyıcının muamele edilmesi sonucunda etkin madde adsorpsiyon/absorbsiyon yöntemi, ikincisi ise etkin maddenin NP hazırlanması sırasında katılmasıdır (Mohanraj ve Chen, 2006).

2.3.2.6. Katı hal analizleri

2.3.2.6.1. Nükleer manyetik rezonans (NMR) analizi

Nükleer manyetik rezonans (NMR), spin kuantum sayısı sıfırdan farklı olan ve dış bir manyetik alan içinde hapsedilen bir çekirdeğin uygun frekans değerinde bir radyo dalgası fotonu ile rezonansa gelmesi prensibine dayanan spektroskopik analiz yöntemidir. NMR analizi ile polimerin düzeni, bileşimi, analiz yapılacak örneğin molekül ağırlığı, atomik bileşimi, yapı şekli ve bağlanması, molekül formülü, bileşiğin niteliği gibi farklı bilgiler elde edilebilmektedir (http-4).

NMR spektroskopisinin kantitatif analiz amacıyla büyük oranda kullanıldığı bilinmektedir. Kantitatif analizde yapılan çalışmalar ikiye ayrılmaktadır. Bunlardan birincisi, numune içerisindeki herhangi bir bileşiğin miktarını dışardan eklenen bir standart ile karıştırılma yolu ile tespit etmek, diğeri ise numuneyi oluşturan karışımların oranlarının, standart kullanmadan sinyallerin bağıl şiddet değerlerinden yola çıkılarak bulunmasıdır (Eroğlu Y, 2020).

2.3.2.6.2. *Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi (FT-IR) Analizi*

FT-IR analizi, eczacılık, kimya, biyoloji, jeoloji, çevre ve gıda gibi farklı alanlarda yapılan çalışmalarda, polimerler, proteinler, su, filmler ve fiberler, molekül kütlesi düşük olan hidrokarbonlar gibi maddelerin analizinde kullanılan bir yöntemdir. Etkin maddenin dozaj şekli hazırlanacak polimerle etkileşip etkileşmediğinin belirlenmesi, hazırlanacak formülasyon için polimerin uygunluğunun tespiti açısından FT-IR analizi büyük önem taşımaktadır (Hişmi, 2015).

2.3.2.6.3. *Termal analiz*

Termal analiz, formülasyon hazırlanma sırasında maddenin kristal özelliğinde oluşabilecek herhangi bir değişikliğin belirlenmesi amacıyla maddenin erime derecesinin tespit edilmesi için yapılmaktadır. Etkin madde ile yardımcı maddelerin geçimliliği ile ilgili bilgileri termogramlar yardımıyla almak mümkündür (Hişmi, 2015).

2.3.2.7. *İn vitro salım*

PNP'lerden aktif madde salımı parçalanma, sızma, kopma, difüzyon, polimerin hidrolizi, iyon değişirmesi ve erozyonu ile gerçekleşmektedir. Difüzyon mekanizmasından başka diğer bütün mekanizmalar kontrollü salım yapmaktadır. PB'den dolayı difüzyon mekanizması sürekli ve kontrollü salım sağlayamamaktadır (Kaş, 2011).

PB, polimer ve etkin maddenin özellikleri, matris ile çeperin yapısı ve gözenek sayısına bağlı olarak etkin madde salımı değişiklik göstermektedir (Gürsoy, 2012). Biyolojik ya da yapay membranlar ile difüzyon hücreleri, ters diyaliz tekniği, difüzyon tekniği, santrifüj/ultrasantrifüjün ardından ultrafiltrasyon ve ajitasyon ya da santrifüj yardımı ile ultrafiltrasyon teknikleri benzeri birçok farklı yöntemler kullanılarak etkin maddenin *in vitro* salımı değerlendirilmektedir (Mohanraj ve Chen., 2006).

2.3.3. Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan polimerler

Polimer, fazla sayıda tekrarlanan monomer olarak adlandırılan birimlerin polimerizasyonu sonucu meydana gelen makromoleküllerdir. Hazırlanacak NP sistemlerinde hangi polimerin kullanılacağına; polimerin biyolojik, kimyasal, ara yüzey

ve mekanik özellikleri göz önünde bulundurularak karar verilmektedir (Pillai ve Panchagnula, 2001).

Tablo 2.4'te ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması için kullanılan polimerler yer almaktadır.

Tablo 2.4. İlaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması için kullanılan polimerler (Pillai ve Panchagnula, 2001)

Doğal polimerler	<i>Protein temelli polimerler</i>	Albumin, kolajen, jelatin
	<i>Polisakkaritler</i>	Kitosan, agaroz, hiyaluronik asit, aljinat, karragenan, dekstran, siklodekstrin
Sentetik polimerler	<i>Poliesterler</i>	PLGA, Poli(laktik asit) (PLA), Poli(glikolik asit) (PGA), poli(α -kaprolakton), poli(hidroksi bütirat), poli(β -malik asit)
	<i>Polianhidritler</i>	Poli(sebazik asit), poli(adipik asit)
Bioparçalanır Polimerler	<i>Poliamidler</i>	Poli(iminokarbonat), poliaminoasit
	<i>Fosfor bazlı polimerler</i>	Polifosfatlar, polifosfazenler, polifosfonatlar
Bioparçalanamayan polimerler	<i>Diğerleri</i>	Poliortoesterler, poli(siyano akrilat), poliüretanlar, polidihidropiranlar
	<i>Selüloz türevleri</i>	Karboksimetil selüloz, hidroksipropil metil selüloz, selüloz asetat, etil selüloz, selüloz asetat propiyonat
	<i>Silikonlar</i>	Polidimetilsiloksan, koloidal silika
	<i>Akrilik polimerler</i>	Polimetakrilatlar, poli(metil metakrilat), poli hidro(etilmetakrilat)
	<i>Diğerleri</i>	Polivinil pirolidon, poloksamerler, poloksaminler, etil vinil asetat

2.3.3.1. Çalışmamızda kullanılan polimerler

2.3.3.1.1. Polikaprolakton (PCL)

Polikaprolakton (PCL) ilk defa 1930'ların başında sentezlenmiştir, fakat PCL üzerinde yapılan çalışmalar son 20 yılda daha da artmıştır. PCL, ilaç taşıyıcı sistemler ve cerrahide kullanılan iplikler gibi biyolojik alanlarda aynı zamanda kolay şekil alması nedeni ile naylon katkılı malzemelerin bileşiminde ambalajlamada kullanılmaktadır (Özsağiroğlu, 2011).

PCL tekrarlanan heksanoat birimlerinden oluşan, alifatik poliesterler grubuna ait bir polimerdir. Yarı kristal bir polimer olan PCL, aynı zamanda % 69'a varan kristalleşme

derecesine sahiptir. PCL'nin molekül ağırlığı ve kristalleşme derecesine bağlı olarak, mekanik, fiziksel ve termal özellikleri farklılık göstermektedir (Labet ve Thielemans, 2009).

PCL 58-60°C erime sıcaklığına ve düşük vizkoziteye sahiptir. Erime derecesinin düşük olması, yüksek biyobozunabilirlik özelliği ve biyouyumlu olması PCL'nin tıbbi kullanımında büyük önem taşımaktadır. PCL'nin ester bağları fizyolojik koşullarda hidroliz ile parçalanır ve bu özelliği nedeni ile ilaç taşınmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Dinparvar, 2018).

PCL'nin camsı geçiş sıcaklığı 60°C'dir. Molekül ağırlığı 3.000 g/mol'den 100.000 g/mol'e kadar değişiklik göstermektedir. Kristal yapısı molekül ağırlığıyla ters orantılıdır. Örneğin, PCL'nin kristallik derecesi %80 olduğunda molekül ağırlığı 5.000 g/mol iken, kristallik derecesi % 40 olduğunda 100.000 g/mol'a kadar artmaktadır (Özsağiroğlu, 2011).

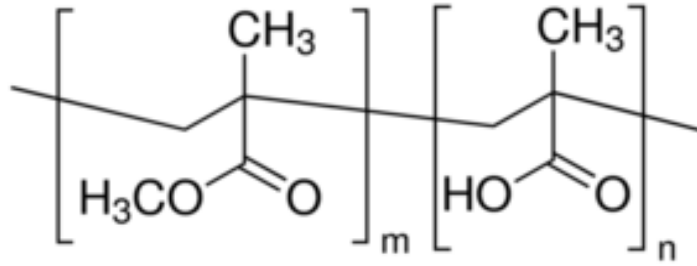
PCL oda sıcaklığında, diklorometan, kloroform, benzen, sikloheksanon, karbon tetraklorür, 2-nitropropan gibi çözücülerde büyük oranda çözünme gösterirken, aseton, asetonitril, etil asetat, 2-butanol ve dimetilformamid gibi çözücülerde ise az oranda çözünmektedir (Labet ve Thielemans, 2009). PCL p-kaprolaktonun halka açılması polimerizasyonu ile stanoz oktanoat isimli bir katalizatör kullanılarak hazırlanmaktadır (Dinparvar 2018).

PCL kullanılarak NP'ler, mikroküreler, miseller, hidrojeller ve lifler hazırlanmaktadır. PCL NP'leri, genel olarak nanoçöktürme ve çözücü buharlaştırma yöntemleri kullanılarak hazırlanmaktadır (Dash ve Konkimalla, 2012).

PCL, ilaç taşıyıcı sistem tasarımında kullanılan ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA) onayladığı polimerlerden biridir. Etkin maddenin PCL'nin gözenekli yapısına kolay bir şekilde hapsedilmesi, hazırlanan formülasyonlarda % EE değerlerinin yüksek olması ve uzun biyobozunma süresi sayesinde etkin maddeyi daha kararlı halde tutabilmesi gibi özellikleri PCL'nin ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmasını arttırmaktadır (Özsağiroğlu, 2011).

2.3.3.1.2. Eudragit® S 100 (ES 100)

Eudragit® S 100 (ES 100) metil metakrilatın ve metakrilik asit'in anyonik kopolimeridir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Eudragit® S 100'ün kimyasal yapısı

Serbest ester gruplarının karboksil gruplarına oranı ES 100 için 1:1 dir. Ortalama molekül ağırlığı yaklaşık olarak 135.000'dir. Beyaz toz şeklinde olan Eudragit® S100 kendine özgün karakteristik bir kokuya sahiptir. % 3 oranında su içeren AC'de, 1N sodyum hidroksit çözeltisinde, etanol, metanol, izopropil alkol içerisinde berrak-hafif bulanık çözelti oluşturan Eudragit® S 100, su, etil asetat, petrol eteri, metilen klorür gibi çözücülerde pratik olarak çözünmemektedir (Sezgin, 2017).

Eudragit® türü polimerler, etkin maddeyi neme karşı korumaları ve etkin maddelerin istenmeyen tat ve kokularını maskelemeleri nedeni ile çok tercih edilen polimerler arasındadır. Farklı kullanım amaçlarına göre, istenilen ilaç salımı tipine (hemen, uzatılmış, sürekli, geciktirilmiş) uygun Eudragit® türevi seçilebilmektedir. Eudragit türü polimerler farklı pH değerlerinde çözünürlük göstermektedir. Örneğin, Eudragit® EPO ve Eudragit® E100, mide sıvısında çözünürlük özelliği gösterdiğinden genellikle hızlı salım yapan taşıyıcı sistemler için kullanılmaktadır. Eudragit® S 100 ise 7.0 üzerindeki pH'da çözündüğü için, kolona hedeflenen oral ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmaktadır (Franco ve Marco, 2020).

2.3.4. Polimerik nanopartiküllerin üstünlükleri

İlaç taşıyıcı sistem olarak NP'lerin kullanılması birçok üstünlük sağlamaktadır. NP'ler parenteral uygulandıktan sonra aktif veya pasif hedeflendirmenin gerçekleştirilmesi için yüzey özellikleri ve PB kolay bir şekilde uygun hale getirilebilmektedir. Etkin maddenin yan etkisini azaltmak ve terapötik etkinliğini arttırmak amacıyla NP'ler ilacın vücuttaki dağılımını ve sonrasında atılımını değiştirerek, taşınması esnasında ve etki bölgesinde sürekli veya kontrollü salımını sağlamaktadır. Manyetik yönlendirme kullanılması veya hedefleme ligandlarının parçacık yüzeyine tutturulması ile bölgeye özel hedefleme yapılmaktadır (Mohanraj ve Chen, 2006).

Farklı polimerler kullanarak PNP'lerden aktif maddenin salımının değiştirilmesi, kanser tedavisi, hedeflendirilen antibiyotiklerin taşınması, kontraseptifler ve aşılarda taşınması gibi alanlarda NP'lere üstünlük sağlamaktadır. PNP'lerin farklı hazırlama yöntemleri kullanılarak ucuz maliyet ve kolaylıkla büyük miktarlarda üretimi ve uçucu özellikteki farmasötik maddelerin kararlılığını arttırması (Nagavarma vd., 2012), aynı zamanda transdermal (Kaş, 2011), parenteral, nazal, oral, intraoküler (Mohanraj ve Chen., 2006), intravenöz ve diğer yollarla uygulanabilmesi, NP'lere büyük üstünlük sağlamaktadır (Nagavarma vd., 2012).

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan maddeler

Madde adı	Firma adı
İbuprofen	Drogsan, Türkiye
Asetonitril	Carlo Erba, Fransa
Aseton	Isolab, Almanya
Cedex, Akıllı lam	Roche Innovatis, İsviçre
Diklorometan	İsolab, Almanya
Dimetilsülfoksit-D6	Merck, Almanya
Dimetilsülfoksit	Sigma-Aldrich, Almanya
Hücre Kültür Besiyeri	Sigma-Aldrich, Amerika
Hücre Kültür Besiyeri	Sigma-Aldrich, Amerika
Hücre Kültür Plakası	TPP, İsviçre
Eudragit S100	Röhm, Almanya
Fosfat tamponu	Capricorn Scientific, Almanya
Fötal Dana Serumı	Sigma-Aldrich, Almanya
Hidroklorik asit	Sigma Aldrich, Almanya
hTERT-HPNE hücre hattı	ATCC, Amerika
İnsan epidermal büyüme faktörü	Sigma Aldrich, Amerika
Kloroform-D1	Merck, Almanya
L-glutamin	Sigma Aldrich, Almanya
Lam	Logos Biosystems, Güney Kore
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide %98)	Alfa Aesar, Almanya
M3 Base Medium	Incub Corporation, Amerika

o-fosforik asit	Sigma Aldrich, İsviçre
pH 7.4 fosfat tampon tableti	Sigma Aldrich, Almanya
Penisilin-streptomisin Solüsyonu	Sigma Aldrich, Almanya
Polikaprolakton Mn~10000	Sigma Aldrich, Japonya
Polikaprolakton Mn~45000	Sigma Aldrich, İngiltere
Polikaprolakton Mn~80000	Sigma Aldrich, İngiltere
Potasyum klorür	Merck, Almanya
Potasyum fosfat monobazik	Sigma Aldrich, Almanya
Puromisin	Wisent Bio Products, Kanada
Sodyum hidroksit	Sigma Aldrich, Almanya
Sodyum bikarbonat	Sigma-Aldrich, Almanya
Tripan mavisi Solüsyonu	Biological Industries, İsrail
Tripsin-EDTA Solüsyonu	Biochrom, Almanya
10, 200, 1000, 5000 µL'lik mikropipet uçları	Axygen, İngiltere
15 ve 50 mL'lik santrifüj tüpleri	Isolab, Almanya
25 ve 75 cm ² 'lik hücre kültür flaskları	Greiner bio-one, Amerika
2 mL'lik Ependorf tüp	Greiner bio-one, Amerika
5 ve 10 mL'lik steril enjektör	Hayat, Türkiye
5-10 ve 25 mL'lik tek kullanımlık serolojik pipet	Sigma-Aldrich, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

Madde adı	Firma adı
Buzdolabı	Arçelik No Frost, Türkiye Roche Innovatis AG,
LUNA II Hücre Sayım Cihazı	Logos Biosystems, Güney Kore
Çeker ocak	Hedlab, Türkiye
Derin dondurucu	Liebherr, Almanya
Diferansiyel taramalı kalorimetri	Shimadzu DSC-60, Japonya
Distile su cihazı	Agilent, Almanya
Etüv	Nüve FN500, Türkiye
Elektroeğirme cihazı pompası	İnovenso, Amerika
Fouriyer dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi	Shimadzu IR Prestige-21, Japonya
Hassas terazi	Mettler Toledo, ABD
Inverted tip ışık mikroskobu	Olympus, Japonya
Kolon	VDSpher 100 C18-E, Almanya
Karbondioksitli inkübatör	BINDER, Almanya
Liyofilizatör	Operon, Korea
Mikropipet seti	Eppendorf, Almanya
Manyetik karıştırıcı	IKA, Almanya
Mr. Frosty	Nalgene, Amerika
Mulltimod Mikroplaka Okuyucu	ELISA Reader, BioTek, Amerika
HTX Synergy AFL	
Nükleer manyetik rezonans Spektrofotometresi	Ultra-Shield™ CPMAS NMR, Almanya
Otoklav	Eryiğit A.Ş. Türkiye
Otomatik hücre sayım cihazı	Logos Biosystems, Güney Kore
Orbital çalkalayıcı	Heidolph Unimax, Almanya
Çok fonksiyonlu plaka okuyucu	BioTek HTX Synergy, Amerika
Parçacık Büyüklüğü Analiz Cihazı	Malvern-Zetasizer Nano Series, İngiltere
pH metre	Mettler Toledo, Çin
Santrifüj	Hettich-Rotina 420 R, Almanya
Sınıf 2 Laminar akış kabini	Labogene ApS, Danimarka
Soğutmalı santrifüj	Hettich Lab Teknoloji, Almanya

Termometre	Ebro, Almanya
Taramalı elektron mikroskopu	Hitachi TM 3030 Plus Masaüstü Tip, Japonya
Ultrasonik banyo	Wisd Laboratory Instruments, Kore
Ultraturaks	Heidolph, Almanya
Vorteks	Scilogex, Almanya
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi	Shimadzu, Japonya
Yatay çalkalayıcı	Eppendorf, Almanya
Zeta potansiyel analiz cihazı	Malvern-Zetasizer Nano Series, İngiltere



4. YÖNTEMLER

4.1. İbuprofen İle Yapılan Çalışmalar

4.1.1. Parçacık şekli ve yüzey özellikleri

İBU'nun parçacık şekli ve yüzey özelliklerinin belirlenmesi amacıyla SEM (SEM, Hitachi TM 3030 Plus, Japonya) kullanılmıştır.

4.1.2. Termal analiz

İBU'nun (~5 mg ağırlığında) termal analizi Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) cihazı (DSC-60, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MI, ABD) kullanılmakla, basınç uygulanarak bağlanmış alüminyum numune kabında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10°C.dk⁻¹ sıcaklık yükselişi ile 30-300°C aralığında alüminyum referansa karşı yapılmıştır ve aktif maddenin termogramı bulunmuştur. Aktif maddenin formülasyon aşamalarından etkilenip etkilenmediğini belirlemek için elde edilen termogram daha sonra yapılan analizlerde referans olarak kullanılmıştır.

4.1.3. FT-IR analizi

İBU'nun FT-IR analizi (IR Prestige- 21 Shimadzu, Tokyo, Japonya) 4000-400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan etkin maddenin formülasyon yapımı aşamalarından etkilenip etkilenmediğini belirlemek maksadıyla bulunan sonuç daha sonra yapılan analizlerde referans olarak kullanılmıştır.

4.1.4. Proton NMR (¹H-NMR) analizi

İBU'nun yapısal özellikleri, ¹H-NMR analiz cihazı yardımı ile (Ultra-Shield™ CPMAS NMR, Bruker, Rheinstetten, Almanya) 25°C'de, çözücü olarak dötörokloroform ve dötoro-dimetilsülfoksit kullanılmakla gerçekleştirilmiştir.

4.1.5. İBU'nun yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile miktar tayini ve validasyon çalışmaları

Etkin madde miktar tayini çalışmaları için HPLC (Shimadzu, Japonya) cihazı kullanılmıştır. Analiz çalışmalarında kullanılan HPLC yönteminin analiz koşulları **Tablo 4.1**'de verilmiştir.

Tablo 4.1. HPLC Analiz koşulları

Cihaz	Shimadzu-20A
Kolon	VDSpher 100 C18-E, 250 x 4.6 mm, 5µm
Mobil Faz	Asetonitril/Distile Su/o-fosforik asit(70:30:1 h/h)
Dedektör	Shimadzu Fotodiyot Dizisi
Fırın Sıcaklığı	30°C
Dalga Boyu	225 nm
Akış hızı	1 mL.dk ⁻¹
Enjeksiyon Hacmi	20 µL

Analitik yöntem validasyonu, kullanılan yöntemin uygulanabilir olup olmadığını kanıtlamak amacı ile yapılmaktadır. Kullanılan yöntemin güvenilirlik ve doğruluk parametreleri elde edilen verilerle ispatlanarak gösterilmektedir. Miktar tayini analitik yöntem validasyonunda doğrusalılık, kesinlik ve kararlılık parametreleri incelenmiştir. Bu çalışmada Uluslararası Harmonizasyon Kongresi'nin Q2(R1)-Analitik İşlem Validasyonu başlıklı Uluslararası Harmonizasyon Kılavuzu kullanılmıştır (ICH, 2005).

4.1.5.1. Doğrusallık

Doğrusallık çalışmasının yapılmasının amacı, analiz yapılan numunedeki aktif madde miktarındaki artışa bağlı olarak analitik yöntemden alınan sonucun doğru orantılı bir şekilde arttığını göstermektir. Analizi yapılan maddenin farklı derişimlerde hazırlanmış örneklerinin pik alanı belirli derişim aralığındaki değerler ile doğru orantılı olmalıdır. Doğrusallığın belirlenmesi amacı ile çalışmalar yapılırken en az 5 farklı derişim ile çalışılmalıdır (ICH, 2005).

Çalışmamızda HPLC yönteminde kullanılacak olan İBU'ya ait standart eğrinin bulunması amacı ile 500 µg.mL⁻¹ derişime sahip stok çözelti hazırlanmıştır. Stok

çözeltiden 5-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ arasında derişimlere sahip on bir farklı numune hazırlanmıştır. Her test üç kez tekrar edilmiş ve analiz sonucunda on bir nokta için İBU derişimine karşılık gelen alan değerleri belirlenmiştir.

4.1.5.2. Doğruluk

Analitik yöntemin kabul edilmiş referans değere veya gerçek değere yakınlığı, analitik validasyonda doğruluk parametresi olarak bilinir. Doğruluk, analitik yöntemde belirlenen aralık boyunca oluşturulmalıdır. Genellikle belirlenmiş aralığın içinde yer alan üç farklı derişim, en az üçer örnek olmak şartıyla hesaplanmaktadır (ICH, 2005).

Yapılan çalışmada doğruluğun belirlenmesi amacı ile 3 farklı derişimde (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) İBU içeren çözelti hazırlanmıştır. Her çözelti için 4 kez ölçüm gerçekleştirilmiştir.

4.1.5.3. Kesinlik

Kesinlik, analitik yöntemde öngörülen koşullar altında, aynı numunenin çok sayıda örneklemesinden alınan bir sıra ölçüm arasında dağılma derecesini ifade eder. Ara kesinlik, tekrarlanabilirlik, tekrar elde edilebilirlik parametreleri ile belirlenir (ICH, 2005).

Gün içi kesinlik, aynı çalışma koşulları altında kısa bir zaman aralığında kesinlik parametresini ifade eder. Aynı stok çözelti kullanılarak hazırlanan örneklerin alan ölçümü tekrarlanarak tekrarlanabilirlik tespit edilir. Bu işlem üç farklı konsantrasyonun dört kez ölçümü ile gerçekleştirilmiştir.

Yöntemin kesinlik çalışmasında, Günler arası kesinliğin belirlenmesi amacı ile kalibrasyon aralığına karşılık gelen üç farklı konsantrasyonda (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) İBU çözeltisi hazırlanmış ve üç farklı günde dört örnekle tekrar edilmiştir.

4.1.5.4. Duyarlılık

Analitik yöntemlerde duyarlılık, numunede bulunabilen fakat kesin bir değer olarak verilemeyen en düşük analitik miktardır. Saptama sınırı (LOD) ve miktar tayini sınırı (LOQ) hesaplanarak değerlendirilmektedir.

LOD, standart madde sinyalinin gürültüden ayrılabilmesi için gerekli olan en düşük madde derişimi olarak bilinmektedir. Deęerin belirlenmesinde analitik yöntemde kullanılan cihaza göre farklı yöntemler kullanılabilir.

Duyarlılık çalışmalarında, sistetkin in kantitatif sınırlar içersine girmeyen en düşük derişimi olan LOD değeri ICH klavuzunda yer alan denklem (4.1)'e göre hesaplanır.

$$LOD = \frac{[3.3 \times SS]}{m} \quad (4.1)$$

Denklem (4.1)'deki SS, y eksen kesim değerinin standart sapmasını, m ise korelasyon denkleminin eğimini gösterir (ICH, 2005).

Analizi yapılan maddenin miktarının kabul edilebilir seviyede doğru ve kesin olarak belirlendiği LOQ değeri ise ICH klavuzunda yer denklemin (4.2)'e göre hesaplanabilir.

$$LOQ = \frac{[10 \times SS]}{m} \quad (4.2)$$

Denklem (4.2)'deki SS, y eksen kesim değerinin standart sapmasını, m ise korelasyon denkleminin eğimini gösterir (ICH, 2005).

4.1.5.5. Seçicilik

Seçicilik, analitik yöntemin karışım içersinde yalnızca amaçlanan maddeyi tespit edebilme yeteneğidir. Ortamda bulunan başka maddelerden kaynaklanabilecek girişimlerden analiz etkilenmemelidir. Amaçlanan maddenin, bileşiminde çok fazla maddenin yer aldığı numunelerin analizi sırasında eksiksiz bulunması gerekir (ICH, 2005).

4.1.6. Çalışma şartlarında kararlılık

4.1.6.1. Formülasyon hazırlama koşullarındaki kararlılık

Etkin maddenin kararlılığı PNP hazırlama koşullarında (aseton-diklorometan karışımı, 25°C’de) incelenmiştir (n=3).

4.1.6.2. Etkin madde miktar tayini analizi için örnek hazırlama koşullarındaki kararlılık

Etkin maddenin kararlılığı İBU’nun formülasyondan ekstraksiyonu için kullanılan ortamda, 1 ml asetonda, 25°C sıcaklıkta incelenmiştir (n=3).

4.1.6.3. İn vitro salım ortamı koşullarındaki kararlılık

Etkin maddenin kararlılığı *in vitro* salım ortamı olan pH 1.2, pH 6.8 fosfat tamponu (PBS) ve pH 7.4 PBS’te 37 °C’de incelenmiştir (n=3).

4.2. Polimerik Nanopartikül Formülasyonu Çalışmaları

4.2.1. Polimerik nanopartikül formülasyonu geliştirme çalışmaları

Formülasyon geliştirilmesi aşamasında kapsamlı literatür incelemesi yapılarak çalışmamıza uygun polimerler seçilmiştir. PNP formülasyonlarını hazırlamak üzere farklı molekül ağırlıklı PCL 10000 (Mn~10000), PCL 45000 (Mn~45000), PCL 80000 (Mn~80000) ve Eudragit® S 100 polimerleri seçilmiştir. Tez kapsamında PNP formülasyonlarının hazırlanmasında nanoçöktürme yöntemi kullanılmıştır. PCL’nin farklı molekül ağırlıklı polimerleri farklı miktarlarda tartılarak oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı yardımıyla 500 rpm karıştırma hızında, farklı oranlarda diklorometan veya diklorometan-aseton karışımı eklenerek 30 dakika süre boyunca karıştırılarak çözündürülmüş, ES 100’de aynı şekilde farklı miktarlarda tartılarak oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 500 rpm karıştırma hızında farklı oranlarda aseton veya diklorometan aseton karışımı eklenerek 30 dakika süre boyunca karıştırılarak çözündürülmüştür. Çözünmüş polimer çözeltileri bazı formülasyonlarda tek, bazılarında ise aynı şişeye aktararak aynı koşullarda 15 dakika daha karıştırılmış ve formülasyon

hazırlanmasında polimer karışımı kullanılmıştır. Formülasyon içerikleri **Tablo 4.2'**de verilmiştir.

Tablo 4.2. Polimerik nanopartikül formülasyonu geliştirme çalışmaları

Kod	PCL	ES 100	Organik faz	Akış hızı
PNP-1	PCL 10000 100 mg	100 mg	4 ml Diklorometan 6 ml Aseton	30 ml/s
PNP-2	PCL 10000 50 mg	50 mg	2 ml Diklorometan 5.5 ml Aseton	15 ml/s
PNP-3	PCL 10000 100 mg	-	5 ml Diklorometan	15 ml/s
PNP-4	PCL 10000 100 mg	-	2 ml Diklorometan 3 ml Aseton	15 ml/s
PNP-5	PCL 45000 100 mg	100 mg	4ml Diklorometan 6 ml Aseton	30 ml/s
PNP-6	PCL 45000 50 mg	50 mg	2 ml Diklorometan 5.5 ml Aseton	30 ml/s
PNP-7	PCL 45000 100 mg	-	7.5 ml Diklorometan	30 ml/s
PNP-8	PCL 45000 100 mg	-	2 ml Diklorometan 3 ml Aseton	30 ml/s
PNP-9	PCL 80000 100 mg	100 mg	4 ml Diklorometan 6 ml Aseton	30 ml/s
PNP-10	PCL 80000 50 mg	50 mg	2 ml Diklorometan 4 ml Aseton	30 ml/s
PNP-11	PCL 80000 100 mg	-	7.5 ml Diklorometan	30 ml/s
PNP-12	-	100 mg	5 ml Aseton	30 ml/s
PNP-13	-	100 mg	2 ml Diklorometan 3 ml Aseton	30 ml/s
PNP-14	PCL 80000 100 mg	-	5 ml Diklorometan	30 ml/s
PNP-15	PCL 80000 100 mg	-	2 ml Diklorometan 3 ml Aseton	30 ml/s

(ES 100: Eudragit® S 100; PCL: Polikaprolakton, PNP: Polimerik Nanopartikül)

Polimer çözeltileri tam karışıktan sonra hazırlanmış polimer karışımı pompa yardımı ile farklı akış hızlarında % 1 Tween® 80 içeren 30 ml sulu faz içerisine aktarılarak ultraturaks ile 15000 rpm’de sürekli olarak karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyonlar çeker ocakta manyetik karıştırıcı yardımıyla 400 rpm karıştırma hızında 3 saat boyunca karıştırılarak organik fazın uçması sağlanmıştır. Bu işlemlerin ardından süspansiyonlar 10 dakika boyunca 11000 rpm’de santrifüjlendikten sonra, ayrılmış sulu faz enjektör yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Çökelti halinde elde edilen PNP’lerin üzerine 1 ml distile su eklenerek yıkanmış ve tekrar 10 dakika santrifüjlendikten sonra enjektör yardımıyla distile su uzaklaştırılmıştır. Yıkama sonrası elde edilen PNP’ler üzerine 2 mL distile su eklenerek PNP’lerin distile suda dağıtılması sağlanmış ve -20 °C’de 24 saat süresince dondurulmuştur. Daha sonra donmuş PNP’ler liyofilizatörde -110 °C’de 24 saat kurutularak katı formda PNP’ler elde edilmiştir.

4.2.2. Polimerik nanopartikül formülasyonu geliştirmede karakterizasyon çalışmaları

4.2.2.1. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı

Hazırlanan PNP’lerin PB ve dağılımı lazer kırınım cihazı (Malvern Zetasizer Nano Series, İngiltere) kullanılarak belirlenmiştir.

4.2.2.2. Zeta potansiyel

Hazırlanan PNP formülasyonlarının ZP değeri Malvern Zetasizer cihazı (Zetasizer Nano Series, İngiltere) kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümler, 25°C’de zeta hücrelerinde, distile su ile seyreltilerek gerçekleştirilmiştir.

4.2.3. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması

Formülasyon geliştirme çalışmalarında hazırlanan formülasyonların, PB, polidisperslik indisi (PDI) ve ZP değeri belirlendikten sonra optimum formülasyonlar belirlenmiştir. Seçilen formülasyonlardan hareketle etkin madde içeren ve etkin madde içermeyen plasebo formülasyonlar hazırlanmıştır. Formülasyon bileşenleri **Tablo 4.3-4.4’te** sunulmuştur.

Tablo 4.3. Optimum İBU içeren PNP formülasyonları bileşenleri ve hazırlama koşulları

KOD	İBU	PCL	ES 100	Organik Faz	Akış hızı
F1	10 mg	10000 100 mg	-	2 ml Diklorometan 3 ml Aseton	30 ml/h
F2	10mg	10000 50 mg	50 mg	2 ml Diklorometan 5,5 ml Aseton	30 ml/h
F3	10mg	45000 100 mg	-	2 ml Diklorometan 3 ml Aseton	30 ml/h
F4	10mg	45000 50 mg	50 mg	2 ml Diklorometan 5,5 ml Aseton	30 ml/h
F5	10mg	80000 100 mg	-	2 ml Diklorometan 3 ml Aseton	30 ml/h
F6	10mg	80000 50 mg	50 mg	2 ml Diklorometan 5,5 ml Aseton	30 ml/h
F7	10 mg	-	100 mg	2 ml Diklorometan 7.5 ml Aseton	30 ml/h

(ES 100: Eudragit® S 100; İBU: İbuprofen; PCL: Polikaprolakton)

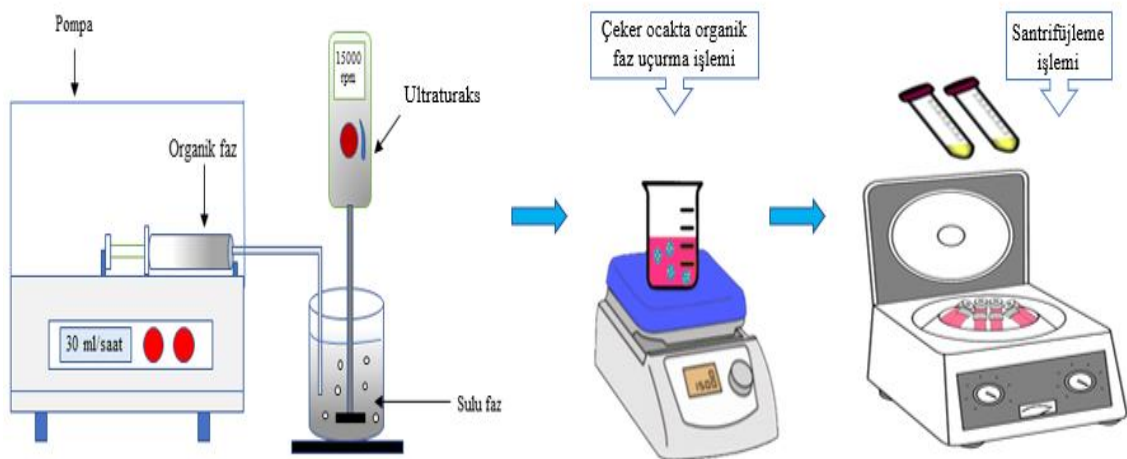
Tablo 4.4. Optimum plasebo PNP formülasyonları bileşenleri ve hazırlama koşulları

KOD	PCL	ES100	Organik Faz	Akış hızı
P1	PCL 10000 100 mg	-	2 ml Diklorometan 3 ml Aseton	30 ml/s
P2	PCL 10000 50 mg	50 mg	2 ml Diklorometan 5.5 ml Aseton	30 ml/s
P3	PCL 45000 100 mg	-	2 ml Diklorometan 3 ml Aseton	30 ml/s
P4	PCL 45000 50 mg	50 mg	2 ml Diklorometan 5.5 ml Aseton	30 ml/s
P5	PCL 80000 100 mg	-	2 ml Diklorometan 3 ml Aseton	30 ml/s
P6	PCL 80000 50 mg	50 mg	2 ml Diklorometan 4 ml Aseton	30 ml/s
P7	-	100 mg	2 ml Diklorometan 7.5 ml Aseton	30 ml/s

(ES 100: Eudragit® S 100; PCL: Polikaprolakton, PNP: Polimerik Nanopartikül)

Optimum formülasyonların hazırlanmasında nanoçöktürme yöntemi kullanılmıştır. Optimum formülasyonlar olarak farklı molekül ağırlıklı PCL polimerleri, PCL polimerleri ES100 kombinasyonları ya da sadece ES 100 içeren PNP formülasyonları hazırlanmıştır. PCL, PCL ve ES 100 ya da ES 100 diklorometan-aseton karışımında manyetik karıştırıcıda 500 rpm karıştırma hızında karıştırılarak oda sıcaklığında çözündürülmüştür. IBU içeren formülasyonlarda IBU, organik fazı oluşturan polimer çözeltisine eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda 500 rpm karıştırma hızında karıştırılarak çözündürülmüştür.

Etkin madde içeren polimer çözeltileri pompa yardımı ile 30 ml/saat akış hızlarında % 1 Tween® 80 içeren 30 ml sulu faz içerisine aktarılarak ultraturaks ile 15000 rpm’de sürekli olarak karıştırılmıştır. Hazırlanan dispersiyon halindeki PNP’lerden organik fazın uzaklaştırılması adına, çeker ocakta manyetik karıştırıcı yardımıyla 400 rpm karıştırma hızında 3 saat boyunca karıştırılmıştır. 3 saat sonrasında elde edilen su bazlı kolloidal PNP’ler 10 dakika boyunca 11000 rpm’de santrifüje tabi tutulmuştur. Süpernatant dekante edilerek ayrılmış ve PNP’ler distile su ile yıkanmıştır. Yıkama prosesi sonrasında elde edilen PNP’ler 2 mL distile suda dağıtılmış ve -20 °C’de 24 saat süresince dondurulmuştur. Sonrasında dondurulmuş PNP’ler liyofilizatörde kurutulmuştur. Kurutma sonrası katı formda PNP’ler elde edilmiştir (Şekil 1.4).



Şekil 4.1. Nanoçöktürme yöntemi ile nanopartikül oluşumunun şematik gösterimi

4.3. Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu

4.3.1. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı

Hazırlanan PNP formülasyonlarının PB ve dağılımı lazer kırınım cihazı kullanılmakla belirlenmiştir.

4.3.2. Zeta potansiyel

Hazırlanan PNP formülasyonlarının ZP değeri Malvern Zetasizer cihazı kullanılmakla belirlenmiştir. Ölçümler, zeta hücreleri kullanılarak, 25°C’de distile su ile seyreltilerek gerçekleştirilmiştir.

4.3.3. Enkapsülasyon etkinliği (% EE)

Hazırlanan PNP formülasyonlarında % EE “İBU’nun yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile miktar tayini ve validasyon çalışmaları” bölümünde anlatılan analiz koşullarında yapılmıştır.

Tam tartılmış 3 mg PNP formülasyonu 1 mL asetonda 2 dk süresince vortekste kırıştırılarak çözündürülmüştür. İBU miktarı HPLC cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Formülasyonlara ilişkin % EE değerleri, Denklem 4.3 kullanılarak hesaplanmıştır (Yurtdaş-Kırımlioğlu vd., 2020). Deney her formülasyon için 3 kez tekrarlanmıştır.

$$\% EE = \frac{\text{Pratik bulunan gerçek etkin madde miktarı}}{\text{Teorik olması gereken etkin madde miktarı}} \times 100 \quad \text{Denklem 4.3}$$

4.3.4. Termal analiz

Hazırlanan PNP formülasyonlarının (~5 mg ağırlığında) termal analizi DSC cihazı kullanılarak, basınç kullanılarak bağlanmış alüminyum numune kabında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10 °C.dk⁻¹ sıcaklık yükselişi ile 30-300 °C aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiştir.

4.3.5. FT-IR analizi

Hazırlanan PNP formülasyonlarının FT-IR analizi 4000-400 cm^{-1} dalga boyu aralığında yapılmıştır.

4.3.6. Nükleer manyetik rezonans (NMR) analizi

Hazırlanan PNP formülasyonlarının yapısal özellikleri, ^1H -NMR analizi ile 25°C’de, çözücü olarak döterokloroform ve dötoro-dimetilsülfoksit kullanılarak araştırılmıştır.

4.4. *İn vitro* salım

PNP’lerden İBU salımı GİS bölgelerinin pH’larını simüle eden salım ortamlarında diyaliz membran yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd., 2020; Yurtdaş-Kırımlıoğlu ve Görgülü, 2021). Çalışma koşulları 70 mL salım ortamı, 37±0.5°C sıcaklık ve 100 rpm karıştırma hızı olarak belirlenmiştir. Öncelikle 3 mg İBU içeren PNP formülasyonları selüloz asetat diyaliz membrana (molekül ağırlığı 12-14 kDa) yerleştirilmiş ve 1 mL dissolüsyon ortamı ilave edilmiştir ve sızdırmadan kapatılmıştır. Diyaliz membranı 37±0.5°C’de tutulan ve 100 rpm’de karışan pH 1.2 içeren reseptör kompartımanına daldırılmıştır. Reseptör kompartıman buharlaşmayı önlemek için kapatılmıştır. Daha önceden belirlenmiş zaman aralıklarında (15.dk, 30.dk, 45.dk, 1.saat, 1.5 saat, 2 saat) diyaliz membranı dışındaki çözünme ortamından (pH 1.2) 1 mL örnekler alınmış ve aynı miktarda taze salım ortamı eklenmiştir. 2 saatin sonunda diyaliz membranları, 37±0.5°C’de tutulan ve 100 rpm’de karışan 70 mL pH 6.8 PBS’e alınmıştır. Reseptör kompartıman buharlaşmayı önlemek için kapatılmıştır. Daha önceden belirlenen zaman aralıklarında (2.5. saat, 3. saat, 3.5. saat, 4. saat, 4.5. saat, 5. saat) diyaliz membranı dışındaki çözünme ortamından (pH 6.8, PBS) 1 mL örnekler alınmış ve aynı miktarda taze salım ortamı eklenmiştir. 5. saatin sonunda diyaliz membranları pH 7.4 PBS’e aktarılmıştır. Daha önceden belirlenmiş zaman aralıklarında (6. saat, 7. saat, 8. Saat, 9. saat, 10. saat, 12. saat, 24. saat, 36. saat, 48. saat, 72. saat) örnekler alınmıştır. Aynı miktarda taze salım ortamı eklenmiştir.

Örneklerdeki İBU konsantrasyonu “İBU’nun yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile miktar tayini ve validasyon çalışmaları” bölümünde anlatılan analiz koşullarında

gerçekleştirilmiştir. Farklı zamanlarda salınan İBU konsantrasyonları ile hesaplanan % kümülatif salınan İBU değerleri zamanın fonksiyonu olarak grafiğe geçirilmiştir. Her bir PNP formülasyonu için deney 3 kez tekrar edilmiştir.



Şekil 4.2. İn vitro salım çalışmasına ilişkin deney fotoğrafı

4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmamızda ATCC hücre bankasından CRL-4023 koduyla elde edilmiş olan normal insan pankreas hücre hattı (hTERT-HPNE: Human pancreatic nestin epithelial cell) hücreleri ve ATCC firmasından CCL-210™ ticari kodu ile satın alınmış normal insan akciğer fibroblast hücre hattı (CCD-19Lu) kullanılmıştır.

4.5.1. Malzeme sterilizasyonu

Deneylerde paketli steril-tek kullanımlık sarf malzemeler haricindeki tüm ekipmanlar steril edilerek kullanılmıştır. Metal, cam ve yüksek sıcaklıkta bozulmayacak her türlü ekipmanın sterilizasyonu kuru hava sterilizatöründe 180°C sıcaklıkta 2 saat; pipet uçları ve sıvı solüsyonların sterilizasyonu 121°C, 1,5 atmosfer basıncında otoklavda 20 dakika için gerçekleştirilmiştir. Otoklavlanamayan sıvı formdaki maddeler için 0.22 µm por çaplı tek kullanımlık filtreler kullanılmıştır.

4.5.2. Hücrelerin besiyerlerinin hazırlanması

hTERT-HPNE hücreleri için Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM), karışım besiyeri olarak düzenlenmiş ve karışımın oluşmasında kullanılan maddeler ise şu şekildedir: Glukozsuz DMEM (%75), M3 Base medium (%25), 2 mM L-glutamin, 1,5 g/L sodyum bikarbonat. Besiyerinin tamamlanması için 5.5 mM D-glukoz (1 g/L), 10 ng/mL insan rekombinant epidermal büyüme faktörü (rhEGF), 750 ng/mL puromisin, fetal bovin serum (FBS, %5) içerisinde yavaşça karıştırılmakla besiyerine eklenmiştir.

CCD-19Lu hücrelerinden ötrü %90 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin-streptomisin antibiyotik içeren besiyeri hazırlanmıştır.

4.5.3. Stok aktivasyonu

Daha önceden stoklanmış hücreler derin dondurucu (-86°C) veya sıvı azot tankı içerisinde (-196°C) çıkartılarak en kısa süre içerisinde, 37°C'de eridikten sonra besiyeri içine alınmış, 1200 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj yapılmıştır. Santrifüjleme yapıldıktan sonra hücrelerin sayıları kontrol edilmiştir. Daha sonra hücre sayısına göre üreyebilmeleri için T25 flasklarda kültüre edilmişlerdir.

4.5.4. Hücrelerin pasajlanması ve stoklanması

Hücrelerin elverişli yoğunluk değerine ulaşınca dek düzenli aralıklarla aseptik ortamda, besiyerleri yenileriyle değiştirilerek flasklarda gelişimi (flask tabanına yapışarak çoğalması) sağlanmıştır. Hücrelerin maksimal olarak %80/flask doluluk miktarına ulaştığında pasajlama yapılmıştır.

Pasajlama: Hücrelerin kullandıkları besiyeri flasklardan temizlendikten sonra hücre flakı steril Ca^{2+} - Mg^{2+} içermeyen fosfat tamponu (PBS) ile birkaç defa yıkanmış ve flask ölçüsüne uygun bir şekilde % 0.25 (w/v) Trypsin / 0,53 mM Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) solüsyonu kullanılarak 3-5 dk boyunca 37°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Daha sonra Trypsin-EDTA solüsyonunu nötrlemek üzere kalkan hücreler üzerine uygun besiyeri eklenerek tüm içerik santrifüj tüpü içerisine koyulmuştur. 1200

rpm’de 5 dk boyunca santrifüj yapılmış, süpernatant kenarlaştırılmış, yeni besiyeri içinde hücreler süspanse edilerek uygun miktarda flasklara bölünmüştür.

Stoklama: Pasajlama yapıldıktan sonra hücreler sayılarak 2 mL’lik stok tüplerine uygun dondurma besiyerleri içinde bölünmüşlerdir. Stok tüpleri Mr. Frosty dondurucusu kullanılmakla 1 gece boyunca -86°C de bekletilmiş ve sonrasında sıvı azot buhar fazında stoğa kaldırılmıştır.

Hücre Sayımı: Hücrelerin canlılıkları ve sayımları LUNA II otomatik hücre sayım cihazı yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Bunun için santrifüjlemeden sonra hücre pelleti 1 mL besiyeri içerisinde homojen olarak seyreltilmiş sonra 10 µL tripan mavisi solüsyonu ile 10 µL hücre süspansiyonu 10 sn homojen bir şekilde karıştırılmış ve ardından sayım cihazı lamına bu karışımdan 10 µL eklenmiştir. Cihaz protokollerine uygun olarak sayım işlemi yapıldıktan sonra, seyreltme oranları dikkate alınmakla hesaplamalar gerçekleştirilmiş ve hücreler alınan sonuçlara göre ekilerek deneysel yöntemler yapılmıştır.

4.5.5. MTT yöntemi

MTT yöntemi 1983 yılında ilk defa Mosmann tarafından hücre proliferasyonu yöntemi olarak bulunmuş ve kanser hücre hatları üzerinde kemoterapötik ilaçların etkisini araştırmak maksadıyla kullanılmaya başlanmıştır. Sitotoksiteyi ve proliferasyonu kantitatif olarak ölçen yöntemde, canlı ve apoptozun erken dönemindeki hücrelerin mitokondrileri yardımıyla MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl Blue] solüsyonunda bulunan tetrazolium halkası, hücrelerdeki dehidrojenaz enzimlerince reaksiyona girip, yalnızca metabolik hücreler aracılığıyla indirgenip parçalanarak suda çözünmeyen formazan kristallerinin oluşmasına yol açır. Reaksiyon nedeniyle oluşan rengin yoğunluğu mitokondriyal aktiviteyle doğrudan alakalıdır. MTT boyasının oluşturduğu sarı renk, bu aktivite gözlendiğinde çözücü ilavesi ile mor renge dönüşmektedir. Çözücü ilavesinden sonra formazan kristallerinin yoğunluğuna göre meydana gelen renk skalasına bağlı ölçüm gerçekleştirilmektedir. Canlı hücrelerin yokluğunda formazan kristali oluşmamaktadır.

Hücreler, kapaklı, düz tabanlı, steril olan ve 96 kuyucuklu tek kullanımlık olan mikropalakalara, 200 µL uygun besiyeri içinde her kuyu içerisine 1×10^4 hücre olmakla

ekilmiştir. Plakaya ekilmesinin ardından hücreler 24 saat boyunca inkübasyona bırakılarak plaka tabanına yapışmaları sağlanmıştır. 24 saat geçtikten sonra 100 µL besiyeri uzaklaştırılarak onun yerine 100 µL içerisinde hazırlanan farklı konsantrasyonda maddeler eklenmiştir (Hücrelere uygulanacak olan konsantrasyonlar, 1:1 seyreltme faktörü dikkate alınarak, 2 kat yoğun hazırlanıp uygulanmıştır). Madde uygulamasını takiben 24 saat inkübasyon süresinin ardından her bir kuyu içerisinde ışıktan korunmakla 20 µL stok olacak şekilde MTT çözeltisinden (5 mg/mL PBS içerisinde çözündürülüp uygulama öncesinde filtrelenen MTT solüsyonu) eklenerek 3 saat boyunca inkübasyon yapılmıştır. Sonrasında hücrelerin besiyerlerinin tamamı kenarlaştırılarak formazan kristallerinin çözünbilmesi için 100 µL DMSO eklenmiş, 15 dk boyunca karanlık ortamda çalkalandıktan sonra mikropilaka okuyucusu yardımıyla 540 nm dalga boyunda meydana gelen renk değişimlerinin optik yoğunlukları (absorbansları) okutulmuştur.

24, 48 ve 72 saat süren analizler sonucunda, numunelere ait hücre canlılığının yarısını inhibe eden etkin konsantrasyon (IC₅₀) değerleri belirlenmiştir. Deneylerde 3 farklı kontrol grubu kullanılmıştır. Kontrol grupları aynı zamanda besiyeri güvenilirliği ve kör okuması için de kullanılmış fakat herhangi bir problem gözlemlenmemiştir. Deneylerde kontrol olarak çözücü kontrol grubu [%90 uygun besiyeri + %10 FBS + %1-2 Pen-Strep (%0,1 DMSO içeren besiyeri) + Hücre] üzerinden hesaplamalar yapılmıştır.

Öncelikle kör kuyusu değeri tüm optik okumalardan çıkartılmıştır. Elde edilen tüm verilerin değerleri 5 tekrar üzerinden ortalamalar ve standart sapmalar alınarak hesaplanmıştır. Optik yoğunlukların (absorbans) ortalamaları ve % canlılık değerleri Microsoft Office Excel formül hesaplarından yapılmış; çözücü kontrol grubunun canlılığı %100 kabul edilerek diğer tüm canlılık değerleri de bunun üzerinden ortalamalar ve standart hata değerleri Hill denklemi kullanılarak sigmoidal doz-cevap eğrisi oluşturmak üzere hesaplanmıştır. Anlamlılık değerleri ise GraphPad 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) yazılımı kullanılarak bulunmuştur. Dunnet testi ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonrasında kontrol grubuna göre önemli farklılıklar için *p < 0.05 ve **p < 0.01 değerleri sırasıyla anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4.5.6. Yara iyileştirici etki deneyi

Hücre migrasyonunda etkili olan spesifik proteinlerin aşırı ekspresyonu veya yıkımı sonucunda nasıl bir sürecin izlendiğini gözlemlemek üzere çizik deneyi

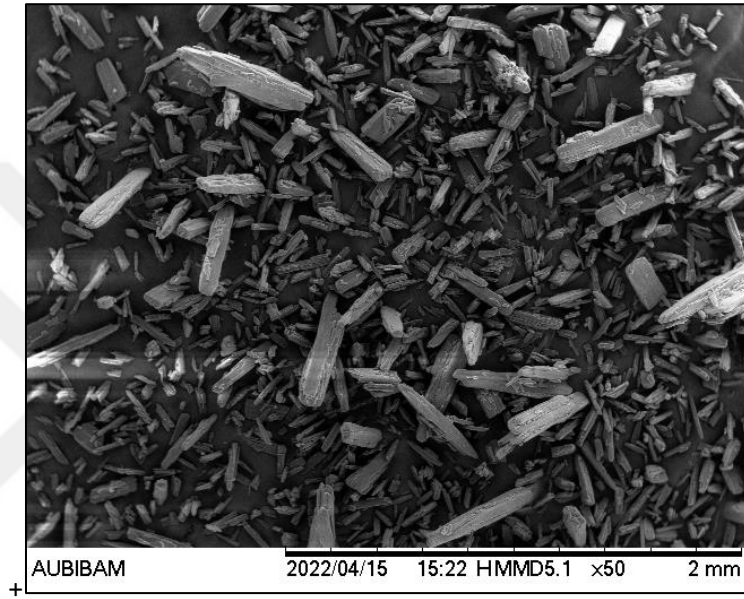
gerçekleştirilmiştir. Deneyin gözlemlenebilmesi için çoğunlukla bulundukları kabın tabanına tek tabaka yayılarak çoğalan (adhere, yapışkan) hücreler tercih edilir. Bunun için hücreler 24 kuyulu hücre kültür plakasında her kuyuya eşit dağılım olacak şekilde bir başka ifade ile kuyuda 100 bin (10^5 hücre/kuyu) hücre olacak şekilde hücreler ekilmiş ve 2 gün süresince kültür şartları idame ettirilerek hücrelerin plaka tabanını kaplaması beklenmiştir. Sonra uygun bir pipet ucu (200 μ L'lik pipet ucu) yardımıyla %90 tabanı kaplamış olan plakaların her bir kuyusunda eşit ve düz bir çizgide kazıma işlemi gerçekleştirilmiştir. Dağılan hücreler besiyeri ile nazikçe ortamdan uzaklaştırılmış ve yeni besiyeri ilave edilmiştir. İBU, İBU içeren formülasyonlar ve plasebo formülasyonlar tüm hücrelere 0.1 μ g/mL konsantrasyonda uygulanmıştır. Açılan çizgiğin görüntü alımı sırasında aynı referans noktasının tespit edilebilmesi için işaretleme yapılmıştır. 0. Saat verisi elde etmek için çizgiğin ilk görüntüsü alınmıştır. Bu işlem için “inverted” tip trinoküler ışık mikroskopunun 4x objektifi ile görüntüler alınmıştır (Olympus CKX41SF). Formülasyonların hücreler üzerindeki etkinliklerinin gözlenebilmesi için belirli zaman aralıklarında morfolojik görüntüleri incelenmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslanarak yara kapanma hızı ele alınmıştır (Liang vd., 2007).

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. İbuprofen İle Yapılan Çalışmalar

5.1.1. Parçacık şekli ve yüzey özellikleri

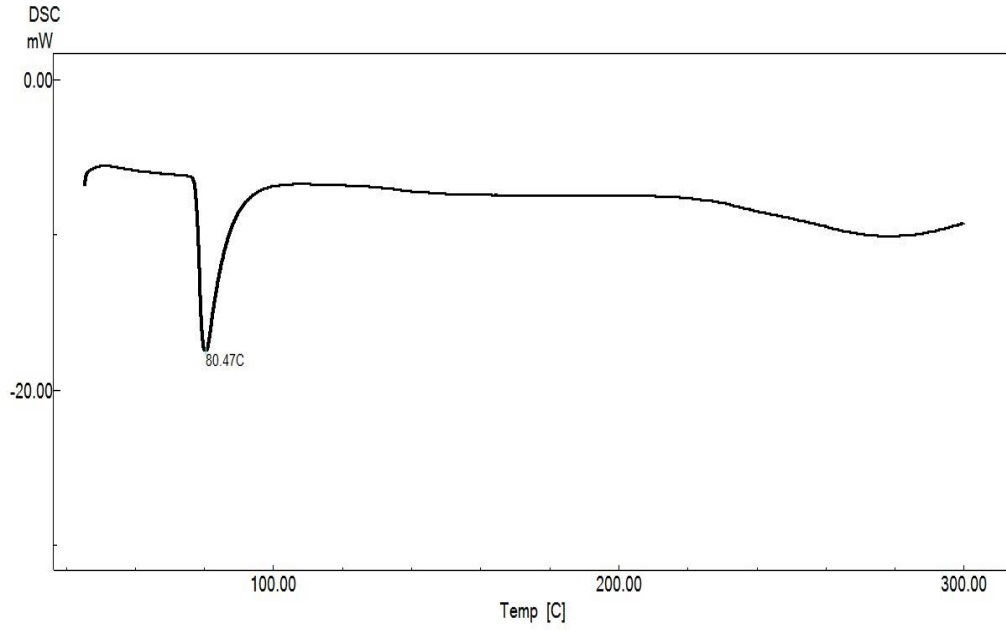
İBU'nun parçacık şekli ve yüzey özelliklerine ilişkin SEM görüntüsü **Şekil 5.1**'de sunulmuştur.



Şekil 5.1. IBU'ya ait SEM görüntüsü

5.1.2. Termal analiz

İBU'nun, DSC analiz cihazı kullanılarak 30-300°C aralığında gerçekleştirilen termal analizinde, erime sıcaklığı 80.47°C olarak tespit edilmiştir. Analiz sonucunda bulunan değerler, literatür araştırması zamanı farklı araştırmacılar tarafından yapılan analiz sonuçları ile uygunluk göstermektedir (Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd., 2020). İBU'ya ait DSC termogramı **Şekil 5.2**'de sunulmuştur.

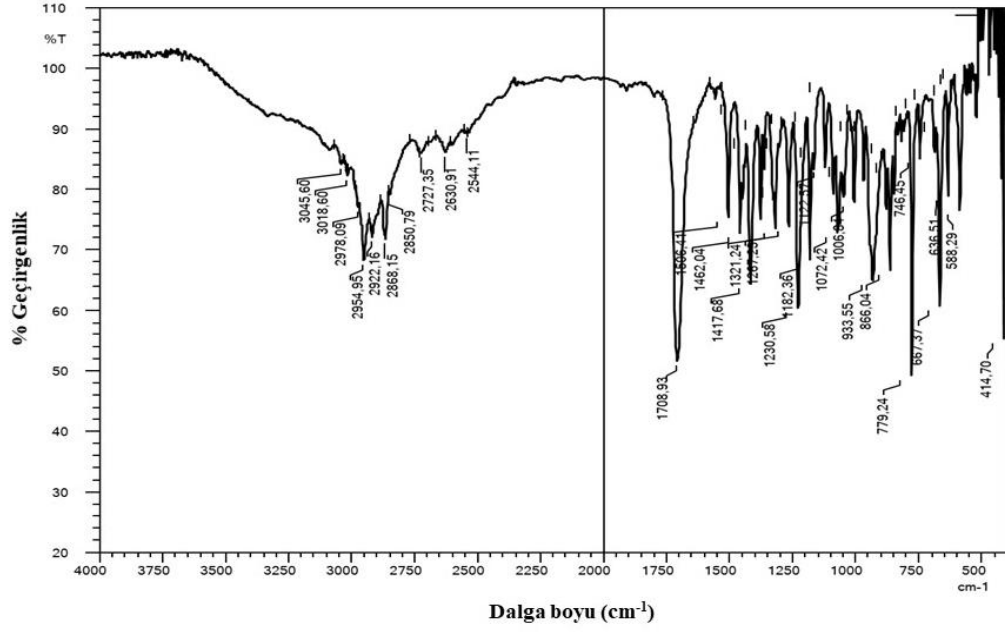


Şekil 5.2. *İBU'nun termal analizine ait termogram*

5.1.3. FT-IR analizi

FT-IR spektroskopisi moleküler etkileşimleri ve moleküler yapıyı yansıtan en önemli karakterizasyon analizlerinden biridir (Duygu vd., 2009). Çalışmamız boyunca etkin maddenin, formülasyonun hazırlanma basamaklarından etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesi ve olabilecek etkileşimlerin belirlenmesi amacı ile FT-IR analizi yapılmıştır. İbuprofen'e ait FT-IR spektrumu **Şekil 5.3**'de sunulmuştur.

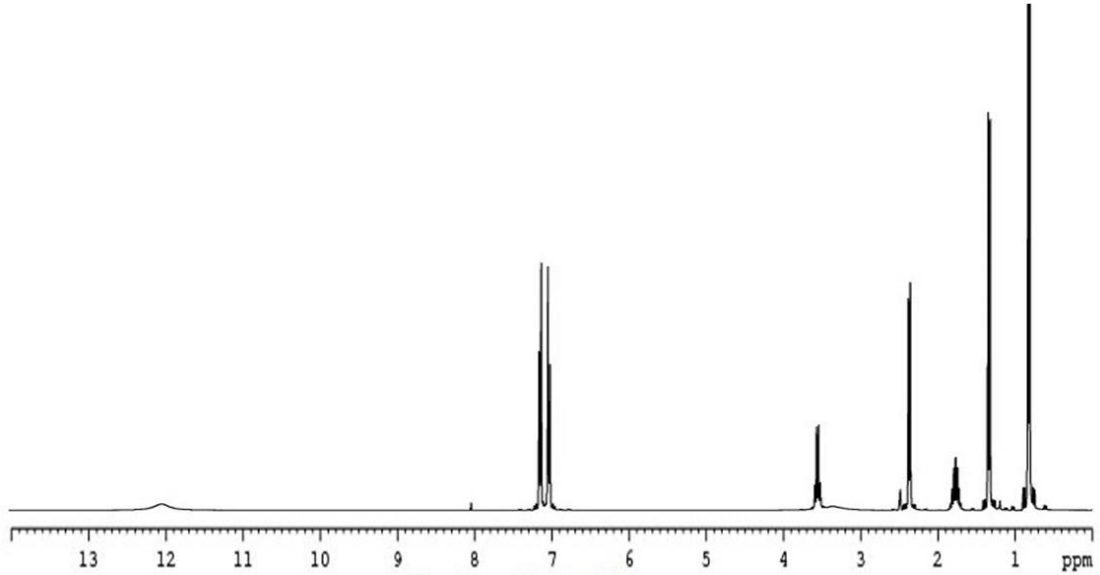
İBU spektrumunda, 3050-3150 cm^{-1} aralığında aromatik -CH pikleri, 2850-3000 cm^{-1} aralığında alifatik -CH pikleri bulunmuştur. 1708 cm^{-1} ve 1203 cm^{-1} 'de görülen gerilme titreşimleri sırası ile C=O ve C-O gerilme titreşimleri olarak saptanmıştır. 1460-1550 cm^{-1} aralığında aromatik C=C bağına ilişkin pikler bulunmuştur. 580 cm^{-1} ve 667 cm^{-1} 'de gözlenen pikler, İBU yapısındaki aromatik kısım ile ilişkilendirilmiştir (Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd., 2020; Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd., 2021a).



Şekil 5.3. İBU'ya ait FT-IR spektrumu

5.1.4. ¹H-NMR analizi

İBU'ya ait ¹H-NMR spektrumu Şekil 5.4'te sunulmuştur.



Şekil 5.4. İBU'ya ait ¹H-NMR spektrumu

İBU'ya ilişkin tüm karakteristik pikler IBU spektrumunda saptanmıştır. 7.10 ppm ve 7.18 ppm'de görülen ikili pikler (doublet) aromatik -CH piklerine aittir. 0.84 ppm, 0.86 ppm ve 1.34 ppm'de (singlet) görülen pikler -CH₃ gruplarına ilişkin pikler olarak

saptanmıştır. 1.80 ppm’de görülen -CH piklerine ilişkin çoklu (multiplet) bant gözlenirken, 2.40 ppm’de görülen ikili piklerin (doublet) de CH₂ piklerine ilişkin olduğu belirlenmiştir. CH-COOH grubundaki CH₃, 3.62 ppm’de dörtlü pik olarak saptanmıştır (Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd., 2020).

5.1.5. İBU’nun yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile miktar tayini ve validasyon çalışmaları

Miktar tayini validasyonunda doğrusallık, kesinlik (tekrar edilebilirlik ve tekrar üretilebilirlik), seçicilik, doğruluk ve duyarlılık parametreleri esas alınmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

5.1.5.1. Doğrusallık

HPLC yönteminde kullanılacak İBU’ya ait standart eğrinin belirlenmesi için asetonitril kullanılarak stok çözelti hazırlanmıştır. 5-100 µg.mL⁻¹ İBU konsantrasyonu aralığında 3 farklı kalibrasyon seti hazırlanmış ve **Tablo 4.1**’de yer alan analiz koşullarında HPLC ile analiz edilmiştir. İBU konsantrasyonlarına karşılık gelen alan değerleri bulunmuştur. Konsantrasyona karşı alan/tutulma zamanı (R_t) değerleri **Tablo 5.1-5.3**’te sunulmuştur.

Tablo 5.1. Seri 1 HPLC sonuçları ve değerlendirilmesi

Seri 1	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	R _t	Alan/ R _t
1	5.0000	200159	8.3920	23851.1688
2	10.0000	384973	8.3900	45884.7447
3	20.0000	759089	8.3860	90518.6024
4	30.0000	1116399	8.3910	133047.1934
5	40.0000	1513232	8.3890	180382.8823
6	50.0000	1877493	8.3820	223991.0523
7	60.0000	2305402	8.3840	274976.3846
8	70.0000	2729466	8.3770	325828.5782
9	80.0000	3053546	8.3820	364298.0206
10	90.0000	3454749	8.3740	412556.6048
11	100.0000	3816733	8.3730	455838.1703

Tablo 5.2. *Seri 2 HPLC sonuçları ve değerlendirilmesi*

Seri 2	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	R _t	Alan/ R _t
1	5.0000	203879	8.3890	24303.1351
2	10.0000	394443	8.3900	47013.4684
3	20.0000	763737	8.3830	91105.4525
4	30.0000	1143238	8.3760	136489.7336
5	40.0000	1519802	8.3730	181512.2427
6	50.0000	1903026	8.3800	227091.4081
7	60.0000	2341047	8.3710	279661.5707
8	70.0000	2711057	8.3750	323708.2995
9	80.0000	3074491	8.3720	367234.9508
10	90.0000	3452773	8.3730	412369.8794
11	100.0000	3826733	8.3690	457250.9260

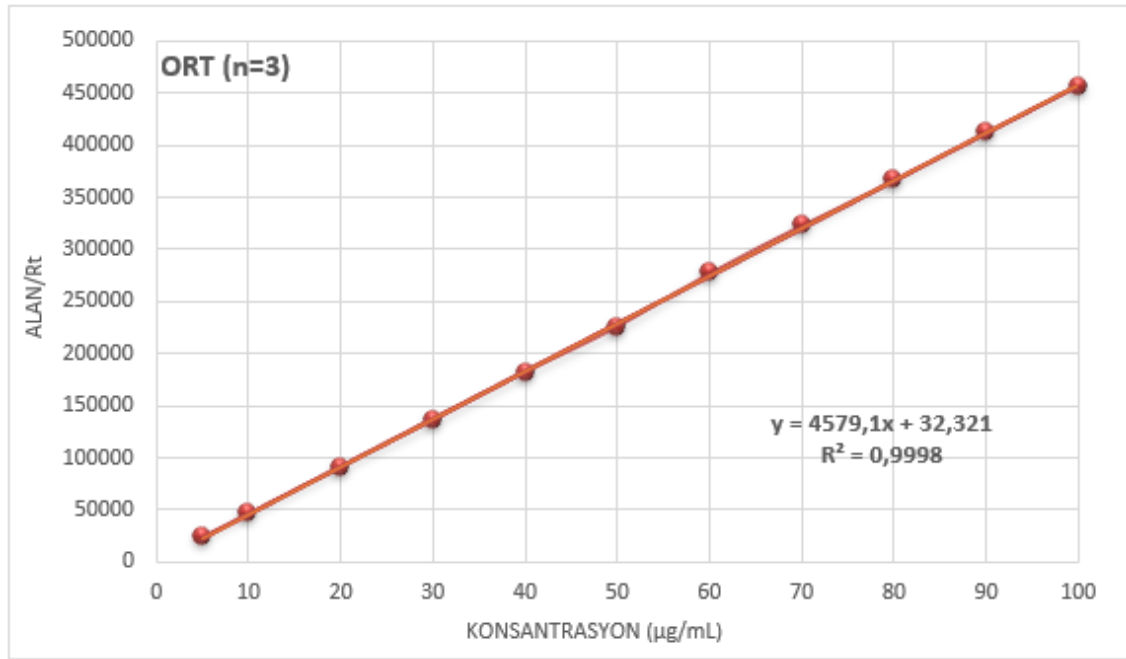
Tablo 5.3. *Seri 3 HPLC sonuçları ve değerlendirilmesi*

Seri 3	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	R _t	Alan/ R _t
1	5.0000	209408	8.3820	24983.0599
2	10.0000	396267	8.3830	47270.3090
3	20.0000	769964	8.3840	91837.3092
4	30.0000	1145156	8.3860	136555.6881
5	40.0000	1540701	8.3870	183701.0850
6	50.0000	1885198	8.3860	224803.0050
7	60.0000	2339664	8.3850	279029.6969
8	70.0000	2697067	8.3840	321692.1527
9	80.0000	3086651	8.3810	368291.4937
10	90.0000	3449409	8.3790	411673.1113
11	100.0000	3827218	8.3840	456490.6976

Üç serinin birlikte değerlendirilmesi için yapılan hesaplamalar **Tablo 5.4**'te verilmiştir. Yapılan doğrusallık çalışması sonucunda, İBU etkin maddesinin konsantrasyon hesabı için kullanılacak doğru denklemi $y=4579.0844x + 32.3210$ [y: alan/R_t; x: konsantrasyon (µg/mL)] olarak bulunmuştur (**Şekil 5.5**).

Tablo 5.4. Doğrusallık hesabı için 3 seriden elde edilen ortalama Alan/Rt değerleri

Konsantrasyon (µg/mL)	Seri 1	Seri 2	Seri 3	ORT (n=3)
5.0000	23851.1688	24303.1351	24983.0599	24379.1206
10.0000	45884.7447	47013.4684	47270.3090	46722.8404
20.0000	90518.6024	91105.4525	91837.3092	91153.7877
30.0000	133047.1934	136489.7336	136555.6881	135364.2047
40.0000	180382.8823	181512.2427	183701.0850	181865.4030
50.0000	223991.0523	227091.4081	224803.0050	225295.1551
60.0000	274976.3846	279661.5707	279029.6969	277889.2164
70.0000	325828.5782	323708.2995	321692.1527	323743.0095
80.0000	364298.0206	367234.9508	368291.4937	366608.1540
90.0000	412556.6048	412369.8794	411673.1113	412199.8648
100.0000	455838.1703	457250.9260	456490.6976	456526.5976



Şekil 5.5. İBU'ya ait doğrusallık grafiği ($\bar{x} \pm SH$, n=3)

Yapılan çalışmalardan da görüldüğü gibi doğrusallık için 5-100 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Elde edilen doğru denklemi İBU etkin maddesinin miktar tayini çalışmalarında kullanılmıştır.

5.1.5.2. Doğruluk

Doğruluk çalışması için çalışma aralığı (5-100 µg/mL) içinde 20, 50 ve 80 µg/mL olmak üzere üç farklı konsantrasyonda İBU içeren örnekler hazırlanmıştır. Analiz sonucunda bulunan yüzde geri kazanım değerlerinin % 98-102 aralığında olması gerekmektedir. Elde edilen değerler ile yöntem geri kazanım yüzde değerleri değerlendirilmiştir (Tablo 5.5-5.7).

Kabul limiti geri kazanım değerinin $\pm$ % 2 çıkmasıdır ve sonuçlara göre yöntem iyi geri kazanım göstermiştir (ICH, 2005).

Tablo 5.5. 20 µg/mL konsantrasyon için doğruluk çalışması (n=3)

20 µg/mL	1	2	3	4
Alan	755462	759743	762287	763887
R _t	8.408	8.410	8.408	8.413
Alan/R _t	89850.3806	90388.0499	90662.1075	90798.4072
Konsantrasyon (µg/mL)	19.6149	19.7214	19.7921	19.8219
% geri kazanım	98.0743	98.6068	98.0743	98,0743
% geri kazanım ORT	98.6878			
% fark	1.3122			
SS	0.4601			
% BSS	0.4663			
SH	0.2301			

Tablo 5.6. 50 µg/mL konsantrasyon için doğruluk çalışması (n=3)

50 µg/mL	1	2	3	4
Alan	1947521	1955076	1958570	1959325
R _t	8.403	8.403	8.394	8.405
Alan/R _t	231764.9649	232664.0486	233329.7594	233114.2177
Konsantrasyon (µg/mL)	50.6068	50.8031	50.9485	50.9014
% geri kazanım	101.2135	101.6062	101.8970	101.8028
% geri kazanım ORT	101.6299			
% fark	1.6299			
SS	0.3029			
% BSS	0.2980			
SH	0.1514			

Tablo 5.7. 80 µg/mL konsantrasyon için doğruluk çalışması (n=3)

80 µg/mL	1	2	3	4
Alan	3052246	3058559	3035201	3093053
R _t	8.387	8.386	8.391	8.390
Alan/R _t	363925.8376	364722.0367	361721.0106	368659.4756
Konsantrasyon (µg/mL)	79.4686	79.6425	78.9871	80.5024
% geri kazanım	99.3358	99.5531	98.7339	100.6280
% geri kazanım ORT	99.5627			
% fark	0.4373			
SS	0.7902			
% BSS	0.7937			
SH	0.3951			

5.1.5.3. Kesinlik

Yöntemin tekrarlanabilirliğini (gün içi) göstermek amacıyla 3 farklı konsantrasyonda (20, 50 ve 80 µg/mL) İBU içeren örnek hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 4 tekrar olacak şekilde ölçüm yapılmıştır. Yöntemin tekrar elde edilebilirliği (günler arası) için, aynı seriler farklı günlerde tekrar hazırlanmış; sonuçlar, SS ve BSS olarak verilmiştir (Tablo 5.8-5.11).

Tablo 5.8. Üç farklı konsantrasyonda tekrar edilebilirlik çalışması 1. gün (n=4)

Gün 1	Alan	R _t	Alan/R _t	Konsantrasyon (µg/mL)
20 µg/mL	770916	8.428	91470.8116	19.9687
	770962	8.421	91552.3097	19.9865
	771324	8.426	91540.9447	19.9840
	771079	8.416	91620.6036	20.0014
50 µg/mL	1960633	8.413	233048.0209	50.8870
	1961428	8.411	233197.9551	50.9197
	1959724	8.417	232829.2741	50.8392
	1958302	8.414	232743.2850	50.8204
80 µg/mL	3059437	8.402	364131.9924	79.5136
	3060679	8.400	364366.5476	79.5649
	3061824	8.397	364633.0832	79.6231
	3055740	8.399	363821.8836	79.4459

Tablo 5.9. Üç farklı konsantrasyonda tekrar edilebilirlik çalışması 2. gün (n=4)

Gün 2	Alan	R _t	Alan/R _t	Konsantrasyon (µg/mL)
20 µg/mL	749849	8.430	88950.0593	19.4182
	749851	8.427	88981.9627	19.4252
	750203	8.427	89023.7332	19.4343
	749605	8.424	88984.4492	19.4257
50 µg/mL	1969840	8.415	234086.7499	51.1138
	1969371	8.412	234114.4793	51.1199
	1968876	8.419	233861.0286	51.0645
	1970324	8.421	233977.4374	51.0899
80 µg/mL	3055339	8.400	363730.8333	79.4260
	3056246	8.404	363665.6354	79.4118
	3057301	8.407	363661.3536	79.4109
	3054132	8.401	363543.8638	79.3852

Tablo 5.10. Üç farklı konsantrasyonda tekrar edilebilirlik çalışması 3. gün (n=4)

Gün 2	Alan	R _t	Alan/R _t	Konsantrasyon (µg/mL)
20 µg/mL	782538	8.430	92827.7580	20.2651
	784125	8.432	92993.9516	20.3014
	782906	8.432	92849.3833	20.2698
	781154	8.428	92685.5719	20.2340
50 µg/mL	1950007	8.418	231647.3034	50.5811
	1949756	8.422	231507.4804	50.5505
	1950621	8.421	231637.6915	50.5790
	1949967	8.422	231532.5338	50.5560
80 µg/mL	3086707	8.406	367202.8313	80.1843
	3082744	8.401	366949.6489	80.1290
	3085519	8.410	366886.9203	80.1153
	3083842	8.402	367036.6579	80.1480

Tablo 5.11. İBU'nun gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları

Gün içi				Günler arası
20 µg/mL	1. Gün	2.Gün	3.Gün	
ORT	19.9852	19.426	20.2676	18.6723
SS	0.0134	0.007	0.0276	0.3657
% BSS	0.0670	0.034	0.1360	1.9584

Gün içi				Günler arası
50 µg/mL	1. Gün	2.Gün	3.Gün	
ORT	50.8666	51.097	50.5666	51.1755
SS	0.0452	0.025	0.0156	0.3039
% BSS	0.0888	0.049	0.0309	0.5939

Gün içi				Günler arası
80 µg/mL	1. Gün	2.Gün	3.Gün	
ORT	79.5369	79.408	80.1441	79.6965
SS	0.0753	0.017	0.0299	0.3379
% BSS	0.0947	0.021	0.0373	0.4240

Elde edilen sonuçlar ICH'e göre değerlendirildiğinde BSS %2'nin altında olduğu için kullanılan yöntemin kesinliği kanıtlanmıştır. Analitik yöntemin kesinliği ile ilişkin gün içi ve günler-arası kesinlik sonuçlarının değerlendirildiği üç farklı konsantrasyonda yapılan ölçümlerde BSS % 2'nin altında bulunmuş ve yöntemin kesinliği kanıtlanmıştır (ICH, 2005).

5.1.5.4. Duyarlılık

Denklem 4.1 kullanılarak hesaplanan LOD değeri, $0.6789 \mu\text{g.mL}^{-1}$, Denklem 4.2 kullanılarak hesaplanan LOQ değeri ise $2.0571 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Analitik yöntemin validasyon çalışmaları zamanı kullanılan en düşük İBU konsantrasyonu $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ 'dir. Hesaplanmış LOD ve LOQ değerlerinin $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ 'den daha düşük değerler alması yöntemin duyarlılığının uygun olmasını kanıtlamaktadır.

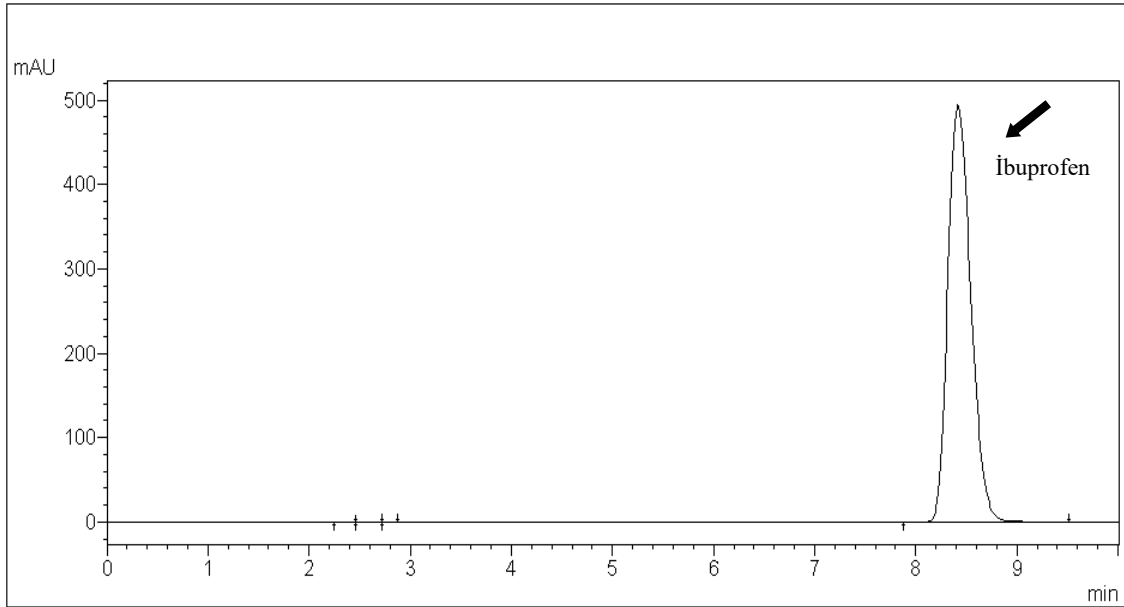
5.1.5.5. Seçicilik

Yöntemin seçicilik özelliğinin belirlenmesi amacı ile, İBU ile formülasyon çalışmalarında kullanılan diğer bileşenlerin 225 nm dalga boyunda HPLC çalışmalarında

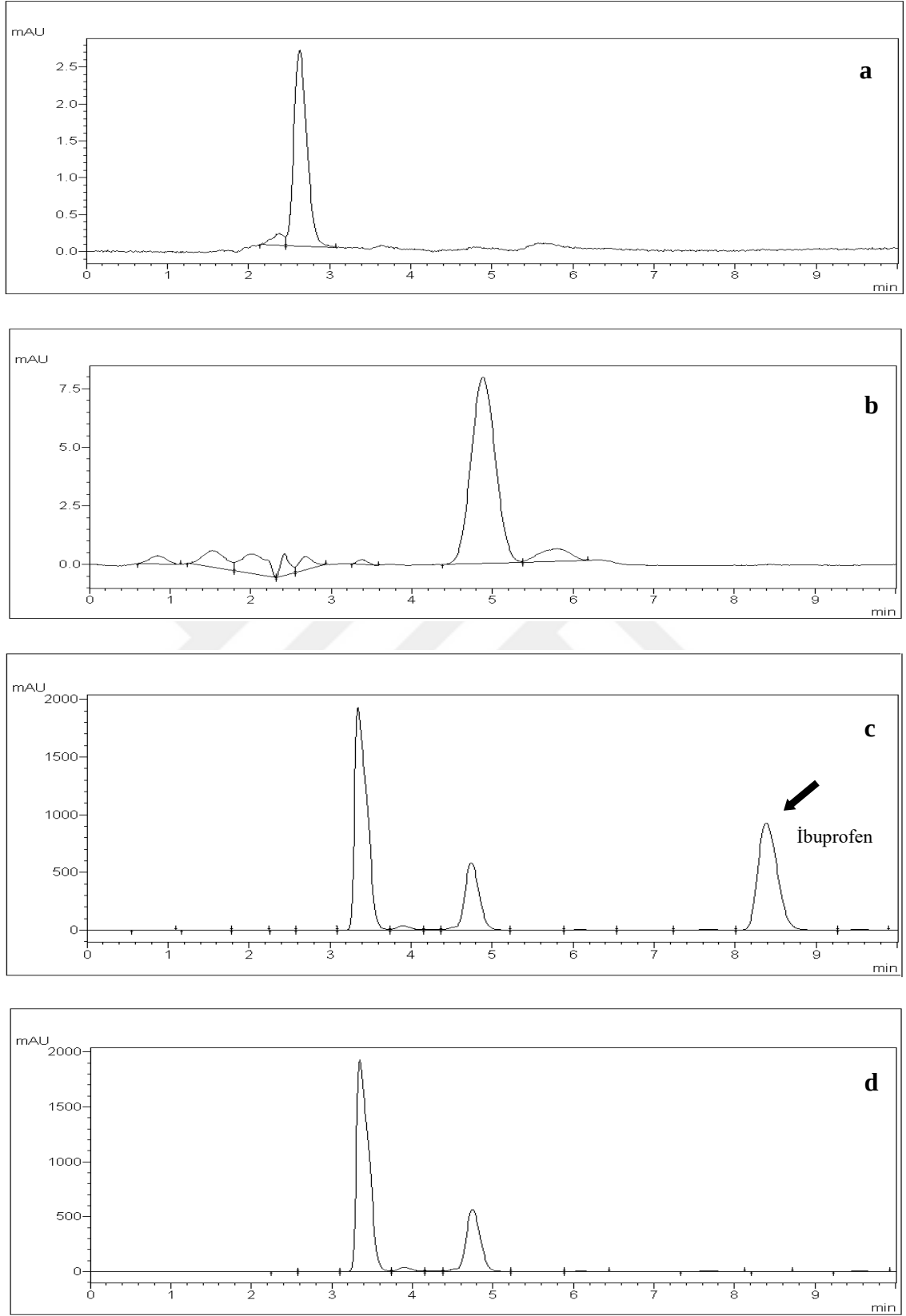
elde edilen sinyallerin birbiri ile çakışma olasılıkları incelenmiştir. Seçicilik çalışması için kullanılan çözücülere, bu çözücüler ile hazırlanmış İBU çözeltilerine, kullanılan salım ortamlarına ve İBU'nun salım ortamlarında çözeltilerine ilişkin kromatogramlar **Şekil 5.6-5.9**'da sunulmuştur.

Çalışmada aktif madde içermeyen formülasyonlar ile aktif madde içeren formülasyonların analizi gerçekleştirilerek sistemin seçiciliği belirlenmeye çalışılmıştır. Hazırlanan formülasyonların HPLC seçicilik analiz kromatogramları **Şekil 5.10-5.13**'te verilmiştir.

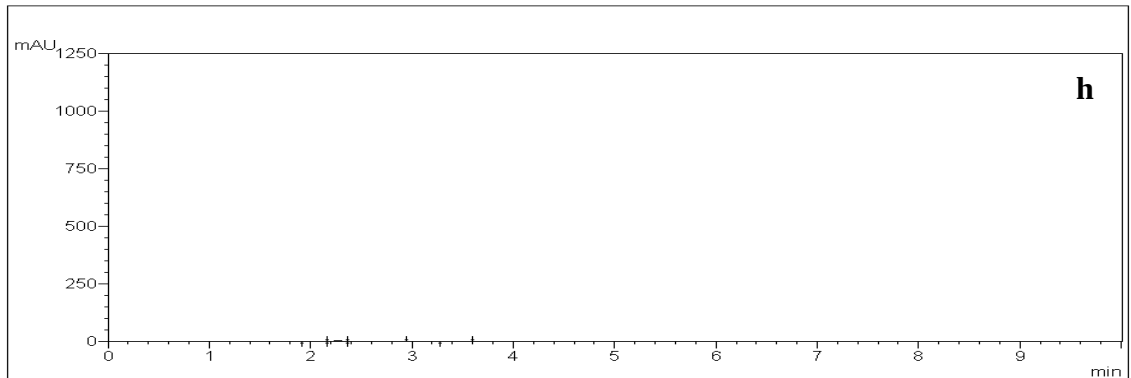
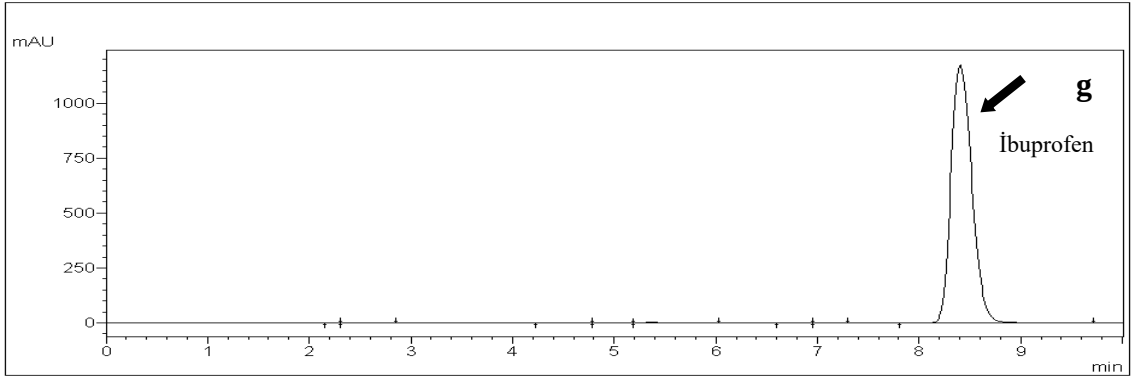
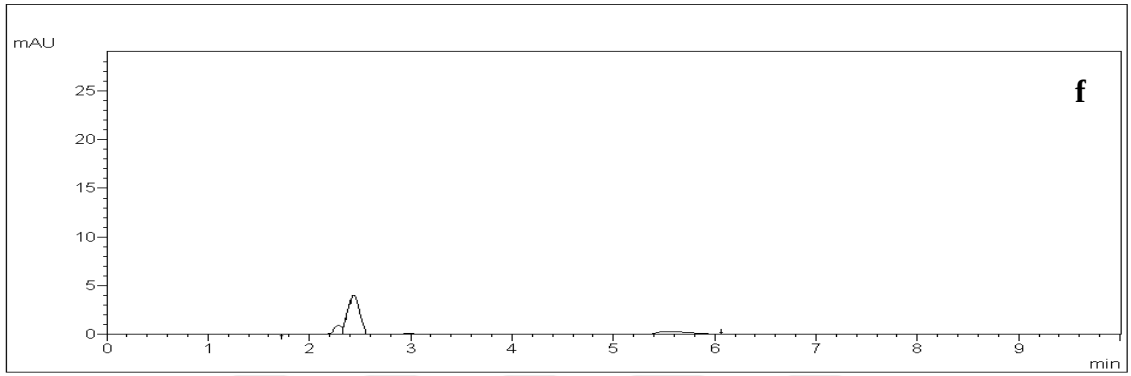
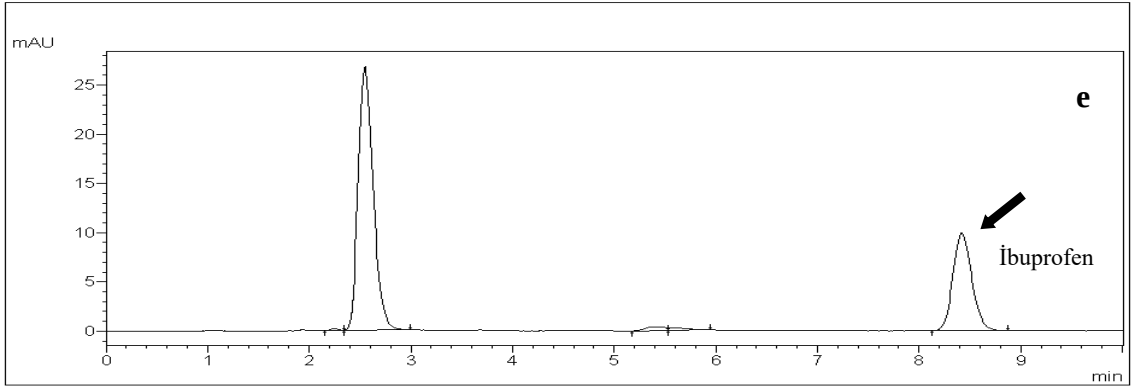
Elde edilen kromatogramlar incelendiğinde aktif madde sinyalinin diğer tüm formülasyon bileşenlerinin sinyallerinden ayrıldığı görülmüştür. Elde edilen analiz sonuçlarının tamamı dikkatle incelendiğinde kullanılan yöntemin İBU'nun HPLC ile gerçekleştirilecek kantitatif analizlerinde başarıyla kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.



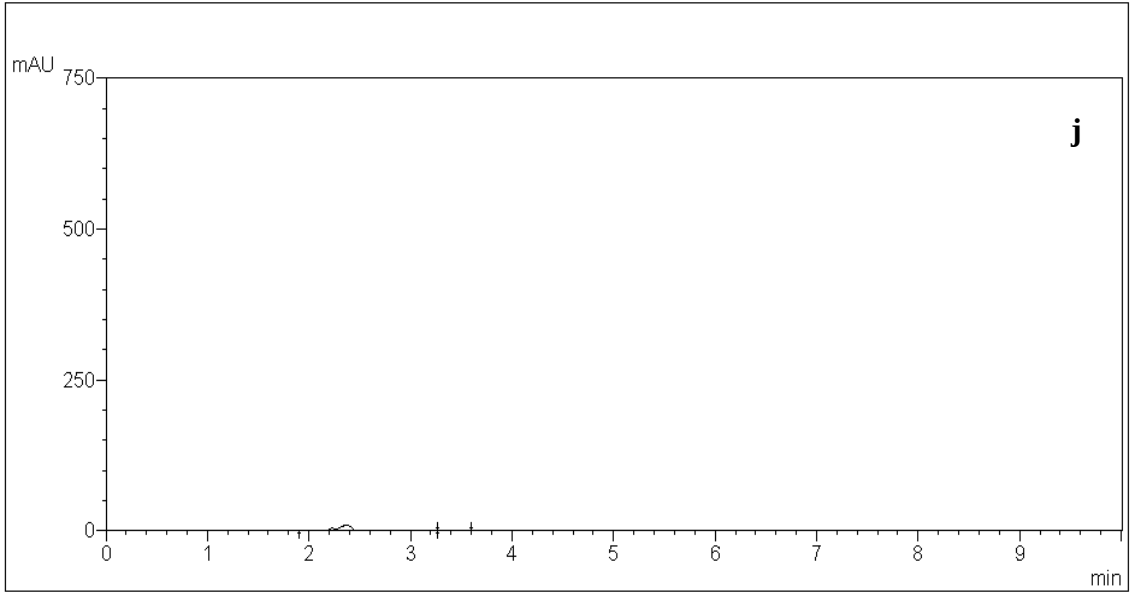
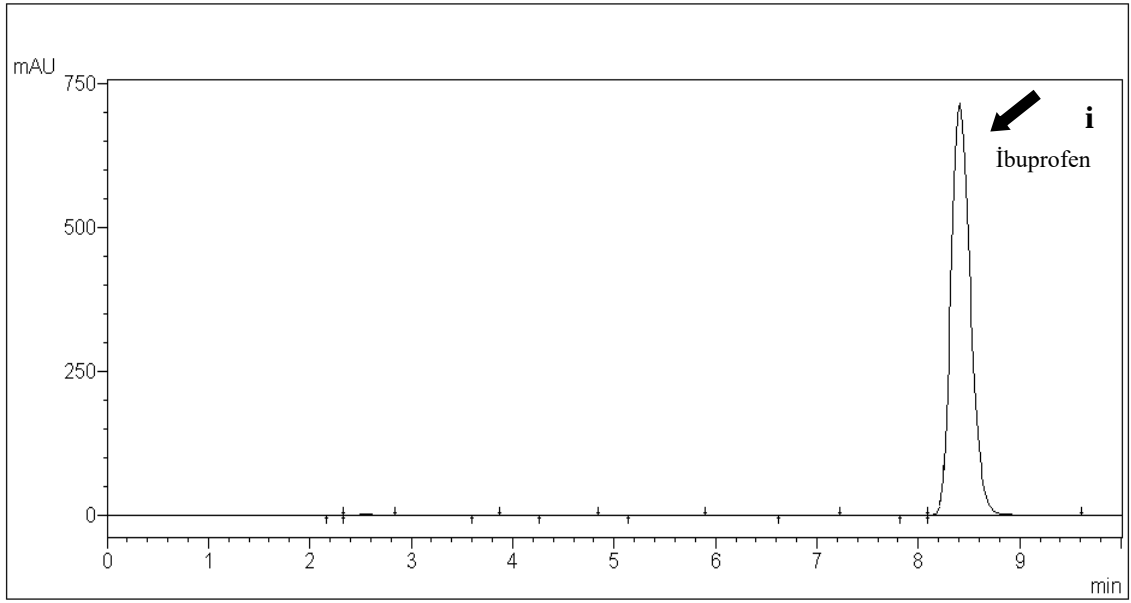
Şekil 5.6. İBU'nun asetonitrildeki çözeltisine ait kromatogramı



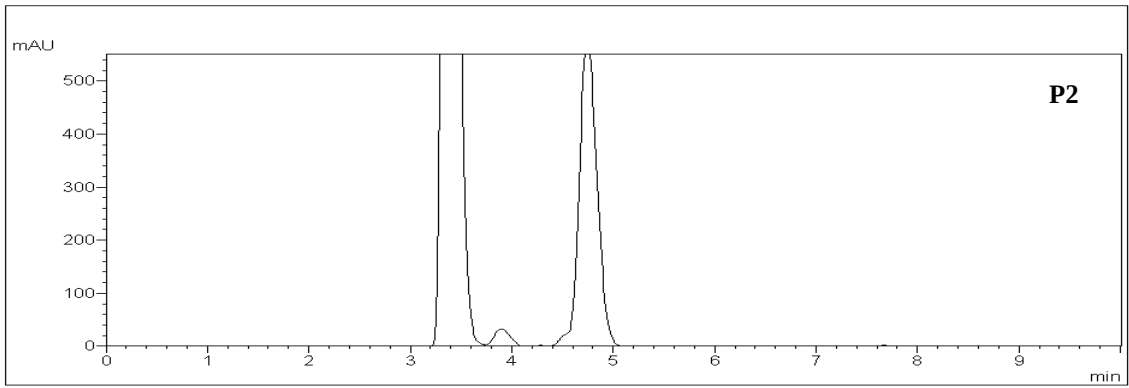
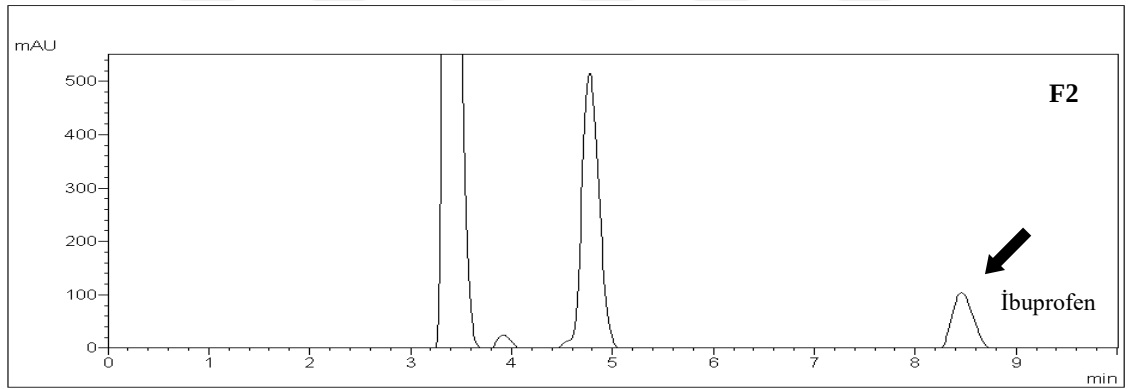
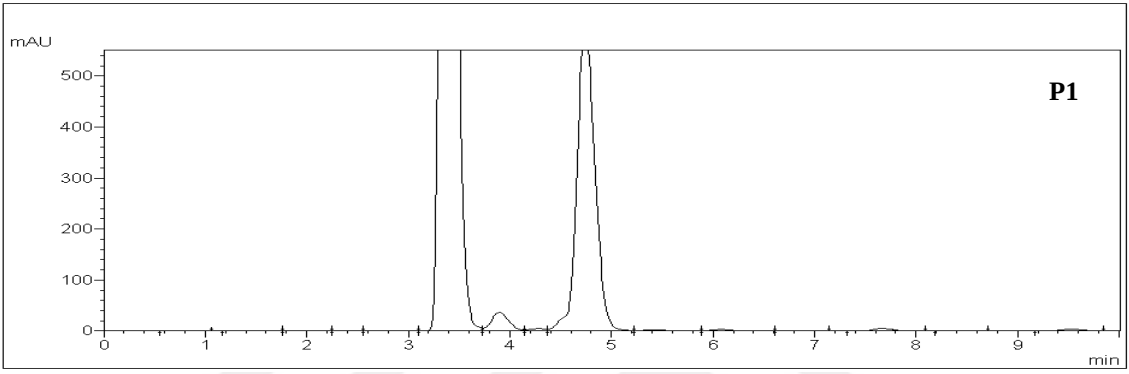
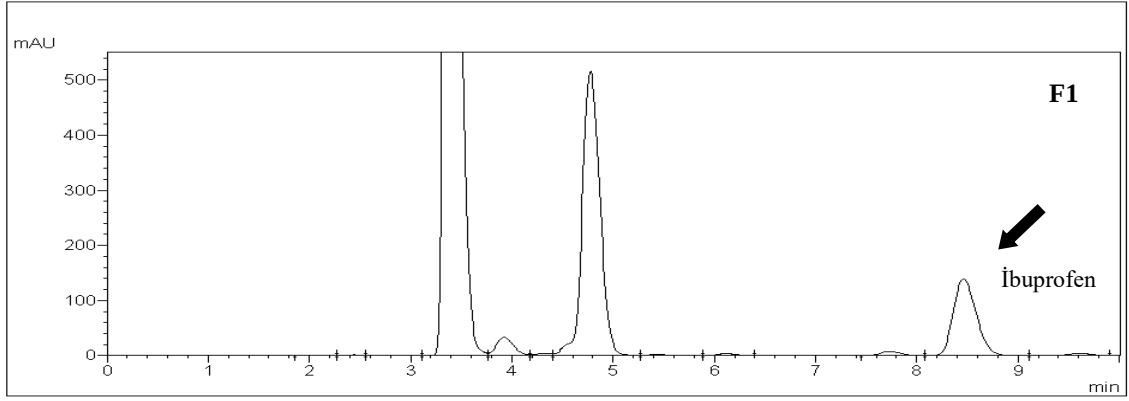
Şekil 5.7. Mobil faz 'a' ait kromatogram (a), % 50 Asetonitril 'e ait kromatogram (b), İBU'nun asetondaki çözeltisine ait kromatogramı (c), asetona ait kromatogramı (d)



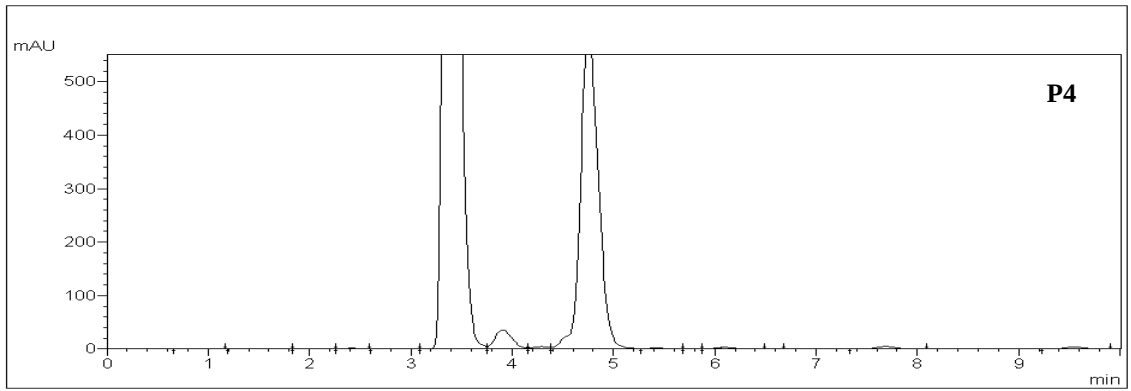
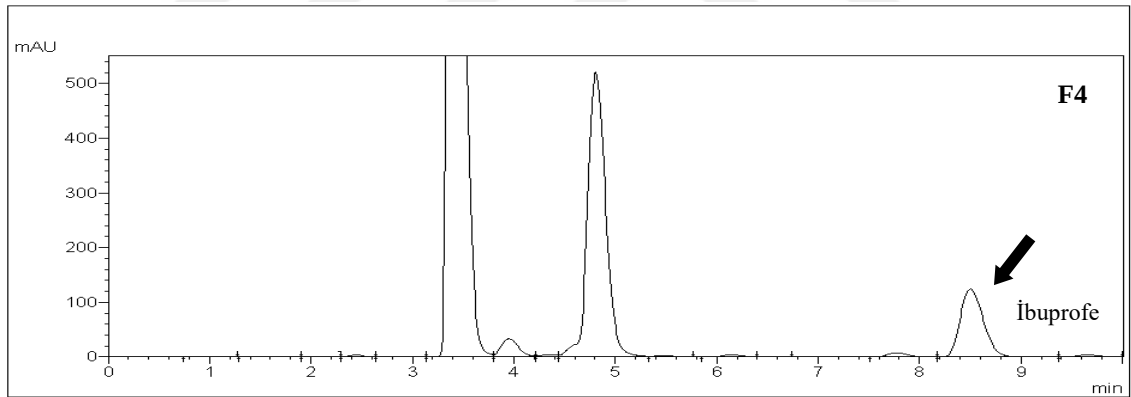
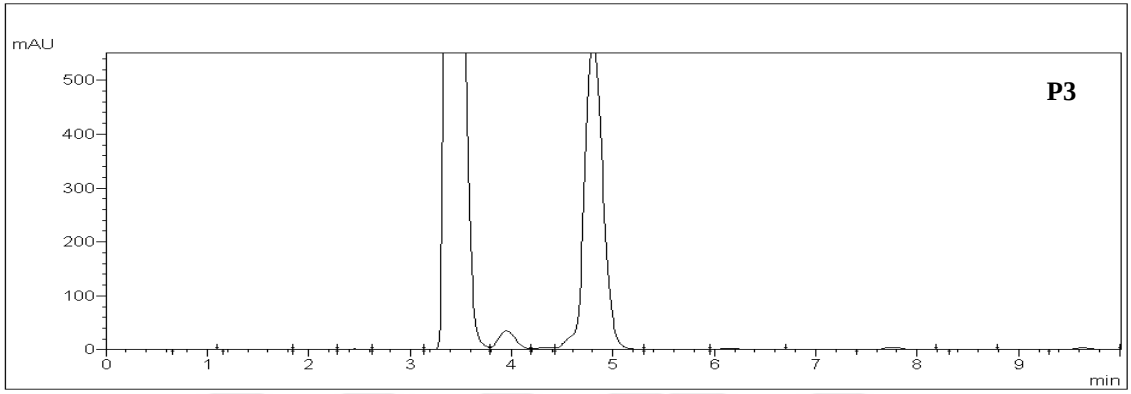
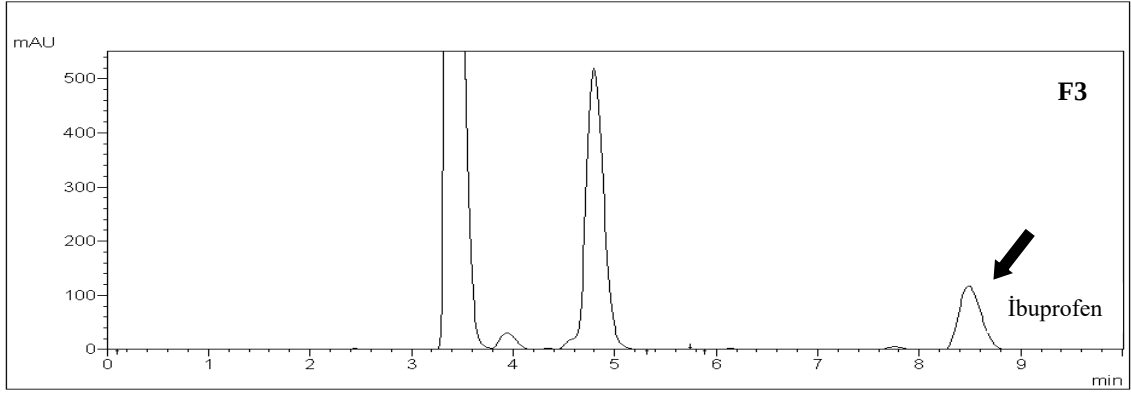
Şekil 5.8. İBU'nun pH 1.2'deki çözeltisine ait kromatogram (e), pH 1.2'e ait kromatogram (f), İBU'nun pH 6.8'deki çözeltisine ait kromatogram (g), pH 6.8'e ait kromatogram (h)



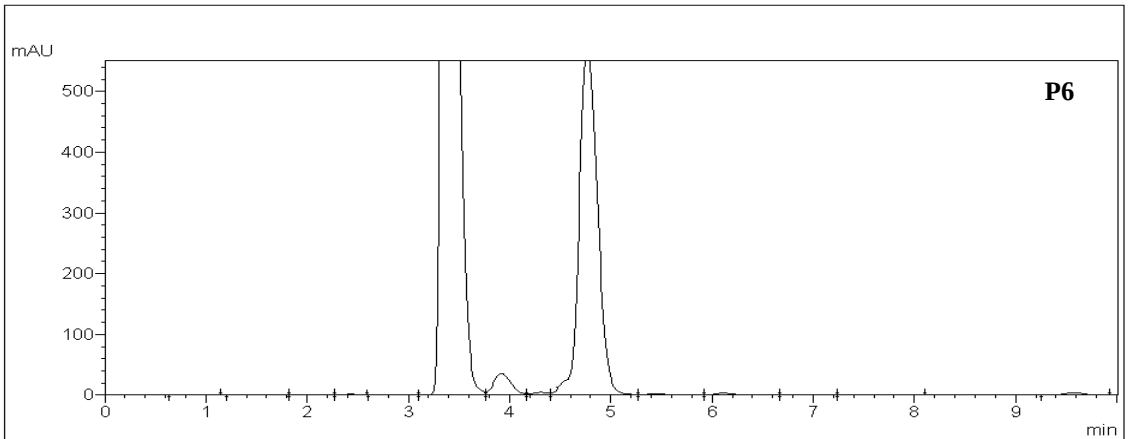
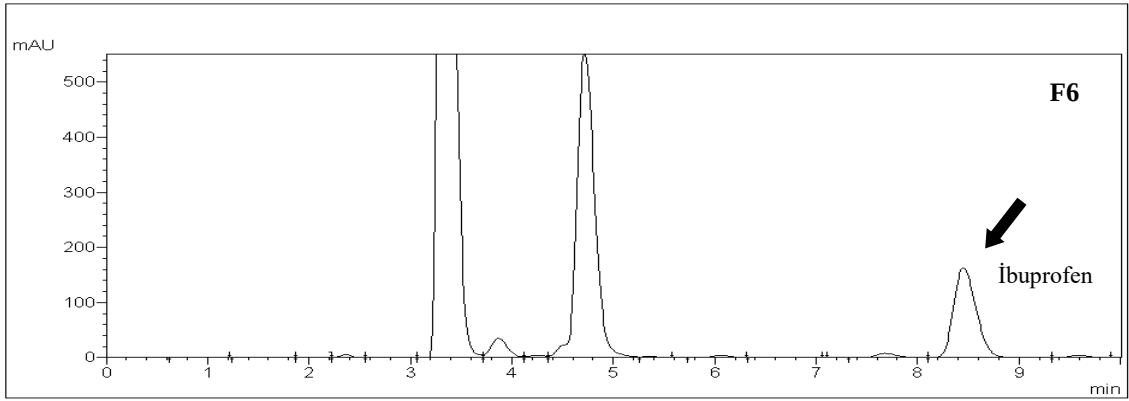
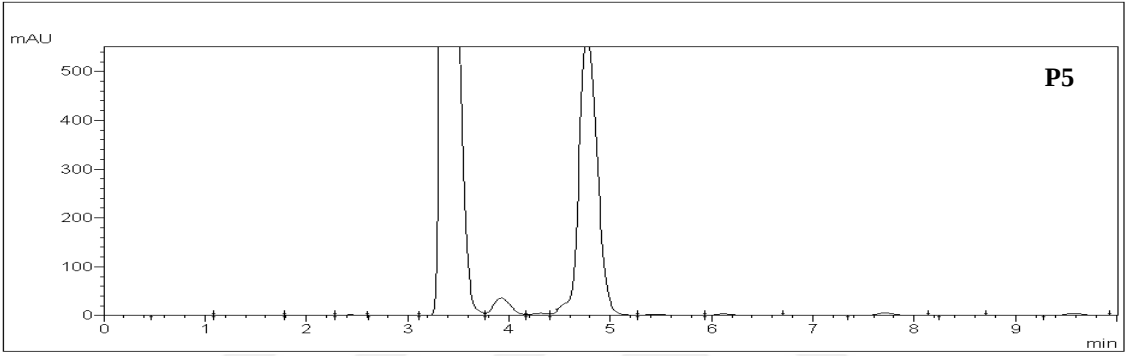
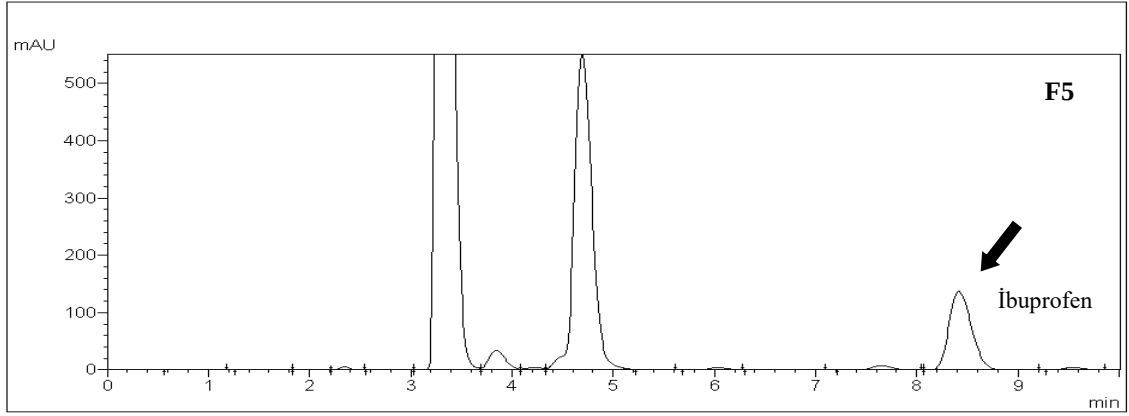
Şekil 5.9. İBU'nun pH 7.4'deki çözeltisine ait kromatogram (i), pH 7.4'e ait kromatogram (j)



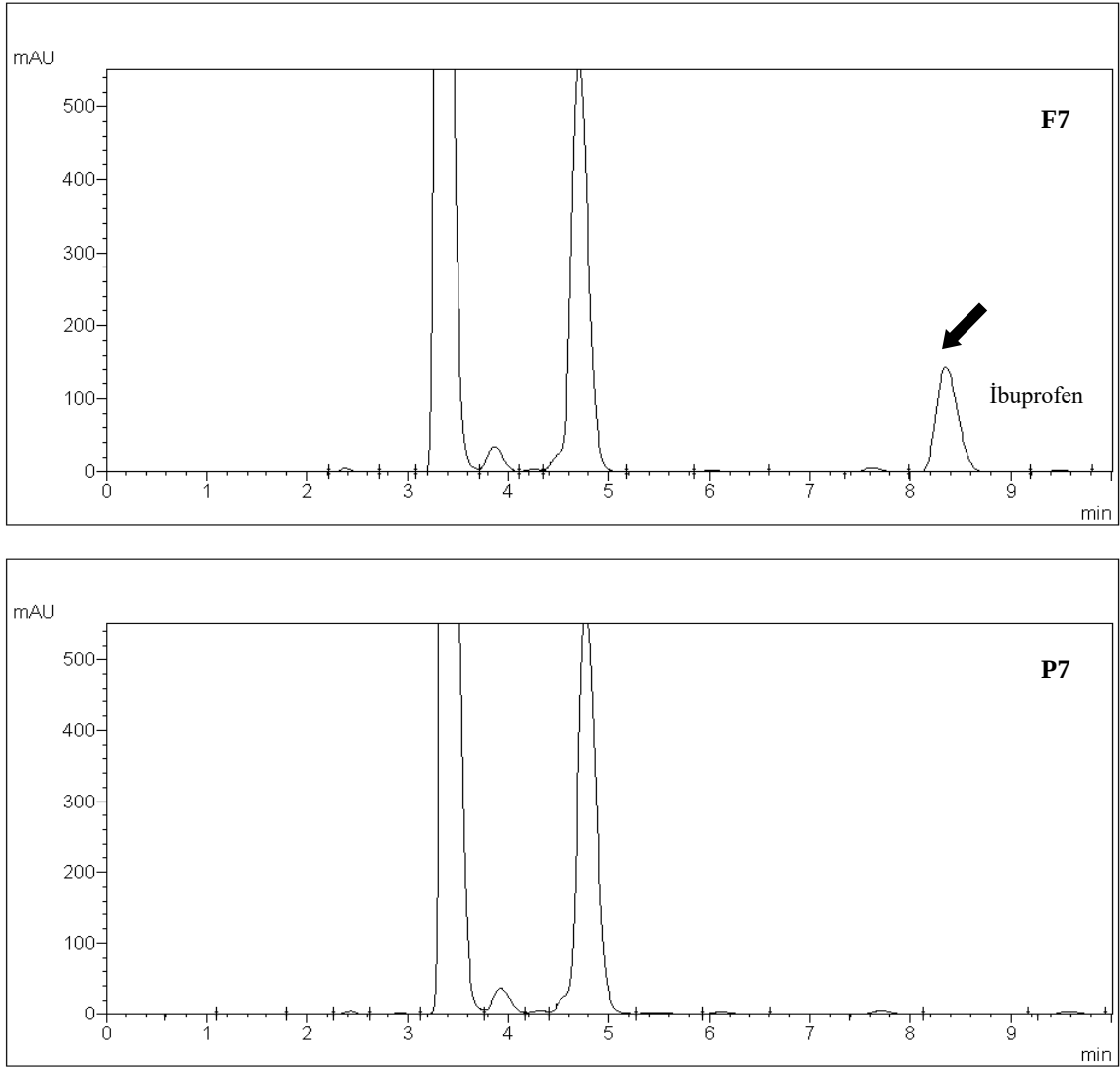
Şekil 5.10. F1, P1, F2 ve P2 formülasyonlarına ait kromatogramlar



Şekil 5.11. F3, P3, F4 ve P4 formülasyonlarına ait kromatogramlar



Şekil 5.12. F5, P5, F6 ve P6 formülasyonlarına ait kromatogramlar



Şekil 5.13. F7 ve P7 formülasyonlarına ait kromatogramlar

5.1.6. Çalışma şartlarında kararlılık

5.1.6.1. Formülasyon hazırlama koşullarındaki kararlılık

Etkin maddenin PNP hazırlama koşullarında (aseton-diklorometan karışımı, 25 °C’de, 1 saat) incelenmesi, “İBU’nun yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile miktar tayini ve validasyon çalışmaları” bölümünde anlatıldığı şekilde İBU miktarının belirlenmesine dayanmaktadır. HPLC kullanılarak yapılan miktar tayini analizinde aktif maddenin 99.367 ± 0.875 ’inin (ORT $\pm$ SH) bozunmadan kaldığı bulunmuştur.

5.1.6.2. Etkin madde miktar tayini analizi için örnek hazırlama koşullarındaki kararlılık

Etkin maddenin kararlılığı İBU'nun formülasyondan ekstraksiyonu amacıyla kullanılan ortamda 1 ml asetonda, 25°C sıcaklıkta incelendiğinde, 15 dk sonunda İBU'nun 99.135 ± 0.142 'sinin (ORT $\pm$ SH) bozunmadan kaldığı bulunmuştur. Bu nedenle kullanılan koşulların uygun olduğu kararına varılmıştır.

5.1.6.3. *In vitro* salım ortamı koşullarındaki kararlılık

Etkin maddenin kararlılığı *in vitro* salım ortamı pH 1.2, pH 6.8 PBS ve pH 7.4 PBS'te incelenmiştir. pH 1.2'de gerçekleştirilen 2 saatlik deney süresi sonunda, etkin maddenin 99.501 ± 0.142 'sinin (ORT $\pm$ SH) bozunmadan kaldığı bulunmuştur (n=3). pH 6.8 PBS'te gerçekleştirilen 3 saatlik deney süresi sonunda, etkin maddenin 99.758 ± 0.537 'sinin (ORT $\pm$ SH) bozunmadan kaldığı bulunmuştur (n=3). pH 7.4 PBS'te gerçekleştirilen 72 saatlik deney süresi sonunda, etkin maddenin 98.618 ± 0.263 'ünün (ORT $\pm$ SH) bozunmadan kaldığı bulunmuştur (n=3). Bu nedenle *in vitro* salım deneyleri boyunca kullanılan şartların etkin madde kararlılığı açısından uygun olduğuna karar verilmiştir.

5.2. Polimerik Nanopartikül Formülasyonu Çalışmaları

5.2.1. Polimerik nanopartikül formülasyonu geliştirme çalışmaları

Formülasyon geliştirme çalışmalarında, farklı molekül ağırlıklı PCL 10000 (Mn~10000), PCL 45000 (Mn~45000), PCL 80000 (Mn~80000) ve ES 100 polimerleri, farklı organik faz bileşenleri ve miktarları, farklı akış hızları kullanılarak formülasyon denemeleri nanoçöktürme yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Formülasyon bileşenleri “4.2.1. Polimerik nanopartikül formülasyonu geliştirme çalışmaları” bölümünde **Tablo 4.2**'de sunulmuştur. Belirtilen her formülasyon denemesinde başarı ile NP'ler elde edilmiştir.

5.2.1.1. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı

Formülasyon geliştirme çalışmalarında hazırlanan formülasyonların PB ve dağılımı değerleri **Tablo 5.12**'de sunulmuştur.

Tablo 5.12. Polimerik nanopartikül formülasyonu geliştirme çalışmalarında hazırlanan formülasyonların PB ve dağılımı değerleri

	Parçacık Büyüklüğü (nm)	
	ORT $\pm$ SH	PDI $\pm$ SH
PNP-1	493.43 $\pm$ 77.78	0.65 $\pm$ 0.05
PNP-2	453.95 $\pm$ 18.90	0.55 $\pm$ 0.04
PNP-3	466.17 $\pm$ 31.50	0.52 $\pm$ 0.03
PNP-4	436.17 $\pm$ 70.77	0.49 $\pm$ 0.09
PNP-5	877.80 $\pm$ 62.69	0.60 $\pm$ 0.14
PNP-6	408.10 $\pm$ 53.95	0.48 $\pm$ 0.02
PNP-7	979.33 $\pm$ 60.98	0.89 $\pm$ 0.04
PNP-8	424.67 $\pm$ 19.96	0.56 $\pm$ 0.02
PNP-9	367.97 $\pm$ 9.30	0.50 $\pm$ 0.02
PNP-10	327.53 $\pm$ 17.53	0.64 $\pm$ 0.03
PNP-11	849.00 $\pm$ 38.40	0.89 $\pm$ 0.06
PNP-12	417.63 $\pm$ 59.60	0.58 $\pm$ 0.05
PNP-13	226.30 $\pm$ 15.35	0.63 $\pm$ 0.03
PNP-14	916.67 $\pm$ 88.19	0.71 $\pm$ 0.17
PNP-15	470.33 $\pm$ 28.17	0.55 $\pm$ 0.07

(ORT: Ortalama, PDI: Polidisperslik indisi, SH: Standart hata)

NP'lerin en önemli karakterizasyon analizleri arasında PB ve dağılımı yer almaktadır. İlaç üretim prosesinin kritik parametrelerinden olan PB, ilaç taşıyıcı sistemin biyofarmasötik, güvenlik ve fizikokimyasal etkinlik gibi parametrelerini etkilemektedir (Shekunov vd., 2007).

Kullanılan çözücünün PB üzerine etkisi büyüktür. Formülasyon geliştirme çalışmalarında hazırlanan formülasyonların PB ve PDI değerleri dikkate alındığında, sadece çözücü olarak diklorometan kullanılan PNP formülasyonlarında daha büyük parçacıkların elde edildiği saptanmıştır.

Kullanılan organik solvanın dielektrik sabiti küçüldükçe, elde edilen PNP'lerin PB'sinin büyüdüğü bildirilmiştir. Dielektrik sabiti $\epsilon=0.83$ olan diklorometan ile dielektrik sabiti $\epsilon=20.7$ olan aseton ve diklorometan-aseton karışımına göre daha büyük parçacıklar elde edilmiştir (Yurtdas-Kirimlioglu, 2019).

PDI değerleri, 0.48 ± 0.02 ile 0.89 ± 0.06 aralığında bulunmuştur. Diklorometan ile hazırlanan formülasyonların PDI değerleri daha yüksek bulunmuştur.

5.2.1.2. Zeta potansiyel

Formülasyon geliştirme çalışmalarında hazırlanan formülasyonların ZP değerleri **Tablo 5.13**'te sunulmuştur.

Tablo 5.13. Polimerik nanopartikül formülasyonu geliştirme çalışmalarında hazırlanan formülasyonların ZP değerleri

	Zeta potansiyel (mV)		
	ORT	SS	SH
PNP-1	-42.67	0.75	0.43
PNP-2	-35.03	1.86	1.07
PNP-3	-27.43	1.19	0.69
PNP-4	-23.63	0.99	0.57
PNP-5	-16.97	0.76	0.44
PNP-6	-32.60	1.18	0.68
PNP-7	-35.30	0.66	0.38
PNP-8	-26.40	1.32	0.76
PNP-9	-34.00	1.21	0.70
PNP-10	-35.73	9.96	5.75
PNP-11	-26.33	0.90	0.52
PNP-12	-26.70	1.71	0.99
PNP-13	-30.77	1.75	1.01
PNP-14	-27.47	1.50	0.87
PNP-15	-25.33	1.04	0.60

(ORT: Ortalama, SH: Standart hata; SS: Standart sapma; ZP: Zeta potansiyel)

Hazırlanan PNP formülasyonlarının ZP değerleri, -42.67 ± 0.43 mV ile -16.97 ± 0.44 mV aralığında bulunmuştur. PCL yapısında bulunan karboksilik gruplar nedeni ile negatif yüklü olması beklenen bir durumdur. Literatür ile uyumludur (Tavares vd., 2017). Aynı zamanda ES 100 anyonik bir polimer olduğundan, elde edilen formülasyonlar negatif ZP'ye sahiptir.

5.2.2. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması

Formülasyon geliştirme çalışmalarında hazırlanan PNP'lerden PB, PDI ve ZP değerleri dikkate alınarak formülasyon seçimi yapılmıştır. Gerçekleştirilen karakterizasyon analizleri göz önüne alındığında, optimum formülasyonların hazırlanmasında, çözücü olarak diklorometan-aseton karışımı seçilmiştir. Polimer miktarının her bir PNP formülasyonu için toplam 100 mg olmasına, ve akış hızı olarak 30 mL/s kullanılmasına karar verilmiştir. Farklı molekül ağırlıklı PCL 10000 ($M_n \sim 10000$), PCL 45000 ($M_n \sim 45000$), PCL 80000 ($M_n \sim 80000$) polimerlerinin kullanılmasına, ES 100 polimeri ile modifikasyona ve sadece ES100 polimeri ile PNP formülasyonlarının hazırlanmasına karar verilmiştir.

5.3. Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu

5.3.1. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı

NP'lerin kimyasal, manyetik, mekanik ve elektronik davranışları gibi birçok özelliği PB değerine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Yurtdaş Kirimlioğlu 2014).

Hazırlanan optimum İBU içeren PNP formülasyonlarının ve plasebo PNP formülasyonlarının PB ve dağılımı **Tablo 5.14 - 5.15**'te sunulmuştur.

Tablo 5.14. Optimum İBU içeren PNP formülasyonlarının PB ve dağılımı değerleri (n=3)

Parçacık Büyüklüğü (nm)		
	ORT $\pm$ SH	PDI $\pm$ SH
F1	375.93 $\pm$ 26.47	0.50 $\pm$ 0.03
F2	350.40 $\pm$ 12.15	0.49 $\pm$ 0.02
F3	409.53 $\pm$ 15.97	0.50 $\pm$ 0.05
F4	391.83 $\pm$ 22.31	0.50 $\pm$ 0.02
F5	485.00 $\pm$ 79.79	0.49 $\pm$ 0.03
F6	379.97 $\pm$ 32.00	0.55 $\pm$ 0.08
F7	276.32 $\pm$ 14.27	0.49 $\pm$ 0.02

(ORT: Ortalama, PDI: Polidisperslik indisi, SH: Standart hata)

Tablo 5.15. Optimum plasebo PNP formülasyonlarının PB ve dağılımı değerleri (n=3)

Parçacık Büyüklüğü (nm)		
	ORT $\pm$ SH	PDI $\pm$ SH
P1	350.57 $\pm$ 84.56	0.47 $\pm$ 0.05
P2	343.37 $\pm$ 17.05	0.48 $\pm$ 0.05
P3	388.57 $\pm$ 47.07	0.49 $\pm$ 0.06
P4	374.77 $\pm$ 25.53	0.48 $\pm$ 0.02
P5	470.33 $\pm$ 28.17	0.50 $\pm$ 0.03
P6	327.53 $\pm$ 17.53	0.57 $\pm$ 0.03
P7	226.30 $\pm$ 15.35	0.52 $\pm$ 0.02

(ORT: Ortalama, PDI: Polidisperslik indisi, SH: Standart hata)

Hazırlanan İBU içeren optimum PNP formülasyonlarının PB değerleri 276.32 $\pm$ 14.27 nm ile 485.00 $\pm$ 79.79 nm aralığında bulunmuştur. En küçük PB, sadece ES100 polimeri ile hazırlanan PNP formülasyonu ile elde edilmiştir.

F5 formülasyonu 485.00 $\pm$ 79.79 nm PB ile, F3 (409.53 $\pm$ 15.97) ve F1 (375.93 $\pm$ 26.47) formülasyonundan daha büyük PB'ye sahiptir. Bir başka ifade ile, kullanılan PCL polimerinin molekül ağırlığı arttıkça, PNP formülasyonun PB'sinin arttığı saptanmıştır. Aynı zamanda PCL ve ES100 içeren kopolimerik PNP'lerde PB, sadece PCL içeren formülasyonlara göre PB daha küçük bulunmuştur.

PB dağılımını değerlendirmek amacıyla 0-1 arasında değerler alan PDI verileri kullanılmıştır. Sıfıra yaklaştıkça tekdüzeliğin arttığı PDI verileri açısından

değerlendirildiğinde, F6 hariç bütün formülasyonların 0.5'ten küçük değerler olarak tekdüze dağılıma sahip olduğu görülmüştür. Hatta bazı kaynaklarda 0.7'den büyük PDI değerlerinin heterojen dağılımı simgelediği belirtilmiştir (Yurtdaş-Kırımlıoğlu 2019; Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd., 2020).

5.3.2. Zeta potansiyel

Kolloidal parçacıklar dispersiyon ortamından iyon adsorbe ederek pozitif (+) ya da negatif (-) yüklenmektedir. ZP, parçacığın üzerindeki net etkili yükü ifade etmektedir (Çelebi, 2012).

Hazırlanan optimum İBU içeren PNP formülasyonlarının ve plasebo PNP formülasyonlarının ZP analiz sonuçları **Tablo 5.16 - 5.17'**de sunulmuştur.

Tablo 5.16. *Optimum İBU içeren PNP formülasyonlarının ZP değerleri (n=3)*

	Zeta potansiyel (mV)		
	ORT	SS	SH
F1	-23.23	1.26	0.73
F2	-37.77	1.63	0.94
F3	-19.87	1.08	0.62
F4	-34.47	5.20	3.00
F5	-19.27	0.46	0.27
F6	-33.00	0.60	0.35
F7	-56.13	1.12	0.65

(ORT: Ortalama, SH: Standart hata; SS: Standart sapma; ZP: Zeta potansiyel)

Tablo 5.17. *Optimum plasebo PNP formülasyonlarının ZP değerleri (n=3)*

	Zeta potansiyel (mV)		
	ORT	SS	SH
P1	-36.50	4.42	2.55
P2	-35.03	1.86	1.07
P3	-26.40	1.32	0.76
P4	-32.60	1.18	0.68
P5	-25.33	1.04	0.60
P6	-35.73	9.96	5.75
P7	-30.77	1.75	1.01

(ORT: Ortalama, SH: Standart hata; SS: Standart sapma; ZP: Zeta potansiyel)

Hazırlanan İBU içeren optimum PNP formülasyonlarının ZP değerleri -19.27 ± 0.27 mV ile -56.13 ± 0.65 mV aralığında bulunmuştur. En düşük ZP değeri sadece ES100 polimeri ile hazırlanan PNP formülasyonu ile elde edilmiştir.

F5 formülasyonu, -19.27 mV ZP ile, F3 (-19.87) ve F1 (-23.23) formülasyonundan daha büyük ZP'ye sahiptir. Bir başka ifade ile, kullanılan PCL polimerinin molekül ağırlığı arttıkça, PNP formülasyonun ZP'sinin arttığı saptanmıştır. Aynı zamanda PCL ve ES100 içeren kopolimerik PNP'lerde ZP, sadece PCL içeren formülasyonlara göre daha küçük bulunmuştur.

ZP, parçacıkların hücrelerle etkileşimi, hücre içine taşınmasında etkili olduğu kadar parçacıkların uzun süreli kolloidal kararlılığı açısından da önem taşımaktadır (Yurtdaş-Kırımlıoğlu, 2019). ZP aldığı değerlere göre; $\pm 0-10$ mV kararsız, $\pm 10-20$ mV nispeten kararlı, $\pm 20-30$ mV orta düzeyde kararlı ve $> \pm 30$ mV çok kararlı olarak sınıflandırılmaktadır (Yurtdaş-Kırımlıoğlu, vd. 2021b). İBU içeren optimum PNP formülasyonlarından, F3 ve F5 nispeten kararlı, F1 orta düzeyde kararlı, F2, F4, F6 ve F7 kararlı formülasyonlar olarak saptanmıştır. Plasebo optimum formülasyonlardan, P5 ve P3 orta düzeyde kararlı; P1, P2, P4, P6 ve P7 kararlı formülasyonlar olarak saptanmıştır.

5.3.3. Enkapsülasyon etkinliği (%EE)

Enkapsülasyonu etkinliği (%EE), etkin maddenin miktarı, çözünürlüğü ve polimer tipi gibi parametrelere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Yurtdaş-Kırımlıoğlu ve Görgülü, 2021).

Hazırlanan İBU içeren optimum PNP formülasyonlarının %EE sonuçları **Tablo 5.18**'de sunulmuştur.

Hazırlanan PNP formülasyonlarının %EE değerleri, $\%18.35 \pm 0.16$ ile $\%32.45 \pm 0.45$ arasında değişmektedir. Sadece PCL kullanılarak hazırlanan formülasyonların %EE değerlerinden görüldüğü gibi, PCL'nin molekül ağırlığı arttıkça, %EE değerleri düşüş göstermiştir. Aynı şekilde PB arttıkça %EE değerlerinin düştüğü saptanmıştır. En düşük %EE değeri ise sadece ES100'le yapılan formülasyonda bulunmuştur. PCL ve ES100 birlikte kullanılarak hazırlanan kopolimerik formülasyonlarda %EE değerleri, sadece ES100'le yapılan formülasyondan daha yüksek bulunmuştur.

Tablo 5.18. Hazırlanan IBU içeren optimum PNP formülasyonlarının % EE değerleri

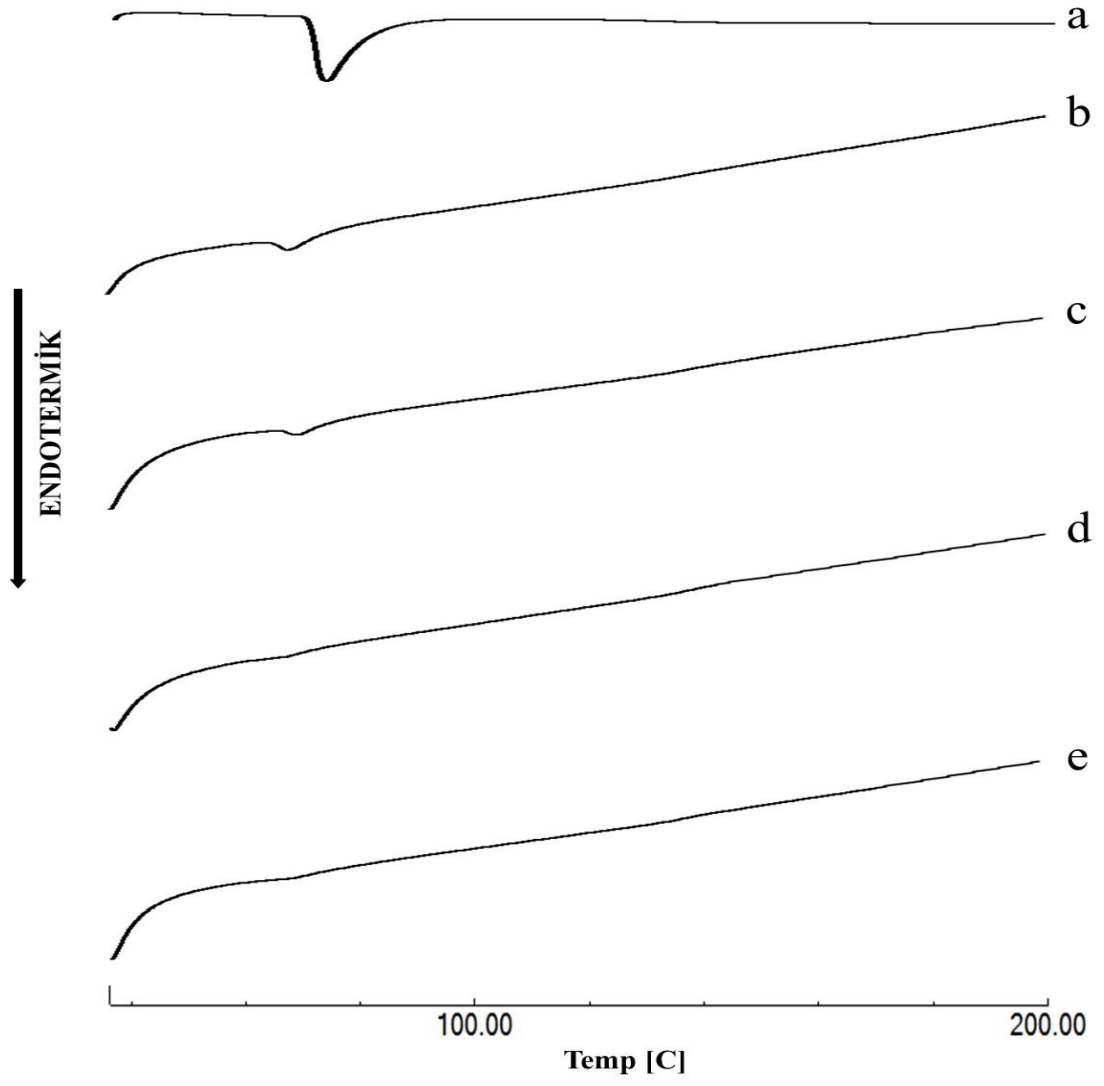
	% EE $\pm$ SH
F1	32.45 $\pm$ 0.45
F2	27.06 $\pm$ 0.72
F3	26.90 $\pm$ 0.73
F4	27.23 $\pm$ 0.53
F5	19.08 $\pm$ 0.38
F6	23.13 $\pm$ 0.38
F7	18.35 $\pm$ 0.16

5.3.4. Termal analiz

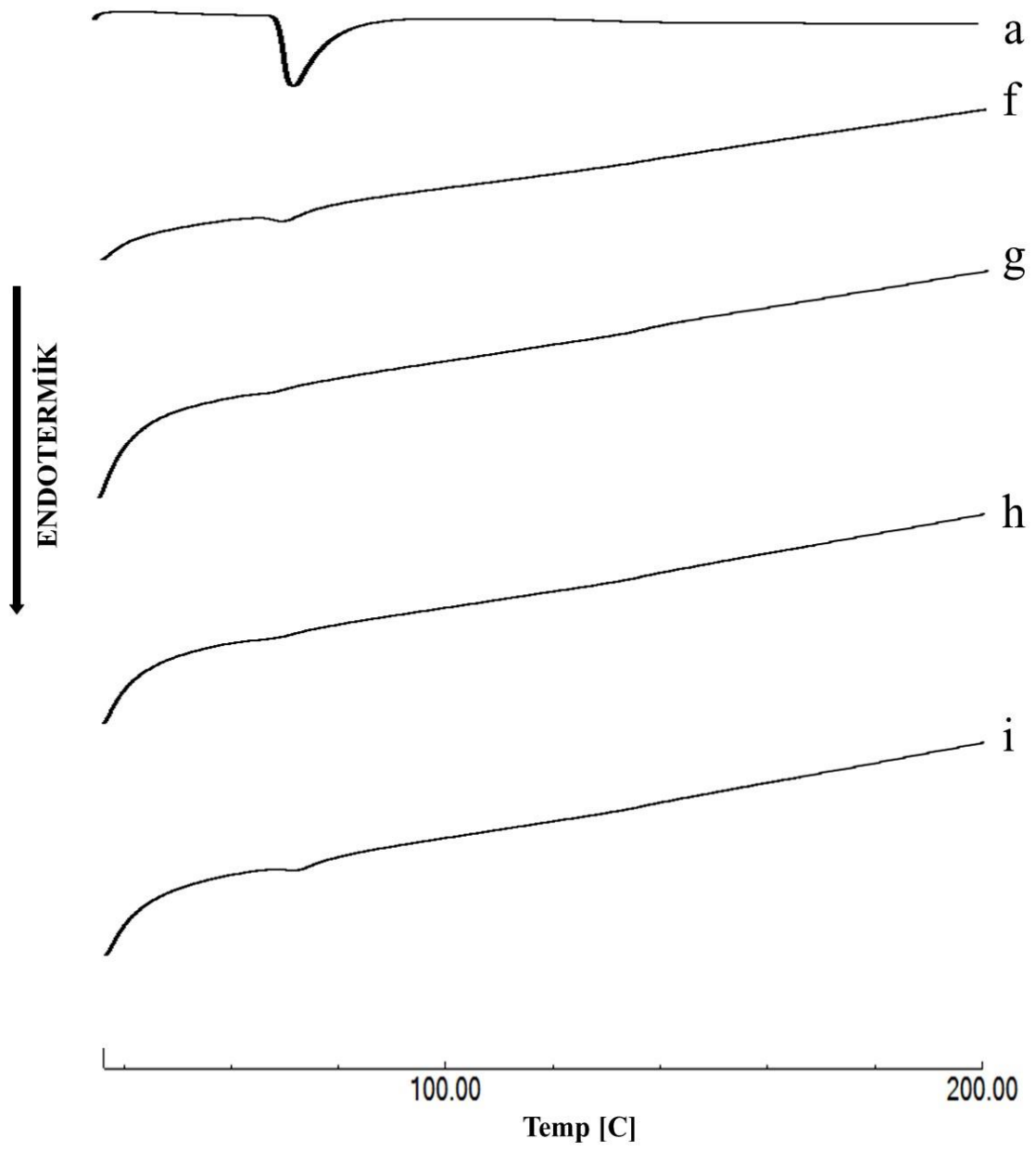
Termal analiz ile oluşabilecek olası polimorfizm ve maddelerin kristal yapıları saptanabilmektedir. Aynı zamanda DSC, etkin madde ve polimer arasında oluşabilecek olası etkileşimlerin ortaya konmasında ve formülasyon prosesi sonrası polimer ve etkin maddenin durumu hakkında bilgi sağlanmasında kullanılmaktadır (Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd. 2018; Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd., 2021b).

Hazırlanan optimum IBU içeren PNP formülasyonlarına ve plasebo PNP formülasyonlarına ait DSC termogramları **Şekil 5.14-5.17**'de gösterilmiştir.

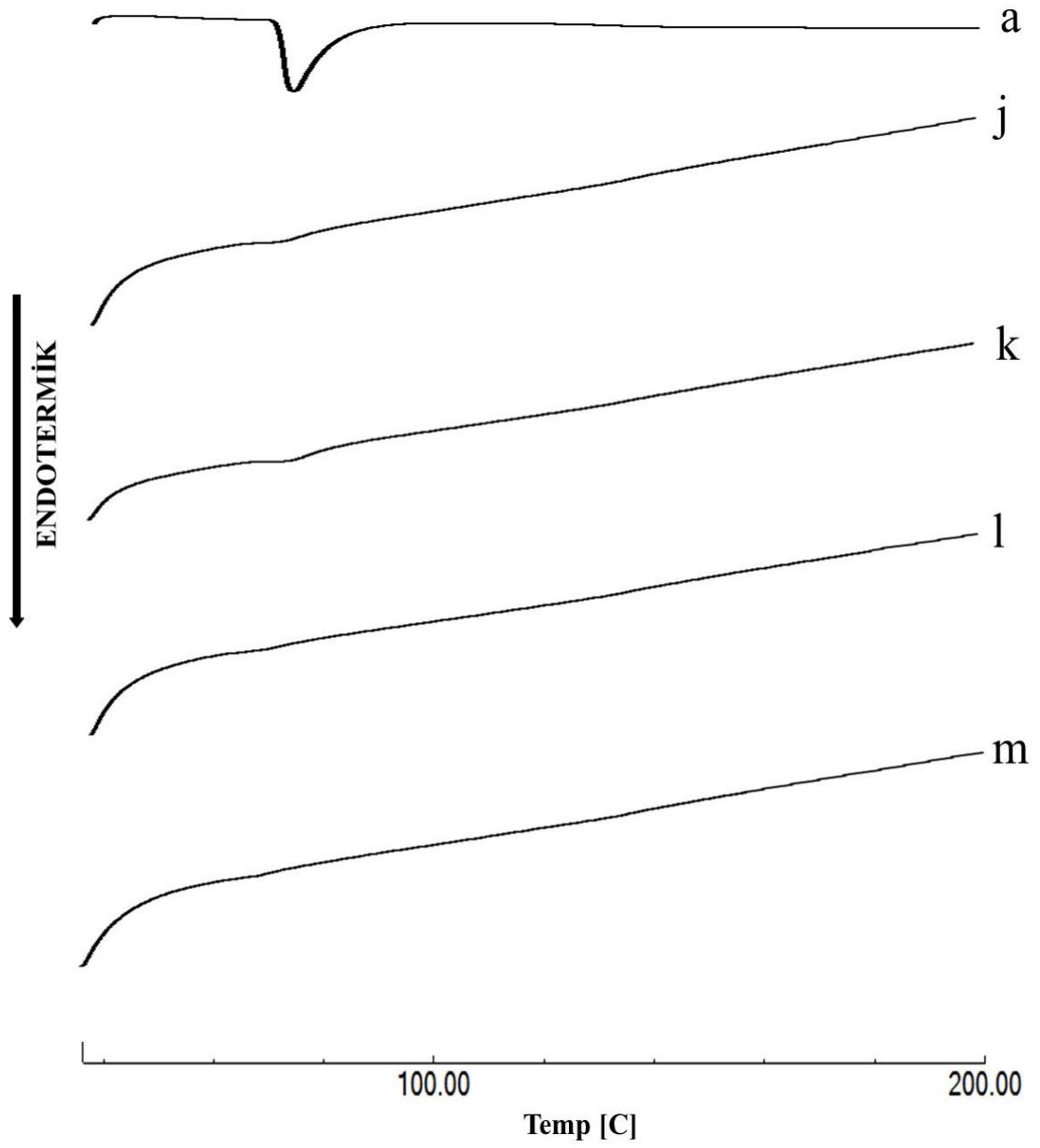
İBU'nun, DSC analiz cihazı kullanılarak 30-300°C aralığında yapılan termal analizinde, erime sıcaklığı 80.47°C olarak tespit edilmiştir (**Şekil 5.2**). Yapılan literatür araştırmaları zamanı PCL'nin erime derecesinin 56.3°C, ES100'ün erime derecesinin ise 208.7°C olduğu görülmektedir (Ravi vd., 2014; Lathaeswari vd., 2013). Hazırlanan plasebo ve IBU yüklenmiş formülasyonlarının DSC termogramları incelendiğinde, hem sadece PCL ve sadece ES 100 kullanılarak yapılmış, hem de iki polimerin karışımıyla yapılmış kopolimerik formülasyonlarda IBU'ya ait pikin kaybolduğu görülmüştür. Etkin maddenin oluşturduğu pikin kaybolması, homojen matriks oluşumu ya da amorf yapının varlığı anlamına gelmektedir (Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd., 2021; Yurtdaş-Kırımlıoğlu 2014; Lathaeswari vd., 2013).



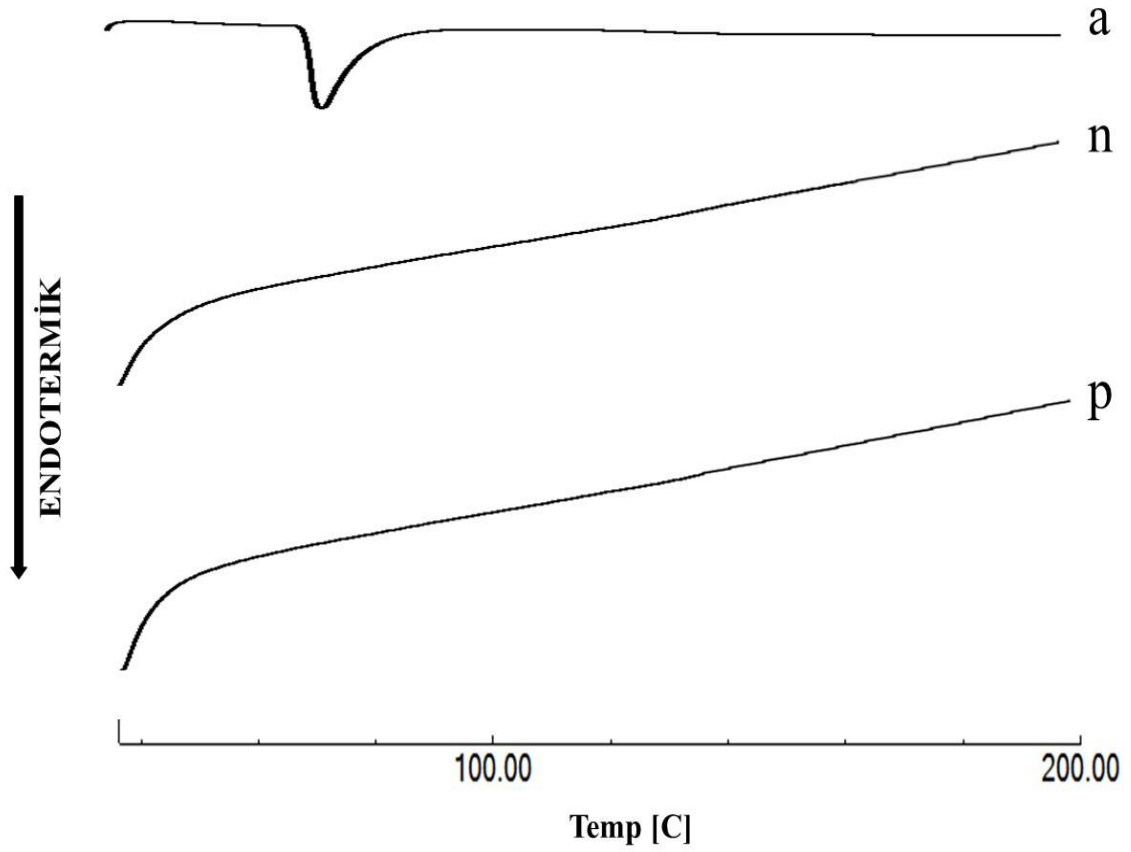
Şekil 5.14. İBU (a), F1 (b), P1 (c), F2 (d) ve P2 (e) 'ye ait DSC termogramları



Şekil 5.15. İBU (a), F3 (f), P3 (g), F4 (h) ve P4 (i) 'e ait DSC termogramları



Şekil 5.16. İBU (a), F5 (j), P5 (k), F6 (l) ve P6 (m) 'ya ait DSC termogramları

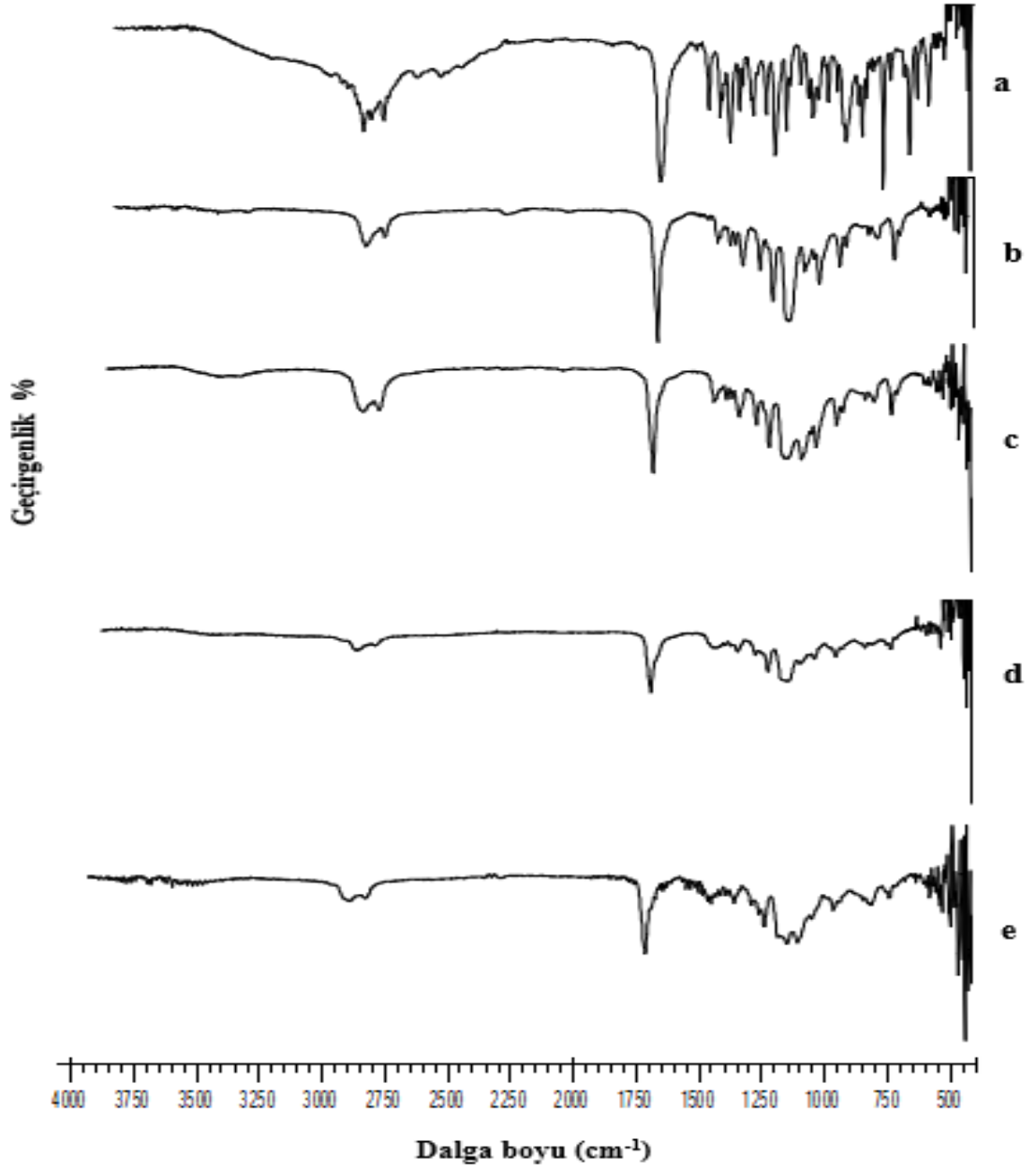


Şekil 5.17. İBU (a), F7 (n) ve P7(p) 'ye ait DSC termogramları

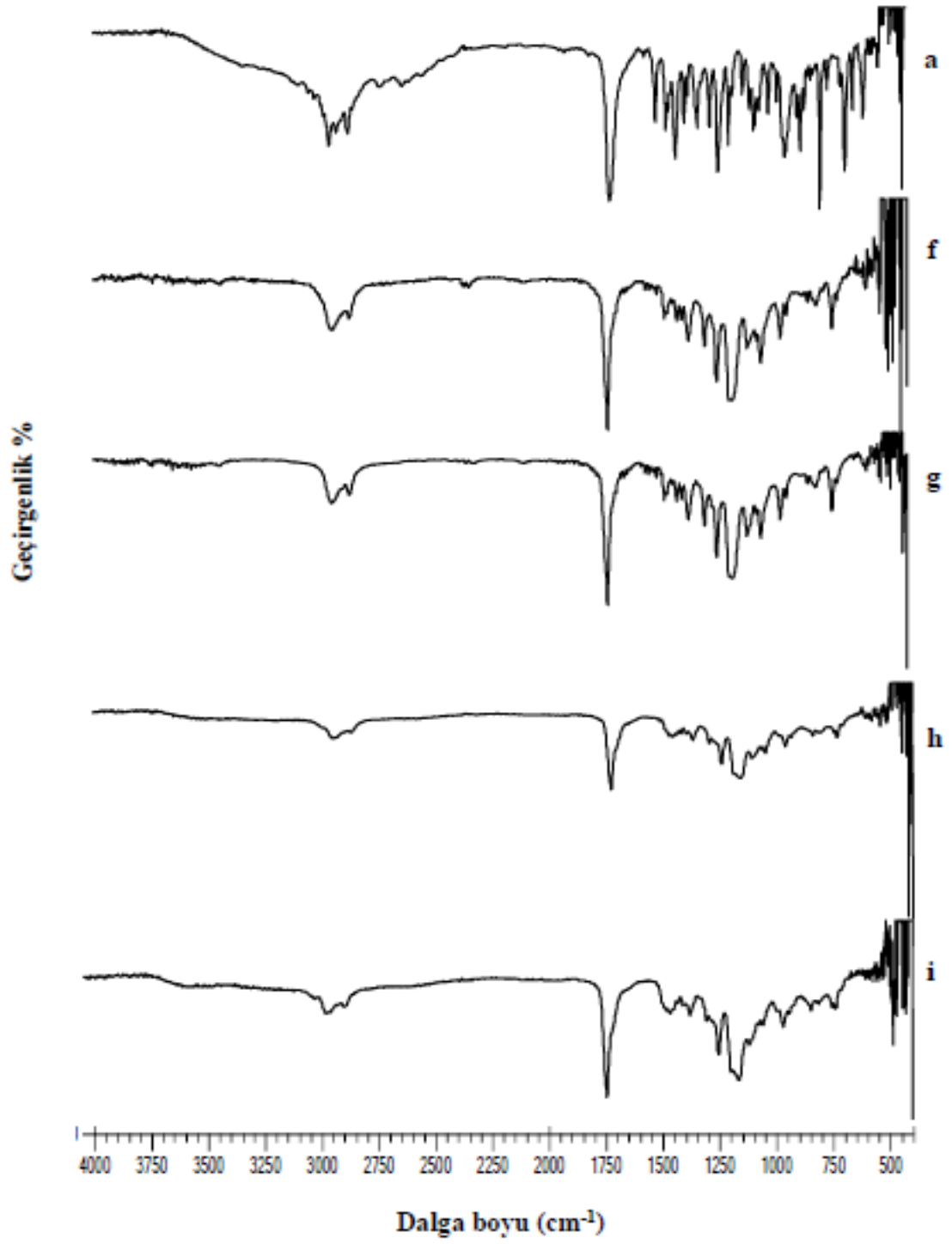
5.3.5. FT-IR analizi

FT-IR spektroskopisi, maddenin yapısını moleküler düzeyde aydınlatmak için gerekli ve önemli bir analizdir. Genel olarak bir homopolimer, kopolimer, polimer kompozit ve polimerik malzemelerdeki bileşenlerin olası etkileşimleri ve bağ düzenlemesi FT-IR spektroskopisi kullanılarak kolaylıkla aydınlatılabilmektedir. Aynı zamanda etkin madde ve ekspiyan maddeler arasındaki olası etkileşimi ve polimerik matristeki olası yapısal değişiklikleri araştırmak için kullanılmaktadır (Yurtdaş-Kırımlıoğlu ve Görgülü, 2021).

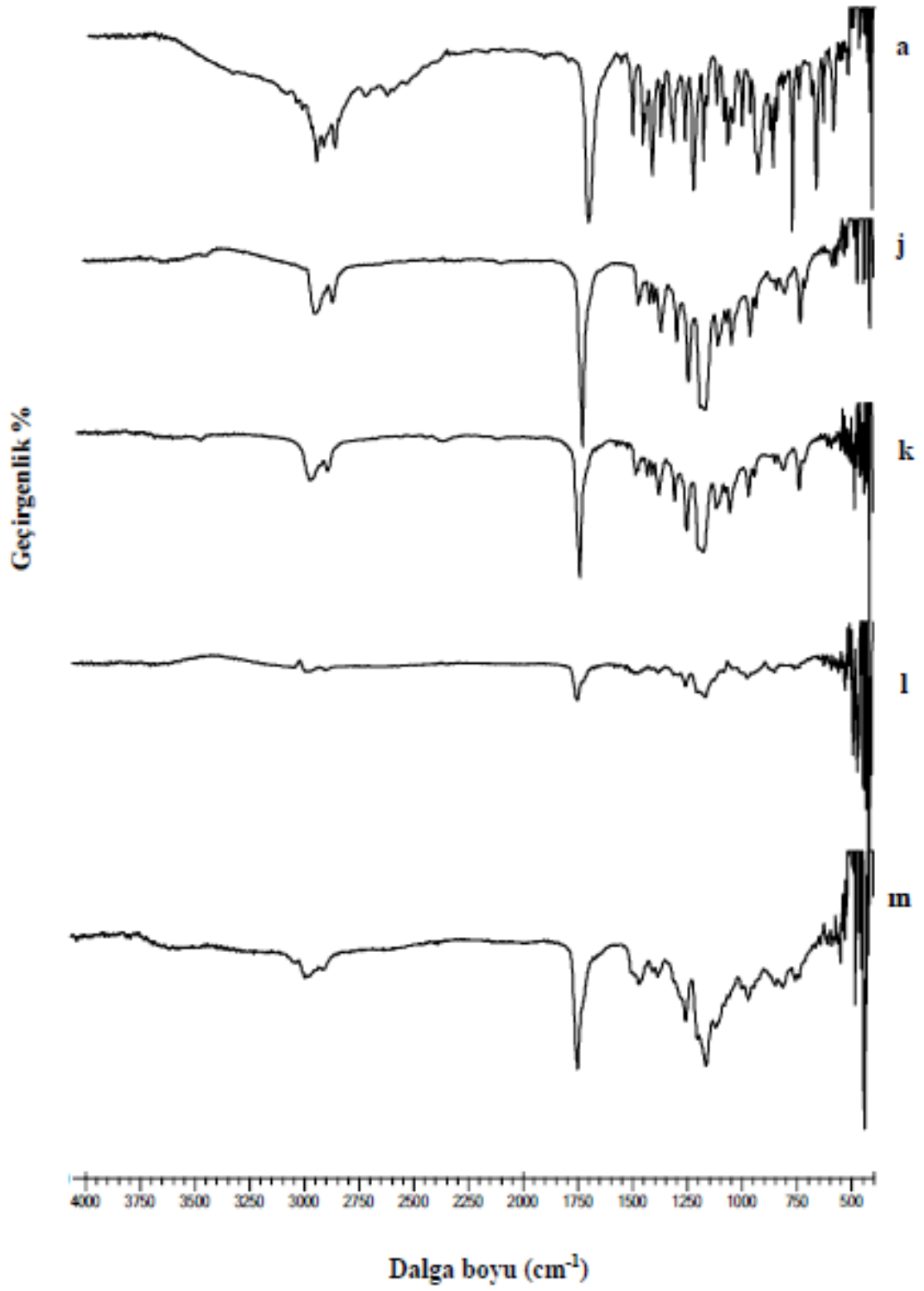
Hazırlanan optimum İBU içeren PNP formülasyonlarına ve plasebo PNP formülasyonlarına ait FT-IR spektrumları Şekil 5.18-5.21'de sunulmuştur.



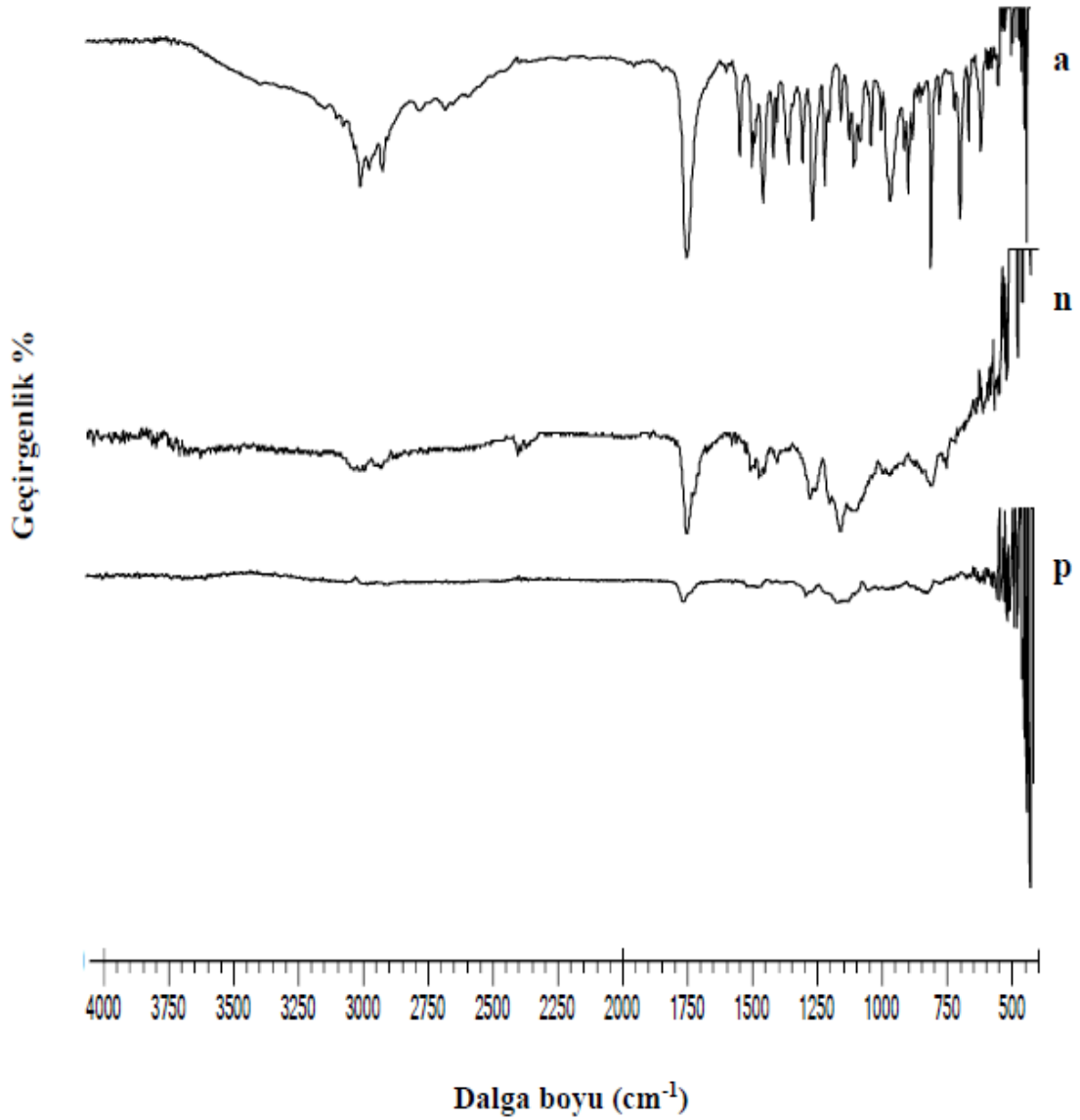
Şekil 5.18. İBU (a), F1 (b), P1 (c), F2 (d) ve P2 (e)'ye ait FT-IR spektrumları



Şekil 5.19. İBU (a), F3 (f), P3 (g), F4 (h) ve P4 (i)'e ait FT-IR spektrumları



Şekil 5.20. İBU (a), F5 (j), P5 (k), F6 (l) ve P6 (m) 'ya ait FT-IR spektrumları



Şekil 5.21. İBU (a), F7 (n) ve P7(p)'ye ait FT-IR spektrumları

Çalışmada etkin madde olarak kullanılan İBU spektrumunda, 3050-3150 cm^{-1} aralığında aromatik -CH pikleri, 2850-3000 cm^{-1} aralığında alifatik -CH pikleri bulunmuştur. 1708 cm^{-1} ve 1203 cm^{-1} 'de görülen gerilme titreşimleri sırası ile C=O ve C-O gerilme titreşimleri olarak saptanmıştır. 1460-1550 cm^{-1} aralığında aromatik C=C bağına ilişkin pikler bulunmuştur. 580 cm^{-1} ve 667 cm^{-1} 'de gözlenen pikler, İBU yapısındaki aromatik kısım ile ilişkilendirilmiştir (Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd., 2020; Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd., 2021a).

Sadece PCL polimeri içeren PNP formülasyonları (F1, F3 ve F6) spektrumlarında, 3500 cm^{-1} 'de -OH grubuna ilişkin pikler, 2945 cm^{-1} 'de asimetrik -CH gerilmesi, 2866

cm^{-1} 'de simetrik -CH gerilmesi, 1722 cm^{-1} 'de C=O gerilmesi, 1294 cm^{-1} 'de C-O ve C-C gerilmeleri, 1240 cm^{-1} 'de asimetrik C-O-C gerilemesi ve 1174 cm^{-1} 'de simetrik C-O-C gerilmesi saptanmıştır (Elzein vd., 2004; Benkaddour vd., 2013). Sadece ES 100 polimeri içeren PNP formülasyonunda (F7) spektrumunda, 2950 cm^{-1} 'de karboksilik asitin -OH grubuna, 1730 cm^{-1} 'de C=O grubuna, 1456 cm^{-1} 'de -CH₃ grubuna ilişkin karakteristik pikler saptanmıştır (Mehta vd., 2013). PCL ve ES 100 içeren kopolimerik PNP formülasyonlarında ise, her iki polimere ilişkin pikler de saptanmıştır.

Formülasyonlara ilişkin spektrumlarda Saf İBU'ya ait belirlenen karakteristik pikler görülmemektedir. Bu durum aktif maddenin polimerik yapı içinde moleküler düzeyde dağılmış halde bulunduğunu ve yeni bir sinyalin belirlenmemesi ile de aktif madde ile polimer arasında kimyasal bir etkileşim olmadığını ortaya koymaktadır (Gomathi vd., 2017; Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd., 2020). FT-IR sonuçları, DSC analizlerini desteklemektedir.

5.3.6. ¹H-NMR analizi

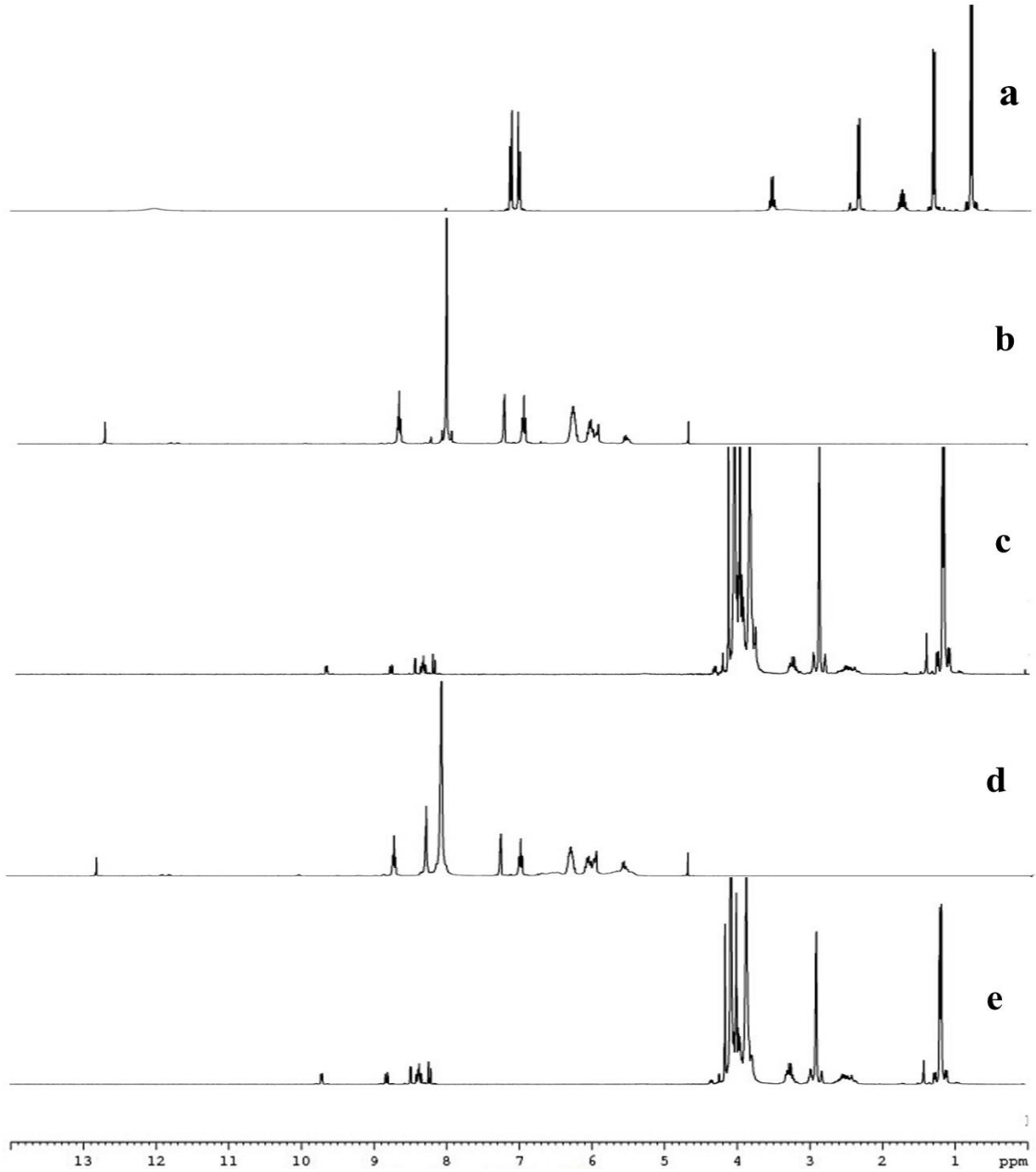
Tez kapsamında hazırlanan İBU yüklü polimerik nanopartiküllerde oluşabilecek moleküler düzeydeki etkileşimleri belirlemek amacıyla ¹H-NMR analizleri yapılmıştır. Çalışmalar sonucu polimerlere ve etkin maddeye ait elde edilen spektrumlar formülasyon analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

Hazırlanan optimum İBU içeren PNP formülasyonlarına ve plasebo PNP formülasyonlarına ait ¹H-NMR spektrumları Şekil 5.22-5.25'te verilmiştir.

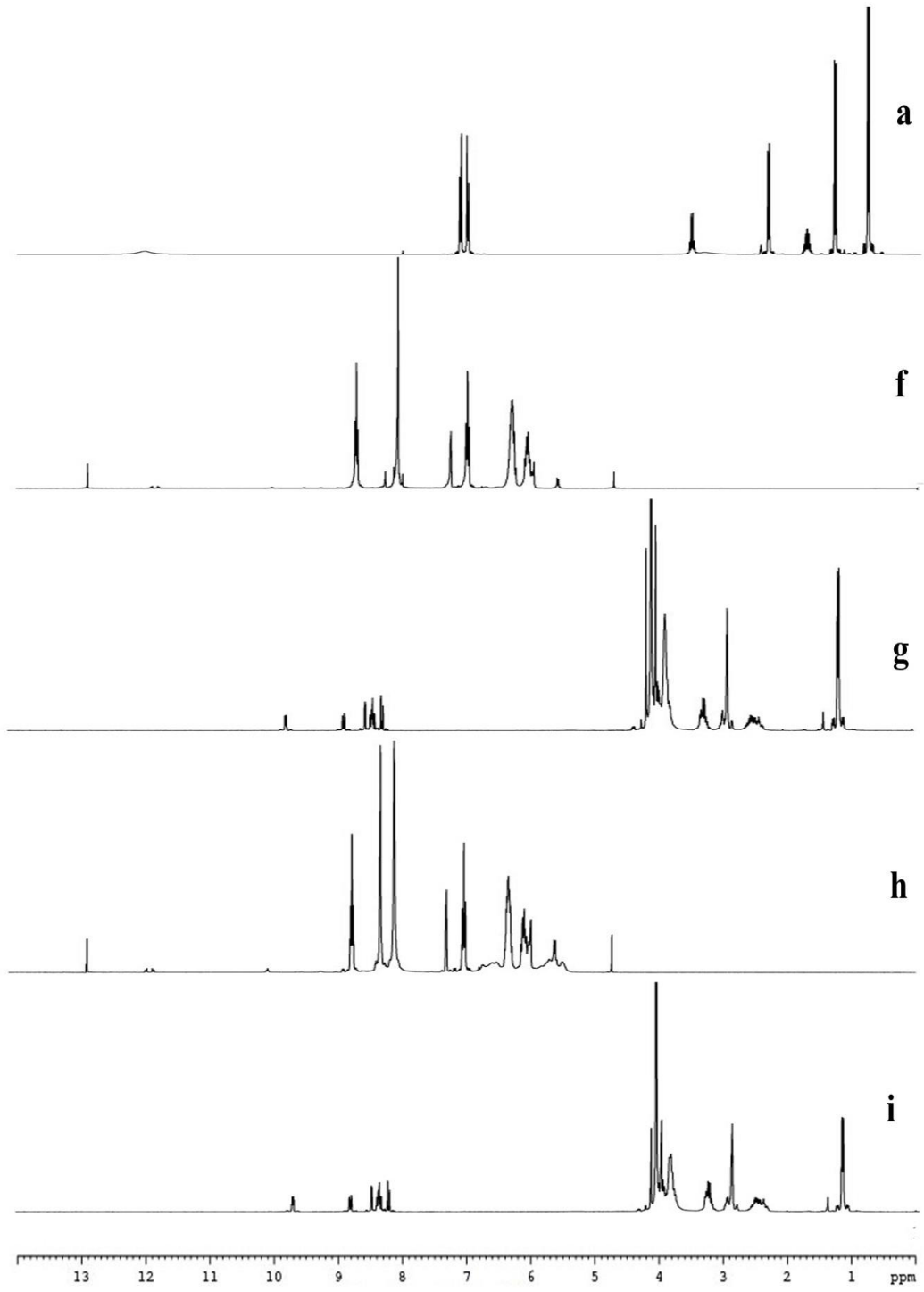
Plasebo formülasyonlar çalışmamızda kullanılan polimerlerin karakteristik sinyallerini göstermektedir. Etkin maddenin, hazırlanmış formülasyonların ve plasebo formülasyonların ¹H-NMR spektrumları birlikte incelendiğinde, plasebo formülasyonlarda sadece polimere ait pikler saptanırken, İBU yüklü formülasyonlarda hem İBU'ya hem de polimerlere ait pikler belirlenmiştir. İBU karakteristik piklerinin PNP spektrumlarında gözlenmesi, İBU'nun polimerik matris içerisinde moleküler düzeyde dağılımını vurgulamaktadır. PNP'lerdeki düşük İBU konsantrasyonuna bağlı olarak pik şiddetlerinin azaldığı da saptanmıştır. Dahası, piklerde kaymaların meydana gelmemesi ya da karakteristik piklerin kaybolmaması, İBU ve polimerler arasında herhangi bir kimyasal etkileşimin olmadığını ortaya koymaktadır (Yurtdaş-Kırımlıoğlu

vd., 2022; Yurtdaş-Kırımlioğlu ve Görgülü 2019; Yurtdaş-Kırımlioğlu vd., 2020). Elde edilen verilere DSC ve FT-IR verileri de aynı çıkarımlar ile destek vermektedir.

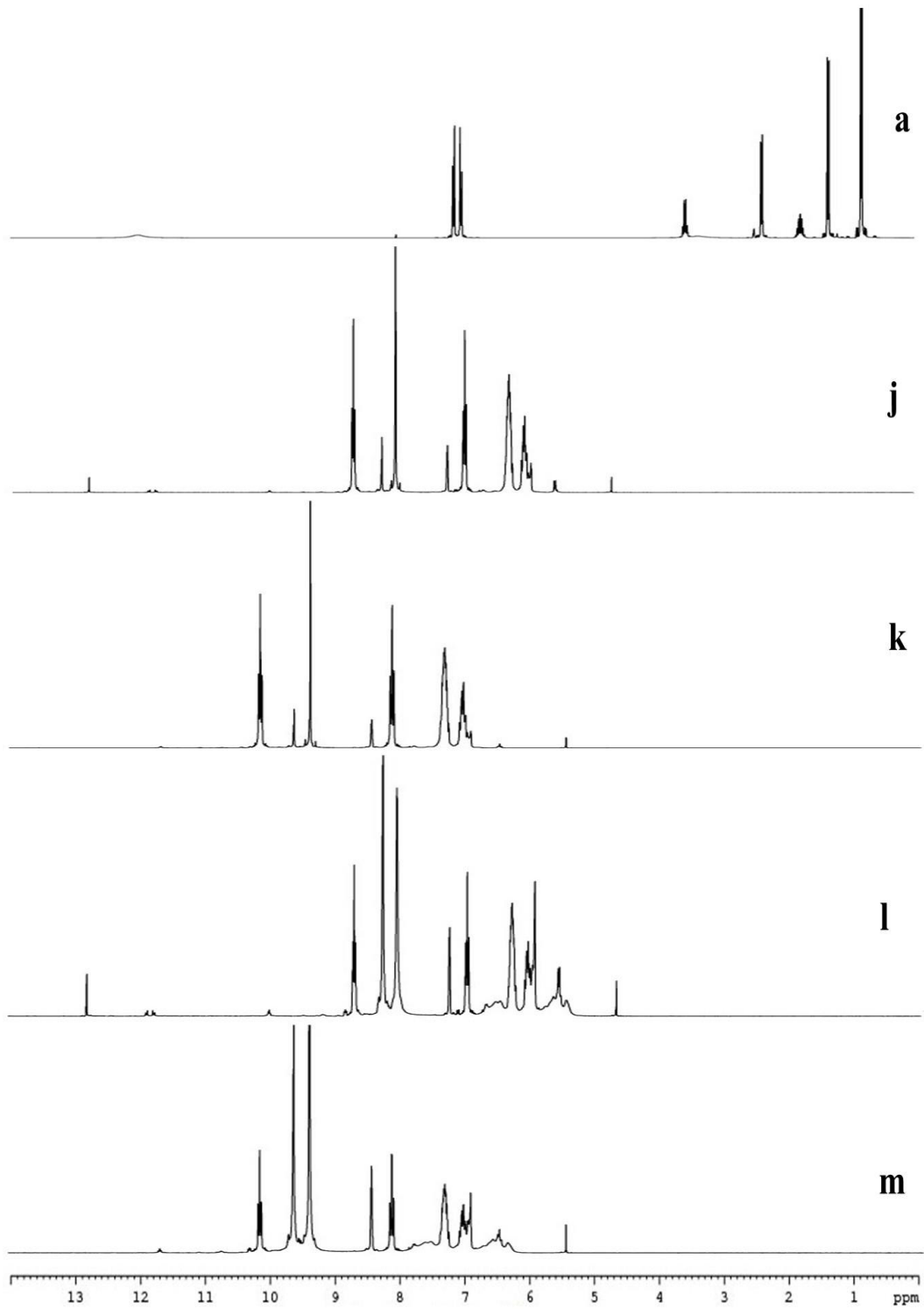
Tüm karakterizasyon analizleri dikkate alındığında, özellikle yüksek % EE değerleri ve PDI verileri incelendiğinde tekdüze büyüklük dağılımı ile nanoboyutlu anyonik PNP'lerden F1, F2, F3 ve F4 sonraki analizler için seçilmiştir.



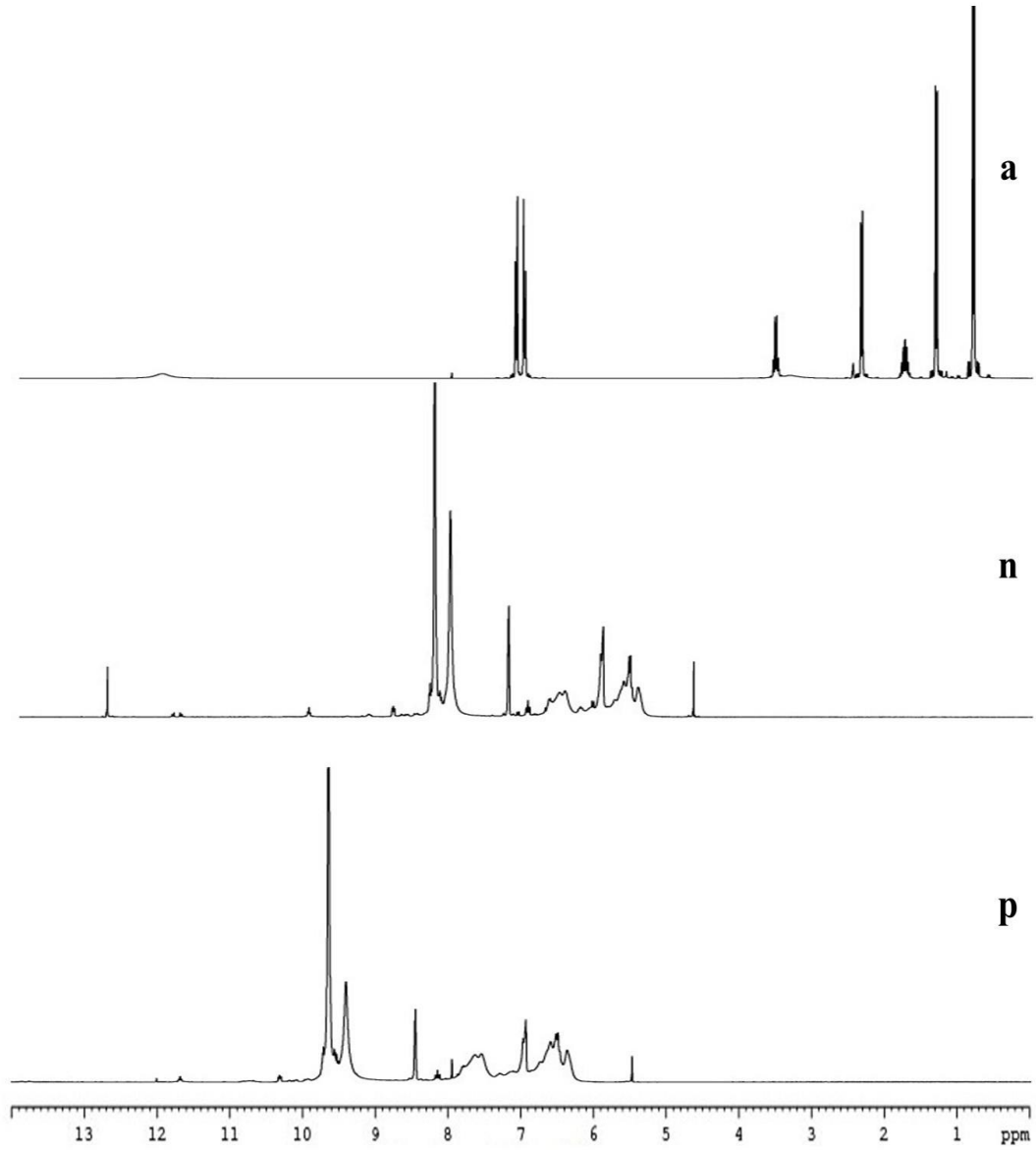
Şekil 5.22. IBU (a), F1 (b), P1 (c), F2 (d) ve P2 (e)'ye ait ^1H -NMR spektrumları



Şekil 5.23. İBU (a), F3 (f), P3 (g), F4 (h) ve P4 (i)'e ait ^1H -NMR spektrumları



Şekil 5.24. İBU (*a*), F5 (*j*), P5 (*k*), F6 (*l*) ve P6 (*m*)'ya ait ^1H -NMR spektrumları



Şekil 5.25. İBU (a), F7 (n) ve P7(p)'ye ait ^1H -NMR spektrumları

5.4. *İn vitro* salım çalışmaları

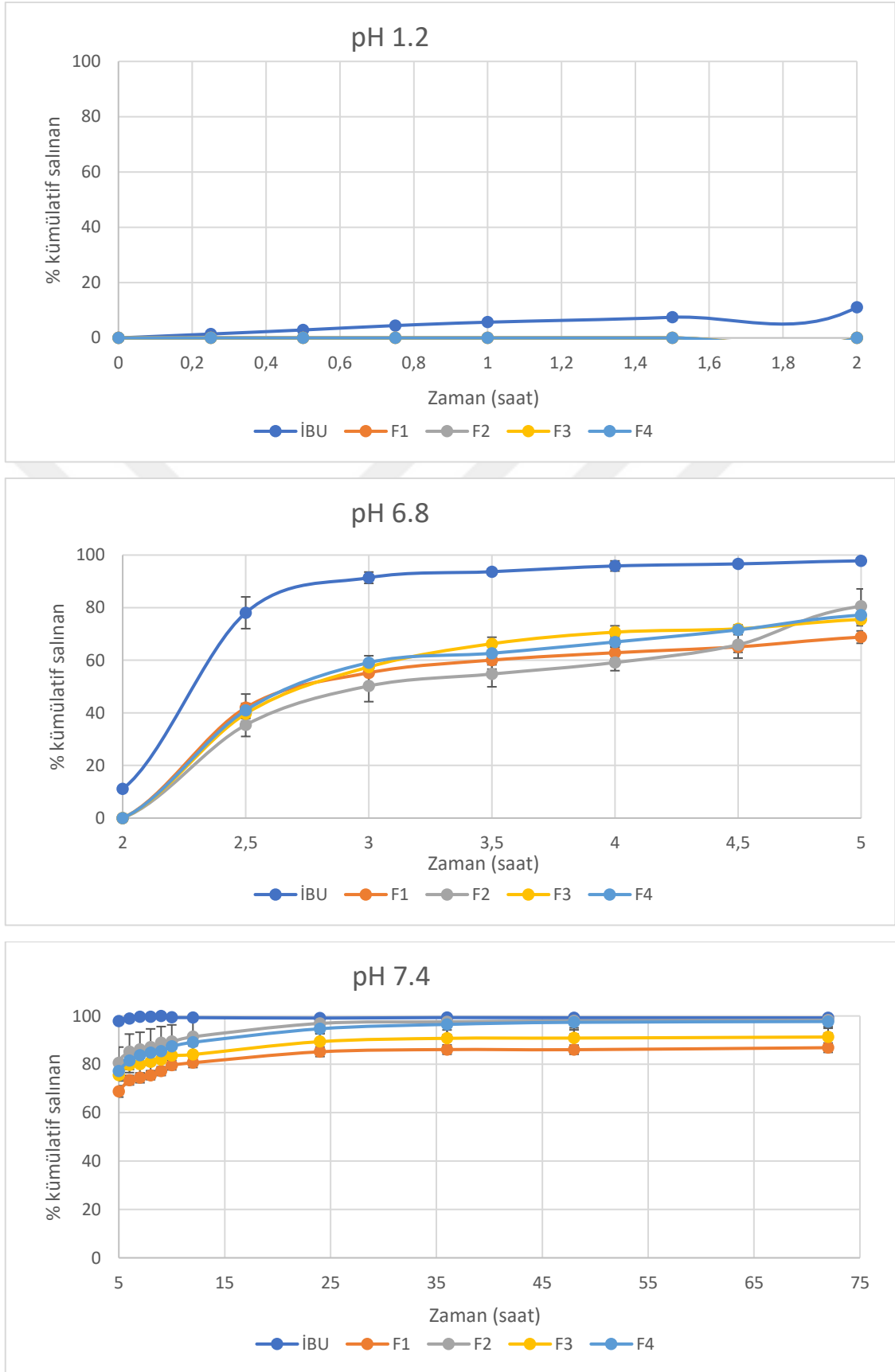
NP'lerden ilaç salımı, NP'lerin yüzey bozunma özelliklerinden, kopolimerlerin konfigürasyonlarından ve bileşenlerinden aynı zamanda etkin maddenin fizikokimyasal davranışlarından etkilenen, polimer bozunmasının eşlik ettiği polimer matrisindeki ilaç difüzyonunun neden olabileceği karmaşık bir süreçtir. *İn vitro* salım davranışı, bir ilaç taşıyıcı sistemin *in vivo* davranışını öngörmektedir (Yurtdaş-Kırımlıoğlu vd., 2020).

İBU ve hazırlanmış İBU içeren PNP formülasyonlarına ait *in vitro* salım verileri **Tablo 5.19**'da verilmiştir.

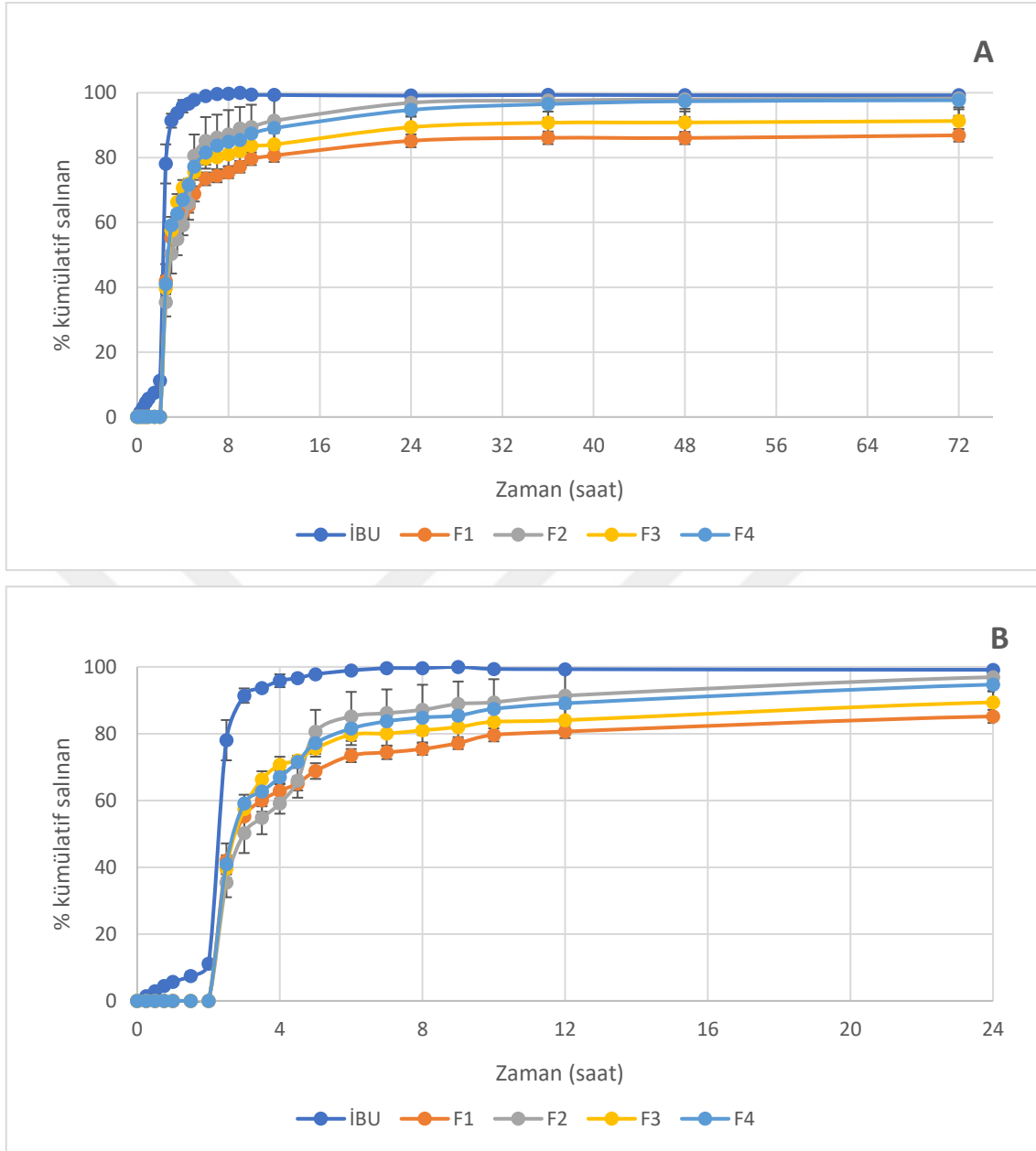
Tablo 5.19. İBU ve İBU içeren PNP formülasyonlarına ait *in vitro* salım verileri (n=3)

Zaman (saat)	% Kümülatif Salınan İBU miktarı (% ORT ± SH)				
	İBU	F1	F2	F3	F4
pH 1.2	0.25	1.413 ± 0.289	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
	0.5	2.875 ± 0.628	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
	0.75	4.469 ± 0.615	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
	1	5.687 ± 0.625	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
	1.5	7.468 ± 1.133	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
	2	11.113 ± 1.151	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
pH 6.8	2.5	78.055 ± 6.036	41.981 ± 5.177	35.394 ± 4.363	39.668 ± 1.800
	3	91.389 ± 2.154	55.236 ± 4.261	50.224 ± 5.964	57.451 ± 2.325
	3.5	93.673 ± 1.075	60.056 ± 3.420	54.763 ± 4.857	66.284 ± 2.474
	4	95.848 ± 1.922	62.866 ± 2.258	59.134 ± 3.090	70.682 ± 2.409
	4.5	96.632 ± 1.181	65.103 ± 2.091	65.909 ± 5.081	71.963 ± 1.419
	5	97.801 ± 0.453	68.807 ± 2.347	80.543 ± 6.586	75.553 ± 2.420
pH 7.4	6	98.921 ± 0.929	73.443 ± 1.962	85.175 ± 7.333	79.714 ± 3.124
	7	99.592 ± 0.794	74.420 ± 2.027	86.153 ± 7.100	80.054 ± 3.761
	8	99.654 ± 0.788	75.402 ± 1.745	87.134 ± 7.519	81.011 ± 3.633
	9	99.974 ± 0.819	77.178 ± 1.794	88.911 ± 6.702	81.984 ± 3.607
	10	99.377 ± 0.769	79.653 ± 1.948	89.386 ± 6.924	83.579 ± 3.462
	12	99.301 ± 0.789	80.641 ± 1.950	91.374 ± 6.982	84.036 ± 3.542
	24	99.127 ± 0.746	85.178 ± 1.960	96.912 ± 6.902	89.378 ± 3.460
	36	99.318 ± 0.948	86.102 ± 1.933	97.577 ± 5.329	90.748 ± 3.462
	48	99.241 ± 1.125	86.048 ± 1.884	97.967 ± 5.459	90.848 ± 3.394
	72	99.210 ± 1.150	86.876 ± 1.930	98.217 ± 5.363	91.291 ± 3.625

ORT: Ortalama, SH: Standart hata



Şekil 5.26. *GİS'in farklı pH'larında İBU ve İBU içeren PNP formülasyonlarına ilişkin in vitro salım profilleri*



Şekil 5.27. İBU ve İBU içeren PNP formülasyonlarına ilişkin *in vitro* salım profilleri (GİS simülasyonu) (A: 72 saat, B: 24 saat) (0-2 saat pH 1.2, 2-5 saat pH 6.8, 5-72 saat pH 7.4)

Çalışmamızda hazırlanan PNP formülasyonlarının kolona hedeflenmesi amaçlandığı için, *in vitro* salım çalışması üç farklı pH değerine sahip (pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4) salım ortamlarında gerçekleştirilmiştir. **Tablo 5.19'**da sunulan % kümülatif salınan İBU miktarları incelendiğinde, pH 1.2'de salımın ilk 15 dk'sından başlayarak 2 saat boyunca etkin maddenin salımı gerçekleşirken, İBU içeren formülasyonlarda herhangi bir salım gerçekleşmemiştir. Hazırlanan tüm formülasyonların, İBU'yu gastrik pH'dan

koruyabileceği deneysel veriler ile bulunmuştur. Yüksek pH'da çözünür polimerlerin kullanılması nedeni ile bu amaçlanan ve beklenen bir durumdur.

pH 6.8'de devam eden salımda salınan etkin maddenin miktarının artış gösterdiği, hazırlanan PNP'lerin de etkin maddeyi saldıgı görülmüştür. Beşinci saatin sonunda saf İBU'nun 97.801 ± 0.453 (ORT $\pm$ SH) oranında salım gösterdiği bulunmuştur. Formülasyonlar dikkate alındığında, beşinci saatin sonunda PCL ve ES 100 kullanılarak yapılan kopolimerik formülasyonların (F2 ve F4), sadece PCL kullanılarak hazırlanan formülasyonlara (F1 ve F3) göre daha yüksek miktarda salım gösterdiği bulunmuştur.

Yapılan literatür araştırmalarından ES100'ün pH 7 ve üzeri pH'larda çözündüğü bilinmektedir (Franco ve Marco, 2020). pH 7.4'de devam eden *in vitro* salım çalışmasında dokuzuncu saatin sonunda saf İBU'nun 99.974 ± 0.819 'sinin (ORT $\pm$ SH) salındığı saptanmıştır. Formülasyonlar göz önüne alındığında, dokuzuncu saatin sonunda PCL ve ES 100 kullanılarak yapılan kopolimerik formülasyonların (F2 ve F4), sadece PCL kullanılarak hazırlanan formülasyonlara (F1 ve F3) göre daha yüksek miktarda salım gösterdiği bulunmuştur. Bu artışın 72. saatin sonuna kadar devam ettiği ve 72. saatin sonunda PCL ve ES 100 karışımı ile yapılan kopolimerik formülasyonlardan F2'nin 98.217 ± 5.363 (ORT $\pm$ SH), F4'ün ise 97.686 ± 2.137 (ORT $\pm$ SH) oranında etkin maddeyi saldıgı görülürken, sadece PCL kullanılarak yapılmış formülasyonlardan F1'in 86.876 ± 1.930 (ORT $\pm$ SH), F3'ün ise 91.291 ± 3.625 (ORT $\pm$ SH) oranında etkin maddeyi saldıgı görülmektedir. Salım sonuçları değerlendirildiğinde, PCL ve ES 100 ile hazırlanan kopolimerik F2 ve F4 formülasyonlarının kolon pH'sında daha fazla İBU saldıgı sonucuna varılmıştır.

5.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

5.5.1. MTT testi

Hazırlanan optimum İBU içeren PNP formülasyonlarına ve plasebo PNP formülasyonlarına ait MTT analizi sonuçları **Tablo 5.20-21** ve **Tablo 5.23-24**'de verilmiştir.

3 günlük MTT analiz sonuçlarından günlere bağlı olarak tüm hücrelerde hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. **Şekil 5.28-Şekil 5.31**'de tüm hücreler için hücre canlılık grafiği ($\pm$ SS değerleri küçük olması nedeniyle tablolarda gösterilmiştir) ile

gösterilmiş, 3 günlük analiz sonuçlarından elde IC_{50} değerleri **Tablo 5.25**'de sunulmuştur.

Tablo 5.20. CCD-19Lu hücrelerinde İBU 'nun MTT analizi sonucu % canlılık değerleri

K (µg/mL)	İBU		
	24 s ± SS	48 s ± SS	72 s ± SS
400 **	7.181±0.574	8.605±0.121	10.251±0.112
200 *	18.997±1.536 **	26.650±0.249	25.338±0.460
100 *	38.279±1.160	31.583±0.418	41.876±0.876
50	45.251±0.564	45.582±0.382	40.643±0.755
25	47.663±0.593 *	50.586±0.516	47.244±0.406 *
12,5	51.653±0.432	53.123±0.536	56.697±0.991
Kontrol	100±0.864	100±0.250	100±0.348

*p < 0.05, **p < 0.01, SS: Standart sapma, K: Konsantrasyon

Tablo 5.21. CCD-19Lu hücrelerinde F1 ve P1 formülasyonlarının MTT analizi sonucu % canlılık Değerleri

K (µg/mL)	F1			P1		
	24 s ± SS	48 s ± SS	72 s ± SS	24 s ± SS	48 s ± SS	72 s ± SS
400 **	4.423±0.216	8.901±0.476	3.765±0.179	11.283±0.702	5.764±0.421	9.281±0.142
200 *	25.840±0.375	29.089±0.674	12.494±0.380 **	23.188±0.751	24.792±0.127	27.334±0.756
100 *	27.521±0.220	30.693±0.494	41.980±0.664	37.348±0.645	33.021±0.313	44.288±1.493
50	43.580±0.556	45.230±0.774	47.359±0.763	44.542±1.115 *	54.201±0.596	48.773±1.023 *
25	51.284±0.339	53.805±1.368	52.103±0.202	55.374±0.563	56.632±0.419	52.214±1.213
12,5	55.390±0.582	56.545±1.055	57.188±2.773	59.182±0.655	63.212±0.262	69.394±1.147
Kontrol	100±0.012	100±0.013	100±0.033	100±0.009	100±0.007	100±0.009

*p < 0.05, **p < 0.01, SS: Standart sapma, K: Konsantrasyon

Tablo 5.22. CCD-19Lu hücrelerinde F2 ve P2 formülasyonlarının MTT analizi sonucu % canlılık Değerleri

K ($\mu\text{g/mL}$)	F2			P2		
	24 s $\pm$ SS	48 s $\pm$ SS	72 s $\pm$ SS	24 s $\pm$ SS	48 s $\pm$ SS	72 s $\pm$ SS
400 **	5.378 $\pm$ 0.423	4.694 $\pm$ 0.370	9.743 $\pm$ 0.340	9.147 $\pm$ 0.337	11.222 $\pm$ 0.324	19.428 $\pm$ 0.188
200 *	19.184 $\pm$ 0.169	29.016 $\pm$ 0.297	30.489 $\pm$ 0.295	22.226 $\pm$ 0.962	33.230 $\pm$ 0.142	38.693 $\pm$ 0.325
100 *	40.076 $\pm$ 0.431	34.023 $\pm$ 0.143	41.589 $\pm$ 0.217	40.742 $\pm$ 0.063	48.744 $\pm$ 0.054	47.435 $\pm$ 0.188
50	50.565 $\pm$ 0.419	59.336 $\pm$ 0.898	61.675 $\pm$ 0.176	56.468 $\pm$ 0.246	52.188 $\pm$ 0.258	57.239 $\pm$ 0.873
25	59.754 $\pm$ 0.361	61.387 $\pm$ 0.522	67.237 $\pm$ 0.291	59.242 $\pm$ 0.290	68.464 $\pm$ 0.282	60.964 $\pm$ 0.222
12,5	67.038 $\pm$ 2.698	70.045 $\pm$ 0.302	78.289 $\pm$ 2.481	69.214 $\pm$ 0.456	76.341 $\pm$ 0.468	71.650 $\pm$ 0.386
Kontrol	100 $\pm$ 0.013	100 $\pm$ 0.004	100 $\pm$ 0.033	100 $\pm$ 0.012	100 $\pm$ 0.013	100 $\pm$ 0.005

*p < 0.05, **p < 0.01, SS: Standart sapma, K: Konsantrasyon

Tablo 5.23. CCD-19Lu hücrelerinde F3 ve P3 formülasyonlarının MTT analizi sonucu % canlılık değerleri

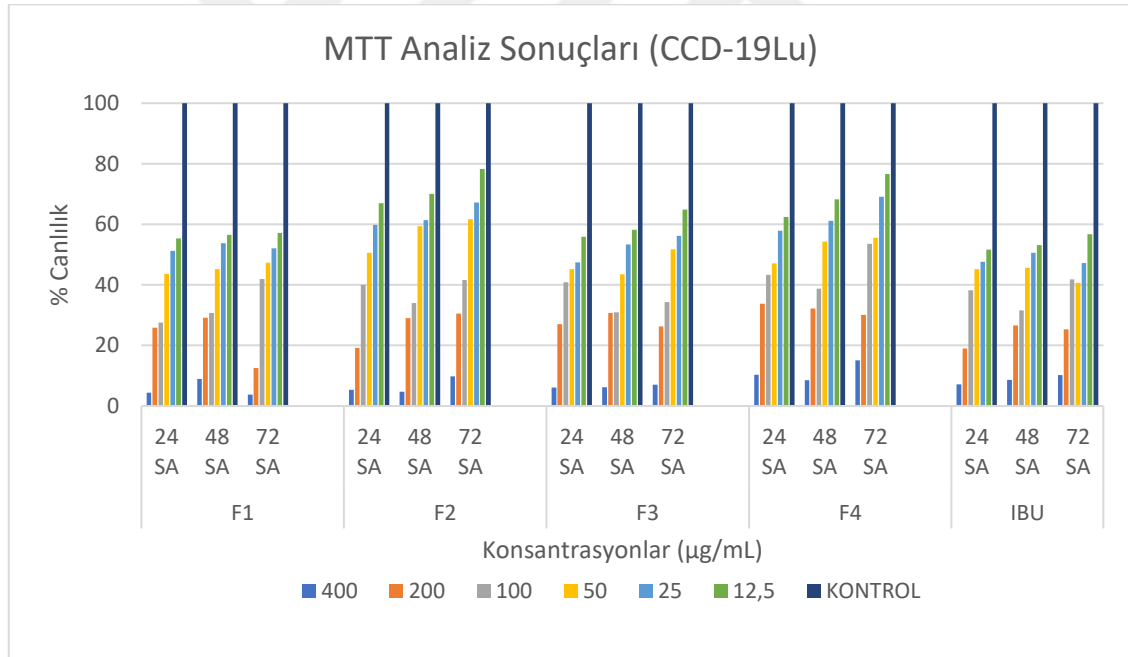
K ($\mu\text{g/mL}$)	F3			P3		
	24 s $\pm$ SS	48 s $\pm$ SS	72 s $\pm$ SS	24 s $\pm$ SS	48 s $\pm$ SS	72 s $\pm$ SS
400 **	6.120 $\pm$ 0.393	6.171 $\pm$ 0.760	7.039 $\pm$ 0.291	6.701 $\pm$ 0.093	13.177 $\pm$ 0.441	6.683 $\pm$ 0.730
200 *	27.069 $\pm$ 0.286	30.737 $\pm$ 0.492	26.262 $\pm$ 1.793	18.470 $\pm$ 0.170 **	29.340 $\pm$ 0.633	23.627 $\pm$ 3.421
100 *	40.873 $\pm$ 0.333	30.915 $\pm$ 0.852	34.306 $\pm$ 1.018	37.819 $\pm$ 0.350	39.826 $\pm$ 0.612	44.363 $\pm$ 0.135
50	45.219 $\pm$ 3.492	43.553 $\pm$ 1.093	51.794 $\pm$ 0.163	48.864 $\pm$ 0.135 *	48.038 $\pm$ 0.280 *	51.046 $\pm$ 0.160
25	47.444 $\pm$ 0.979 *	53.332 $\pm$ 1.467	56.230 $\pm$ 0.214	55.664 $\pm$ 0.636	57.778 $\pm$ 0.631	59.461 $\pm$ 0.098
12,5	55.894 $\pm$ 3.350	58.241 $\pm$ 0.613	64.886 $\pm$ 0.831	63.146 $\pm$ 0.374	66.319 $\pm$ 0.646	70.425 $\pm$ 0.084
Kontrol	100 $\pm$ 0.004	100 $\pm$ 0.009	100 $\pm$ 0.009	100 $\pm$ 0.028	100 $\pm$ 0.007	100 $\pm$ 0.005

*p < 0.05, **p < 0.01, SS: Standart sapma, K: Konsantrasyon

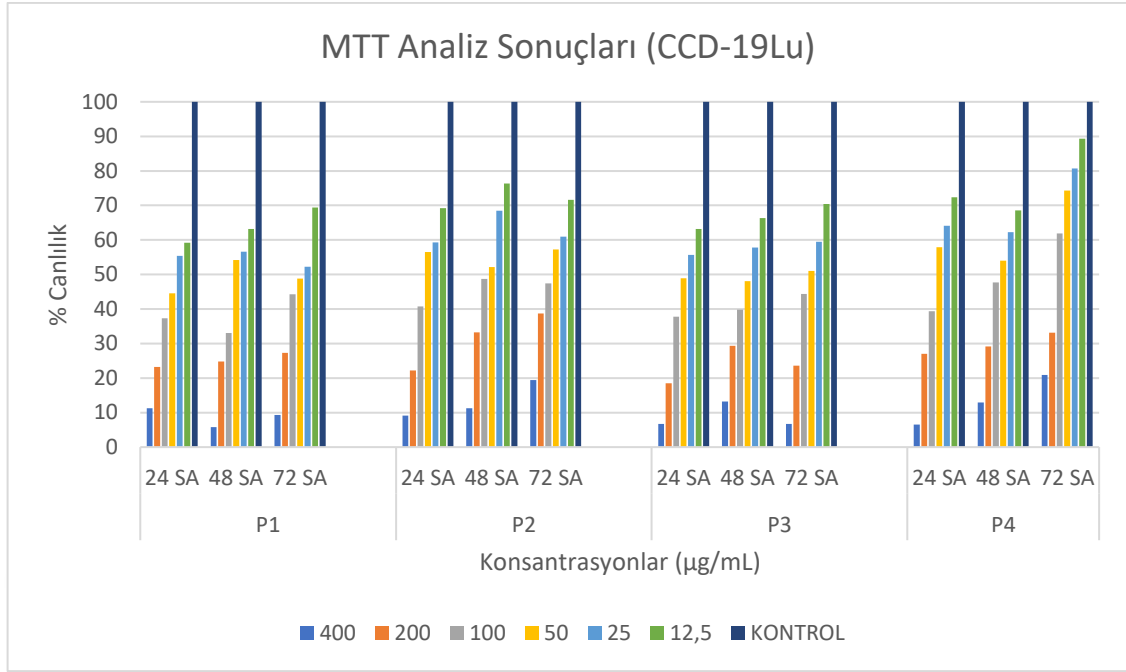
Tablo 5.24. CCD-19Lu hücrelerinde F4 ve P4 formülasyonlarının MTT analizi sonucu % canlılık Değerleri

K ($\mu\text{g/mL}$)	F4			P4		
	24 s $\pm$ SS	48 s $\pm$ SS	72 s $\pm$ SS	24 s $\pm$ SS	48 s $\pm$ SS	72 s $\pm$ SS
400 **	10.330 $\pm$ 0.093	8.571 $\pm$ 0.200	15.063 $\pm$ 0.660	6.536 $\pm$ 0.572	12.917 $\pm$ 0.295	20.874 $\pm$ 0.226 *
200 *	33.814 $\pm$ 0.284	32.197 $\pm$ 0.590	30.067 $\pm$ 0.394	27.042 $\pm$ 0.834	29.115 $\pm$ 0.369	33.173 $\pm$ 0.206
100 *	43.276 $\pm$ 0.056	38.717 $\pm$ 0.223	53.569 $\pm$ 0.645	39.363 $\pm$ 1.622	47.674 $\pm$ 0.448	61.862 $\pm$ 0.800
50	47.078 $\pm$ 1.789	54.346 $\pm$ 0.314	55.599 $\pm$ 0.417	57.892 $\pm$ 0.970	53.993 $\pm$ 0.352	74.274 $\pm$ 1.156
25	57.885 $\pm$ 0.247	61.144 $\pm$ 0.525	69.144 $\pm$ 0.076	64.069 $\pm$ 0.145	62.222 $\pm$ 0.488	80.733 $\pm$ 0.795
12,5	62.482 $\pm$ 0.093	68.272 $\pm$ 0.313	76.597 $\pm$ 0.808	72.353 $\pm$ 0.092	68.524 $\pm$ 0.688	89.365 $\pm$ 1.140
Kontrol	100 $\pm$ 0.033	100 $\pm$ 0.004	100 $\pm$ 0.009	100 $\pm$ 0.005	100 $\pm$ 0.007	100 $\pm$ 0.009

*p < 0.05, **p < 0.01, SS: Standart sapma, K: Konsantrasyon



Şekil 5.28. CCD-19Lu hücrelerinde İBU ve İBU yüklü formülasyonların MTT analizi sonucu % canlılık değerlerine ait grafikler



Şekil 5.29. CCD-19Lu hücrelerinde plasebo formülasyonların MTT analizi sonucu % canlılık değerlerine ait grafikler

Tablo 5.25. Formülasyonların CCD-19Lu hücreleri için IC_{50} değerleri ($\mu\text{g/mL}$)

	24 s	48 s	72 s
IBU	1.392	5.598	10.903
F1	6.101	21.765	31.401
F2	68.394	87.727	120.099
F3	23.230	25.241	59.851
F4	70.658	88.397	131.294
P1	34.422	58.488	70.789
P2	83.225	120.553	124.895
P3	49.269	69.946	82.820
P4	97.390	100.351	188.569

Tablo 5.26. hTERT-HPNE hücrelerinde İBU ’nun MTT analizi sonucu % canlılık değerleri

K (µg/mL)	İBU		
	24 s ± SS	48 s ± SS	72 s ± SS
400 **	5.786±0.333	4.800±0.028	3.897±0.065
200 *	24.293±0.294	29.520±0.739	34.913±0.639
100 *	33.929±0.480	31.628±0.564	38.735±1.340
50	44.527±0.230 *	47.515±0.279 *	53.734±0.414
25	55.009±3.718	57.980±2.310	63.880±1.896
12,5	63.138±2.493	66.338±2.057	72.718±2.493
Kontrol	100±0.001	100±0.015	100±0.004

*p < 0.05, **p < 0.01, SS: Standart sapma, K: Konsantrasyon

Tablo 5.27. hTERT-HPNE hücrelerinde F1 ve P1 formülasyonlarının MTT analizi sonucu % canlılık Değerleri

K (µg/mL)	F1			P1		
	24 s ± SS	48 s ± SS	72 s ± SS	24 s ± SS	48 s ± SS	72 s ± SS
400 **	7.045±0.326	13.510±0.465	8.745±0.409	6.153±0.597	9,938±0.374	27.548±0.839 *
200 *	28.507±0.381	28.890±1.302	22.587±2.090	29.182±0.454	30.889±0.374	42.299±0.765
100 *	33.520±0.433	39.943±0.937	41.466±0.346	48.545±1.436 *	57.503±0.884	57.276±1.363
50	48.138±0.893 *	47.603±0.749 *	53.996±0.187	63.504±0.740	76.586±1.068	65.430±1.103
25	56.176±1.049	54.644±0.744	58.323±0.490	68.165±0.535	91.308±0.792	77.576±0.877
12,5	64.168±0.551	62.485±0.485	70.190±0.058	70.431±0.431	96.518±1.123	82.050±1.276
Kontrol	100±0.010	100±0.010	100±0.010	100±0.008	100±0.066	100±0.066

*p < 0.05, **p < 0.01, SS: Standart sapma, K: Konsantrasyon

Tablo 5.28. hTERT-HPNE hücrelerinde F2 ve P2 formülasyonlarının MTT analizi sonucu % canlılık Değerleri

K (µg/mL)	F2			P2		
	24 s ± SS	48 s ± SS	72 s ± SS	24 s ± SS	48 s ± SS	72 s ± SS
400 **	7.682±0.797	7.557±0.381	8.713±1.380	18.763±0.969	22.859±1.494 *	17.069±0.993
200 *	29.159±0.318	25.279±0.746	22.604±0.386	36.691±0.705	43.667±0.633	42.611±0.651
100 *	41.884±0.306	46.151±0.446	49.981±0.292	50.104±0.990	57.946±0.920	58.448±0.559
50	52.716±0.434	58.225±0.308	64.857±0.623	58.716±1.186	68.290±1.403	86.010±0.687
25	60.475±0.570	65.968±0.880	67.852±0.854	69.363±0.904	80.579±1.074	95.665±1.100
12,5	75.791±0.925	73.898±0.577	79.502±3.193	73.382±1.026	85.268±1.136	104.951±1.542
Kontrol	100±0.014	100±0.010	100±0.014	100±0.042	100±0.010	100±0.051

*p < 0.05, **p < 0.01, SS: Standart sapma, K: Konsantrasyon

Tablo 5.29. hTERT-HPNE hücrelerinde F3 ve P3 formülasyonlarının MTT analizi sonucu % canlılık Değerleri

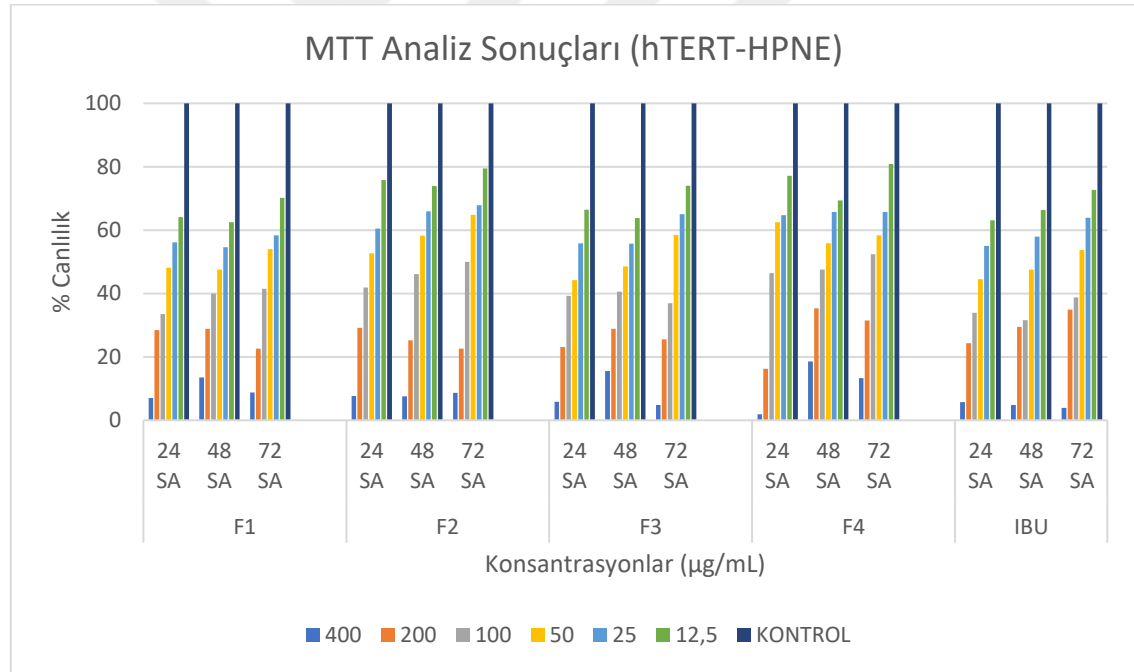
K (µg/mL)	F3			P3		
	24 s ± SS	48 s ± SS	72 s ± SS	24 s ± SS	48 s ± SS	72 s ± SS
400 **	5.804±0.688	15.487±1.303	4.857±0.431	18.547±0.640	13.100±0.988	17.223±0.144
200 *	23.076±1.511	28.895±0.728	25.559±0.270	35.099±0.565	37.761±0.454	37.384±1.525
100 *	39.292±0.445	40.580±0.855	36.965±0.342	47.143±0.954 *	69.154±1.053	71.915±1.601
50	44.243±0.592 *	48.588±0.737 *	58.473±0.415	57.340±1.368	72.573±0.580	87.109±0.297
25	55.881±0.636	55.773±0.654	65022±1.288	69.187±0.806	96.555±0.772	87.278±1.253
12,5	66.465±0.551	63.842±0.561	73.991±0.365	74.631±1.606	105.089±0.599	96.682±0.518
Kontrol	100±0.010	100±0.010	100±0.010	100±0.051	100±0.042	100±0.005

*p < 0.05, **p < 0.01, SS: Standart sapma, K: Konsantrasyon

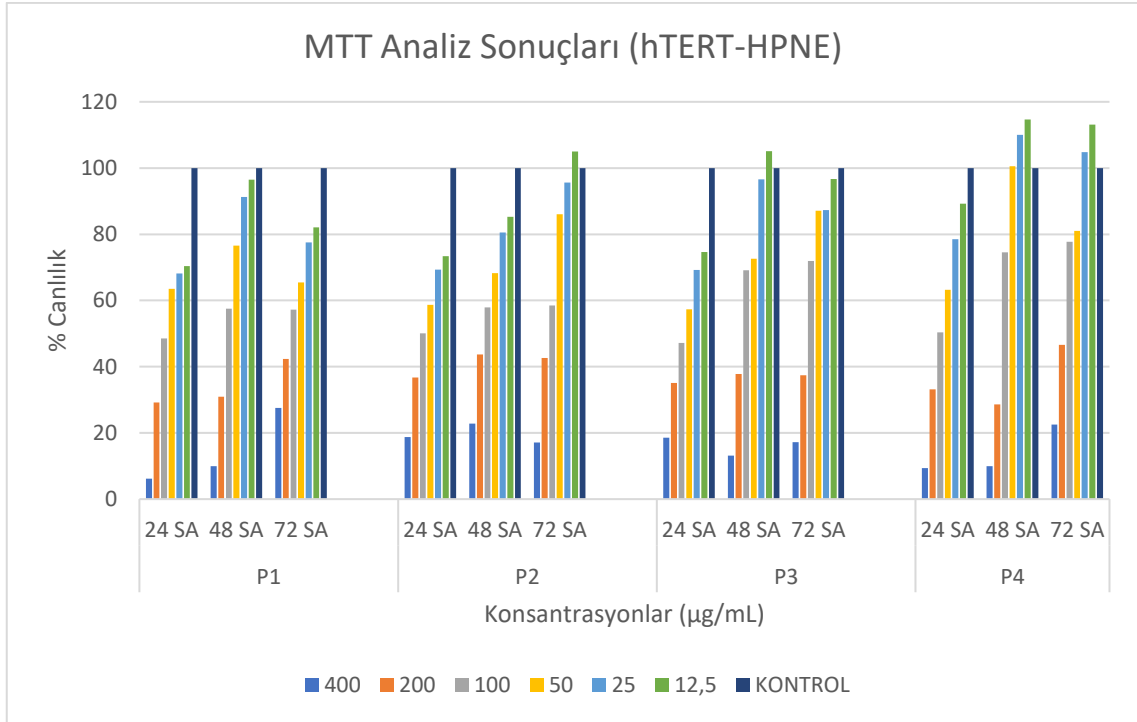
Tablo 5.30. *hTERT-HPNE hücrelerinde F4 ve P4 formülasyonlarının MTT analizi sonucu % canlılık Değerleri*

	F4			P4		
K (µg/mL)	24 s ± SS	48 s ± SS	72 s ± SS	24 s ± SS	48 s ± SS	72 s ± SS
400 **	1.860±0.582	18.547±1.038	13.268±0.925	9.414±0.435	9.938±1.006	22.521±0.927 *
200 *	16.251±1.564 **	35.296±0.655	31.487±0.205	33.143±1.415	28.652±0.911	46.555±0.490
100 *	46.450±1.061	47.562±0.684	52.436±0.457	50.368±0.128	74.547±0.484	77.688±1.221
50	62.468±0.636	55.887±1.237	58.364±0.093	63.265±0.852	100.510±1.376	81.054±0.542
25	64.708±1.228	65.714±0.989	65.782±0.783	78.537±1.827	110.051±0.884	104.776±0.492
12,5	77.198±1.222	69.384±0.970	80.881±0.659	89.278±3.563	114.694±1.044	113.126±0.535
Kontrol	100±0.005	100±0.051	100±0.010	100±0.008	100±0.066	100±0.042

*p < 0.05, **p < 0.01, SS: Standart sapma, K: Konsantrasyon



Şekil 5.30. *hTERT-HPNE hücrelerinde İBU ve İBU yüklü formülasyonların MTT analizi sonucu % canlılık değerlerine ait grafikler*



Şekil 5.31. hTERT-HPNE hücrelerinde plasebo formülasyonların MTT analizi sonucu % canlılık değerlerine ait grafikler

Tablo 5.31. Formülasyonların hTERT-HPNE hücreleri için IC₅₀ değerleri (µg/mL)

	24 s	48 s	72 s
IBU	40.46282	58.02718	97.72008
F1	53.39393	55.05218	81.054
F2	96.34278	108.1634	125.1779
F3	54.17263	63.01409	96.53016
F4	104.0876	121.1736	133.6076
P1	117.458	178.381	195.9272
P2	139.9072	194.781	211.463
P3	133.635	201.203	209.391
P4	150.266	212.595	240.9925

Bu veriler ışığındaki analiz sonuçlarına göre pankreas hücreleri için hesaplanan IC₅₀ değerleri akciğer hücrelerine göre daha yüksek bulunmuş ve bu nedenle formülasyonlara karşı pankreatik hücrelerin daha dayanıklı olduğu gözlemlenmiştir. Ancak saf İBU ile karşılaştırıldığında, tüm formülasyonların hücre canlılığı değerleri daha yüksek bulunmuştur.

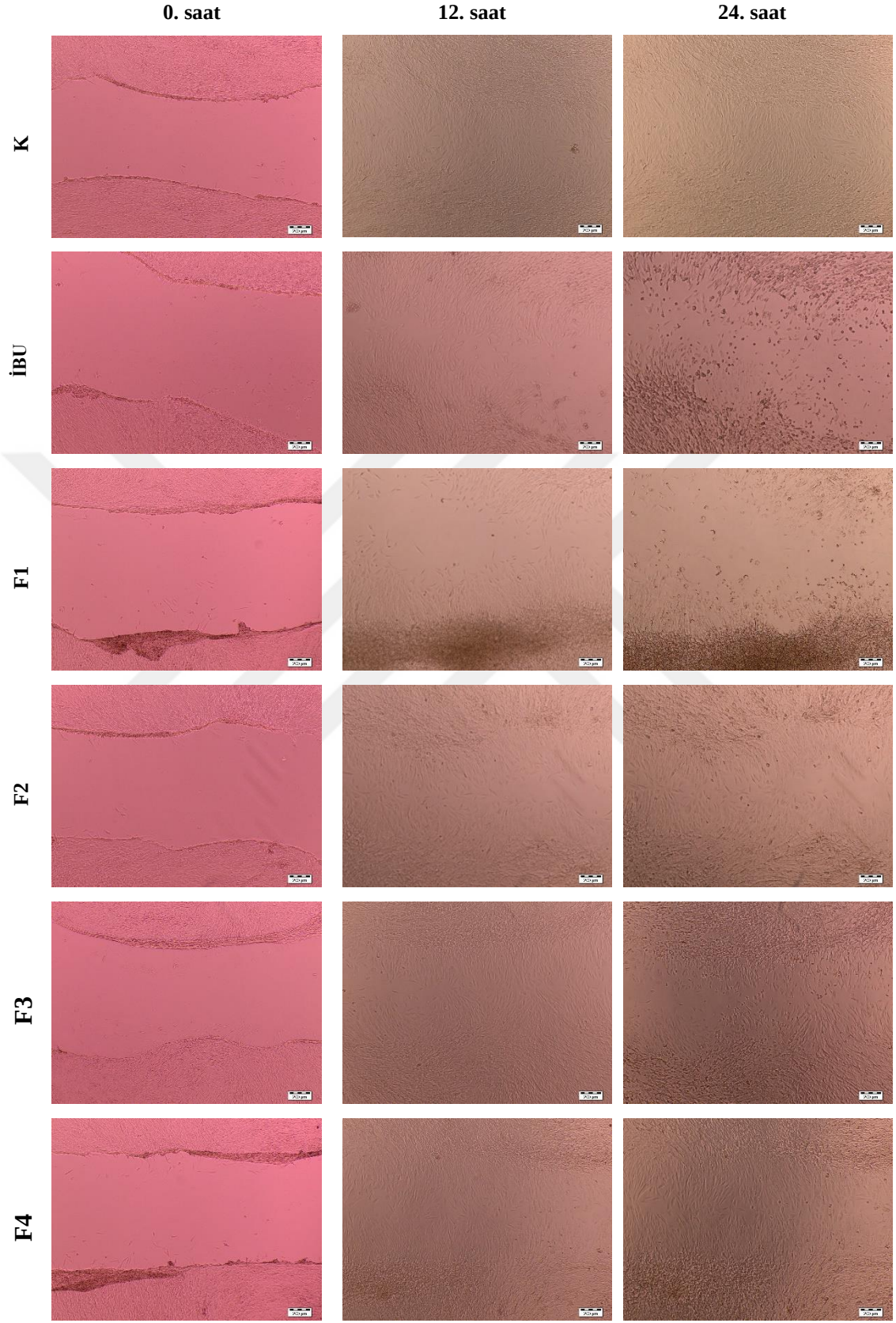
Bulunan IC₅₀ değerleri incelendiğinde, akciğer hücreleri üzerinde etkin madde yüklü formülasyonlar için en yüksek konsantrasyonda (400 µg/mL) kontrole göre yüksek

düzeyde anlamlı fark, 50 µg/mL konsantrasyona kadar anlamlı bir fark gözlemlenirken, 50 µg/mL konsantrasyonun altında istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlenmemiştir, plasebo formülasyonlarda ise 100 µg/mL konsantrasyonun altında istatistiksel anlamlılık gözlemlenmemiştir. Pankreatik hücrelerde ise yine aynı şekilde en yüksek konsantrasyonda yüksek düzeyde anlamlılık gözlenirken anlamlılık seviyesi 100 µg/mL konsantrasyona çekilmiştir.

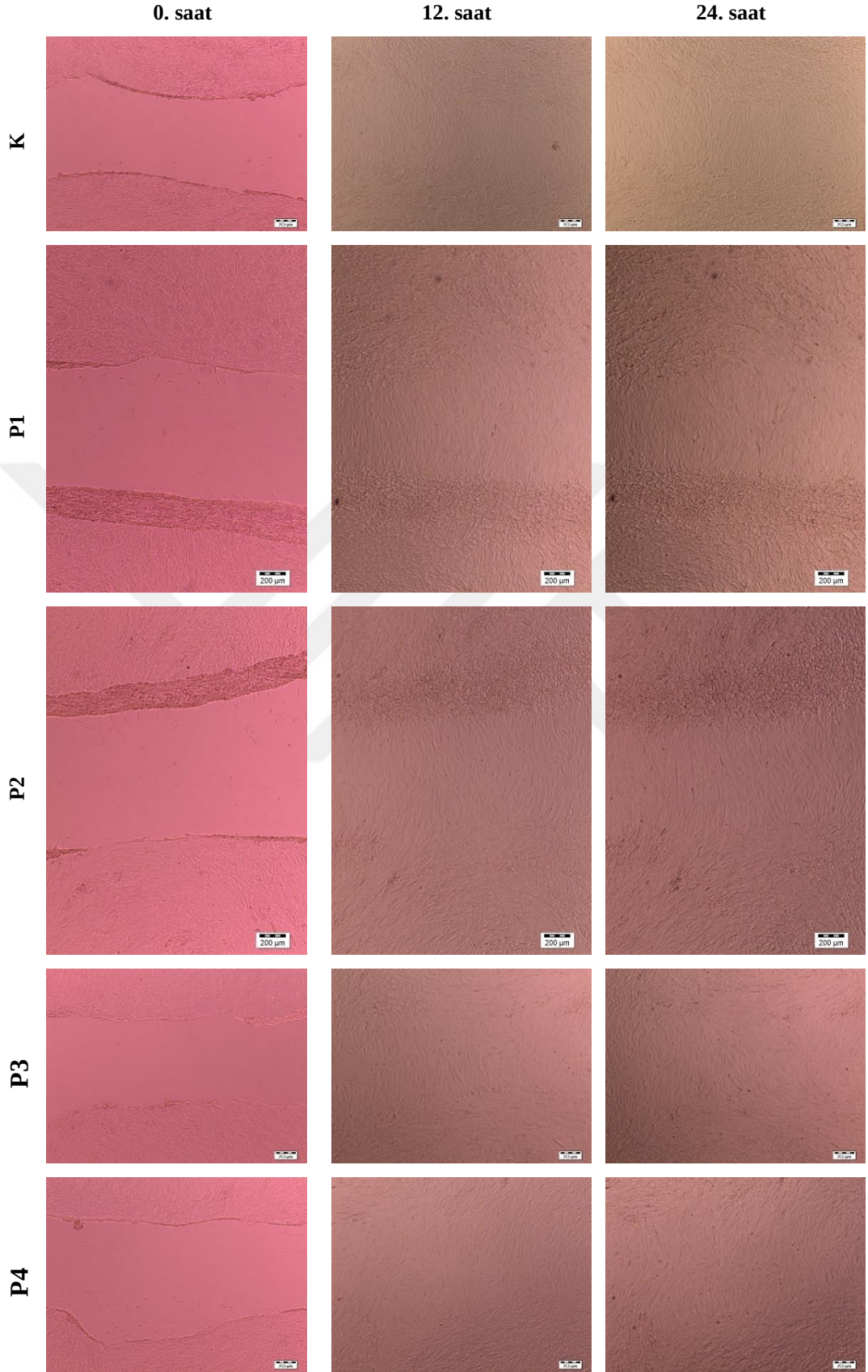
IC₅₀ değerleri dikkatle incelendiğinde, her iki hücre tipinde de İBU yüklü formülasyonlar için hücre canlılığı değerleri $F4 > F2 > F3 > F1$ olarak bulunmuştur. Plasebo formülasyonlar için $P4 > P2 > P3 > P1$ olmak üzere benzer sıralama elde edilmiştir.

5.5.2. Yara iyileştirici etki deneyi

Tüm formülasyonlarda, kontrol ile karşılaştırabilmek için aynı konsantrasyon değerleri uygulanmış olup morfolojik değerlendirme yapıldığında, İBU'nun yara iyileştirici etkisinin formülasyonlar ile arttırıldığı gözlemlenmiştir. Hücre migrasyonunun farklı hızlarda olma nedeninin açılan çizik kenarında biriken hücre öbekleri olduğu düşünülmüş, ancak hücre kapanmasını en az düzeyde etkilediği sonucuna varılmıştır (Kırbaş vd., 2021).



Şekil 5.32. Kontrol, İBU ve İBU içeren PNP formülasyonlarının yara iyi edici etkisinin incelenmesine ilişkin 0. saat, 12. saat ve 24. saate ilişkin mikroskop görüntüleri (4x büyütme)



Şekil 5.33. Kontrol grubu ve plasebo PNP formülasyonlarının yara iyi edici etkisinin incelenmesine ilişkin 0. saat, 12. saat ve 24. saate ilişkin mikroskop görüntüleri (4x büyütme)

6. SONUÇ

Yapılan tez çalışması kapsamında, kolona hedefleme yapılarak, kolonda oluşan yaraların iyileştirilmesini sağlayabilecek İBU yüklü PNP'ler hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan etkin maddenin termal davranışı, çözünürlük özellikleri, FT-IR ve ¹H-NMR spektrumları literatüre ve maddelere ait firma spesifikasyonlarına uyum göstermiştir. Formülasyonların hazırlama yöntemleri ile *in vitro* salım çalışmalarının yapılacağı ortam ve koşullar dikkate alınarak İBU'nun bu ortam ve koşullardaki kararlılığı etkin madde miktar tayini analizi kullanılarak incelenmiştir.

İBU'nun analitik miktar tayini için literatür araştırılması sonrasında çeşitli modifikasyonlarla HPLC yöntemi ortaya konmuştur ve geliştirilen yöntemin doğrusal, kesin, doğru ve seçici olduğuna karar verilmiştir. % EE sonuçları incelendiğinde hazırlanmış PNP'lere yeterli düzeyde etkin madde yüklendiği sonucuna varılmıştır.

Tez kapsamında PCL'nin farklı molekül ağırlıklı türevleri ve ES 100 kullanılarak hazırlanmış İBU içeren PNP'lerin ZP ve PB sonuçları değerlendirilerek, optimum formülasyonların bileşenlerine karar verilmiştir. Optimum yedi formülasyon üzerinde PB, PDI ve ZP analizlerinin yanı sıra DSC, FT-IR ve ¹H-NMR gibi katı hal analizleri gerçekleştirilmiş ve %EE değerleri hesaplanmıştır. Tüm karakterizasyon analizleri dikkate alındığında, özellikle yüksek % EE değerleri ve PDI verileri incelendiğinde tekdüze büyüklük dağılımı ile nanoboyutlu anyonik PNP'lerden F1, F2, F3 ve F4 sonraki analizler için seçilmiştir. GİS'i simgeleyen ardışık üç farklı pH ortamında (pH 1.2, pH 6.8, pH 7.4) yapılan *in vitro* salım çalışması sonuçları değerlendirildiğinde hazırlanan PNP'lerin kolon pH'sında etkin maddeyi saldıgı saptanmıştır. Bu da hazırlanan formülasyonların kolona yönelik olduğunun öngörüsü anlamına gelmektedir.

MTT sonuçları incelendiğinde, tüm formülasyonların İBU ile karşılaştırıldığında, daha yüksek hücre canlılığı değerleri verdiği bulunmuştur. Aynı zamanda F2 ve F4 gibi kopolimerik PNP'lerin, F1 ve F3 gibi PNP'lerden daha yüksek IC₅₀ değerlerine sahip olduğu bulunmuştur.

Yapılan yara iyileştirici etki deneylerinin sonuçları incelendiğinde, morfolojik değerlendirme yapıldığında, İBU'nun yara iyileştirici etkisinin formülasyonlar ile arttırıldığı gözlemlenmiştir.

Yapılan karakterizasyon, *in vitro* salım, *in vitro* toksisite ve yara iyileştirici etki deneylerinin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, hazırlanan İBU yüklü PNP'lerin başarılı bir şekilde kolona hedeflendiği ve kolonda oluşabilecek yaralar üzerine olumlu etki yarattığı sonucuna varılmıştır.



KAYNAKÇA

- Akdere, M., & Schneiders, T. (2021). Modeling of the electrospinning process. *Advances in Modeling and Simulation in Textile Engineering* Woodhead Publishing. (pp. 237-253).
- Alkan, G., (2019). Parasetamol ve ibuprofen içeren nanoliflerin antibiyofilm özelliklerinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2016). Nanoparticles in the clinic. *Bioengineering & translational medicine*, 1(1), 10-29.
- Andini, S., Bolognese, A., Formisano, D., Manfra, M., Montagnaro, F., & Santoro, L. (2012). Mechanochemistry of ibuprofen pharmaceutical. *Chemosphere*, 88(5), 548-553.
- Atasoy, Ö. (2019). Paklitaksel içeren biyoparçalanır polimerik nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi ve *in vitro* değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Augusti, D. V., & Augusti, R. (2005). Determination of the enantiomeric composition of ibuprofen solutions via a rapid and sensitive mass spectrometry method. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16(10), 1881-1885.
- Bashyal, S. (2018). Ibuprofen and its different analytical and manufacturing methods: A review. *Asian J Pharm Clin Res*, 11(7), 25-29.
- Belali, N., Wathoni, N., & Muchtaridi, M. (2019). Advances in orally targeted drug delivery to colon. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 10(3), 100.
- Blouza, I. L., Charcosset, C., Sfar, S., & Fessi, H. (2006). Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. *International journal of pharmaceutics*, 325(1-2), 124-131.
- Benkaddour, A., Jradi, K., Robert, S., & Daneault, C. (2013). Grafting of polycaprolactone on oxidized nanocelluloses by click chemistry. *Nanomaterials*, 3(1), 141-157.

- Bushra, R., & Aslam, N. (2010). An overview of clinical pharmacology of Ibuprofen. *Oman medical journal*, 25(3), 155.
- Busson, M., (1986). "Update on ibuprofen." *Journal of International Medical Research* 14.2, 53-62.
- Calvo, P., Gouritin, B., Chacun, H., Desmaële, D., D'Angelo, J., Noel, J. P., Georgin D., Fetta E., Andreux J.P., Couvreur P., (2001). Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery. *Pharmaceutical research*, 18(8), 1157-1166.
- Canan, O. (2018). Çocuklarda antipiretik olarak ibuprofen doğru seçenek mi?. *Cukurova Medical Journal*, 43(2), 502-503.
- Cesur, S. (2021). Biyomedikal Uygulamalar İçin Mikroakışkan Yöntemiyle Mikrobaloncuk ve Partikül Üretimi. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Çelebi, N., Koloitler, In: Farmasötik Teknoloji, Ayla Z., G. (Ed), Aktif Matbaa ve Reklam Hizmetleri, İstanbul, 245-255 (2012).
- Çobanoğlu, E. (2018). Simvastatin içeren nanosünger formülasyonun geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Çomoğlu, T., Müderrisoğlu A.E. (2010). An Overview Of Polymeric Particulate Drug Delivery System Formulations. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 39(4), 343-368.
- Dash, T. K., and Konkimalla, V. B. (2012). Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release*, 158(1), 15-33.
- Davies, N. M. (2012). Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. *Clinical pharmacokinetics*, 34(2), 101-154.
- Derman, S., Kızılbey, K., and Akdeste, Z. M. (2013). Polymeric nanoparticles. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*, 31(1), 107-120.
- Demiröz, T.F., Acartürk, F. (2002). Kolona Özgü ttaç Taşıyıcı Sistemler. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(2), 117-134.

- Dinparvar, S. (2018). Polikaprolakton temelli nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi, karakterizasyonu ve meme kanseri kök hücrelerine karşı etkinliğinin *in vitro* incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Duygu, D., Baykal, T., Açıkgoz, I., and Yildiz, K. (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for biological studies. *Gazi University Journal of Science*, 22(3), 117–121.
- Elzein, T., Nasser-Eddine, M., Delaite, C., Bistac, S., & Dumas, P. (2004). FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. *Journal of colloid and interface science*, 273(2), 381-387.
- Eminler, A. T., Uslan, M. İ., Köksal, A. Ş., ve Parlak, E. (2014). Non-steroid anti-inflamatuvar ilaçların üst gastrointestinal sistem yan etkileri ve önlenmesi. *Güncel Gastroenteroloji*, 18(3), 333-338.
- Eroğlu, Y. (2020). Nabumeton İçeren Tabletlerde Yeni Miktar Tayin Yöntemleri ve Diğer Yöntemlerle Karşılaştırması. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(1), 61-87.
- Fassihi, S. C., Talukder, R., & Fassihi, R. (2019). “Colon-Targeted Delivery Systems for Therapeutic Applications: Drug Release from Multiparticulate, Monolithic Matrix, and Capsule-Filled Delivery Systems.” *ACS Symposium Series* 1309:310–38.
- Filippa, M. A., & Gasull, E. I. (2013). Ibuprofen solubility in pure organic solvents and aqueous mixtures of cosolvents: Interactions and thermodynamic parameters relating to the solvation process. *Fluid Phase Equilibria*, 354, 185-190.
- Franco, P., and De Marco, I. (2020). Eudragit: A novel carrier for controlled drug delivery in supercritical antisolvent coprecipitation. *Polymers*, 12(1), 234.
- Galindo-Rodríguez, S. A., Puel, F., Briançon, S., Allémann, E., Doelker, E., and Fessi, H. (2005). Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles. *European journal of pharmaceutical sciences*, 25(4-5), 357-367.
- Gürsoy, A.Z., Kontrollü salım sistemleri, In: Farmasötik Teknoloji-Temel Konular ve Dozaj Şekilleri, A.Z. Gürsoy, (Ed), Aktif Matbaa ve Reklam Hizmetleri, İstanbul, 409-421 (2012)

- Gomathi, T., Sudha, P. N., Florence, J. A. K., Venkatesan, J., & Anil, S. (2017). Fabrication of letrozole formulation using chitosan nanoparticles through ionic gelation method. *International journal of biological macromolecules*, 104, 1820-1832.
- Haskell, R. J. (2006). Physical characterization of nanoparticles. In *Nanoparticle Technology for Drug Delivery*. CRC Press. 159: 127-162.
- Hişmi, S. I. (2015). *FT-IR ve termal analiz yöntemleri ile diflunisal içeren pektin mikrokürelerinin ön formülasyon çalışmaları*.
- ICH, E. W. G. (2005). Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1) Current. 1–17.
- Jalbani, N. S., Solangi, A. R., Khuhawar, M. Y., Memon, S., Junejo, R., and Memon, A. A. (2020). Gas Chromatographic and Spectrophotometric Determination of Diclofenac Sodium, Ibuprofen, and Mefenamic Acid in Urine and Blood Samples. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(5), 465.
- Kahraman, S. (2016). İbuprofen ve metformin hidroklorür ile bu etken maddeleri içeren bazı ilaçların radyosterilizasyon işleminin elektron paramagnetik rezonans tekniğiyle incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kandilli, B. (2019). Antiepileptik etkin madde içeren ilaç şekillerinin hazırlanması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı.
- Kaş, H. S. (2011). İlaç taşıyıcı partiküler sistemler. *Gürsoy A,(ed), içinde: Kontrollü Salım Sistemleri.*, 82-88.
- Kırbaş, O. K., Bozkurt, B. T., Taşlı, P. N., Hayal, T. B., Özkan, İ., Bülbül, B., & Şahin, F. (2021). Effective scarless wound healing mediated by erbium borate nanoparticles. *Biological Trace Element Research*, 199(9), 3262-3271.
- Kızılelma, M.S. (2019). *İbuprofen etkin maddesinin farmasötik preparatlarda hplc ve gc-ms yöntemi ile miktar tayini*.

- Kreuter, J. (2007). Nanoparticles—a historical perspective. *International journal of pharmaceutics*, 331(1), 1-10.
- Labet, M., Thielemans, W. (2009). Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical society reviews*, 38(12), 3484-3504.
- Lathaeswari, R., Prasad, G. S., and Sujanitha, T. (2013). Development and *in-vitro* evaluation of capecitabine loaded surface modified eudragit nanoparticles for colon targeting. *Advances in Pharmacology & Toxicology*, 14(2).
- Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007). *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nature protocols*, 2(2), 329-333.
- Lozoya-Agullo, I., Araújo, F., González-Álvarez, I., Merino-Sanjuán, M., González-Álvarez, M., Bermejo, M., and Sarmiento, B. (2018). PLGA nanoparticles are effective to control the colonic release and absorption on ibuprofen. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 115, 119-125.
- Magiera, S., Gülmez, Ş. (2014). Ultrasound-assisted emulsification microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of ibuprofen and its metabolites in human urine. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 92, 193-202.
- Makadia, H. K., Siegel, S. J. (2011). Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3(3), 1377-1397.
- Malmsten, M., (2002 a). Polymer particles, Martin M. (ed), in: *Surfactants and Polymers in Drug Delivery*, 261-291. New York, Marcel Dekker Incorporated.
- Malmsten, M., (2002 b). Degradation of Surfactants and Polymers in Drug Delivery, Martin M. (ed), in: *Surfactants and Polymers in Drug Delivery*, 293-317. New York, Marcel Dekker Incorporated.
- Matkovic, S. R., Valle, G. M., Briand, L. E. (2005). Quantitative analysis of ibuprofen in pharmaceutical formulations through FTIR spectroscopy. *Latin American Applied Research*, 35(3), 189-195.

- Merkel, T. J., Herlihy, K. P., Nunes, J., Orgel, R. M., Rolland, J. P., & DeSimone, J. M. (2010). Scalable, shape-specific, top-down fabrication methods for the synthesis of engineered colloidal particles. *Langmuir*, 26(16), 13086-13096.
- Mehta, R., Chawla, A., Sharma, P., & Pawar, P. (2013). Formulation and *in vitro* evaluation of Eudragit S-100 coated naproxen matrix tablets for colon-targeted drug delivery system. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 4(1), 31.
- Miladi, K., Ibraheem, D., Iqbal, M., Sfar, S., Fessi, H., and Elaissari, A. (2014). Particles from preformed polymers as carriers for drug delivery. *EXCLI journal*, 13, 28.
- Mitić, S. S., Miletić, G. Ž., Pavlović, A. N., Arsić, B. B., and Živanović, V. V. (2008). Quantitative analysis of ibuprofen in pharmaceuticals and human control serum using kinetic spectrophotometry. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 73(8-9), 879-890.
- Mohanraj, V. J., Chen, Y. (2006). Nanoparticles-a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), 561-573.
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1-2), 113-142.
- Nagavarma, B. V. N., Yadav, H. K., Ayaz, A. V. L. S., Vasudha, L. S., and Shivakumar, H. G. (2012). Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-a review. *Asian J Pharm Clin Res*, 5(3), 16-23.
- Operti, M. C., Bernhardt, A., Grimm, S., Engel, A., Figdor, C. G., and Tagit, O. (2021). PLGA-based nanomedicines manufacturing: Technologies overview and challenges in industrial scale-up. *International Journal of Pharmaceutics*, 605, 120807.
- Özsağıroğlu, E. (2011). Enzimatik polimerizasyon ile sentezlenen polikaprolaktona reaksiyon koşullarının etkisinin ve polikaprolaktonun biyobozunurluğunun incelenmesi. Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Philip, A. K., Philip, B. (2010). Colon targeted drug delivery systems: a review on primary and novel approaches. *Oman medical journal*, 25(2), 79.

- Pillai, O., Panchagnula, R. (2001). Polymers in drug delivery. *Current opinion in chemical biology*, 5(4), 447-451.
- Rainsford, K. D. (1999). History and development of ibuprofen. In: *Ibuprofen*. 1-24. CRC Press.
- Rainsford, K. D. (2009). Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacology*, 17(6), 275-342.
- Rao, J. P., Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. *Progress in polymer science*, 36(7), 887-913.
- Ravi, P. R., Vats, R., Dalal, V., and Gadekar, N. (2015). Design, optimization and evaluation of poly- ϵ -caprolactone (PCL) based polymeric nanoparticles for oral delivery of lopinavir. *Drug development and industrial pharmacy*, 41(1), 131-140
- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., and Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(1), 8-21.
- Schubert, S., Delaney Jr, J. T., Schubert, U. S. (2011). Nanoprecipitation and nanofosieglrmulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly (lactic acid). *Soft Matter*, 7(5), 1581-1588.
- Sezgin, S.(2017). *In vitro* ilaç salımına ultrasonun etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Shekunov, B. Y., Chattopadhyay, P., Tong, H. H., and Chow, A. H. (2007). Particle size analysis in pharmaceutics: principles, methods and applications. *Pharmaceutical research*, 24(2), 203-227.
- Shin, D., Lee, S. J., Ha, Y. M., Choi, Y. S., Kim, J. W., Park, S. R., and Park, M. K. (2017). Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation according to absorption differences in three formulations of ibuprofen. *Drug design, development and therapy*, 11, 135.
- Sun, W., Xie, C., Wang, H., Hu, Y. (2004). Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain. *Biomaterials*, 25(15), 3065-3071.

- Sun, W., Wang, H., Xie, C., Hu, Y., Yang, X., and Xu, H. (2006). An attempt to directly trace polymeric nanoparticles *in vivo* with electron microscopy. *Journal of controlled release*, 115(3), 259-265.
- Thakkar, A., Chenreddy, S., Wang, J., Prabhu, S. (2015). Evaluation of ibuprofen loaded solid lipid nanoparticles and its combination regimens for pancreatic cancer chemoprevention. *International journal of oncology*, 46(4), 1827-1834.
- Tavares, M. R., de Menezes, L. R., Dutra Filho, J. C., Cabral, L. M., ve Tavares, M. I. B. (2017). Surface-coated polycaprolactone nanoparticles with pharmaceutical application: Structural and molecular mobility evaluation by TD-NMR. *Polymer Testing*, 60, 39-48.
- Toktaş, S. (2016). Glioma tedavisinde nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi, *in vitro* ve *in vivo* etkinliğinin değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Tuba, Ş. T. C., Hasçıçek, C.(2006). Colon targeted drug delivery systems. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 35(2), 125-148.
- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G. (2010). Flukonazol ve ketokonazol'un β -siklodekstrin ile hazırlanan kompleksleri üzerinde yapılan çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G. (2014). Epileptik mekanizmaya müdahale edecek nanoboyutta ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi ve *in vivo* davranışının değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G., Menciloğlu, Y., Kevser, E., and Yazan, Y. (2016). *In Vitro/in Vivo* Evaluation of Gamma-Aminobutyric Acid-LoadedN, N-Dimethylacrylamide-Based Pegylated Polymeric Nanoparticles for Brain Delivery to Treat Epilepsy. *Journal of Microencapsulation*, 33(7), 625-635.
- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G., Özer, S., Büyükköroğlu, G., & Yazan, Y. (2018). Formulation and *in vitro* evaluation of moxifloxacin hydrochloride-loaded polymeric nanoparticles for ocular application. *Latin American Journal of Pharmacy*, 37(9), 1850-62

- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G. (2019). A systematic evaluation of formulation parameters on the characteristics of biodegradable PLGA-based nanoparticles for ophthalmic application. *Latin American Journal of Pharmacy*, 38(11), 2131-2142.
- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G., Görgülü Ş. (2019). Design and characterization of montelukast sodium loaded Kollidon® SR nanoparticles and evaluation of release kinetics and cytotoxicity potential. *Latin American Journal of Pharmacy*, 38(7), 1350-60.
- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G., Yenilmez, E., Başaran, E., and Yazan, Y. (2019). Preparation and *in Vitro* Characterization of a Fluconazole Loaded Chitosan Particulate System.” *Acta Pharmaceutica Scientia* 57(2):203–15.
- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G., Görgülü Ş., Berkman, M.S. (2020). Novel Approaches to Cancer Therapy with Ibuprofen-Loaded Eudragit® RS 100 and/or Octadecylamine-Modified PLGA Nanoparticles by Assessment of Their Effects on Apoptosis.” *Drug Development and Industrial Pharmacy* 46(7):1133–49.
- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G. and Öztürk, A. A. (2020). Levocetirizine dihydrochloride-loaded chitosan nanoparticles: formulation and *in vitro* evaluation. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(1), 27.
- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G., Görgülü Ş. (2021). Surface Modification of PLGA Nanoparticles with Chitosan or Eudragit® RS 100: Characterization, Prolonged Release, Cytotoxicity, and Enhanced Antimicrobial Activity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 61:102145.
- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G., Süzen-Demircioğlu, Y., Berkman, M. S., Metinoğlu-Örüm, S., & Altun, E. (2021a). Synthesis, spectroscopic, thermal properties, *in vitro* release, and stability studies of ibuprofen-loaded microspheres cross-linked with hexachlorocyclotriphosphazene/octachlorocyclotetraphosphazene. *Polymer Bulletin*, 78(11), 6221-6250.
- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G., Özer, S., Büyükköroğlu, G., & Yazan, Y. (2021b). Moxifloxacin hydrochloride-loaded Eudragit® RL 100 and Kollidon® SR based nanoparticles: Formulation, *in vitro* characterization and cytotoxicity. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 24(3), 328-341.

- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G., Görgülü Ş., Güleç, K., and Kıyan, H.T. (2022). “Nanoarchitectonics of PLGA Based Polymeric Nanoparticles with Oseltamivir Phosphate for Lung Cancer Therapy: *In Vitro-in Vivo* Evaluation.” *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 67:102996.
- Wahlgren, M., Axenstrand, M., Håkansson, Å., Marefati, A., and Lomstein Pedersen, B. (2019). *In vitro* methods to study colon release: State of the art and an outlook on new strategies for better in-vitro biorelevant release media. *Pharmaceutics*, 11(2), 95.
- Zhang, C. L., Yu, S. H. (2014). Nanoparticles meet electrospinning: recent advances and future prospects. *Chemical Society Reviews*, 43(13), 4423-4448.
- http-1: <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/i/ibuprofen.html>
- http-2: <https://chemwriter.com/>
- http-3: https://www.tebrp.com/tebrp_plus/login/login.jsp?from=operation=etkin_madde,etkin_madde_id=125
- http-4: <https://www.ottokemi.com/polymers/e1672.aspx>

20th International Pharmaceutical Technology Symposium

February 21 - 23, 2022

ONLINE

**Shaping the Future of
Pharmaceutics**

**With Special Industrial and
Regulatory Sessions**

Pharmaceuticals Development and Manufacturing
Solutions

Data Science and Cyber Tools in Pharmaceuticals
Development and Manufacturing Sciences

Interchangeability of Pharmaceuticals:
Current Status and Future Outlook

Rare Diseases and Orphan Drugs

Supporting Organizations

P-52

ANALGESIC AGENT LOADED EUDRAGIT® S 100 BASED NANOPARTICLES: FORMULATION AND *IN VITRO* CHARACTERIZATION

Kalabalayi Namazov¹, Gülsel Yurtdaş Kırımlıoğlu²

¹ Department of Pharmaceutical Technology, Graduate School of Health Science, Anadolu University, Eskişehir, Türkiye

² Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, Eskişehir, Türkiye

³ Department, Faculty, City, Country

INTRODUCTION

Oral administration remains the most effective, appropriate and convenient route for the delivery of many active agents. Many therapeutic agents orally administered encounter challenges such as lower absorption, quicker metabolism and degradation, higher toxicity, lower drug solubility and dissolution rate, unpredictable bioavailability, etc. Such major problems need to be solved to achieve effective treatment with active ingredients. One of the promising approaches to come through these difficulties is design of nanosized drug delivery systems. [1].

Nanoparticles (NPs) provides significant benefits including better drug release, improved stability, intracellular drug transportation and gives active and passive targeted characteristics with surface modifications [2]. Some medications breakdown in the stomach or small intestine, but the colon provides a better environment. Certain biodegradable and/or soluble polymers with higher pH polymers and surface alterations will be used to achieve a prolonged release, and NPs will deliver the drug to the colon without releasing the drug [3].

Ibuprofen (IBU) is one of the most used and frequently prescribed nonsteroidal anti-inflammatory active agents. IBU displays rapid absorption and has a short half-life [4]. IBU has the disadvantage of frequently generating gastrointestinal side effects owing to direct mucosal damage or COX-1 inhibition in rapid release drug carriers. As a result, a controlled-release formulation targeting to the colon could minimize upper-intestinal injury and make chronic treatment more manageable.

The aim of this study was to formulate IBU loaded Eudragit® based polymeric NPs for modified release. Eudragit® S 100 (ES 100) polymer, which is widely used in drug delivery to the colon, was chosen as the base polymer in our study and various combinations with PCL polymer were tried.

MATERIALS AND METHODS

Materials

IBU was donated by Drogosan (İstanbul, Turkey). ES 100 was purchased from Röhm Pharma Polymers (Germany). All other chemicals used were of analytical grade.

Preparation of polymeric nanoparticles

Modified nanoprecipitation technique was used for NP preparation. Different types of polymers and active agent were dissolved in organic phase at 25°C. This solution was injected (0.5 mL/min) into 30 mL distilled water containing Tween® 80 (1%) and stirred continuously for 10 minutes at 14000 rpm using an ultraturrax. In a fume cupboard, the nanosuspensions were mixed at 400 rpm for 3 hours, allowing organic solvent residues to evaporate and collecting the final volume of the aqueous suspension. After centrifuging the aqueous nanosuspension at 11000 rpm for 10 minutes, the precipitated NPs were washed. Components and molar ratios of IBU loaded PNPs were presented in Table 1.

Table 1. Compositions of IBU loaded Eudragit based polymeric NPs

Compositions (mg)	A	B	C
Eudragit® S 100	50	50	100
PCL (Mn ~10,000)	50	-	-
PCL (Mn ~40,000)	-	50	-
IBU	10	10	10

Characterization of polymeric nanoparticles

Malvern Nano ZS was used to evaluate particle size (PS), polydispersity index (PDI), and zeta potential (ZP) on freshly prepared samples (Zetasizer Nano Series, Worcestershire, UK). By using a modified high performance liquid chromatography method (HPLC), the encapsulation efficiency (EE) % of IBU loaded PLGA NPs was determined (Shimadzu, Japan). The formulations were analyzed using a Shimadzu IR Prestige-21 (Japan) FT-IR spectrometer in the wavelength range of 4000-400 cm⁻¹. ¹H-NMR analyses were performed using Fourier 300 FT-NMR spectrometer (Bruker, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation and characterization of polymeric nanoparticles

IBU loaded Eudragit based NPs were formulated successfully. Mean particle sizes and PDI values were presented in Table 2.

Table 2. Mean particle sizes and PDI values of IBU loaded Eudragit based NPs

Code	Mean PS $\pm$ SE	PDI $\pm$ SE
A	350.40 $\pm$ 12.15	0.49 $\pm$ 0.02
B	391.83 $\pm$ 22.31	0.53 $\pm$ 0.02
C	518.87 $\pm$ 39.14	0.68 $\pm$ 0.02

Zeta potential and EE % values of IBU loaded Eudragit based NPs were demonstrated in Table 3.

Table 3. Zeta potential and encapsulation efficiency % values of IBU loaded Eudragit based NPs

Code	Mean ZP $\pm$ SE (mV)	EE % $\pm$ SE
A	-37.77 $\pm$ 0.94	27.06 $\pm$ 0.72
B	-34.47 $\pm$ 3.00	27.23 $\pm$ 0.53
C	-56.13 $\pm$ 0.65	18.35 $\pm$ 0.16

The incorporation of IBU into the Eudragit based polymeric network was also verified by FTIR and $^1\text{H-NMR}$ studies.

CONCLUSION

Eudragit®-based NPs with IBU were effectively formulated. Characterizing analyses resulted in nanoparticles with a relatively higher EE% and anionic characteristic.

REFERENCES

1. Yurtdaş-Kırmıoğlu, G., et al., Surface modification of PLGA nanoparticles with chitosan or Eudragit® RS 100: Characterization, prolonged release, cytotoxicity, and enhanced antimicrobial activity, Journal of drug delivery science and technology, 2021. 61: 102145.
2. Yurtdaş-Kırmıoğlu, G., et al., In vitro/in vivo evaluation of gamma-aminobutyric acid loaded N,N-dimethylacrylamide-based polymeric nanoparticles for brain delivery to treat epilepsy, Journal of microencapsulation, 2016. 33(7): 625–635.
3. Lozoya-Agullo, I., et al., PLGA nanoparticles are effective to control the colonic release and absorption on ibuprofen. European Journal of pharmaceutical sciences, 2018. 115: p. 119-125.
4. Yurtdaş-Kırmıoğlu, G., et al., Synthesis, spectroscopic, thermal properties, in vitro release, and stability studies of ibuprofen-loaded microspheres crosslinked with hexachlorocyclotriphosphazene/octachlorocyclotetraphosphazene, Polymer bulletin, 2021. 78: p. 6221-6250.

P-53

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF IBUPROFEN LOADED POLYCAPROLACTONE NANOPARTICLES AIMING COLONIC DELIVERY

Kalabalayi Namazov¹, Gülsel Yurtdaş Kırımlıoğlu²

¹ Department of Pharmaceutical Technology, Graduate School of Health Science, Anadolu University, Eskişehir, Türkiye

² Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, Eskişehir, Türkiye

³ Department, Faculty, City, Country

INTRODUCTION

Ibuprofen (IBU), derived from isobutyl-phenyl-propanoic acid, is a NSAID used for the treatment of fever, mild to moderate post-operative pain, osteoarthritis, dental pain, headaches, and pain from kidney stones. Also, it is beneficial for inflammatory diseases like idiopathic rheumatoid arthritis and juvenile arthritis [1,2].

Nanoparticles (NPs) have become a significant approach in the field of drug delivery since they can deliver broad range of active agents to the target organs and with different purposes for a long period. The oral delivery is the most physiological and favoured route of drugs administration. Some of drugs are degraded in stomach or small intestine, but colon supplies a more appropriate environment. NPs will reach the colon without releasing the medicine, and certain biodegradable, soluble polymers with higher pH polymers and surface changes will be used to create an extended release [3].

In immediate release delivery systems, IBU has a rapid and extensive oral adsorption, but it has the drawback of frequently causing gastrointestinal side effects due to direct mucosal injury or COX-1 inhibition. Thus, a controlled release formulation directed to the colon could reduce upper intestinal damage and make easier chronical treatments.

The aim of the current work was to develop polymeric NPs (PNP) of ibuprofen with polycaprolactone (PCL) with different molecular weight (M_w) as a polymer to examine their characteristics and performance as controlled/extended-release formulation aiming colonic delivery.

MATERIALS AND METHODS

Materials

IBU was kindly supplied from Drog-san (Istanbul, Turkey). Different PCL types PCL ($M_w \sim 14,000$, average $M_n \sim 10,000$), PCL (average $M_n \sim 45,000$) and PCL (average $M_n \sim 80,000$) was purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Tween® 80 was a product of Merck. All other chemicals used were of analytical grade.

Preparation of polymeric nanoparticles

IBU loaded PCL based nanoparticles were prepared by the nanoprecipitation technique with some modifications. Nanoprecipitation supplies a mild, facile, and low energy input technique for the preparation of PNPs [1,4].

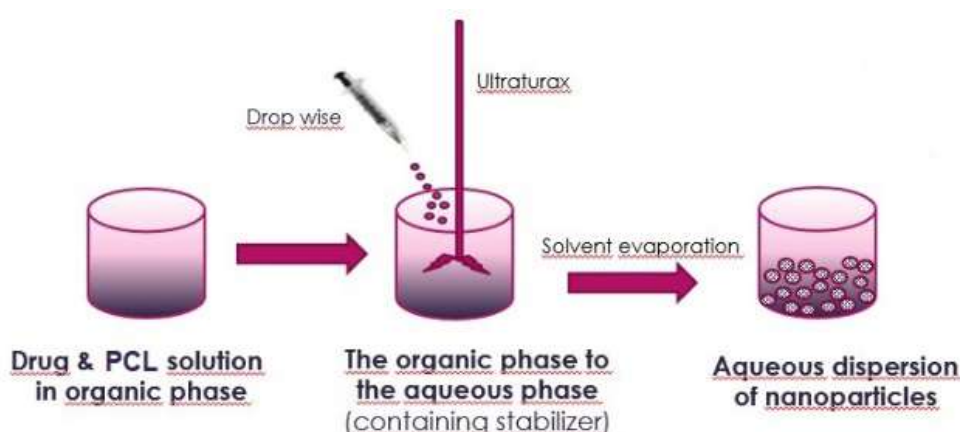


Figure 1. Schematic representation of the nanoprecipitation technique for active substance loading into the PCL nanoparticles.

Different types of polymers and active agent were dissolved in organic phase at room temperature. The resulting solution was slowly injected (0.5 mL/min) in 30 mL distilled water containing Tween® 80 (1%) with continuous stirring by ultra turrax for 10 min at 14000 rpm. The nanosuspensions were stirred at 400 rpm for 3h in fume cupboard allowing organic solvent residues to evaporate and the final volume of the aqueous suspension was collected. Aqueous nanosuspension was then centrifuged at 11000 rpm for 10 min, the precipitated NPs were subjected washing.

Components and molar ratios of IBU loaded PNPs were presented in Table 1.

Table 1. Compositions of IBU loaded PNPs

Compositions (mg)	NP-1	NP-2	NP-3
PCL (Mn ~10,000)	100	-	-
PCL (Mn ~40,000)	-	100	-
PCL (Mn ~80,000)	-	-	100
IBU	10	10	10

Characterization of polymeric nanoparticles

Particle size (PS), polydispersity index (PDI) and zeta potential (ZP) measurements were performed on freshly prepared samples using Malvern Nano ZS (Zetasizer Nano Series, Worcestershire, UK). Samples of all NPs were dispersed in double-distilled water. The EE% of IBU loaded PLGA NPs were measured by modified high performance liquid chromatography method (HPLC) (Shimadzu, Japan). FT-IR analysis spectra were recorded using Shimadzu IR Prestige-21 (Japan) and the formulations were analysed at the wavelength range of 4000-400 cm⁻¹. ¹H-NMR analyses were carried out on Fourier 300 FT-NMR spectrometer (Bruker, USA) using deuterated dimethyl sulfoxide as the solvent.

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation and characterization of polymeric nanoparticles

IBU loaded PNPs were developed successfully. Mean particle sizes and PDI values were presented in Table 2. Zeta potential and EE % of nanoparticles were demonstrated in Table 3.

Table 2. Mean particle sizes and PDI values of IBU loaded PNPs

Code	Mean PS ± SE	PDI ± SE
NP-1	375.93 ± 26.47	0.50 ± 0.03
NP-2	409.53 ± 15.97	0.50 ± 0.05
NP-3	485.00 ± 79.79	0.49 ± 0.03

Table 3. Zeta potential and encapsulation efficiency % values of IBU loaded PNPs

Code	Mean ZP ± SE (mV)	EE % ± SE
NP-1	-23.23 ± 0.73	32.45 ± 0.45
NP-2	-19.87 ± 0.62	26.90 ± 0.73
NP-3	-19.27 ± 0.27	19.08 ± 0.38

FTIR and ¹H-NMR analyses also confirmed the loading IBU into the PCL polymeric network.

CONCLUSION

IBU loaded PNPs were developed successfully with modified nanoprecipitation method. Nanosized, negatively charged PCL based PNPs were characterized with different techniques.

REFERENCES

- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G., et al., Novel approaches to cancer therapy with ibuprofen-loaded EudragitVR RS 100 and/or octadecylamine-modified PLGA nanoparticles by assessment of their effects on apoptosis. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2020. 46(7): p. 1133-1149.
- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G., et al., Synthesis, spectroscopic, thermal properties, in vitro release, and stability studies of ibuprofen-loaded microspheres crosslinked with hexachlorocyclotriphosphazene/octachlorocyclotetraphosphazene, *Polymer Bulletin*, 2021. 78: p. 6221-6250.
- Lozoya-Agullo, I., et al., PLGA nanoparticles are effective to control the colonic release and absorption on ibuprofen. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018. 115: p. 119-125.
- Yurtdaş-Kırımlıoğlu, G., A Systematic Evaluation of Formulation Parameters on the Characteristics of Biodegradable PLGA-Based Nanoparticles for Ophthalmic Application. *Latin American Journal of Pharmacy*, 2019. 38(11): p. 2131-2142.