

**NOKODAZOL YÜKLÜ
KATI LİPİD NANOPARTİKÜLLERİN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Gökhan DİKMEN
Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Şubat, 2012

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gökhan Dikmen'in “Nokodazol Yüklü Katı Lipid Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu” başlıklı İleri Teknolojiler Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 26.01.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Doç. Dr. LÜTFİ GENÇ	
Üye : Prof. Dr. ZEKİ ATKOŞAR	
Üye : Yrd. Doç. Dr. ÖZGÜR ALVER	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Rıdvan SAY

ÖZET
Yüksek Lisans

NOKODAZOL YÜKLÜ KATI LİPİD NANOPARTİKÜLLERİN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Gökhan DİKMEN

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
İleri Teknolojiler Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Lütfi GENÇ
Yardımcı Danışman: Yrd. Doç. Dr. Erol ŞENER
2012, 98 sayfa

Bu çalışma, nokodazol etken maddesinin katı lipid nanopartiküllere yüklenerek, bu KLN formülasyonlarına karakterizasyon çalışmaları yapılarak, KLN'lerin nokodazol maddesine göre daha iyi fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olduğunun gösterilmesine yöneliktir.

Çalışmanın ilk aşamasında YPSK kullanılarak miktar tayini çalışması yapılmış ve KLN formülasyonlarının ve nokodazol'un ilaç salımına bakılmıştır. İkinci aşamada ise, KLN'lerin partikül boyutu ve zeta potansiyelleri ölçülmüş, partikül boyutları TEM görüntüleri ile desteklenmiştir.

Spektroskopik yöntemler kullanılarak KLN içindeki nokodazol maddesinin nasıl durduğuna bakılmış, son olarak da KLN'lerin kararlılık çalışmaları için SK-KS kullanılmıştır. KLN formülasyonlarının kararlılıklarını incelemek için DSC analizi yapılmıştır. Sonuç olarak da, nokodazol yüklü KLN'ler üzerine yapılan karakterizasyon çalışmalarıyla, hazırlanmış olan KLN formülasyonlarının uygun bir taşıyıcı sistem olarak kullanılabileceği kararına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nokodazol, KLN, TEM, Spektroskopik Yöntemler (FT-IR, Raman, NMR Spektroskopisi).

ABSTRACT
Master of Science Thesis

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NOCODAZOL
LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLES**

Gökhan DİKMEN

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Advanced Technologies Program

Supervisor: Doç. Dr. Lütfi GENÇ
Co-Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Erol ŞENER
2012, 98 pages

In this study, nocodazole active compound was loaded to lipid nanoparticles and characterization of SLN formulations was performed.

In the first stage of this study, determination of amount studies was using HPLC and release of the drug was investigated of SLN formulations and nocodazole. Particle size and zeta potential were measured and particle size supported with TEM.

In the second stage, orientation of nocodazole located in the SLN was investigated by spectroscopic methods. After, stability studies of SLN's were investigated by LC-MS. DSC analysis was performed to examine stability of SLN formulations. As a result, we came up with a conclusion, by means of characterization studies on nocodazole loaded SLN that prepared to SLN formulations can be used as a appropriate carrier sistem.

Keywords: Nocodazole, SLN, TEM, Spectroscopic methods (FT-IR, Raman and NMR Spectroscopy).

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, beni yönlendirerek, çalışma alanımla ilgili deneyim kazanmamı sağlayan ve her zaman destek olan ayrıca, tez çalışmam boyunca Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (BİBAM) bünyesindeki imkanlardan faydalanmamı sağlayan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Lütfi GENÇ'e,

Tezimin deneysel ve yazım aşaması boyunca desteğini esirgemeyen ve her zaman bana destek olan, ayrıca tezimin miktar tayini kısmında yardımını esirgemeyen yardımcı danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Erol ŞENER'e,

Tezimin spektroskopik yöntemler kısmında yardımını esirgemeyen ve tüm bilgi ve becerilerini benimle paylaşıp her zaman desteğini hissettiğim Sayın Yrd. Doç. Dr. Özgür ALVER'e,

Her zaman bana destek olan, tüm bilgilerini benimle paylaşan, her zaman desteğini hissettiğim Sayın Doç. Dr. Deniz HÜR'e,

Tezimin yazım aşamasında bana yardımcı olan ve bana her zaman destek olan arkadaşlarım Gamze GÜNEY ve Ersin ESKİLER'e,

Lisansüstü eğitimim boyunca bana moral desteklerini esirgemeyen BİBAM Personeli'ne,

Beni tüm hayatım boyunca destekleyen, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan ve bugün burada olmamı sağlayan Ailem'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Gökhan DİKMEN

Ocak 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
GİRİŞ.....	1
1. Nanopartiküler İlaç Taşıma Sistemleri.....	2
1.1. Nanopartiküller.....	3
1.1.1. Nanopartiküllerin Avantajları.....	5
1.1.2. Nanopartiküllerin Dezavantajları.....	5
1.2. Katı Lipid Nanopartiküller (KLN).....	6
1.2.1. KLN'lerin Avantaj ve Dezavantajları.....	7
1.3. Katı Lipid Nanopartiküllerin Üretim Teknikleri.....	8
1.3.1. Yüksek Basınçlı Homojenizasyon Yöntemi.....	8
1.3.2. Yüksek Hızda Karıştırma ve/veya Ultrasonikasyon Yöntemi.....	10
1.3.3. Çözücü Buharlaştırma-Emülsifikasyon Yöntemi.....	11
1.3.4. Mikroemülsiyon.....	11
1.3.5. Süperkritik Akışkan Metod.....	12
1.3.6. Liyofilizasyon.....	12
1.3.7. Püskürterek Kurutma.....	12
1.4. Katı Lipid Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	13
1.4.1. Etken Madde Yüklenmesi ve Yükleme Kapasitesi.....	13
1.4.2. İlaç Salımı.....	14
1.4.3. Yüzey Özellikleri.....	15
1.4.4. Nanopartiküllerin Kararlılığı.....	15
1.4.5. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli.....	15
1.4.6. KLN ile İlgili Yapılan Çalışmaları.....	17

1.5. Dendrimerler.....	19
1.6. Miseller.....	22
1.7. Lipozomlar.....	24
2. Nokodazol'un Biyokimyasal Yapısı.....	28
2.1. Nokodazol'un Özellikleri.....	28
2.2. Nokodazol'un Kimyasal Yapısı ve Kimyasal Özellikleri.....	29
2.3. Nokodazol ile İlgili Çalışmalar.....	29
GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
1. Gereç.....	32
1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	32
1.2. Kullanılan Cihazlar.....	32
2. Yöntem.....	34
2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) için Optimizasyon ve Validasyon Çalışmaları.....	34
2.1.1. Çözeltilerin Hazırlanması.....	34
2.1.2. Etken Madde Çözeltisinin Hazırlanması.....	35
2.2. Miktar Tayini Metod Validasyonu.....	35
2.2.1. Doğrusallık.....	35
2.2.2. Doğruluk.....	36
2.2.3. Kesinlik.....	36
2.2.4. Seçicilik.....	37
2.2.5. Duyarlılık.....	37
2.2.6. Sağlamlık/Tutarlılık.....	38
2.2.7. Sistem Uygunluk Testi.....	38
2.2.8. Pik Morfolojisi.....	39
2.3. Nokodazol Yüklü KLN Hazırlanması.....	40
2.3.1. KLN'in Hazırlanması.....	40
2.3.2. Nokodazol Yüklü KLN'lerin Karakterizasyonu.....	41

3. BULGULAR	47
3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İçin Optimizasyon Çalışmaları	47
3.1.1. Hareketli Faz Optimizasyonu	47
3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İçin Validasyon Çalışmaları	48
3.2.1. Doğruluk	50
3.2.2. Kesinlik	50
3.2.3. Seçicilik	51
3.2.4. Duyarlılık	52
3.2.5. Sağlamlık/Tutarlılık	53
3.2.6. Sistem Uygunluk Testi	54
3.3. Parçacık Büyüklüğü ve Dağılımı	55
3.4. Zeta Potansiyeli	61
3.5. Etken Madde Yükleme Etkinliği	64
3.6. İlaç Salımının Belirlenmesi	65
3.7. Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi	66
3.8. FT-IR Spektrumu	68
3.9. Raman Spektrumu	69
3.10. NMR Spektrumu	70
3.11. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrumu (SK-KS)	72
3.12. Termal Analiz	74
4. TARTIŞMA	77
KAYNAKLAR	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. KLN hazırlanmasında kullanılan lipidler ve yüzey etkin maddeler.....	7
Çizelge 2.1. Validasyon işlemi sırasında uygulanan çalışma koşulları.....	35
Çizelge 3.1. 6 farklı konsantrasyonda hazırlanan nokodazol çözeltisinin PN oranları.....	49
Çizelge 3.2. Gün-içi ve günler-arası doğrusallık sonuçları.....	49
Çizelge 3.3. Doğruluk çalışması için hazırlanan seriler ve % geri kazanım sonuçları.....	50
Çizelge 3.4. Gün-içi doğruluk ve kesinlik sonuçları.....	50
Çizelge 3.5. Günler-arası doğruluk ve kesinlik sonuçları.....	51
Çizelge 3.6. YPSK cihazının parça, marka ve modelleri.....	55
Çizelge 3.7. Sistem uygunluk testi parametreleri Askorbik asit uygulanan.....	55
Çizelge 3.8. Nokodazol'ün, boş KLN'nin ve nokodazol yüklü KLN'lerin 0.günde farklı sıcaklıklardaki partikül boyutlarının ve polidispers indislerinin gösterilmesi.....	57
Çizelge 3.9. Nokodazol'ün, boş KLN'nin ve nokodazol yüklü KLN'lerin 30.günde farklı sıcaklıklardaki partikül boyutlarının ve polidispers indislerinin gösterilmesi.....	58
Çizelge 3.10. Nokodazol'ün, boş KLN'nin ve nokodazol yüklü KLN'lerin 90.günde farklı sıcaklıklardaki partikül boyutlarının ve polidispers indislerinin gösterilmesi.....	58
Çizelge 3.11. Boş KLN'lerin ve nokodazol yüklü KLN'lerin 0.günde farklı sıcaklıklardaki zeta potansiyel değerlerinin ve iletkenlik değerlerinin gösterilmesi.....	61

Çizelge 3.12. Boş KLN'lerin ve nokodazol yüklü KLN'lerin 30.günde farklı sıcaklıklardaki zeta potansiyel değerlerinin ve iletkenlik değerlerinin gösterilmesi.....	61
Çizelge 3.13. Boş KLN'lerin ve nokodazol yüklü KLN'lerin 90.günde farklı sıcaklıklardaki zeta potansiyel değerlerinin ve iletkenlik değerlerinin gösterilmesi.....	62
Çizelge 3.14. Nokodazol ve nokodazolyüklü KLN formülasyonlarının erime, donma sıcaklık ve ısı değerlerinin gösterilmesi.....	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Nanoküre ve Nanokapsül Şekillerinin Karşılaştırılması.....	4
Şekil 1.2. Sıcak ve Soğuk Homojenizasyonun Şekilsel Gösterimi.....	10
Şekil 1.3. KLN’lerde görülen etken madde yükleme modelleri.....	14
Şekil 1.4. Zeta Potansiyel’in Şekilsel Gösterilmesi.....	16
Şekil 1.5. Dendrimer’in Temel Yapısı.....	20
Şekil 1.6. Yakınsak ve ıraksak metodun şekilsel karşılaştırılması	21
Şekil 1.7. Misellerin oluşum şeması.....	22
Şekil 1.8. Lipozom yapısının şematik olarak gösterilmesi	25
Şekil 1.9. Lipozom çeşitlerinin gösterilmesi	27
Şekil 1.10. Nokodazol’ün açık kimyasal yapısı	29
Şekil 2.1. KLN’lerin hazırlanmasının şematik olarak gösterilmesi grafiği.....	40
Şekil 3.1. Tampon çözeltisinin molarite seçimi	47
Şekil 3.2. Tampon çözeltisinin pH seçimi	48
Şekil 3.3. Nokodazol’ün doğrusallık grafiği.....	49
Şekil 3.4. BoşKLN faz kromotogramı.....	51
Şekil 3.5. İç standart madde kromotogramı.....	51
Şekil 3.6. Nokodazol kromotogramı.....	52
Şekil 3.7. İç standart madde ve nokodazol kromotogramı.....	52
Şekil 3.8. Nokodazol yüklü KLN’lerin 0., 30. ve 90.günlerde farklı sıcaklıklardaki partikül boyutlarının grafiksel olarak gösterilmesi.....	59
Şekil 3.9. Boş KLN’lerin 0., 30. ve 90.günlerde farklı sıcaklıklardaki partikül boyutlarının grafiksel olarak gösterilmesi.....	59

Şekil 3.10. Boş KLN'lerin 0., 30. ve 90.günlerde farklı sıcaklıklardaki polidispers indekslerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	60
Şekil 3.11. Nokodazol yüklü KLN'lerin 0., 30. ve 90.günlerde farklı sıcaklıklardaki polidispers indekslerinin grafiksel olarak gösterilmesi	60
Şekil 3.12. Nokodazol yüklü KLN'lerin 0., 30. ve 90.günlerde farklı sıcaklıklardaki zeta potansiyellerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	63
Şekil 3.13. Boş KLN'lerin 0., 30. ve 90.günlerde farklı sıcaklıklardaki zeta potansiyel değerlerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	63
Şekil 3.14. Boş KLN'lerin 0., 30. ve 90.günlerde farklı sıcaklıklardaki elektriksel iletkenlik değerlerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	64
Şekil 3.15. Nokodazol yüklü KLN'lerin 0., 30. ve 90.günlerde farklı sıcaklıklardaki elektriksel iletkenlik değerlerinin grafiksel olarak gösterilmesi.....	64
Şekil 3.16. Nokodazol'ün zamana bağlı salım grafiği.....	65
Şekil 3.17. Nokodazol yüklü KLN'lerin zamana bağlı salım grafiği.....	66
Şekil 3.18. a,b)Nokodazol yüklü KLN'lerin TEM görüntüleri, c,d) Nokodazol'ün TEM görüntüleri.....	67
Şekil 3.19. Boş KLN'lerin FT-IR spektrumları.....	68
Şekil 3.20. Nokodazol yüklü KLN'lerin FT-IR spektrumları.....	69
Şekil 3.21. Nokodazol'ün FT-IR spektrumu.....	69
Şekil 3.22. Nokodazol yüklü KLN formülasyonlarının raman spektrumu.....	70
Şekil 3.23. Boş KLN formülasyonlarının raman spektrumu.....	70
Şekil 3.24. Nokodazol yüklü KLN'lerin NMR Spektrumu.....	71
Şekil 3.25. Boş KLN'lerin NMR spektrumu.....	71
Şekil 3.26. 4°C'de bekletilen KLN formülasyonlarının SV-KS spektrumu.....	72

Şekil 3.27. 25°C’de bekletilen KLN formülasyonlarının SV-KS spektrumu.....	73
Şekil 3.28. 40°C’de bekletilen KLN formülasyonlarının SV-KS spektrumu.....	73
Şekil 3.29. Nokodazol’ün SV-KS spektrumu.....	74
Şekil 3.30. Nokodazol ve nokodazol içeren katı lipid nanopartikül formülasyonlarının termal analizi.....	75

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AFM	: Atomik kuvvet mikroskopisi
BSS	: Bağlı Standart Sapma
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EPR	: Gelişmiş Tutma Etkisi
E.M.	: Etken Madde
FKS	: Foton Korelasyon Spektroskopisi
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi
İS	: İç Standart Madde
KBr	: Potasyum Bromür
KLN	: Katı Lipid Nanoparikül
LD	: Lazer kırınımı
LOD	: Belirleme Sınırı
LOQ	: Saptama Sınırı
MeOH	: Metanol
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
NP	: Nanopartikül
PAMAM	: Poliamidoamin
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PEG	: Polietilen Glikol
SH	: Standart Hata
SK-KS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskopi
YEM	: Yüzey Etken Madde
YPSK	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre

GİRİŞ

Nanopartiküler ilaç taşıma sistemleri, 1000 nm altında biyomolekül ya da etken maddeleri hedeflenen bölgeye taşıyabilen, bu bölgede arzu edilen zaman da kontrollü salım yapabilen ve yüklenen moleküllerin çeşitli morfolojik özelliklerini değiştiren nanoboyutlu taşıyıcı sistemlerdir. İlaç taşıma sistemleri lipozom, misel, dendrimer, katı lipid nanopartikül (KLN) gibi birbirinden farklı bir çok sistemden oluşur (Liu ve ark., 2008; Buyukozturk ve ark., 2010).

KLN, 50 ile 1000 nm arasında boyuta sahip ve oda sıcaklığında katı durumda lipitten oluşan, yüzeyinde tek tabaka halinde fosfolipitten ve hidrofobik bir çekirdekten oluşan, diğer ilaç taşıma sistemlerinin bütün avantajlarına sahip fakat hiçbir dezavantajını taşımayan, su ya da sulu çözeltilerde disperse olan, fiziksel olarak kararlı yapıya sahip katı kolloidal ilaç taşıyıcılarıdır. Bu sistemin üstünlükleri arasında, kolloidal büyüklükte olmaları, biyolojik olarak geçirimli olmaları, üretimi için gerekli olan aletlerin kolay olması, endüstriyel boyutta üretim yapılabilmesi, yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olmaları, toksik kalıntılara sahip olmamaları gibi özellikler sayılabilir (Charcosset ve ark., 2005; Kheradmandnia ve ark., 2010; Pal ve Nayak, 2010; Irache ve ark., 2011).

Bir çok yöntem yardımıyla KLN üretimi yapılabilmektedir. Fakat üretimden sonra yapılan karakterizasyon çalışmaları ile hazırlanan KLN formülasyonlarının gerekli olan özellikleri taşıyıp taşımadığı görülebilmektedir. Bu yüzden KLN formülasyonları hazırlandıktan sonra ilk olarak zeta potansiyeli ve partikül boyutu ölçülerek, daha sonra da ilaç yükleme kapasitesi, ilaç salımı gibi birden fazla karakterizasyon çalışmaları yapılarak uygun KLN formülasyonunun hazırlanıp hazırlanmadığına bakılmalıdır (Schwarz ve Mehnert, 1999; Mehnert ve Mader, 2001).

Nokodazol, oldukça düşük konsantrasyonlarda bile polimerizasyon kinetiği ve yüksek afiniteyle beta-tubuline bağlanabilen, sentromerler'in morfolojilerini ve kromozomlar üzerinde bulunan mikrotubulleri değiştirebilen bir anojendir (Shen ve ark., 2005).

Bu çalışmada; antikanserojen bir ilaç olan nokodazol, sıcak homojenizasyon yöntemi ile KLN'ler içine yüklenmiştir. Daha sonra üretilen KLN formülasyonlarının, zeta potansiyeli ve partikül boyutu ölçülmüş, yüzey

özelliklerinin belirlenmesi için TEM kullanılmıştır. Ayrıca NMR, FT-IR ve Raman spektroskopileri kullanarak etken maddenin yağ ile nasıl kaplandığına bakılmış, optimizasyonu ve validasyonu gösterilmiş bir YPSK analizi kullanılarak ilaç salımı ve ilaç yükleme kapasitesine bakılmış ve son olarak da SK-KS kullanılarak farklı sıcaklıklarda bekletilen KLN formülasyonlarının kararlılık çalışması yapılmıştır.

1. Nanopartiküler İlaç Taşıma Sistemleri

Nanoteknoloji, nanometre ölçeğindeki malzemelerin tasarımı, üretimi, montajı, karakterizasyonu ve bu malzemelerden elde edilmiş fonksiyonel sistemlerin uygulanmasını inceleyen ve disiplinler arası araştırma geliştirme faaliyetlerinin tümünü temsil eden, 1-1000 nm boyutlarındaki maddelerin dizayn edilmesini, kontrol edilmesini ve atomsal seviyede değiştirilip işlevsel hale getirilmesini sağlayan bilim dalıdır (Linazasoro, 2008; Sahoo ve ark., 2007; Jain ve ark., 2011; Duncan, 2011).

Nanoteknoloji, eczacılık teknolojisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Diğer disiplinlere göre ilaç teknolojisi nanoteknoloji ile daha erken tanışmıştır. İlaç etken maddelerinin çeşitliliğinin artmasıyla birlikte bu etken maddelerin yan etkilerin azaltılması hasta uyumunun ve biyoyararlanımın artırılması amacıyla farklı farklı ilaç taşıyıcı sistemler (nanoküre, nanokapsül, lipozom, mikrokapsül, nanosünger, nanopartikül, mikroemülsiyon gibi) geliştirilmiştir (Oyewumi, 2009).

Kısa biyolojik yarı ömre, zayıf kararlılığa ve çözünürlüğe, ciddi yan etkilere sahip olan biyofarmasotiklerin kullanımı ilaç taşıma sistemlerine olan ilginin artmasına yol açmıştır. Nanoboyutlu ilaç taşıma sistemleri bu dezavantajları ortadan kaldırmak için geliştirilmiştir (Sitterberg ve ark., 2010).

Yeni moleküllerin güvenlik ve etkinliğini artırmak, yan ve istenmeyen etkileri azaltıp, biyoyararlanım ve terapötik etkiyi artırmak ilaç taşıyıcı sistemler üzerinde çalışma nedenlerinin başında gelmektedir (Kaş, 2002). Nanopartiküler ilaç taşıma sistemleri, 1000 nm altında biyomolekül ya da etken maddeleri hedeflenen bölgeye taşıyabilen, bu bölgede arzu edilen zaman da kontrollü salım yapabilen ve yüklenen moleküllerin çeşitli morfolojik özelliklerini değiştiren nanoboyutlu taşıyıcı sistemlerdir (Liu ve ark., 2008; Buyukozturk ve ark., 2010).

İlaç taşıma sistemlerine onlarca veya yüzlerce etken madde (e.m.) yüklenebilir. İlaç taşıma sistemlerine genelde polyester, polianhidritler, poliaminoasitler gibi biyoyumlu moleküller yüklenebilmektedir. Fakat son zamanlarda silika, karbon materyaller gibi inorganik moleküllerde yüklenebilmektedir (Jeong ve ark., 1999; Lin ve ark., 2010).

Nanopartiküler (NP) ilaç taşıma sistemleri, konvensiyonel dozaj formlarına göre birçok avantaja sahiptir. Bunlar, azaltılmış toksisite, geliştirilmiş biyoparçalanabilirlik ve hastalıklı dokuya hedeflenebilirlik, iyi terapötik etkidir (Chakraborty ve ark., 2009; Attama ve ark., 2011).

İlaç geliştirme sistemlerinin en önemli özelliği; e.m.'nin hedef bölgeye gitmesi ve gönderilen hedef bölgede kontrollü salım yapabilmesidir. Bunun dışında; esneklik, fiziksel durum, şekil, boyut, yüzey özellikleri gibi fiziksel özelliklere de sahiptir (Pillai ve Panchagnula, 2001).

NP ilaç taşıma sistemleri, polimerik nanopartikül, katı lipid nanopartikül, lipozom, yüzey ya da yağ modifiyeli hidrojel gibi sistemleridir. İlaç taşıma sistemlerinin yüzey modifiyelerinin araştırılması, nano boyuttaki yapıların fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak daha iyi anlaşılmasını sağlar. Bunun için; yüzey yüklerinin, polidisperslik indekslerinin, partikül boyutunun ve zeta potansiyelinin ölçülmesi, kararlılık, ilaç salımı ve yükleme kapasitesi gibi fizikokimyasal özellikler incelenmektedir (Sitterberg ve ark., 2010; Sahoo ve ark., 2008).

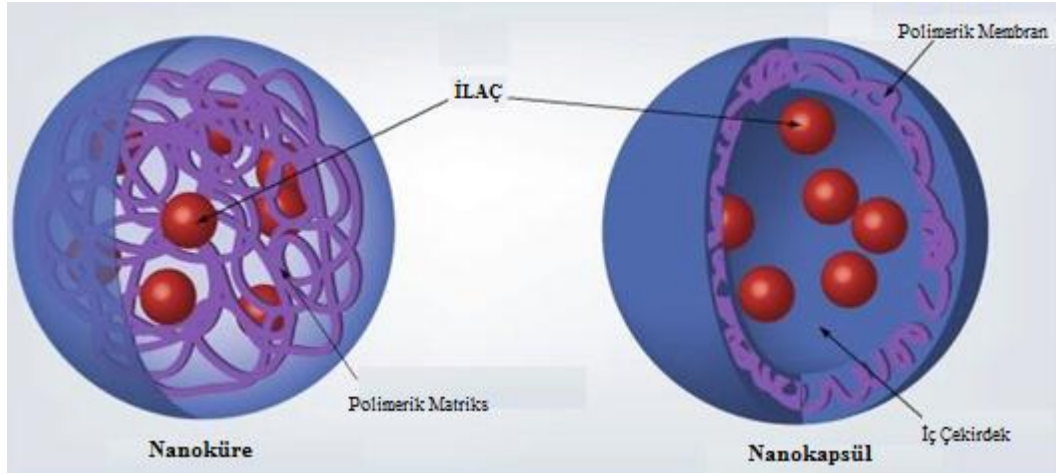
1.1. Nanopartiküller

NP, 100 nm ile 1000 nm arasında boyuttaki makromoleküler maddeleri içeren küçük boyuta sahip, zayıf çözünen ilaçların alımını kolaylaştıran, ilacı hedeflendirilebilen ve ilaç biyoyumluluğunu sağlayan katı polimerik kolloidal sistemdir (Wu ve ark., 2005; Cai ve ark., 2008; Rao ve Geckeler, 2011). NP hazırlama yöntemlerine, kullanılan lipitlere, enkapsüle edilmiş terapötik ajanlara, salım hızına ve diğer özelliklere bağlı olarak nanokürecikler ya da nanokapsüller elde edilebilir (Gou ve ark., 2008).

Nanoküre, polialkilsiyanoakrilat veya polilaktidler gibi farklı polimerler kullanılarak partiküller hazırlandıktan sonra matriks sistem içine ilacın fiziksel

olarak ve eşit şekilde dağıtılmasıyla elde edilen matriks sistemlerdir. Fosfotidil kolin gibi yağlar kullanılarak katı lipid nanoküreler hazırlanabilir (Reis, 2006; Abdelwahed ve ark., 2006).

Nanokapsüller ise ilaç içeren sulu veya yağlı çekirdeğe sahip olan 1µm' den daha küçük çapa sahip ultra ince veziküler sistemlerdir. İlaç tek bir polimer membranla çevrilerek sınırlandırılır (Şekil 1.1) (Abdelwahed ve ark., 2006; Reis, 2006; Jing ve ark., 2011).



Şekil 1.1. Nanoküre ve Nanokapsül Şekillerinin Karşılaştırılması

NP'in tercih edilmesinde temel amaç, taşıma sistemleri olarak partikül boyutunu ve yüzey özelliklerini kontrol edebilmesidir.

Partikül boyutu büyük olan moleküller nanopartiküler sistemlere yüklendiğinde veya boyutu nanometre boyutuna getirildiğinde maddenin erime-kaynama noktası, suda çözünürlüğü gibi kimyasal özellikleri, partikül boyutu, yüzey özellikleri, yüzey alanı gibi fiziksel özellikleri, ışığı kırma, ışıkla etkileşme, ışık dağıtma gibi optik özellikleri, elektriksel yük, elektrik alanından etkilenme gibi elektriksel özellikleri, manyetik alanda yönelmesi, hareketi ve manyetik alandaki hareketleri gibi manyetik özellikleri değiştirilebilmektedir (Eliana ve ark., 2007; Gupta, 2006).

1.1.1. Nanopartiküllerin Avantajları

İlaç geliştirme sistemi olarak NP'in kullanımının avantajları şöyle sıralanabilir (Li ve ark., 2007; Iannonea ve ark., 2010; Saraf, 2010; Dahan ve Hoffman, 2008; Parveen ve ark., 2011; Wu ve ark., 2011; Chakraborty ve ark., 2009; Liu, ve ark., 2008; Porter ve ark., 2008);

- Sonikasyon ve çalkalama gibi olayları gereksiz hale getirme,
- Matrikste eşsiz ilaç dağılımı sağlayabilmesi,
- Artık yüzey etken maddeden kurtulabilme,
- Uygun ve kolayca ölçeklenebilme,
- Küçük boyuta sahip olduklarından dolayı küçük kılcallardan geçerek hedeflenen bölgeye gidebilirler,
- NP'in partikül boyutu ve yüzey karakterizasyonları hem pasif hem de aktif hedeflemeyi sağlamak için kolaylıkla manipüle edilebilir.
- İstenilen oranda ilaç salımı yapabilirler,
- Yan etkileri ve toksisitesi azaltılmıştır,
- pH ve sıcaklık gibi etkilere iyi yanıt verirler,
- Kontrollü salım yapabilirler
- Herhangi bir kimyasal reaksiyona gerek olmadan nanopartikül içine ilaç yüklenebilir,
- Bu sistemler oküler, paranteral, nazal, oral dahil olmak üzere çeşitli şekilde verilebilirler.

1.1.2. Nanopartiküllerin Dezavantajları

NP'in sınırlamaları; küçük boyuta ve büyük yüzey alanına sahip olduklarından dolayı (Park, 2007; Rong ve ark., 2003);

- Partikül toplanmasına,
- Sınırlı ilaç yüklenmesine,
- Yüklenen ilacın çabuk salınmasına sebep olabilirler.

Yeni ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesi bir önceki taşıma sisteminin dezavantajlarını ortadan kaldırmış fakat daha değişik dezavantajların ortaya

ıkmasına neden olmuştur. Buna rağmen ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesiyle hedeflenebilirliğin, salım yapma süresinin ve etkinliğin artması gibi birçok avantaj ortaya çıkmıştır. İlaç geliştirme sistemlerindeki en büyük sorun suda çözünemeyen moleküllerin yüklenememesidir. Bu sorunu ortadan kaldırmak için lipozomlar, dendrimerler, polimerik miseller ve KLN geliştirilmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır (Kaş, 2002).

1.2. Katı Lipid Nanopartiküller (KLN)

KLN, 19. y.y.'da Müller tarafından geliştirilen son yıllarda geleneksel taşıyıcı sistemlere (emülsiyon, lipozom ve polimerik nanopartiküller) alternatif olarak kullanılan, 50 ile 1000 nm arasında boyuta sahip ve oda sıcaklığında katı durumda lipidden oluşan, yüzeyinde tek tabaka halinde fosfolipidden ve hidrofobik bir çekirdekten oluşan, diğerk ilaç taşıma sistemlerinin avantajlarını birleştiren, su ya da sulu çözeltilerde disperse olan, fiziksel olarak kararlı yapıya sahip katı kolloidal ilaç taşıyıcılardır (Charcosset ve ark., 2005; Kheradmandnia ve ark., 2010; Pal ve Nayak, 2010; Irache ve ark., 2011).

KLN'ler oda ve vücut sıcaklığında katı halde bulunan lipitlerle hazırlanır. Oda sıcaklığında katı olan lipitler taşıyıcı matris olarak kullanılır (Shegokar ve ark., 2010; Müller ve Keck, 2004). KLN katı lipid, emülsifan ve su/çözücüden oluşur. Lipitler trigliserit, gliserit, yağ asidi ve steroid olabilir. Çeşitli emülsifanlar ve çözücüler lipit dağılımını stabil etmek için kullanılır. 50–100 nm aralığında parçacık boyutu dağılımına sahip olan kolloidal yapılu bu sistemler, hidrofilik, hidrofobik veya suda çözünmeyen e.m.'nin ile vücutla uyumlu ve vücutta metabolize olabilen katı lipitlerin sudaki dispersiyonlarından oluşmaktadır (Lippacher ve ark., 2001; Ocheke ve ark., 2009; Padois ve ark., 2011; Mukherjee ve ark., 2009).

KLN üretiminde bir çok yüzey aktif madde kullanılabilir (izelge 1.1). Fakat yüzey etken madde (YEM) seçiminin, sistemin veriliş yoluna ve üretim metoduna bağlı olduğu ve parenteral yol için sınırlı olduğu belirtilmektedir (Bunjes, 2011; Serpe ve ark., 2004; Mehnert ve Mader, 2001).

LİPİTLER	YÜZEY AKTİF MADDELER
Trigliseritler Trilaurin, Trikaprin, Trimiristin, Tristearin vb Hidrojenize ko-gliseritler (Softisan® 142) Katı yağlar Witepsoller (W35, H35, H42, E85) Gliseril monostearat (Imwitor® 900) Gliseril behenat (Compritol® 888 ATO) Gliseril palmitostearat (Precirol® ATO 5) Stearik asit, Palmitik asit, Behenik asit	Lesitinler Soya yağı lesitini (Lipoid® S 75, S 100) Yumurta Lesitini (Lipoid® E 80) Polisorbat (Tween® 20, 60, 80) Fosfatidil kolin (Epikuron® 170, 200) Poloksamerler (Poloxamer® 188, 182, 407) Diğerleri Sodyum Kolat, Butanol, Butirik asit Taurokolik asit sodyum tuzu

Çizelge 1.1. KLN hazırlanmasında kullanılan lipitler ve yüzey etkin maddeler (Mehnert ve Mader, 2001).

1.2.1. KLN'lerin Avantaj ve Dezavantajları

KLN'ler diğer ilaç taşıma sistemlerinin avantajlarını taşımakta, dezavantajlarını taşımamaktadır. Bu özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmektedir. KLN'lerin avantajları (Esposito ve ark., 2008; Bondi ve ark., 2003; Brioschive ve ark., 2008; Jennings ve ark., 2000; Delgado ve ark., 2011; Seetapan ve ark., 2010; Subedive ve ark., 2009; Gualbert ve ark., 2004; Kamboj ve ark., 2010);

- Küçük boyuta sahip olması,
- Biyouyumlu olması,
- Kontrollü ilaç salabilmesi,
- Yüzey modifikasyonu ile özel bölgelere e.m. taşıyabilmesi,
- Kimyasal bozunmalara karşı e.m.'yi koruyabilmesi,
- Toksik metabolit üretmemesi,
- Endüstriyel boyutta kolay üretilebilme ve üretim maliyetinin düşük olması,
- E. m.'nin yan etkilerini azaltma veya tamamen ortadan kaldırması,
- Üretiminde özel bir çözücüye gerek olmaması,
- Sterilize edilebilmesi,
- Püskürterek kurutulabilme ve toz formunda dondurulabilmesi,
- Liyofilik ve lipofilik e.m.'leri yükleyebilmesi,

- Hapsedilmiş e.m.'lerin salım kinetiğini daha iyi kontrol edilebilmesi,
- Oral, dermal, rektal, transdermal,vs. gibi yollarla verilebilmesi.

KLN'lerin dezavantajları (Mukherjee ve ark., 2009; Vighi ve ark., 2010; Jores ve ark., 2003; Irache ve ark., 2011);

- Nispeten düşük e.m. yükleme kapasitesine sahip olması,
- Düşük birleşme oranına sahip olması,
- Fiziksel olarak stabil olmaması,
- Ortamda farklı kolloidal yapılar bulunması,
- KLN dispersiyonlarının su içeriği (%70-99,9) yüksek olması,
- Saklanması sırasında görülebilen polimorfik geçişler nedeniyle, etken madde taşıyıcıdan hızla dışarı salınabilmesi,
- Çökme eğiliminde olmaları olarak özetlenebilir.

1.3. Katı Lipid Nanopartiküllerin Üretim Teknikleri

1.3.1. Yüksek Basınçlı Homojenizasyon Yöntemi

Yüksek basınçlı homojenizasyonun, 1950'lerden beri geniş ölçekli KLN üretimde kullanılan güvenilir en etkili tekniktir. Bu teknikte, yüksek basınçlı homojenizatörler, sıvıyı 100-2000 bar'lık yüksek bir basınçla birkaç μm aralığındaki dar bir delikten geçirirler. Burada sisteme uygulanan sıvı kısa bir mesafede yaklaşık 100 km.sn^{-1} 'lik hıza ulaşır. Oluşan kayma gerilimi ve uygulanan kuvvet sayesinde partikül büyüklüğü nanometre boyutuna düşer. Bu yöntemde sıcak homojenizasyon ve soğuk homojenizasyon uygulanır (Silve ve ark., 2011; Li ve ark., 2008; Müller ve ark., 2002; Lippacher ve ark., 2001; Sharma A. ve ark 2010; Müller ve ark., 2000).

i) Sıcak Homojenizasyon Yöntemi: Temel olarak, suda çözünmeyen, lipofilik ve sıcaklığa dayanıklı olan maddeler için uygun bir yöntemdir. Lipit, erime derecesinin yaklaşık 5°C – 10°C üzerine ısıtılır. E.m. bu eriyikte çözündürülür veya dağıtılır. Daha sonra aynı sıcaklığa kadar ısıtılmış YEM içeren sulu faz da yüksek hızda karıştırma ile disperse edilir. Böylece ön emülsiyon elde edilir. Hazırlanan ön emülsiyon yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilerek homojenize edilir ve

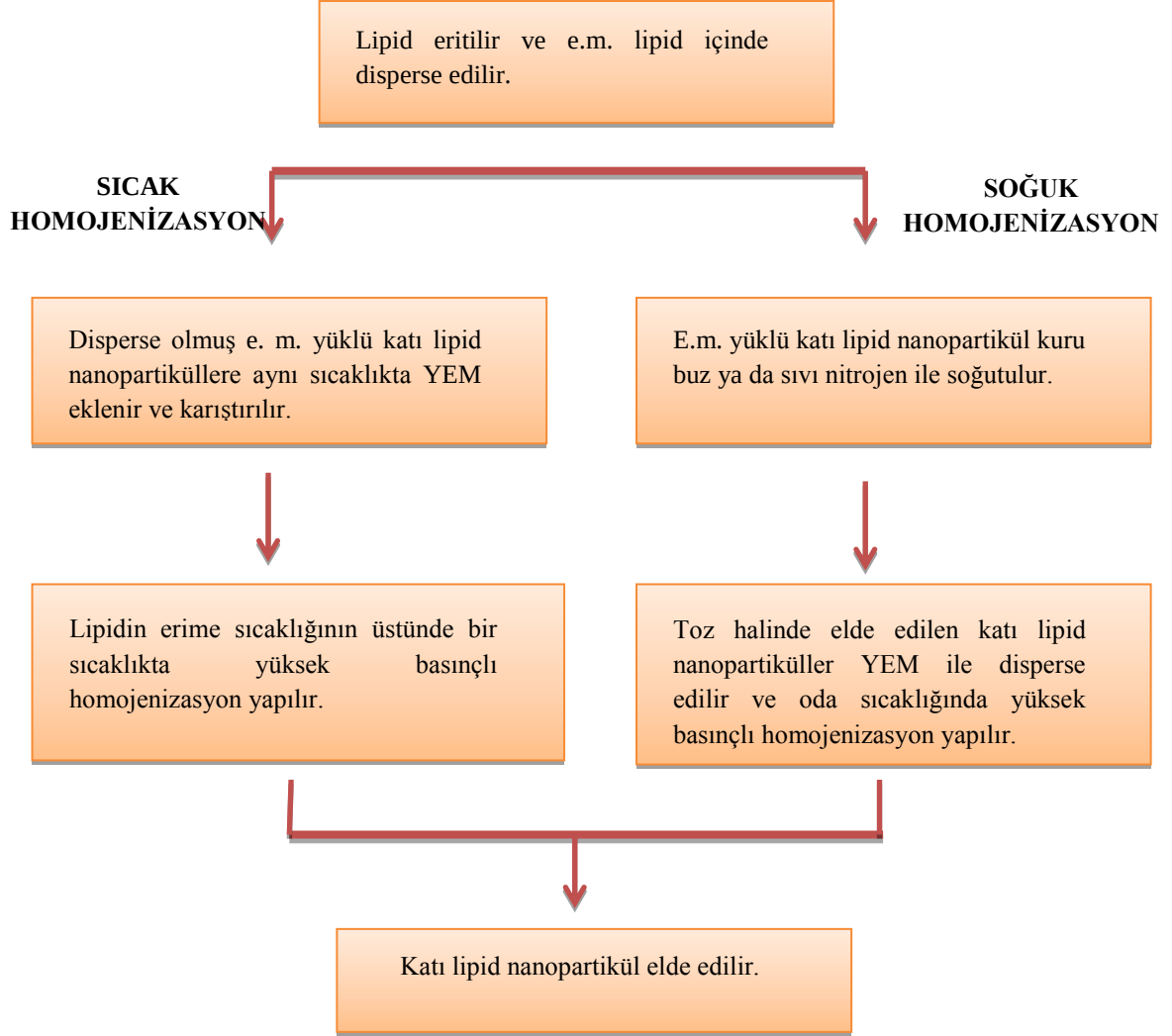
oda sıcaklığına kadar soğutulur. Oda sıcaklığına geldiğinde lipit kristallenir ve KLN elde edilmiş olur. Homojenizasyon tekniğinde, basınç ayarlanarak veya istenilen sayıda homojenizasyon gerçekleştirilerek üretim yapmak mümkündür (Alhaj ve ark., 2008; Kamble ve ark. 2010; Sharma ve ark 2010).

Homojenizasyon basıncını ya da devir sayısını artmasıyla parçacıklar daha fazla hız kazanır. Partiküllerin hızının artması kinetik enerjilerinin artmasına sebep olur. Yüksek kinetik enerjiden dolayı da partikül birleşmeleri artar. Bu yüzden de partikül büyüklüğü artar. Yapılan çalışmalarda, 3-5 homojenizasyon sayısı ile 500-1500 bar basınç kullanılmasının KLN hazırlanmasında etkili bir yöntem olduğunu görülmüştür. Sıcak homojenizasyon tekniği yüksek sıcaklığa maruz kalınan sürenin çok kısa olması nedeniyle ısıya duyarlı maddelere de uygulanabilir. Yüksek sıcaklığa çok duyarlı olan maddeler ile hidrofilik maddeler soğuk homojenizasyon yöntemiyle hazırlanırlar (Kaş, 2002; Müller ve ark., 2000; Suresh ve ark., 2007; Mukherjee ve ark. 2009).

ii) Soğuk Homojenizasyon Yöntemi: E.m.'nin sıcaklığa bağlı olarak bozulması veya farklı ürüne dönüşmesi, homojenizasyon boyunca sulu fazda dağılı kalması ve de nanoemülsiyon kristallendirme aşamasının karmaşık ve zor olması nedeniyle soğuk homojenizasyon yöntemi kullanılmaktadır (Kaş ve Eldem, 2002).

Hidrofilik e.m.'ler için sıcak homojenizasyon tekniği uygun bir yöntem değildir. Bu yöntemin ilk aşaması sıcak homojenizasyondaki aşamaya benzer, lipit eritilir ve e. m.'nin erimiş lipidde çözünmesi sağlanır. Fakat diğer aşamalar farklıdır. Sıvı lipid içinde çözünmüş olan e.m. kuru buz veya sıvı nitrojen yardımıyla ani bir şekilde soğutulur. Bu ani soğutma, lipit matriste e. m.'nin homojen dağılmasına ve lipitin kırılabilirliğinin artmasına neden olur. Soğutularak katı hale gelen karışım öğütücü havanda öğütülerek, 50–100 µm arasında toz lipitten oluşan parçacıklar elde edilir. Toz ürün, sulu YEM çözeltisinde dağıtıldıktan sonra lipitin erime noktasının 5–10°C altında, oda sıcaklığında veya oda sıcaklığı altında homojenize edilir. Bu sayede KLN elde edilmiş olur (Şekil 1.2). Soğuk homojenizasyon tekniği sıcak homojenizasyon ile karşılaştırıldığında, daha büyük partikül boyutu ve daha dar boyut dağılımına sahiptir (Parhi ve

Suresh, 2010; Sharma ve ark 2010; Müller ve ark., 2000; Müller ve ark., 2002; Mukherjee ve ark. 2009).



Şekil 1.2. Soğuk ve sıcak homojenizasyonun şekilsel gösterimi

1.3.2. Yüksek Hızda Karıştırma ve / veya Ultrasonikasyon Yöntemi

Her iki yöntem de, yaygın olarak kullanılan ve basit yöntemlerdir. Genellikle bu yöntemler bir arada kullanılmakta ve belli bir süre boyunca yüksek sıcaklıklarda uygulanmaktadır. Yöntemin esası, lipidin erime derecesinden 5-10°C daha yüksek sıcaklıkta erimiş lipid ve etken maddenin karıştırılması daha sonra yüksek karıştırma hızıyla aynı sıcaklıktaki YEM'nin karıştırılması esasına

dayanır. Daha sonra sisteme ultrasonikasyon uygulanır. Bu işlemde soğuma sırasında partiküllerin birleşmesini engellemektedir.

Bu yöntemin bir dezavantajı, geniş partikül büyüklüğü dağılımına sahip ürünler oluşturmastır. Bu durumda saklama sırasında partiküllerin birleşerek büyümesi gibi fiziksel kararlılık problemler ortaya çıkar. Ultrasonikasyon yönteminde metal kontaminasyonu gibi dezavantajlar da göz önünde bulundurulmalıdır (Sailaja ve ark. 2011; Mukherjee ve ark. 2009; Numanoglu ve Tarımcı, 2006; Kamboj ve ark., 2010).

1.3.3.Çözücü Buharlaştırma- Emülsifikasyon Yöntemi

Lipid, su ile karışmayan organik bir çözücünde (toluen, kloroform, vb.) çözülür. Isıya ihtiyaç duymadan çözücü vakum altında buharlaştırılır ve lipid nanopartikülleri çöker. Hazırlama sırasında ısı uygulanmaması, yüksek sıcaklıkta bozulan e.m.'lerin yüklenmesi için bir avantajdır. Yöntemin dezavantajı ise, organik çözücü kullanımının gerekmesidir. Bu yöntem ile elde edilen ürünün ortalama partikül büyüklüğü, organik fazdaki lipidin konsantrasyonuna bağlıdır (Kamboj ve ark. 2010; Sailaja ve ark. 2011; Delgado, 2011; Mehnert ve ark., 2001).

1.3.4.Mikroemülsiyon

Mikroemülsiyonların dilüsyonuna dayanan bu yöntemde, lipit (yağ asitleri veya gliseridler) eritilir, su, emülgatör ve yardımcı emülgatör karışımı, lipitle aynı sıcaklıkta olacak şekilde ısıtılır ve erimiş lipide eklenerek karıştırılır. Oluşan mikroemülsiyon, özel olarak geliştirilen termostatl bir şırınga kullanılarak, aşırı miktardaki soğuk su (2–3 °C) içinde mekanik bir karıştırma ile disperse edilir. Fazla su, ultrafiltrasyon veya liyofilizasyon ile sistemden uzaklaştırılır. Mikroemülsiyonun oluşumunda sıcaklık ve pH önemlidir. Bu teknikte KLN dispersiyonundaki lipit içeriği azalır (Parhi ve Suresh P., 2010; Hu ve ark., 2002; Kheradmandnia ve ark., 2010; Kamboj ve ark., 2010).

1.3.5.Süperkritik Akışkan Metod

Az kullanılan bu yöntem, çözücü kullanımından kaçınma, nanopartikülleri süspanse elde etmek yerine kuru toz halinde elde etme, yumuşak basınç ve sıcaklık koşulları gibi bazı avantajlara sahiptir. CO₂, yanıcı olmaması, ucuz olması, sistemden kolayca uzaklaştırılması, kritik sıcaklığının ve basıncının düşük olması gibi özelliklerinden dolayı bu yöntem için karbon dioksit solüsyonu iyi bir seçenektir (Kamble ve ark. 2010; Kamboj ve ark., 2010; Mehnert ve ark., 2001; Parhi ve Suresh, 2010).

1.3.6.Liyofilizasyon

Liyofilizasyon, KLN'nin uzun süreli fiziksel ve kimyasal stabilitesini artırmak için umut vadeden bir yoldur. Katı forma dönüşüm, partikül büyümesini ve hidroliz reaksiyonlarını önlemektedir. Pahalı ve zor olmasına rağmen çok az agregasyona neden olduğu için oldukça sık tercih edilmektedir. KLN'lerin liyofilizasyon sırasındaki agregasyonunu azaltmak, dolayısıyla partikül büyüklüğü artışını önlemek ve kuru ürünün daha iyi bir redispersiyonunu sağlamak için, dondurma işlemi koruyucuları eklenmesi gerekmektedir (Numanoğlu ve Tarımcı, 2006; Gupta, 2006).

1.3.7.Püskürterek Kurutma

Püskürterek kurutma, sulu halde bulunan KLN'i kuru bir ürüne çevirmek için, liyofilizasyona alternatif olarak kullanılan bir yöntemdir. Liyofilizasyona göre daha ucuz bir yöntem olmasına rağmen, KLN için nadir olarak kullanılmıştır. Bunun nedeni; yüksek sıcaklık, kayma kuvveti ve partiküllerin kısmi erimesi nedeniyle partikül agregasyonuna neden olabilmesidir. Yüksek sıcaklıklar ve kayma kuvvetleri, kinetik enerjiyi artırmakta ve bunun sonucunda partiküllerin çarpışma sıklığı artmaktadır. Partiküllerin çarpışması, emülgatör filminde kısmi hasara neden olabilmektedir. Böylece, partiküllerin agregasyon eğilimi artmaktadır. KLN'in sıvı halden kuru toz haline dönüştürülmesi oldukça faydalı olmaktadır. Çünkü toz halinde elde edilen ürün sıvı haldeki ürüne göre daha iyi

stabiliteye sahiptir. Böylece ürünün saklanması kolaylaşmakta ve raf ömrü artmaktadır (Sailaja ve ark. 2011; Kamboj ve ark. 2010).

1.4. Katı Lipid Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

1.4.1. Etken Madde Yüklenmesi ve Yükleme Kapasitesi

KLN'nin e.m. yükleme kapasiteleri eriyen yağda ilacın çözünübilirliği, yağ matriksinin yapısı ve yağ matriksinin polimerik durumu ile sınırlıdır. Eğer lipid matriks benzer moleküller içeriyorsa, mükemmel kristal oluşur. Çünkü yüklenen e.m., yağ asitlerinin zincirleri ile yağ tabakaları arasında konumlanır ve e.m.'nin büyük miktarı da kristal içinde konumlanamaz. Böylece kompleks lipidlerin kullanımı ile daha yüksek ilaç yüklemesi yapılabilir (Shingai ve Moses, 2009).

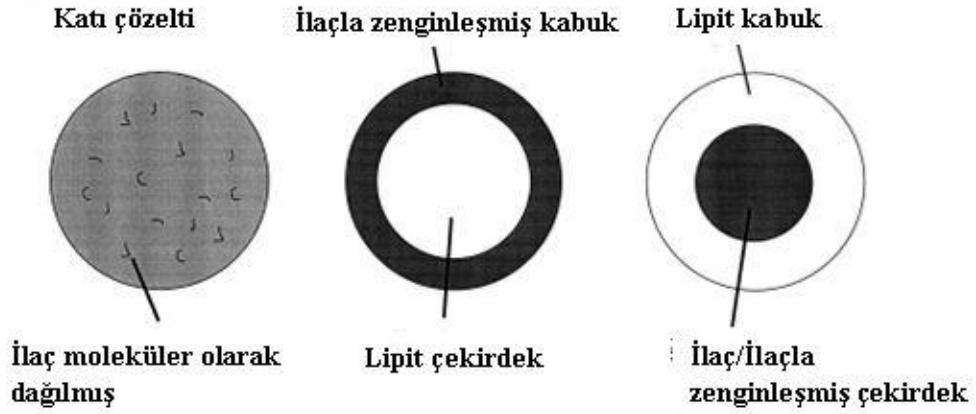
KLN'e yüklenen etken maddelerin miktarı %1-25 arasında değişmektedir. Yükleme, e.m.'nin fizikokimyasal özelliklerine ve üretim tekniğine bağlıdır. Lipofilik özellikteki maddelerin çekirdek lipid tabakadaki çözünürlüklerinin güçlü olması nedeniyle hiç bir zorluk yaşanmamaktadır. Fakat, düşük lipofilik e.m.'nin yüklenmesinde lipofilik özelliklerini artırmak için iyon çiftleri oluşturulmaktadır. İyon çiftlerindeki zincir uzunluğuna bağlı olarak ilaç yükleme kapasitesi de değişmektedir. Hidrofilik etken maddeler ise çoklu mikroemülsiyonlar hazırlanarak yüklenebilmektedir (Kaş, 2002; Wissing ve ark., 2004; Üner ve ark., 2007).

E.m.'nin KLN içine yükleme kapasitesini etkileyen faktörler (Müller ve ark., 2000);

- Katı lipid matriksin kimyasal yapısı
- Lipid matriksin polimorfik formu
- Eritilmiş lipid içinde e.m.'nin çözünürlüğü

E.m. yüklenmesi ve buna bağlı olarak farklı salım modelleri için üç farklı model verilebilir (Şekil 1.3) (Müller ve Wissing, 2002; Jensen ve ark., 2010);

- Katı çözelti modeli
- Çekirdek-kabuk modeli, e.m. ile zenginleşmiş kabuk
- Çekirdek-kabuk modeli, e.m. ile zenginleşmiş çekirdek



Şekil 1.3. KLN’lerde görülen etken madde yükleme modelleri (Müller ve ark., 2000)

1.4.2. İlaç Salımı

KLN’lerin salım profilleri genellikle 2 aşamalıdır. Baştaki hızlı salımın ardından, uzatılmış e.m. madde salımı ile ikinci bir faz meydana gelmektedir. Salım süresi ve şekli, matriksin yapısına, hazırlanma yöntemine, partikül büyüklüğüne, yüklenen e. m. miktarına ve lipidin nanopartikül içindeki dağılımına bağlı olarak değişir. E.m., ya lipitte moleküler düzeyde dağılabilir ya da dış kabukta veya partikül içinde yoğunlaşması da mümkün olmaktadır. E.m. dağılımına en çok etki eden parametreler de, ortalama homojenizasyon sıcaklığı, YEM’lerin konsantrasyonu ve kimyasal yapısıdır. Partiküler sistemin büyüklüğü ve yoğunluğu, e. m.’nin fizikokimyasal özellikleri, yardımcı maddelerin etkisi, pH ve polarite e.m. salımını etkiler (Üner ve Yener, 2007; Üner ve ark., 2007; Souto ve Müller, 2007).

KLN’den hızlı salım geniş yüzey alana, küçük molekül büyüklüğü nedeniyle yüksek difüzyon katsayısına, matriksin düşük viskozitesine ve kısa difüzyon mesafesine bağlanmaktadır (Huang ve Brazel, 2001; Kaş, 2002). İlacın yüzeyden salınması durumunda adsorbe olan e.m. salım ortamıyla temas haline gelince hemen çözünür. Partiküllerin yüzey tabakasında tutulmuş olan e.m.’ler bu şekilde salım özelliği gösterirler. Bu şekilde salım patlama etkisine (burst effect) yol açar (He ve ark., 1999).

1.4.3. Yüzey özellikleri

KLN'lerin şekillerinin belirlenmesinde, diğer partiküler sistemlerde olduğu gibi, atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) ve taramalı elektron mikroskobu (TEM) ya da SEM kullanılabilir. Düz bir silikon yüzeye sabitlenen nanopartiküllerin şekilleri, AFM ile vakuma ihtiyaç duyulmadan belirlenebilmektedir (Kaş, 2002; Numanoglu ve Tarımcı, 2006). TEM ile de partiküllerin morfolojik özellikleri ve boyutu gözlemlenebilir. Mikrometre altında boyuta sahip olan partiküller için iyi karakterizasyon yöntemlerinden biridir (Sailaja ve ark., 2011; Haskell ve ark., 2006).

1.4.4. Nanopartiküllerin Kararlılığı

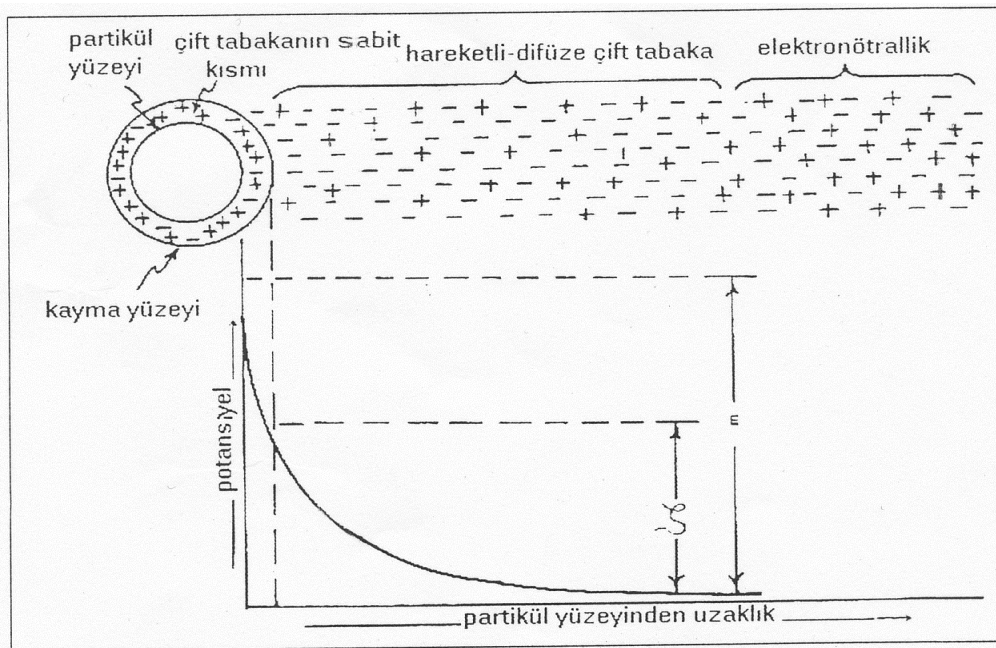
Nanopartiküllerin raf ömürleri ve bozulmaları sıvı kromatografisi kütle spektroskopisi (SK-KS) yardımıyla görülebilir. Belirli bir konsantrasyondaki ve belirli bir zaman bekletilmiş olan KLN, KS yardımıyla parçalanarak iyonlarına ayrılabilir. Bu sayede partiküllerin ya da e. m.'nin ne kadar süre sonra bozulduğu gözlemlenmiş olur.

1.4.5. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli

Partikül boyutu ve dağılımı, nanopartiküler sistemlerin en önemli karakteristik özelliklerinden birisidir. Bu özellik nanopartiküler sistemlerin hedeflenebilme özelliğini, toksisitesini, nanopartiküllerin kararlılığını, ilaç yükleme kapasitesini ve ilaç salınımı gibi özelliklerini belirler. Nanopartiküllerin partikül boyutunun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemler foton korelasyon spektroskopisi (FKS) ya da lazer kırınımı (LD) yöntemidir. FKS'nde partikül hareketinin neden olduğu yayılan ışığın yoğunluğunun ölçümüne dayanır ve partiküllerin yarıçapını belirler. Nanopartiküllerin karakterizasyonu için iyi bir cihazdır fakat büyük moleküller daha geniş bir bölgede veya daha büyük bir çapta ışık dağıtacağından FKS mikrometre boyutundaki partiküllerin dağıtacağı ışının tamamını ölçemez. Dolayısıyla da FKS, büyük mikromoleküllerin yarıçapını saptayamaz. Genellikle de foton korelasyon cihazı ile alınan sonuçlar TEM ile

doğrulanır (Mohanraj ve Chen, 2006; Sailaja ve ark. 2011; Weyhers ve ark., 2006).

Zeta potansiyel, kolloidal dağılımların stabilitesinin değerlendirilmesinde önemlidir. Zeta potansiyel ne kadar yüksek ise kolloidal dağılımların stabilitesi de o kadar iyidir. Kolloidal partiküller dispersiyon ortamında iyon adsorbe ederler. Pozitif ve negatif olarak yüklenirler. Her partikül pozitif veya negatif yüklü oluşuna göre aksi yöndeki iyonlarla çevrilebilirler. Tek tabakalı (monomoleküller) bir yapı oluşturur. Bu tabakanın etrafında da partiküle bağlı olmayan, hareketli ikinci iyon tabakası yer almaktadır. Bu tabakaya Helmholtz çift tabakası veya hareketli difüze çift tabaka denir. Partikül yüzeyine yapışmış olan elektriksel tabakanın potansiyeline elektrotermodinamik potansiyel veya Nernst potansiyeli denir. Çift tabakanın dışında da pozitif iyonların negatif iyonlara eşit olduğu nötral bir alan vardır. Partikülün yüzeyi ile bu nötral bölge arasındaki potansiyel farkına zeta potansiyel denir (Şekil 1.4). Diğer bir deyişle, zeta potansiyel partikülün yüzeyi üzerindeki net etkili yükü göstermektedir. Zetametre ile ölçülür ve birimi milivolttur. Nanopartiküllerin zeta potansiyellerinin ± 30 mV olması süspansiyonda partiküllerin toplanmasını engelleyen yüzey yüklemesi ile kararlı olduğunu gösterir (Kaş, 2002).



Şekil 1.4. Zeta potansiyel'in şekilsel gösterilmesi

1.4.6. KLN ile Yapılan Çalışmaları

Schwarz ve Mehnert yaptıkları çalışmalarda, zeta potansiyel değerinin ve partikül boyutunun ilaç yükleme kapasitesine etki ettiğini ayrıca, KLN'lerin stabilitelerinin uzun olmadığını, KLN'in ilaç yükleme kapasitesi açısından diğer taşıyıcı sistemlere göre daha iyi olduğunu bulmuşlardır (Schwarz ve Mehnert, 1999). Oksibenzon KLN'den üretilen güneş kreminin aynı boyuttaki emülsiyonlara göre %50 daha az salım yaptığı, dolayısıyla salım yapma süresinin uzadığı bulunan çalışmada KLN'in 2 avantajı tespit edilmiştir. Birincisi, potansiyel olarak tehlikeli güneş ışınlarının azaldığını, ikincisi, KLN ile yapılan güneş kreminin ciltte daha uzun süre kaldığını dolayısıyla da güneş ışınlarından daha uzun süre koruduğu görülmüştür (Wissing ve Müller, 2002). Başka bir çalışmada mikroemülsiyon yöntemiyle 60 nm boyuta sahip KLN üretilmiş ve bu partiküllere magnetit yüklenmiştir. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucu olarak da manyetik parçacıkların çevresine lipidin toplandığını, manyetik alanda nanopartiküllerin toplanma ve sedimentasyon gibi dezavantajlarının yok olduğunu görmüşlerdir. Bu sayede de hedeflemenin kolay yapıldığını görmüşlerdir (Igartua ve ark., 2002). Yang ve Zhu, yaptıkları çalışmalarında, Kanfotoksin yüklü KLN'in kanfotoksine göre kararlılığının daha fazla olduğunu ve etki sürelerinin daha uzun olduğunu bulmuşlardır (Yang ve Zhu, 2002). Diğer bir çalışmada KLN'ler mikroemülsiyon sistemlerle karşılaştırılmış ve bu aşamada farklı konsantrasyonlarda triptolid yüklü KLN'ler hazırlamışlar. İlaç salım zamanı ve hızına bakarak KLN'lerin konsantrasyonları arttıkça etkilerinin de arttığını ve ayrıca KLN'lerin mikroemülsiyon sistemlerine göre daha kararlı olduğunu bulmuşlardır (Mei ve ark., 2003). Ultrasonikasyon yöntemi kullanılarak klozapin yüklü KLN üretildiği bir çalışmada, üretiminde yağ asidi olarak trigliserit kullanarak diğer yağ asitlerine göre e.m.'nin daha kolay yüklendiği, e.m. yüklü KLN'lerin biyouyumluluğunun arttığı bulunmuştur (Venkateswarlu ve Manjunath, 2004). Jores ve ark. KLN'lerin yüzeylerinin tüm e.m.'lere uygun olmadığını, daha farklı modifiye edilerek KLN'lerin ilaç yükleme kapasitesinin ve yüklenecek olan ilaç türünün değiştirilebileceğini bulmuşlardır. Ayrıca KLN'lerin farmakokinetik özelliklerinin değiştiğini görmüşler (Jores ve ark., 2004). Hu ve ark. çözücü difüzyon yöntemiyle peptid yüklü KLN hazırlamışlar ve 12 saat

boyunca salım yaptığını görmüşler (Hu ve ark., 2004). Schubert ve Müller-Goyman ürettikleri KLN'lere karakterizasyon çalışmaları yapmışlar ve e.m.'nin %30 kritik konsantrasyona ulaşınca kadar parçacık boyutunun azaldığını, e.m. yüklerken KLN'nin partikül boyutunun azaldığını bunun yanında sulu fazda sürekli bir emülgatör konsantrasyonunda lipid matriks içindeki e.m.'nin KLN'nin zeta potansiyeline bağlı olduğunu, buna karşılık olarak sulu fazda partikül boyutunun ve zeta potansiyelinin emülgatör konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığını, ayrıca katı ve kristal durumdaki partiküllerin anizometrikal bir şekilde şekillendiğini, KLN'lerin kristallenmelerinin lipid matriks içinde trigliserid konsantrasyonuna bağlı olduğunu gözlemlemişler (Schubert ve Müller-Goymann, 2005).

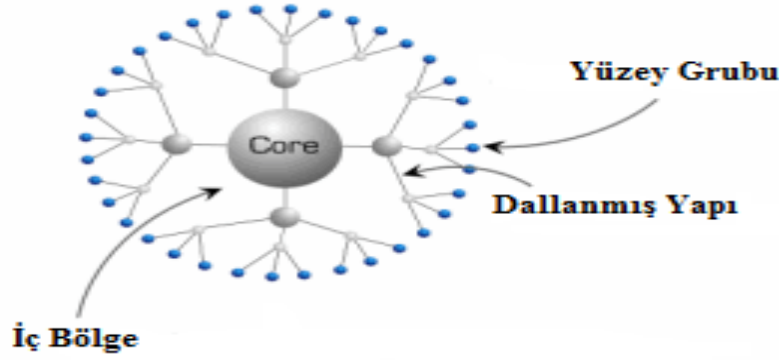
Başka bir çalışmada mikroemülsiyon tekniği ile üretilen KLN'in ilaç yükleme kapasitesi (% 70), partikül boyutunun (447 nm) lipid ve emülsifer miktarından etkilendiği bulunmuştur (Tiyaboonchai ve ark., 2007). Müller ve ark. yaptıkları çalışmalarında KLN içine yüklenen % e.m. miktarının KLN dispersiyonun % bileşen toplamıyla, % e.m. miktarının çarpımına eşit olacağını göstermişlerdir. Örneğin %10 KLN dispersiyonu ve %2 e.m. miktarı varsa KLN'lerin e.m. yükleme kapasitelerinin %20 olacağını söylemişlerdir. Bunu yanında KLN'lerde etken madde bozunma miktarının kolayca hesaplanamadığını e.m.'nin bozunma miktarına bakılırken plazma konsantrasyonuna da bakılmasının önemli olduğunu belirtmişlerdir (Müller ve ark., 2008). Zhu ve ark. hazırladıkları KLN'de partikül boyutu, ilaç salımı, ilaç yükleme kapasitesi, termal analizi gibi karakterizasyon çalışmaları yapmışlar ve partikül büyüklüğünü 50 nm ölçmüşler ve %71,6 ilaç yükleme kapasitesi bulmuşlar. Sonuç olarak KLN'lerin daha uzun süre salım yaptığını, daha hızlı ve uzun süre etki ettiğini, ürettikleri KLN'lerin çoğunun küresel şekil aldığını gözlemlemişler ve fiziksel özelliklerinin iyi olduğunu görmüşler (Zhu ve ark., 2009).

Blasi ve ark. yüksek basınçlı sıcak homojenizasyon tekniği kullanılarak 3 farklı matriks yapısına sahip lipid nanopartiküller üretmişlerdir ve YEM konsantrasyonuna ve homojenizasyon çevirme sayısına bakmışlardır. Beyine hedefleme yapmak için uygun lipid mataryelleri ve çalışma koşullarını bulmuşlardır (Blasi ve ark., 2011). Das ve ark., emülsifikasyon- ultrasonikasyon

yöntemiyle ürettikleri KLN'in partikül boyutunu, ilaç salımını ve ilaç yükleme kapasitesini araştırmışlar. KLN'in biyoyararlanımlarının ve fizikokimyasal özelliklerinin de iyi olduğunu görmüşler (Das ve ark., 2011). Xie ve ark., sıcak homojenizasyon metodu yardımıyla KLN üretmişler. Yağ zinciri uzunluğunun ilaç yüklenmesini olumlu yönde etkilediğini yani yağ zinciri uzatıldığında daha çok e.m. yüklenebileceğini buna bağlı olarak da biyoyararlanımın ve KLN'nin dolaşım sürecinin arttığını ve KLN'lere e.m. yüklenmesinde uygun yağ asitlerinin seçilmesi gerektiğini bulmuşlardır (Xie ve ark.,2011). Vitorino ve ark. KLN'in özelliklerine bakmak için FTIR, TEM, DSC, vb. gibi analizler yaparak, KLN'lerin boyutunu, bozunma hızını ve lipid yapısını incelemişler. Partikül büyüklüğünün lipid türüne veya YEM'in etkilemediğini, çözücünün ve lipid miktarının etkilediğini bulmuşlar (Viterino ve ark., 2011). Kovacevic ve ark., YEM'nin hidrofobik zincir yapısının partiküllerin kristallenme eğilimlerinin artırdığını bunun yanında lipid matriks moleküllerinin ve YEM'nin etkileşmesiyle ayrıca YEM'nin yapısının partiküllerin kristallenmelerine sebep olduğunu gözlemlemişler. KLN'in kristallenme durumları ve stabilitelelerini geliştirmişlerdir (Kovacevic ve ark., 2011). Ying ve ark., KLN'e kimyasal çapraz bağlı madde bağlamışlar ve salım zamanı ve hızını incelemişler. Salım oranının e.m. miktarına ve molekül ağırlığına bağlı olduğunu bulmuşlardır (Ying ve ark., 2011).

1.5. Dendrimerler

Dendrimerler, boyutları 50-1000 nm arasında değişen makromolekülleri bir arada tutan bir çekirdek, dallanmış moleküllerden oluşan iç bölge ve sonunda bir çok sayıda fonksiyonel grubu olan suda çözünebilen, enkapsülasyon özelliğine sahip, hedefleme ve modifiye yapılabilen ilaç taşıyıcılardır. İç çekirdek moleküllerin merkezini oluşturur ve dışa doğru dallanarak genişler (Şekil 1.5). Bu merkeze, fonksiyonel gruplar sayesinde hem hidrofilik hem de hidrofobik e.m.'ler yüklenebilir (Bharali ve ark., 2009; Perumal ve ark., 2008; Tomalia, 2005; Ciolkowski ve ark., 2011).



Şekil 1.5. Dendrimer'in temel yapısı

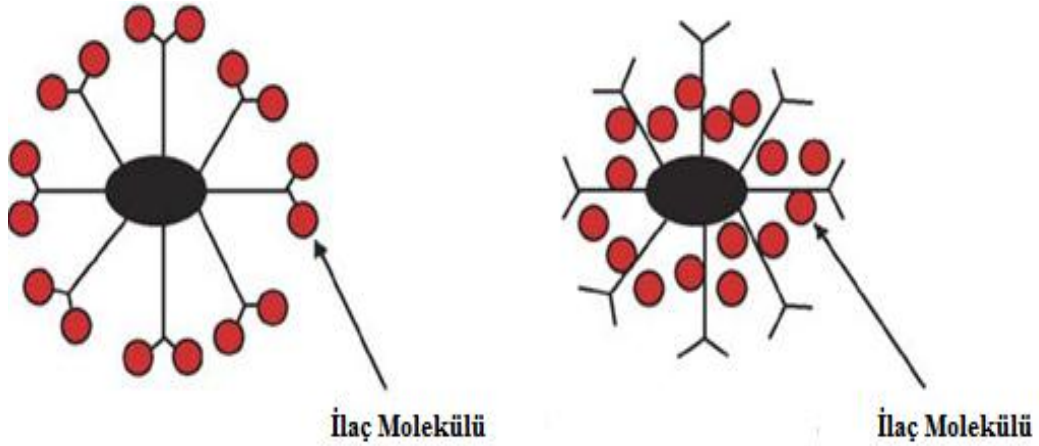
Dendrimerler'in yüzeyleri, çözünürlüğü değiştirici, özel hedeflemeyi sağlayıcı özel bir platform gibidir. Dendrimerler genelde yüklenecek molekülleri tanıdığı ve bu moleküllerin yüzeyine bağlandığında kolayca kontrol edilebildiği için lipozom, misel gibi diğer ilaç taşıma sistemlerinden farklıdır. İlk olarak Tomalia ve arkadaşlarının geliştirdiği bir sistemle dendrimerler ilaç geliştirmede ve görüntülemelerde kullanılmaktadır. Dendrimerlere etken maddeler ya iç bölgeye, ya da adsorbe veya kimyasal yöntemlerle yüzeyine bağlanarak belirli bölgelere hedeflenmesi sağlanmaktadır. Ayrıca matematiksel olarak yüzey gruplarının bağlanması ayarlanabilir (Tomalia ve ark., 2007; Lee1 ve ark., 2005; Oliveira ve ark., 2010).

Günümüzde, dendrimerlerle e. m. taşınması 3 farklı yöntemle olmaktadır; Kovalent bağ ile, iyonik etkileşimlerle ve kapsülleştirilip misel oluşumu ile bağlanabilir (Morgan ve ark., 2006)

Dendrimerlerin değişik çeşitleri bulunmaktadır. Günümüzde en yaygın kullanılan poliamidoamin (PAMAM) dendrimerleridir. PAMAM dendrimerler spesifik ve sentetik makromoleküllerden oluşan ilaç taşıma sistemidir (Zhu ve ark., 2010). Bu dendrimerler daha çok suda çözünabilen ve biyouyumlu olan ligandlar taşınmaktadır ve ilaç taşımada, ilaç hedeflemesinde ve görüntülemelerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Patri ve ark., 2004; Naha ve ark., 2010; Borowska ve ark., 2010; Caminade ve ark., 2010).

Dendrimerlerin sentezlenmesinde genellikle 2 strateji yaygındır; Birincisi, iraksak yöntemidir ve dendrimerler merkezden çekirdeğin dışında doğru

büyütülürler. Diğer yöntem ise yakınsak yöntemidir ve yüzey birim monomerleri birbiriyle bağlanarak çekirdek içine doğru sentez yapılabilir (Şekil 1.6) (Wolinsky ve Grinstaff, 2008).



Şekil 1.6. Yakınsak ve ıraksak metodun karşılaştırılması

Dendrimerlerin avantajları;

- Nanoboyuta sahip olmaları,
- Hedefleme gruplarıyla, biyouyumlu moleküllerle ve e. m.'lerle bağlanacak bir çok sayıda fonksiyonel yüzey gruplarının olması,
- Yüzeylerindeki fonksiyonel gruplar modifiye edilerek e. m. yüklenmesi ve biyouyumluluğu artırılabilir (PEG modifiyeli) olması,
- E.m.'ler yüzeyle çekirdek arasındaki iç bölgeye yüklenerek toksisite azaltılabilir ve kontrollü salım kolaylaştırılabilir olması,
- Pozitif yüklü dendrimerler değişik derecelerde toksisite gösterirken negatif yüklü ve nötr dendrimerler genellikle biyolojik olarak uyumlu olması,
- E. m.'nin farmakokinetik özelliklerini değiştirebilir olması gibi avantajları vardır (Pan ve ark., 2007; Joralemon ve ark., 2005; Li ve ark., 2002; Tintaru ve ark., 2011; Zhu ve ark., 2010; Bharali ve ark., 2009).

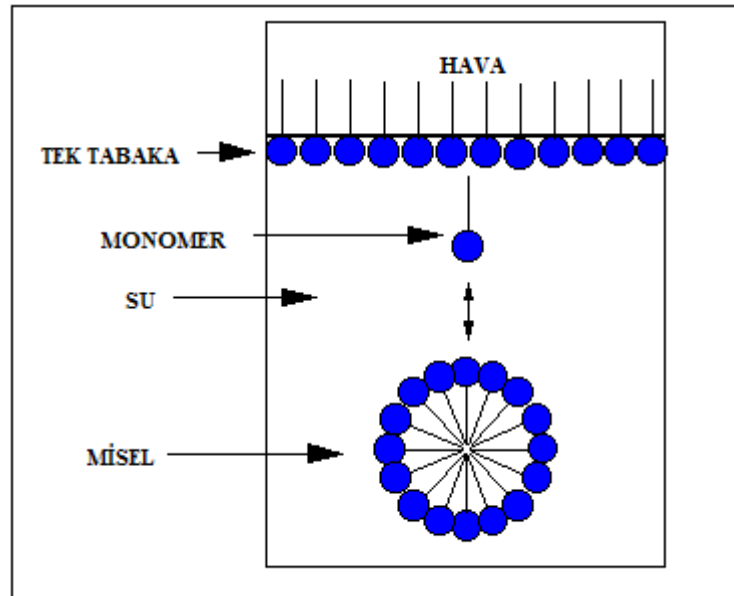
Dendrimerlerin dezavantajları ise; üretiminde reaksiyon oluşturulması için çözücünün kullanılmaması,

- Çözücü olmadığından reaksiyonun zor kontrol edilmesi,
- Üretim için metal katalizöre ihtiyaç olması,

- Üretim sırasında ortamda gaz fazında oluşan bileşikler istenmeyen bir desen oluşturabilir,
- Çok düşük molekül ağırlıklı e. m.'lerin hedeflenmesi oldukça zordur (Wu ve ark., 2002; Killops ve ark., 2008; Gillies ve Frechet, 2005).

1.6. Miseller

İlaç taşıma sistemi olarak kullanılan miseller nano boyutlu ve termodinamik olarak kararlı yapıya sahiptirler. Miseller sulu bir faz içinde amfifilik polimerler çözündürülerek oluşturulan, 10-100 nm aralığında boyuta sahip ilaç taşıyıcılardır (Lukyanov ve Torchilin, 2004; Soga ve ark., 2005). Miseller nano boyutlu bir çekirdek ve amfifilik blok kopolimerlerden oluşurlar. Çekirdekleri genellikle hidrofobik yapıdayken dış kabuk hidrofilik yapıdadır. Dış kabuk, ilaç yüklü iç çekirdeği korumaktadır (Şekil 1.7) (Shin ve ark., 2009).



Şekil 1.7. Misellerin oluşum şeması

Misel yapımında amfifilik kopolimerler kullanılır ve bunlar aynı iki tür veya hidrofilik monomer ve hidrofobik monomer gibi birbirinden farklı iki monomerden oluşabilir. İlk olarak hidrofilik bir zincire hidrofobik bloklar

birleştirilerek kopolimerler oluşturulur. Misel yapımında stabiliteyi artırmak için deterjanda kullanılır. Misellere yapımı aşamasında deterjan eklenerek suda çözünürlüğü az olan ilaçlar hidrofobik çekirdeğe daha fazla yüklenir ve böylece biyoyararlanım artmış olur. Bazı durumlarda geliştirilmiş geçirgenlik sayesinde hedeflenme kendiliğinden sağlanabilir (Lukyanov ve Torchilin, 2004; Sezgin ve ark., 2006; Gaucher ve ark., 2005).

Misellerde moleküllerin misel çekirdeğine yüklenmesi önemlidir. Hidrofilik ilaçların yüklenmesi sınırlı olduğu için suda çözünen ilaçlar nispeten düşük oranda yüklenir. Miselerin içlerine yüklenen maddelerin molekül ağırlıkları düşük olduğu için hedeflenme özellikleri yüksektir. Misellere yüklenecek olan moleküller kararsız yapıya sahip ise hedefleme yapılması oldukça zordur (Yamamoto ve ark., 2007). Misellerde hedeflemenin daha kolay yapılabilmesi için dış yüzeylerine polietilen glikol (PEG) bağlanarak fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri artırılabilir. Böylece misellerin belirli bir bölgede toplanması ve o bölgede salım yapması da artırılabilir. Miseller, ya katyonik blok kopolimerler ile negatif yükler arasındaki elektrostatik etkileşmelerle ya da amfifilik blok kopolimerler ve hidrofobik bloklar arasındaki hidrofobik güçler tarafından bir arada tutulurlar. Miseller gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisi denilen özelliğe sahiptir. Gelişmiş tutma etkisi (EPR) nüfuz etme özelliklerinden dolayı misellerin belirli bölgelerde birikme oranları artırılmıştır. Hidrofilik ve hidrofobik bloklar arasındaki oran, genel zincir uzunluğu, kimyasal bileşimi, kullanılan polimerlerin çeşidi misellerin özelliklerini belirleyen ana faktörlerdir (Chang ve Chu, 2008; Rijcken ve ark., 2007; Attia ve ark., 2011; Sun ve ark., 2009; Licciardi ve ark., 2006).

Misellerin yüzeylerine antikor, peptid, hormon gibi düşük molekül ağırlıklı moleküller bağlanarak hedefleme yapılabilir. Misellerde suda hidrofobik maddeler çözdürülerek çekirdeğine toplanır ve hidrofobik moleküller suda çözülerek hedefleme yapılır. Miselleri daha etkili yani akıllı bir malzeme yapmak için ise sıcaklık ve pH' ya hassas, çevre değişikliklerine kolay yanıt veren malzemeler kullanılmaktadır. Buna göre miseller termosensitif miseller, pH-duyarlı miseller olarak isimlendirilirler (Sezgin ve ark., 2006; Sun ve ark., 2010; Trubetskoy ve ark., 2006; Yang ve ark., 2008; Osada ve ark., 2009; Lee, 2008).

Misellere yüklenecek olan maddelerin iyonik ya da non iyonik maddeler elektrostatik etkileşmelerden yararlanılarak yüklenir (Boudier ve ark., 2009). Hidrofilik kabuğun farmakokinetik özelliklerinin modifikasyonu ile suda çözülmeyen ilaçlar hidrofobik çekirdeğin boşluğuna yüklenebilir (Ye ve ark., 2008; Liu ve ark., 2005; Kim ve ark., 2008; Uskokovic ve Drofenik, 2007).

İlaç taşıma sistemlerinden biri olan misellerin avantajları (Ye ve ark., 2008; Lukyanov ve Torchilin, 2004; Bae ve ark., 2007; You ve ark., 2008; Lee, 2008);

- Hidrofobik ilaçların çözünürlüğünü ve farmakokinetik özelliklerini artırabilirler,
- Uzun yapısal stabiliteye ve yüksek kinetik stabiliteye sahiptirler,
- Nano boyutta partikül büyüklüğüne sahiptirler,
- Dağılımları yavaştır,
- Yüksek termodinamik özellikleri vardır,
- Yüklenen ilacın toksisitesini düşürürler.

Dezavantajları;

Bir çözücünün ve YEM'nin toksisiteye ve istenmeyen birçok yan etkiye sahip olmalarıdır. Üretiminde kullanılan ve yüklenecek maddenin birleşme özelliğinin düşük olması nedeniyle hızlı salım yapması istenmeyen bir özelliğidir (Sezgin ve ark., 2006). Misellerde ilaç yüklemesi ve hedeflemesi her zaman aynı olmayabilir (Shin ve ark., 2009).

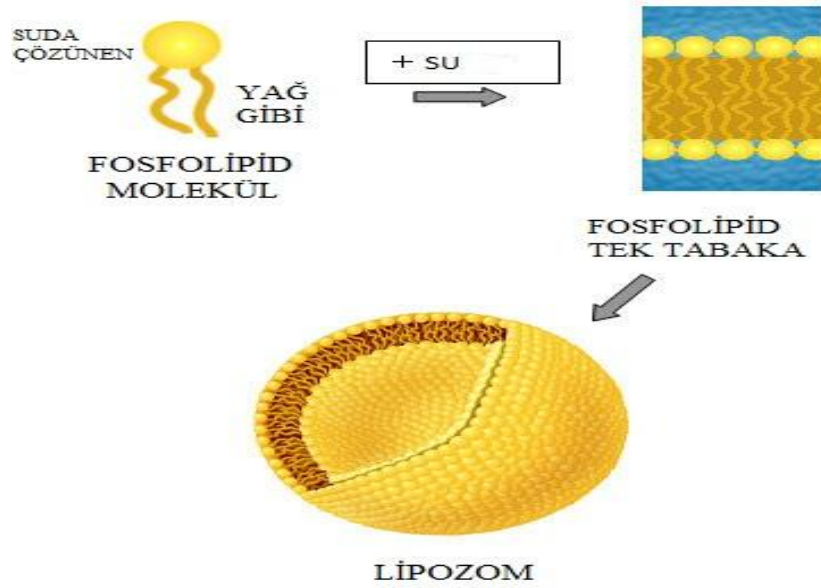
1.7. Lipozomlar

Lipozomlar, hidrofilik ve hidrofobik e.m.'leri taşıma ve koruma yeteneklerine sahip olduklarından dolayı yaygın bir şekilde ilaç taşıma sistemi olarak kullanılmaktadır (Shao ve ark., 2006; Ishida ve ark., 2006).

Boyutları 50-200 nm arasında değişen iç çekirdek ve fosfolip tek tabakadan oluşurlar. Yapılarında PEG, poliakrilamid gibi sentetik polimerler ya da glikolipidler gibi doğal bileşenler kullanılarak lipozomların yüzey değişiklikleri yapılarak stabil lipozomlar üretilir (Ji ve ark., 2006; Lindner ve ark., 2008; Zamboni, 2005).

Fosfolipidler genellikle hidrofilik ısı grubu ve iki tane hidroforik zincirden oluşmaktadır. Lipozomlarda hidrofilik ilaçlara iç sulu boşluğa, lipofilik ilaçlar fosfolipidik tek tabakaya yüklenerek kullanılır (Şekil 1.8) (Castelli ve ark., 2010; Goyal ve ark. 2005).

Lipozomlara maddelerin yüklenmesi, lipozomların hazırlanması sırasında e.m.'nin yüklenmesi veya boş lipozomlara e. m.'nin yüklenmesi şeklinde olur (Chonn ve Cullis, 1995).



Şekil 1.8. Lipozom yapısının şematik olarak gösterilmesi

Lipozomlar, ince tabaka buharlaştırma, dondurarak çözme, ters faz buharlaştırma, sonikasyon gibi birçok değişik yöntemle üretilmektedir. Lipozomların üretim tekniklerinde kullanılacak tekniğin seçilmesinde boyut dağılımı ve yüzey özellikleri önemlidir. Boyut dağılımı lipozom üretim metodunda fiziksel ve kimyasal parametrelere bağlıdır (Justo ve Moraes, 2010).

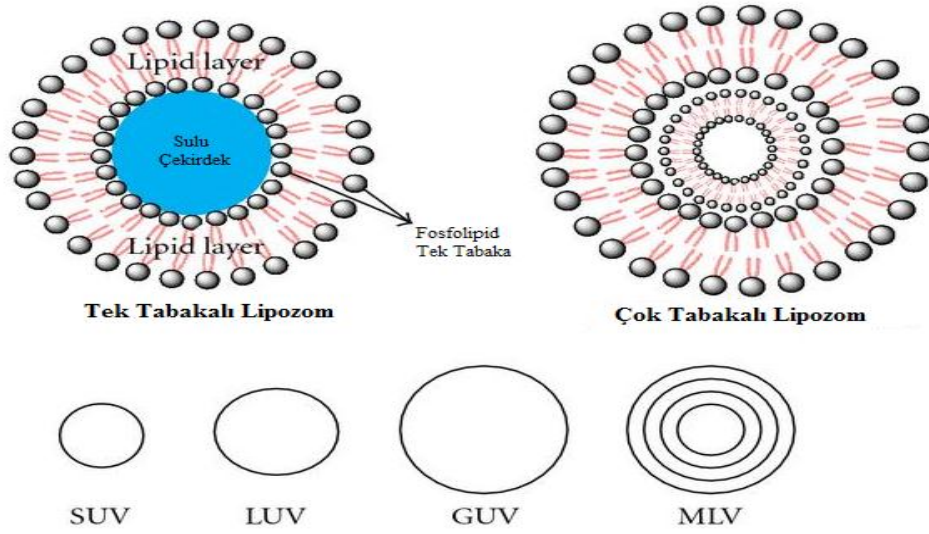
Lipozomların tek veya çok tabakalı olmalarına göre 3 sınıfta incelenir. Bu sınıflandırmada lipidin, hidroforik alkil zincir uzunluğuna, alkil zincirin doymamışlık derecesine, polar olan ısı gruplarının yapısına bağlıdır (Crommelin ve ark., 2001). Lipozomlar genel olarak 3' ayrılır. (Yokoyama ve ark., 2005; Kozubek, 2000; Kaş, 2002).

Çok tabakalı lipozomlar (MLV): İç içe bir çok tabakadan oluşan, tabakalar arasında sulu faz barındıran ve büyüklükleri 400-3500 nm arasında değişen lipozomlardır. Hidrofilik e.m.'ler sulu fazda, lipofilik e.m.'ler lipid tabakalarda tutunurlar. Ancak lipid tabaka sayısı fazla olduğu için lipofilik maddelerin tutulma oranı diğer lipozom türlerine göre daha fazladır (Şekil 8).

Büyük tek tabakalı lipozomlar (LUV): Tek tabakalı büyük lipozomlar, tek bir lipid tabakasından oluşan ve 100 nm'den daha büyük olan bir lipozomlardır. İçlerindeki sulu faz MLV'lere göre daha fazla olduğu için sulu fazda tutulan e. m. miktarı fazla olmaktadır. Daha az lipid kullanılarak hazırlandıkları için daha ekonomiktirler. Boyutları homojenizatörler kullanılarak istenilen boyuta ayarlanabilmektedir. Genellikle ters faz buharlaştırma ve deterjan dializ yöntemleri ile üretilmektedir.

Küçük tek tabakalı lipozomlar (SUV): Büyüklükleri 0.25-0.50 nm arasında olan tek tabakalı lipozomlardır. Hazırlanmalarında kullanılan en yaygın yöntem MLV'lerin sıvı azot altında sonikasyonudur. Avantajı hazırlanması sırasında sıcaklığın her zaman denetlenebilir olmasıdır (Şekil 1.9).

Bu lipozom türlerinin yanında pH'ya ve sıcaklığa hassas, hedeflenebilen, katyonik ve anyonik lipozomlar, vb. gibi bir çok lipozom türleri de geliştirilmiştir (Kaş, 2002; Obata ve ark., 2010; Crommelin ve ark., 2001; Mahato, 2007).



Şekil 1.9. Lipozom çeşitlerinin gösterilmesi

Lipozomlar'ın avantajları (Shao ve ark., 2006; Przeworska ve ark., 2010; Evjen ve ark., 2011; Hwang ve ark., 2007; Khalil ve ark., 2008; Yamauchi ve ark., 2008; Sihorkar, ve Vyas, 2001);

- Biyolojik olarak yıkılırlar ve parçalandıklarında toksik özellik göstermezler.
- Küçük dozlarda terapötik etki sağlayabilirler.
- Kontrollü salım yapabilirler,
- Yan ve toksik etkileri azaltır veya tamamen ortadan kaldırabilirler,
- Yarılanma ömrü kısa olan maddelerin yarılanma ömrünü uzatabilirler,
- Suda ve yağda çözünen maddeleri taşıyabilirler,
- İlacı hedeflenen bölgeye götürebilirler,
- Lipozomlanmış maddenin dağılımı, absorpsiyonu, eliminasyonu normal maddeden farklıdır,
- Aktif bileşiklere hedeflenebilirler,
- Özel bölgelere hedeflenebilirler,
- İlacın toksitesini azaltabilirler.

Lipozomların dezavantajları; (Ishida ve ark., 2010; Hwang ve ark., 2007; Yamauchi ve ark., 2008; Khalil ve ark., 2008)

- Stabilité sorunlarının olması,
- Endüstriyel boyutta üretimlerinin zor olması,
- Seriler arası farklılıklarının olması,
- Ekonomik olmamaları,
- Uzun hedefleme yapılamamaları,
- Sterilize edilememeleridir (Kaş, 2002; Zamboni, 2005).

2. Nokodazol'un Biyokimyasal Yapısı

Nokodazol, oldukça düşük konsantrasyonlarda bile yüksek affiniteyle beta-tubuline bağlanabilen, sentromerlerin morfolojilerini ve mikrotübülleri değiştirebilen bir maddedir. Mikrotübüller, hücre bölünmesi sırasında kromozomların transferinde, dokudan dokuya değişen çeşitli diğer kimyasallarla birlikte organellerin ve paketlenmiş kimyasalların hücre içerisinde ve hücre dışına taşınmasında kullanılır (Shen ve ark., 2005; Cho ve ark., 2006). Kanseri hücreleri üzerinde inhibitör etkiye sahip olan ve kanser hücrelerini apoptosize götüren antikanserojen bir ilaçtır (Li ve ark., 2009; Lee ve ark., 2010).

Nokodazol, genellikle kemoterapötik tedavi ve farmasötik uygulamalarda daha yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen, son zamanlarda fungusit olarak da uygulanmaktadır. Kanseri tedavisinde genel olarak, kanser hücrelerini öldürmek ve hücre bölünmesini durdurmak için mikrotübül inhibitörü olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, hücre bölünmesi üzerindeki etkilerden dolayı anöplit ve poliploitlere neden olabilir (Decordier ve ark., 2008).

2.1. Nokodazol'un Özellikleri

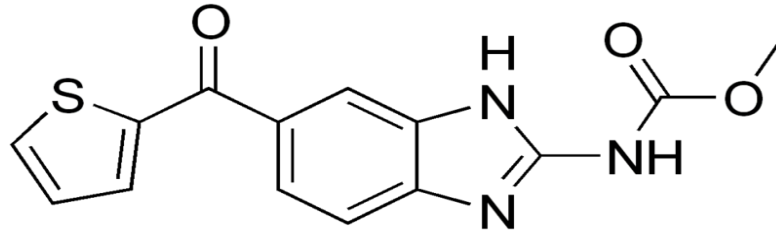
- Mikrotübül sentezini engellediği için klinikte bir anti kanser ilacı olarak kullanılmaktadır.
- Hücre döngüsündeki fazlarda etkili olduğu için hücre bölünmesi üzerinde etkilidir.
- Akım sitometri cihazında analiz edildiğinde DNA'nın M fazında ya da G2' fazında nokodazolün etkili olduğu görülür ve buradan yola çıkarak hücre döngüsü üzerinde etkisine bakılarak, hücreler tedavi edilebilir.

- Nokodazol tubüline bağlanarak mikrotübül inhibe ettiği için mitozu inhibe ederek hücreyi apoptoza götürür (Attia ve ark., 2008; Li ve ark., 2009; Cho ve ark., 2006; Decordier ve ark., 2008).

Hücrelerin nokodazol ile tedavisine mikroskop altında bakıldığında, nokodazol mikrotübül polimerizasyonunda etkili olduğu için mitoz aşamasında etkili olduğu görülmektedir. Yani hücrelerde metafaz aşamasında iğ iplikçikleri oluşumu engellediğinden dolayı hücrenin bölünmesini durdurarak mikrotübül polimerizasyonunu engeller (<http://en.wikipedia.org/wiki/Nocodazole>).

2.2. Nokodazol'un Kimyasal Yapısı ve Kimyasal Özellikleri

Kimyasal adı Methyl (5-[2-thienylcarbonyl]-1H-benzimidazol-2-yl) olan, kapalı formülü $C_{14}H_{11}N_3O_3S$ ve açık formülü Şekil 1.10'da gösterilen, molekül ağırlığı 301,3 g/mol, erime sıcaklığı $256^{\circ}C$ olan DMSO'da çözünebilen organik bir maddedir (<http://en.wikipedia.org/wiki/Nocodazole>; <http://www.sigmaaldrich.com>.)



Şekil 1.10. Nokodazol'un açık kimyasal yapısı

2.3. Nokodazol İle İlgili Çalışmalar

Nokodazol ile ilgili çalışmaların çoğuna bakıldığında, antikanserojen bir ilaç olduğu için kanser hücreleri üzerinedir. Baumgartner ve ark. nokodazol ile parazitler üzerinde çalışmışlar ve nokodazolün tersinir hücre döngüsünü artırıcı kapasiteye sahip olduğu için hücre döngüsü çalışmalarında kullanılabileceğini, nokodazolün parazitlerin miktarını ve kalitesini artırmak için konak hücrelere bağlı olduğunu konak hücre mirotübüllerini yok etmek için farklı konsantrasyonlarda etkili olduğunu bulmuşlardır (Baumgartner ve ark., 1999).

Shen ve ark. farelere belirli sürelerde ve farklı konsantrasyonlarda nokodazol uygulamışlardır. Nokodazol konsantrasyonu arttıkça, hücre döngüsündeki fazların sürelerinin azaldığını ve oldukça düşük dozlardaki nokodazolün bile kromozom üzerinde etkili olduğunu bulmuşlardır (Shen ve ark., 2005). Mariante ve ark. tedavi amacıyla hücrelere nokodazol uygulamışlar, meydana gelecek olan değişiklikleri görmek için mikroskop altında incelemişler ve sonuç olarak da nokodazolün hücrenin kromozomlarında değişiklik meydana getirdiğini ve mikrotübül oluşumu ile tubülün polimerizasyonunun etkileyerek, tubülün hedeflenmesi ile de bazı hastalıkların tedavi edilebileceği bulmuşlardır (Mariante ve ark., 2005). Cho ve ark. HeLa hücrelerinde mikrotübül yok edici ajanlar kullanarak gen baskılamasını artırıcı analizler yapmışlardır. Mikrotübül yıkıcı ajan olarak da nokodazol kullanmışlar ve mikrotübül ağının çeşitli mekanizmaları sayesinde kardeş kromotidlerin ayrılmasının kolaylaştığını, nokodazolün hücre iskeletini değiştirdiğini bulmuşlardır. Hücre iskeletinin tekrar modellenmesi için de, iğ ipliklerinin oluşması için ek mekanizmaların gerektiğini ayrıca mikrotübül yıkıcı ajanların mitoz sırasında birden fazla yollara sapacağından dolayı bir çok yolağın izlenmesi gerektiğini bulmuşlardır (Cho ve ark., 2006). Beswick ve ark. nokodazolü farklı hücrelere vermişler ve nokodazolün hücrelerde mitozu inhibe ettiğini ve hücreleri apoptoza götürerek öldürdüğünü bulmuşlardır (Beswick ve ark., 2006). Marx ve ark. mikrotübül yapısal proteini tubulin ile farklı konsantrasyonlarda nokodazolün farklı kanser hücreleri ile etkileşimini incelemişlerdir. Protein tubulin yapılarına yüksek konsantrasyonlarda nokodazol uygulandığında, tubulin yapılarını değiştirdiğini ve düşük konsantrasyonlarda nokodazolün mikrotübüllerin dinamik stabilitesinin zayıflattığı sonucuna varmışlar (Marx ve ark., 2007). Attia ve ark. balık spermeleri üzerinde nokodazolün etkisini çalışmışlardır ve nokodazolün mayoz bölünme süresini 24 saate uzatarak, mitoz sırasında anöplidlere sebep olduğunu ve kemoterapik uygulamalarda kullanımının doğurganlığı azalttığını bulmuşlar. Ayrıca, tüm çalışmayı 18 farklı kimyasal madde ile denemişler ve bunlar içinde nokodazolün de bulunduğu sadece 4 farklı kimyasal maddenin anöplidlere neden olduğunu ve mayoz süresini geciktirdiğini bulmuşlardır (Attia ve ark., 2008). Decordier ve ark. çeşitli hücreler üzerinde nokodazolün etkisini incelemişler ve nokodazolün

hücreleri 8-9 saat sonra apoptoza götürdüğünü fakat mitoz aşamasında etkili olduğu için hücrelerin beklenen ölüm oranından daha az oranda ölüme gittiğini bulmuşlardır (Decordier ve ark., 2008). Li ve ark. nokodazol yüklü altın nanopartiküller ve lipozomlar hazırlayarak, aralarındaki farkı araştırmışlar ve gen taşınması ile ilgili deneyler yapmışlardır. Sonuç olarak da nokodazolün transfeksiyon artırıcı bir özelliğe sahip olduğunu, nokodazol yüklü lipozomların agregasyona uğradığını ve etkili bir şekilde gen taşımadan önce hücrelerin nokodazol ile tedavi edilmesi gerektiğini ayrıca nokodazol yüklü altın nanopartiküllerin daha etkin olması içinde kullanılan lipidlerin modifiye edilmesinin daha iyi olacağını bulmuşlardır (Li ve ark., 2009). Lee ve ark. domuzlara SCNT embriyoları transfer etmişler ve bunun sonucunda doğacak olan domuz yavrularının canlılık oranlarının neredeyse 0 olacağını görmüşlerdir. Daha sonra domuz embriyolarına nokodazol ile tedavi edilmiş SCNT embriyoları transfer etmişler ve bunun sonucunda da doğan domuz yavrularının canlı olduğu ve ilk duruma göre canlılık oranının ise neredeyse %50 oranında arttığını görmüşlerdir (Lee ve ark., 2010).

GEREÇ VE YÖNTEM

1. Gereç

1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

DMSO	: Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Hidroklorik asit	: Carlo Erba, Rodano, İtalya
Metanol	: Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Naproksen	: Abdi İbrahim İlaç Sanayi, İstanbul, Türkiye
Nokodazol	: Acros Organics, New Jersey, USA
Uranil Asetat	: Elektron Microscopy Science
Tween 80	: Merck Schuchardt, Hohenbrunn, Almanya

1.2. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik No Frost, Türkiye
Derin Dondurucu	: Bosch, Türkiye
Diferansiyel Taramalı Kalorimetri	: Shimadzu DSC 60, Japonya
Distile SU Cihazı	: Human UP 900 Scholar-UV, Kore
DSC	: Shimadzu DSC 60, Japonya
FT-IR	: Perkin Elmer FT-IR Spektrometresi
Spektrum 2000, İngiltere	
Hassas Terazî	: Ohaus, İsviçre
Liyafilizatör	: Leybold- Heraeus LyovacGT-2, Almanya
NMR	: Ultra Shield 500MHz NMR Bruker,
Almanya	
Partikül Boyutu Analiz Cihazı	: Zetasizer Nano Series, İngiltere
pH Metre	: WTW Profi Lab pH 597 Weilheim,
Almanya	
SK-KS	: Agilent, USA
Ultraturaks	: T25, Janke&Kunkel IKA, Almanya
TEM	: Fei, Hollanda
YPSK	: Shimadzu SCL-10 AVP
	Shimadzu Degazer DGU-14 A
	Shimadzu Pompa LC-10 AT

Shimadzu Sistem Kontrol SCL-10 AD
Shimadzu Otoenjektör SIL-10 AD
Shimadzu DID SPD-MID A VP
Shimadzu Fırın CTO-10 AC VP, Japonya
Zeta Potansiyel Analiz Cihazı : Nano Zetasizer ZS Malvern
Insturuments, İngiltere

2. YÖNTEM

2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) için Optimizasyon ve Validasyon Çalışmaları

YPSK, biyoteknoloji ve farmasötik endüstri alanında araştırma ve geliştirmeden kalite güvenliğinden ve validasyona uzanan işlemlerin her basamağında ki molekülleri teşhis etmek, karakterize etmek ve saflaştırmak için kullanılan en önemli yöntemlerden birisidir. YPSK, özellikle kalite kontrol laboratuvarlarda, kalitatif ve kantitatif veri toplamak için kullanılan bir yöntemdir (Karcher ve ark., 2005; Doğrukol-Ak, D., 2011).

2.1.1. Çözeltilerin Hazırlanması

- **İç Standart Madde Çözeltilisinin Hazırlanması**

Yapılan ön çalışmalarda iç standart madde (İS) olarak birçok madde denenmiş ve içlerinden Naproksen maddesinin kullanılmasına karar verilmiştir. 10 mg Naproksen metanolde (MeOH) çözündürülmüş ve MeOH ile 40 mL'ye tamamlanıp 250 ppm konsantrasyonunda İS elde edilmiştir. Daha sonra hazırlanan bu çözelti MeOH ile 1:10 seyreltilerek 25 ppm'lik derişim elde edildi. 1 mL nokodazol standart ve örnek çözeltilerine 100 µL IS eklenerek kullanılmıştır.

- **Hareketli faz ayarlanması**

İlk hazırlanan mobil faz MeOH:Su (45:55) olarak denendi. Daha sonra mobil faz'a fosfat tamponu eklenerek MeOH:Su:Fosfat Tamponu (45:42.5:12.5) şeklinde mobil faz hazırlandı. Bunun içinde fosfat tomponuna ilk olarak pH taraması daha sonrada molarite taraması yapıldı. Molarite çalışması için; 10, 25, 75, 100, 200 mM'lık tampon çözeltileri hazırlanarak YPSK'ya verildi. Daha sonra pH için 200 mM, pH 3.07, 4.02, 5.03, 6, 6.8, 7.4 değerlerinde tampon çözeltileri hazırlandı ve YPSK'ya enjekte edildi. Çıkan piklerin asimetri, genişlik, teorik tabaka sayısı değerlerine bakılarak en iyi pH ve molarite değeri seçildi.

2.1.2. Etkin Madde Çözeltisinin Hazırlanması

10 mg Nokodazol Dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözündürülmüş ve 10 mL'ye DMSO ile tamamlanmış ve 1:2 ve 1:10 seyreltmeler yapılmıştır. Uygun konsantrasyonlarda seriler hazırlanması için, bu stok çözeltisinden 0.1-1000 ppm konsantrasyon aralığında miktarlar alınmış, her bir konsantrasyondaki çözeltilerden 900 µL alınıp, üzerine 100 µL metanol ile çözölmüş İS eklenerek YPSK'ya enjekte edilmiştir. Alıkonma zamanları, pik simetrisi ve alanları incelenerek çalışma aralıkları belirlenmiştir.

2.2. Miktar Tayini Metod Validasyonu

2.2.1. Doğrusallık

Analitik yöntemin, çalışılan aralık boyunca doğrusal ilişkisi olup olmadığının değerlendirilmesidir. Yöntemin doğrusallığı, maddenin belirlenen derişim aralığında elde edilen pik alanlarının doğrusallık göstermesidir.

Stok çözeltisinden hareketle 0.1-1000 ppm konsantrasyon aralığındaki 9 farklı çözelti hazırlanmış ve YPSK'ya enjekte edilerek pik alanları bulunmuştur. Kullanılan yöntem çizelge 2.1'de gösterilmiştir. Her bir farklı molaritedeki nokodazol'un pik alanları kayıt edilmiş ve bilgisayar yardımıyla kalibrasyon denklemi hesaplanmıştır. Hesaplamalarda her bir nokta için en az 3 enjeksiyon yapılarak çıkan değerlerin ortalaması hesaplanmış ve bu ortalama değerleri kullanılmıştır. Yapılan her ölçüm 3 defa tekrarlanmış ve gün-içi ve günler-arası doğrusallık sonuçları hesaplanmıştır.

Hareketli Faz	MeOH:Su:Fosfat tamponu (pH 5.03) (45: 42.5: 12.5)
Enjeksiyon hacmi	20µl
Kolon fırını sıcaklığı	40°C
Akış hızı	1mL.dk ⁻¹
Kolon	150×4.6 mm, 5µ C ₁₈

Çizelge 2.1. Validasyon işlemi sırasında uygulanan çalışma koşulları

2.2.2. Doğruluk

Doğruluk, kullanılan analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere olan yakınlığıdır. En az 9 tayinle (3 konsantrasyon/3 tekrar) yapılmalı ve % geri kazanım olarak ifade edilmelidir.

Doğruluğun belirlenebilmesi için 3 farklı (0.5, 10, 100 ppm) konsantrasyonda Nokodazol içeren örnekler hazırlanmış, hazırlanan bu örnekler YPSK'ya enjekte edilerek örnekleri geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Her bir konsantrasyon için 3 tekrar (n=3) yapılmıştır. Hesaplanan miktarlar, gerçek miktarlarla karşılaştırılmış; sonuçlar, % geri kazanım, standart hata (SH) ve bağlı standart sapma (BBS) olarak verilmiştir. % Geri kazanım aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = (K_{\text{pratik}} / K_{\text{teorik}}) \times 100$$

K_{pratik} = Etkin maddelerin kalibrasyon denklemi kullanılarak elde edilen konsantrasyon değerleri

K_{teorik} = Etkin maddeleri enjeksiyon için hazırlanan konsantrasyon değerleri

2.2.3. Kesinlik

Kesinlik, gün-içi tekrarlanabilirlik, günler-arası tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik olarak ölçülebilir.

Gün-içi tekrar edilebilirlik, aynı işlem koşullarında ve kısa zaman aralığındaki kesinliği ifade eder. Yöntemin tekrarlanabilirliği, aynı stok çözelti kullanılarak hazırlanan örneklerin ölçümünün birkaç kez tekrarlanması ile elde edilebilir. Bu işlem, çoklu örnek hazırlanması (n=3) ya da 3 farklı konsantrasyonda 3 tekrar ile yapılabilir. Hazırlanan örnekler YPSK'ya verilerek pik alanlarının ortalaması, SH ve BSS hesaplanır. BSS değeri %2'den küçük olduğu durumda yöntemin kesinliği ispatlanmış olur.

Günler-arası tekrar edilebilirlikte, birbirinden bağımsız olayların analitik yöntemin kesinliğine olan etkisi bulunmalıdır. Bu değişkenler, günler, analistler, kullanılan malzeme ve araçlar olabilir. Tekrar elde edilebilirlik ise, farklı laboratuvarlarda deneyin tekrarlanarak, aradaki kesinliğin gösterilmesidir. Yöntemin standardizasyonu için genellikle, farklı birimlerle ortak çalışmalar yapılmalıdır. Bu, zorunlu olmayan bir validasyon parametresidir.

Yöntemin gün-içi tekraredilebilirliğini göstermek için 5 farklı konsantrasyonda Nokodazol içeren örnekler hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 3 tekrar (n=3) yapılmıştır. Günler-arası tekraredilebilirlik için de, 1. gün yapılan çalışmalar 2. ve 3. günlerde de yapılarak günler-arası tekraredilebilirlik değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar, SH, BBS ve %95 güven aralıkları (CI) olarak verilmiştir.

2.2.4. Seçicilik

Analitik yöntemin, sadece amaçlanan bileşeni veya bileşenleri tayin edebilme yeteneğidir. Tek bir bileşen için yapılan ölçüm, ortamda bulunabilecek diğer bileşenlerden (yardımcı maddeler, biyolojik örnekteki endojen bileşikler, etken maddenin bilinen metabolitleri, safsızlıklar, bilinen veya bilinmeyen degradasyon ürünleri) kaynaklanabilecek girişimden etkilenmemelidir. Seçicilik, karmaşık numune karışımının analizinde girişim derecesinin de ölçüsüdür.

Yöntemin seçiciliği plasebo analizlerle belirlenmiştir. Bu çalışma için, Nokodazol hariç diğer bütün bileşenleri içeren KLN'lerin plaseboları hazırlanmıştır. Örnekler, miktar tayini çalışmasında kullanılan işlem basamaklarından geçirilmiştir. Elde edilen kromotogramlardan formülasyondaki diğer bileşenlerin girişimlerinin, Nokodazol'un seçiciliğine etkisi çalışılmıştır.

2.2.5. Duyarlılık

Kullanılan analitik yöntemlerin düşük konsantrasyonları saptayabilme yeteneğidir. Saptama sınırı, Limit of Detection (LOD) ve miktar tayini sınırı, Limit of Quantitation (LOQ) hesaplanarak değerlendirilir.

LOD, standart madde sinyalinin geri plan gürültüsünden ayrılabilmesi için gerekli olan en düşük madde miktarıdır. Yöntemin aletli olup olmamasına bağlı olarak, LOD'yi belirlemenin birçok yöntemi vardır.

- Görsel değerlendirme
- Sinyal-Gürültü (Signal-Noise)
- Elde edilen cevabın ve eğimin standart sapması

- Boş örneklerin standart sapması
- Kalibrasyon eğrisinin kullanılması

LOQ, standart maddenin güvenilir şekilde doğru ölçümünün yapılabilmesi için gerekli olan en düşük madde miktardır. LOD'nin belirlenmesi için kullanılan yöntemler, LOQ içinde geçerlidir.

Düşük konsantrasyonda bir seri örneğin analiz edilmesiyle belirlenmiştir. Her bir ortam için 3 paralel kalibrasyon denklemi bulunmuştur. En düşük değerleri yerine doğrunun günler arası verileriyle hesaplanan doğrunun standart sapması aynı verilerle hesaplanan doğru eğimine bölünmüştür. Bulunan değer 3.3 ile çarpılarak teşhis sınırı (LOD), 10 ile çarpılarak da tayin sınırı (LOQ) belirlenmiştir.

2.2.6. Sağlamlık/Tutarlılık

Tutarlılık, yöntem parametrelerinin çeşitliliği denenerek, yöntemin güvenilir olduğunun gösterilmesidir.

Tutarlılık çalışması için, hareketli faz, akış hızı, enjeksiyon hacmi, fırın sıcaklığı, kolon özellikleri ve İS gibi yöntem parametreleri değiştirilmiş; validasyon ve miktar tayininin güvenilirliği için en uygun şartlar belirlenmiştir.

2.2.7. Sistem Uygunluk Testi

Sistem uygunluk testi, birçok analitik işlemin gerekli parçasıdır. Testler, ekipman, elektronik ve analitik işlemleri kapsar.

Sistem uygunluk testi ekipman bilgileri için, YPSK cihazının parça, marka ve modelleri, kalibrasyonu ve çalışmanın nerede yapıldığı hakkında bilgiler verilmiştir. Yapılan analizlerde elde edilen kromotogramdaki Nokodazol ve İS'nin pik morfolojisi YPSK cihazının yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

2.2.8. Pik Morfolojisi

USP tarafından tanımlanan ve hesaplamaları yapılan sistem uygunluk testi parametreleri aşağıda verilmiştir.

- Teorik tabaka sayısı (N):
Kolonun en önemli parametresidir. Kolondan çıkan pikin sivri/dar olması ve piklerin birbirlerinden iyi ayrılması ile ilgilidir. N'nin sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine bağlı olduğu gibi deney koşullarına da bağlıdır. Önerilen değer $N > 2000$ 'dir.
- Kuyruklanma (T) ve asimetri faktörleri (As):
Bu faktörler, pikin simetrik olması ile ilgilidir. Pik asimetri faktörü (AS) taban yüksekliğinin %10'u, kuyruklanma faktörü (t)'de %5'i civarında ölçülür. As'nin 0,95-1,2 arasında, T'nin de ≤ 2 olması istenir.
- Kapasite faktörü (k'):
Analizi yapılan maddelerin alıkonma zamanları veya alıkonma hacimleri yardımıyla hesaplanır. Kolonun performansı ve alıkonmanın uzun süreli tekrarlanabilirliği ile ilgilidir. Elde edilen k' değerinin genel çalışmalarda 2-8, eser madde miktar tayininde 1-3 ve kararlılık belirleyici çalışmalarda $k' > 4$ olması istenir.
- Seçicilik Faktörü (α):
Bağıl alıkonmayı ifade eder. İki pikin elde edildiği sistemlerde (ikili karışım veya etkin madde ve İS'nin kullanıldığı karışımlar için) kullanılır. Genel olarak $\alpha > 1$ olması istenir.
- Ayırım gücü (Rs):
Ayırım, kantitatif kromatografi çalışmalarının başlıca gerekliliğidir. Genellikle beş veya daha az madde içeren numunelerde $R_s > 1,5$ kolaylıkla sağlanabilir. $R_s > 1,5$ maksimum kesinliğin göstergesidir. Rs kolonun eskiliğini, günler-arası ayırım şartlarındaki değişiklikleri gösterir. Genel

ayırımlarda $R_s \geq 2$, miktar tayini çalışmalarında $R_s > 1,5$ ve biyolojik sınırlarda yapılan çalışmalarda $R_s > 1,2$ değerleri kabul edilebilir değerlerdir.

- Pik yüksekliği veya alanının %BSS'si:

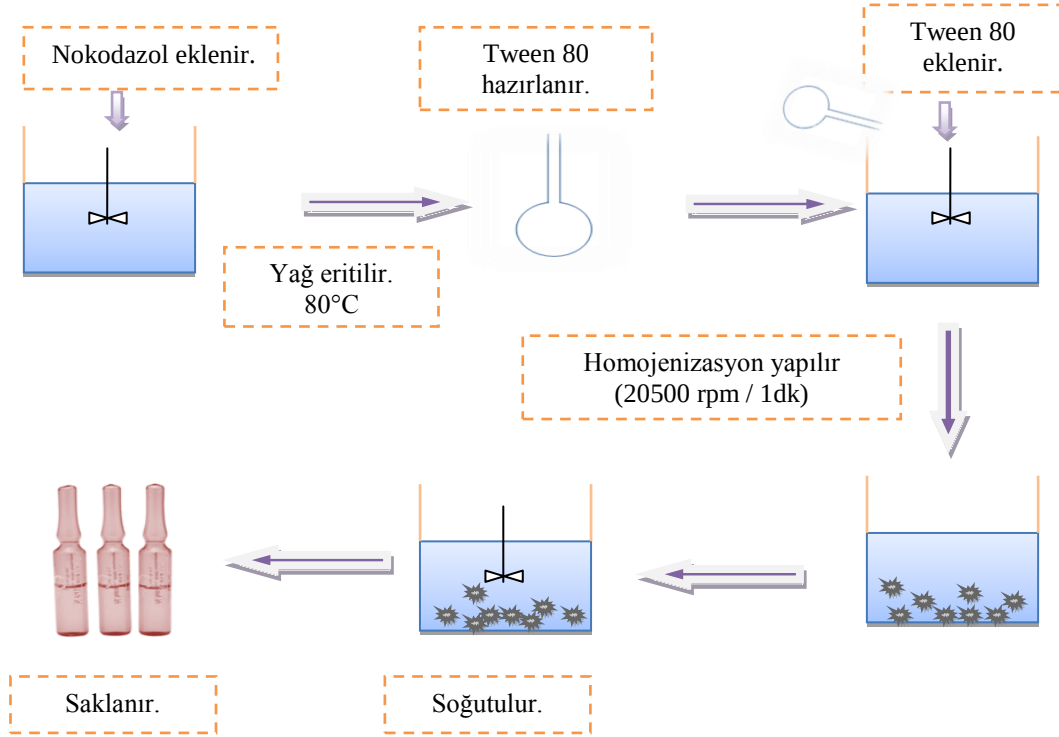
En az 3 defa tekrarlanan deneyler sonucu elde edilen pik alanı veya yüksekliğinin %BSS'sinin hesaplanması ile elde edilir. Genel ayırımlarda %BSS < 1.5, biyolojik sınırlarda yapılan çalışmalarda %BSS < 5, eser madde miktar tayininde %BSS değeri 5-15 değerleri arasındadır.

Bu kriterlerden en az iki tanesinin gerekli şartları sağlaması yöntemin sistem uygunluğunu göstermektedir.

2.3. Nokodazol Yüklü KLN Hazırlanması

2.3.1. KLN'in Hazırlanması

Nokodazol yüklü KLN hazırlamak için sıcak homojenizasyon tekniği kullanılmıştır. Bu tekniğe göre; % 3 lipit, % 5 Nokodazol ve % 1.2 oranında YEM (Tween 80) kullanılmıştır. Önce lipidin 80°C erimesi sağlanmıştır. Lipit eridikten sonra nokodazol eklenerek aynı sıcaklıkta erimesi sağlanmıştır. Daha sonra Tween 80 yavaş yavaş ilave edilerek ultraturaks aracılığıyla 20500 rpm'de yaklaşık 1 dk. karıştırılarak nokodazol yüklü KLN elde edilmiştir. Aynı zamanda e.m. (Nokodazol) kullanmadan kontrol grubu olarak aynı şekilde boş KLN hazırlanmıştır (Şekil 2.1) (Müller ve ark., 1993).



Şekil 2.1. KLN'lerin hazırlanmasının şematik olarak gösterilmesi

2.3.2. Nokodazol Yüklü KLN'lerin Karakterizasyonu

• Zeta Potansiyel, Parçacık Büyüklüğü ve Elektriksel İletkenlik Ölçümü

Nokodazol yüklü KLN'in 4°C, 25°C ve 40°C'lık ortamlarda bekletilen formülasyonları'nın zeta potansiyel ve elektriksel iletkenlik ölçümleri Zetasizer Nano Series (Nano-ZS) (Malvern Instruments, İngiltere) kullanılarak yapılmıştır. Her formülasyon için ard arda 3 ölçüm yapılmıştır. Ölçümler distile su ile seyretmeler yapılarak ölçülmüştür. Distile sudaki iletkenliğin neden olacağı değişimlerin ölçüm sonuçlarını etkilememesi için, kullanılan distile su, ölçümlerden önce NaCl ile 50µS iletkenliğe ayarlanmıştır. Ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25°C, ışık saçılım açısı 90° olacak şekilde ayarlanmıştır.

4°C, 25°C ve 40°C'lık ortamlarda bekletilen formülasyonların, 0. zaman, 30. ve 90. günlerdeki parçacık büyüklüğü ve dağılımı lazer kırınım cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

- **Liyofilizasyon**

Sulu çözelti halde bulunan katıların içindeki sıvı formlardan uzaklaştırılarak kurutulması için kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde kurutma işlemi, dondurarak kurutma aleti olarak da adlandırılan liyofilizatörlerde yapılır. KLN süspansiyonları hazırlandıktan sonra liyofilize edilmiştir.

- **Enkapsülasyon Değerlendirilmesi**

Etken madde yüklü KLN 7500 rpm, +4°C’de 30 dk. boyunca santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatandaki e.m. miktarı 0.2 µm’lik membran filtreden süzildükten sonra YPSK yöntemiyle miktar tayini hesaplanmıştır. E.m.’nin yükleme etkinliği (%YE), aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%YE = 100 \times \frac{\text{Toplam e. m. miktarı} - \text{Serbest e. m. miktarı}}{\text{Toplam e. m. miktarı}}$$

- **İlaç Salımı**

İlaç salımı, USP XXXI, NF26 (2008) palet modu (apparatus 2) kullanılarak 37°C’ de, 75 rpm’de 450 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (pH 6,8) disolüsyon ortamında gerçekleştirilmiştir. Örnekler alınarak YPSK’ya enjekte edilerek salıverilen nokodazol nokodazol miktarı ölçülmüştür. bakılmıştır. Çözünme ortamından (6., 12., 24., 48., 72., 96. saatler) enjektör yardımıyla 5 mL’lik örnekler 0.2 µm’lik membran filtreden süzülerek alınmış ve YPSK’da ölçüm yapılmıştır. Elde edilen doğru denklemi kullanılarak çözünen nokodazol miktarı hesaplanmıştır. Alınan örnek hacmi kadar ortam sıvısı her seferinde yerine konulmuştur. Her bir çalışma 3 kez tekrarlanmıştır.

- **Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi**

Sıcak homojenizasyon tekniği ile elde edilen nokodazol yüklü KLN’lerin yüzey özellikleri ve şekilleri, transmiyon elektron mikroskobu (TEM) (TEM; FEI,

Hollanda) ile fotoğrafları çekilerek incelenmiştir. TEM yönteminde santrifüjlenerek süpernatanın ayrıldığı nanopartiküller 100 µL MiliQ su içinde süspanse edildikten sonra karbon kaplı bakır grid üzerine damlatılarak emdirilmiştir. %2'lik (a/h) uranil asetat ile 20 saniye muamele edilerek boyanması sağlandıktan sonra suyla boyanın fazlası uzaklaştırılmıştır. 24 saat boyunca kuruyan nanopartiküller TEM ile görüntülenmiştir.

- **Nanopartiküllerin Stabilitésinin İncelenmesi**

- **Sıvı kromatografisi- kütle spektrometrisi (SK-KS)**

Hazırlanan KLN formülasyonlarının stabiliteleri SK-KS kullanılarak incelendi. İlk olarak 10 mg nokodazol 10 mL DMSO'da çözüldü ve daha sonra DMSO ile 1:4 ve 1:100 seyreltmeler ile 25 ppm'lik standart cihaza enjekte edildi. 30 gün ve 90 gün 40°C'de beklemiş olan nokodazol yüklü KLN'den 1'er mL alınarak üzerlerine 10 mL DMSO ilave edildi. Elde edilen karışımlar 30 dk. Ultrasonik banyoda bekletildi. Daha sonra 1dk. vorteks ile karıştırıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı ve bu sayede nanopartiküllerin DMSO içinde tam olarak çözülmesi sağlandı. Elde edilen karışımlardan ayrı ayrı yaklaşık 1.5 mL alınarak cihaza enjekte edildi.

SK-KS geniş bir kimyasal yelpazede kalitatif ve kantitatif analitik çalışmalara imkan sağlayan bir tekniktir.

KS tekniğı 1950'li yıllardan itibaren kullanılan bir tekniktir. İyon, elektriksel alan ve vakum olarak özetlenebilecek üç ana esas üzerine çalışır. Tekniğın temelinde gaz fazında, üzerinde elektriksel yük taşıyan bileşenlerin vakumlanan boşlukta uygulanan elektriksel veya manyetik alanda uçuş farklılıkları göstermekte ve bu farktan yararlanılarak birbirinden ayrılabilir. Birbirinden ayrılan iyonlar uygulanan elektriksel veya manyetik alanla yönlendirilip bir yüzeye çarptırılarak elektrik sinyali oluşturlar. Böylece iyonik bileşenler hem birbirinden ayrılmış hem de miktarlarıyla doğru orantılı olarak sinyale çevrilmiş olurlar (Doğruyol-Ak, D., 2011).

SK ile KS'nin birlikte kullanılması SK'nın seçici ayırım gücü ile KS'nin tanımlama gücünü birleştirmiş, böylelikle özgün zamanlarda kolonu terk eden bileşenlerin özgün molekül ağırlıklarının da belirlenmesi yöntemlerin kesinlik ve

seçiciliğini artırmıştır. Bu çalışmada, nokodazol standartının ve stabilite çalışmalarında kullanılan farmasötik preparatların SK-KS analizi yapılarak herhangi bir bozunma ürününün olup olmadığı ve nokodazolün molekül ağırlığı kontrol edilerek herhangi bir kimyasal dönüşüme uğrayıp uğramadığı kontrol edilmiştir.

Ayrıca hazırlanan KLN formülasyonunun stabilite, 30. Gün ve 90.günde de partikül boyutları ve zeta potansiyelleri ölçülerek ilk hazırlanan durumdaki ölçümlere karşılaştırılarak aradaki fark'a bakılarak da yorumlar yapıldı.

- **NMR Spektroskopisi**

Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi çoklu bileşenleri sistemlerin moleküller arası etkileşim ve yapılarının aydınlatılması için kullanılan güçlü deneysel yöntemlerden biridir. NMR spektroskopisinin numunelerin moleküller arası agregatlar'ın yapılarını çözmesi nükleer spin-örgü durulma zamanlarını (T1) değiştirmesine ve bu değişimi pik halinde ölçmesine dayanır (Peres ve ark., 2010).

NMR spektroskopisi yağ moleküllerinin çevreye etki etmesiyle, moleküllerin mobilitesi hakkında bilgi verir. Burada yağ moleküllerinin mobilitesi, meydana çıkan sinyallerin genişliğini etkilemektedir. NMR spektrumu için ortaya çıkan piklerin geniş ve zayıf olması moleküllerin mobilitesinin sınırlı olduğunu göstermektedir. Moleküllerin mobilitelerinin azalmaları protonun durulma zamanlarının azalmasına sebep olmaktadır. Yüksek mobilitede keskin pikler elde edilir. Ayrıca NMR, sinyallerin kimyasal kaymalarına bakarak moleküllerin çevreleri hakkında bilgi verir (Jenning ve ark., 2000).

KLN içindeki e.m. durumu için NMR Spektroskopisi çekildi. Bunu için ilk olarak Nokodazol DMSO içinde çözülüp NMR spektroskopisi alındı. Daha sonra aynı şekilde boş KLN'in ve Nokodazol yüklü KLN'in spektrumu 500 MHz'lik Bruker NMR Spektroskopisi'nde alınmış ve çıkan piklere göre KLN içindeki e.m. ve kimyasal kaymalar yorumlanmıştır.

- **FT-IR Spektroskopisi**

Infrared spektroskopisi, görünür bölge ile mikrodalga bölge arasında kalan enerjinin moleküller ve kimyasal gruplar tarafından absorplanmasının ölçümüne dayanan ucuz, hızlı ve hassas bir yöntemdir.

Infrared spektroskopisi ile bir organik bileşiğin yapısının aydınlatılması, hidrojen bağlarının bulunması, yapı tayini, bağ uzunlukları ve bağ açıları bulunabilir. Infrared spektroskopisi tekniği, belirli bir dalga boylarında örnek hücrelerine giren ve çıkan ışınların şiddetlerinin karşılaştırılması ve dalga boylarına göre grafiğe geçirilmesi prensibine göre çalışır. Infrared spektroskopisi genel olarak 2 tür bilgi verir. Bunlar; organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonlu grupların bulunmasını sağlar ve iki organik bileşiğin aynı olup olmadığı anlaşılır (Kacurakova ve Wilson , 2001).

KLN içine yüklenmiş olan nokodazol KBr içine eklenerek toz hale getirildi. Daha sonra toz halindeki karışım pres makinasına konuldu ve yaklaşık 3000 bar basınç uygulanarak ince disk haline getirildi. Bu disk halindeki numune FT-IR cihazına konularak 400-4000 nm dalga boyu aralığında incelendi. Daha sonra aynı liyofilize edilmiş katı haldeki işlemler sırayla boş KLN için ve nokodazol yüklü KLN için yapıldı. Çıkan piklerdeki frekans kaymalarına ve pikler arasındaki farklara bakılarak yorum yapıldı.

- **Raman Spektroskopisi**

Raman spektroskopisi, moleküller içindeki moleküllerin ve kristal örgü titreşimleri hakkında bilgi veren yapı aydınlatmasında yaygın bir şekilde kullanılan spektroskopik yöntemdir. Raman spektroskopisinin sisteminin simetri ve yapılarını oldukça hassas olduğundan dolayı nanomateryallerin ve nano yapıların karakterizasyon çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Choi, H. ve ark., 2005).

Raman spektroskopisi fotonlar'ın hapsedilmesi ilkesine dayanarak çalışır. Fotonlar'ın hapsedilmesiyle, pik pozisyonlarına, çizgi kalınlıklarına, yoğunluğuna, frekans kaymalarına bakılarak bileşiklerin kristal veya amorf

yapıları, bantları, kimyasal çevreleri hakkında bilgi edinilir (Srivastava ve ark., 2011).

Raman spektroskopisi nanopartiküllerin yapısal özelliklerinin belirlenmesi için oldukça yaygın kullanılan güçlü bir yöntemdir. Nanopartiküllerin raman spektrumu çekildiğinde 2 farklı bilgiye ulaşılır. Bunlardan birincisi, düşük frekanslı raman bantlarının maksimumlarının ölçülmesiyle nanopartiküllerin partikül boyutları ölçülebilir. Diğeri ise, nanopartiküllerin yüzey alanı arttığında partikül boyutunun azaldığı için yüzey modları baskın olmaya başlar. İşte bu yüzey modları raman spektroskopisi ile belirlenebilir (Choi ve ark., 2005).

FT-IR çekildikten sonra daha dar aralıktaki dalga boylarında çalışmak ve 400 cm^{-1} 'in aşağısındaki dalga boylarını da görmek amacıyla Raman Spektrometresi ile çalışıldı. Burada da ilk olarak yaklaşık olarak 5-10 mg nokodazol lam üzerine dökülüp, ince bir zar şeklinde yayıldı. Daha sonra spektroskopi cihazı içine konularak 100 mV değerinde bir gerilimde 40-4000 nm dalga boyu aralığında incelendi. Daha sonra aynı işlemler sırayla boş KLN ve nokodazol yüklü KLN için tekrarlandı. Çıkan sonuçlar arasında frekans kaymalarına ve pikler arasındaki farklara bakılarak yorum yapıldı.

- **Termal Analiz**

DSC, standart bir referans numuneye karşı başka bir maddenin ısıtılarak ve soğutulurken zamanın bir fonksiyonu olarak maddelerin enerji geçişlerini, erime ve tekrar kristallenme sıcaklıklarını belirlemeye olanak sağlayan bir tekniktir. Isınma ve soğuma ortamları normal koşullarda dakikada 0.2°C ile 50°C sıcaklık arasında değişebilir. Bu teknik sayesinde üretilen materyallerin kararlılığı hakkında bilgi sahibi olunabilir (Ford ve Mann, 2011).

Nokodazol ve nokodazol yüklü KLN'lerin termal analizi, DSC kullanılarak belirlenmiştir. Basınç yardımıyla sıkıca kapatılan alüminyum örnek kabında, 10^{-4} duyarlılıkla yaklaşık olarak 5 mg tartılan nokodazol ve nokodazol yüklü KLN'lerin boş referansa karşı $200\text{ mL}\cdot\text{dk}^{-1}$ azot akış hızının, $5\text{ K}\cdot\text{dk}^{-1}$ sıcaklık artışı ve yine $5\text{ K}\cdot\text{dk}^{-1}$ soğutma hızı ile $50-300^{\circ}\text{C}$ aralığında incelenmiştir.

3. BULGULAR

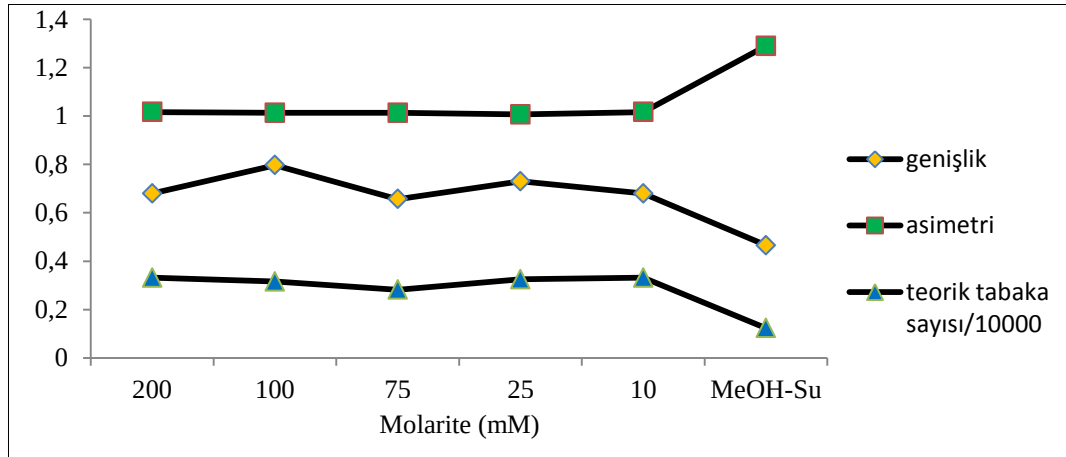
3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İçin Optimizasyon Çalışmaları

3.1.1. Hareketli Faz Optimizasyonu

Tampon Derişiminin Belirlenmesi

Hareketli faz içerisinde kullanılan fosfat tamponu çözeltisi için ilk olarak molarite taraması daha sonrada karar verilen molarite için pH taraması yapıldı.

Molarite taraması için 10, 25, 75, 100 ve 200 mM'lık tampon çözeltileri hazırlanarak hareketli faza ilave edildi. Daha sonra sabit bir derişimde İS ve nokodazol YPSK'ya enjekte edildi. Çıkan piklerin genişlik, asimetri değerlerinin minimum olduğu, teorik tabaka sayısı değerlerinin en büyük olduğu ve aradaki fark'ın minimum olduğu değer olan 25 mM'lık fosfat tamponu kullanılmasına karar verildi (Şekil 3.1).

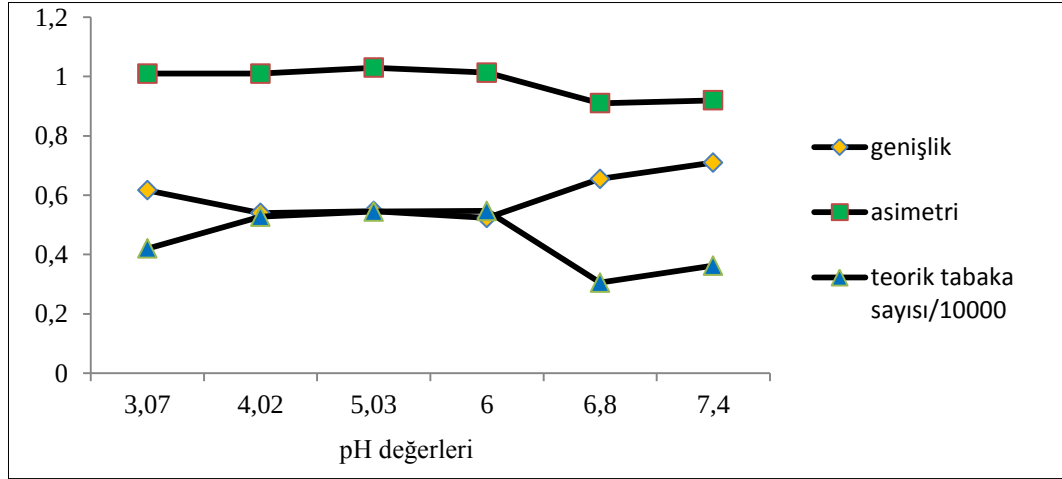


Şekil 3.1. Tampon çözeltisinin molarite seçimi

pH'nın Belirlenmesi

Hareketli faz içine konulacak fosfat tamponunun molaritesine karar verildikten sonra, 25 mM'lık pH 3.07, 4.02, 5.03, 6, 6.8, 7.4 değerlerde tampon çözeltileri hazırlanarak, bu pH'larda 25 mM'lık 6 farklı mobil faz hazırlandı ve sabit konsantrasyondaki İS ve nokodazol YPSK'ya enjekte edildi. Çıkan piklerin genişlik, asimetri ve teorik tabaka sayısı değerlerinin en büyük ve aralarındaki

fark'ın minimum olduğu değer olan 5.03 pH değerinin olmasına karar verildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Tampon çözeltisinin pH seçimi

3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İçin Validasyon Çalışmaları

Nokodazol ve İS, hareketli faz içindeki stok çözeltileri kullanılarak 6 farklı (0.5 – 100 ppm) konsantrasyonda nokodazol içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Bütün çözeltilerde İS'nin konsantrasyonu 25 ppm olarak sabit tutulmuştur. Hazırlanan seriler YPSK'ya enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogramdaki alanlar ve alıkonma zamanları (R_t) kullanılarak, nokodazol için pik normalizasyonu (PN) hesaplanmıştır (Çizelge 3.1).

$$PN_{is} = \text{Alan}_{is} / R_{t_{is}}$$

$$PN_{NOKODAZOL} = \text{Alan}_{NOKODAZOL} / R_{t_{NOKODAZOL}}$$

$$PN \text{ oranı} = PN_{NOKODAZOL} / PN_{is}$$

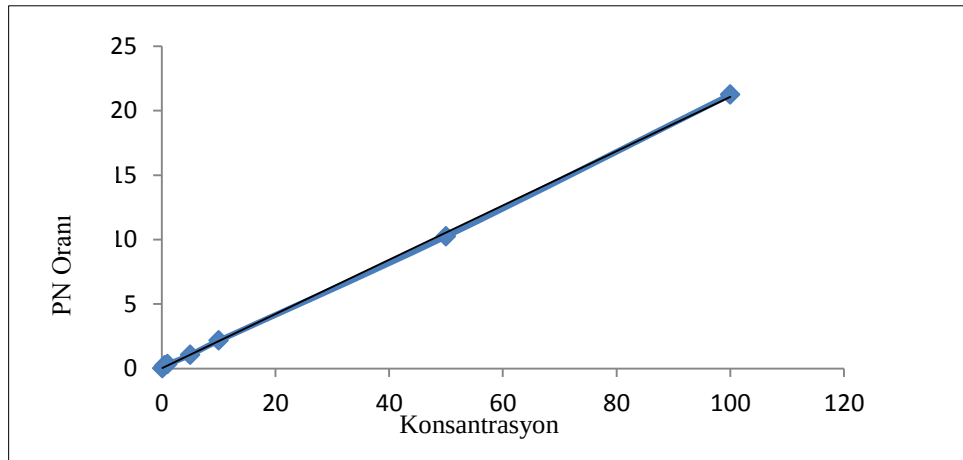
Doğrusallık çalışması için hazırlanan serilerde, gün-içi ve günler-arası lineer regresyon analizi yapılmış ve elde edilen sonuçlar çizelge 3.2'de verilmiştir. Doğrusallık eşitliğinin hesaplanabilmesi için nokodazol'ün konsantrasyon değerlerine karşı, altı serinin ortalama PN oranları kullanılmıştır (Çizelge 3).

Nokodazol (ppm)	1.Seri PN Oranı	2.Seri PN Oranı	3.Seri PN Oranı	Ortalama PN Oranı
0,5	0,0975	0,1023	0,1140	0,1046
1	0,2003	0,2041	0,2685	0,2243
5	0,9960	1,0680	1,0996	1,0545
10	1,9705	1,9974	2,0018	1,9899
50	10,7925	10,8455	10,9125	10,8501
100	22,2888	22,2994	22,3650	22,3177

Çizelge 3.1. 6 farklı konsantrasyonda hazırlanan nokodazol çözeltisinin PN oranları

	Gün-İçi (n=5)			Günler-arası (n=15) Ortalama
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	
Eğim	0.1909	0.1886	0.1873	0.2080
Eğim SS	0.0009	0.0007	0.0007	0.0030
y-kesişim	0.06438	0.1243	0.09634	-0.02633
y-kesişim SS	0.03747	0.02824	0.03067	0,0069
% 95 GA	0.0023	0.0017	0.0026	0.0063
r ²	0.9996	0.9999	0.9996	0.9997

Çizelge 3.2. Gün-İçi ve günler-arası doğrusallık sonuçları



Şekil 3.3. Nokodazol'ün doğrusallık grafiği

3.2.1. Doğruluk

Doğruluk çalışması için, çalışma aralığı içinde 6 farklı konsantrasyonda (0.5-100 ppm) nokodazol içeren örnekler hazırlanmıştır. Yöntemin geri kazanım sonuçları göstermiştir (Çizelge 3.3).

Nokodazol Hazırlanan derişim (ppm)	Geri Kazanım Ölçülen derişim (ppm)	% Geri Kazanım	SH	%BSS
0.5	0.4983	99.66	0.0032	1.56
1	1.0202	102.02	0.0069	1.69
5	5.0742	101.48	0.032	1.56
10	10.3180	103.18	0.068	1.66
50	49.0870	98.17	0.39	1.91
100	100.4207	100.42	0.8	1.95

Çizelge 3.3. Doğruluk çalışması için hazırlanan seriler ve % geri kazanım sonuçları (n=6)

3.2.2. Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliği ile ilgili tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik ölçümlerinin değerlendirildiği 3 farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek) yapılan ölçümlerde, % varyans katsayıları % 2'nin altında ise kullanılan yöntemin kesinliği kanıtlanmış denenebilir. Tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik test sonuçlarına göre, yöntemin kesinliği istenilen aralıklar içinde bulunmuştur (Çizelge 3.4-3.5).

Nokodazol (ppm) (n=3)	1.Gün			2.Gün			3.Gün		
	Ölçülen Derişim	SH	%BSS	Ölçülen Derişim	SH	%BSS	Ölçülen Derişim	SH	%BSS
0.5	0.45	0.002	0.69	0.41	0.004	1.38	0.7	0.003	1.03
10	9.2	0.06	1.03	9.3	0.09	1.55	8.9	0.07	1.2
100	94	0.7	1.2	95	0.82	1.42	99.6	0.8	1.39

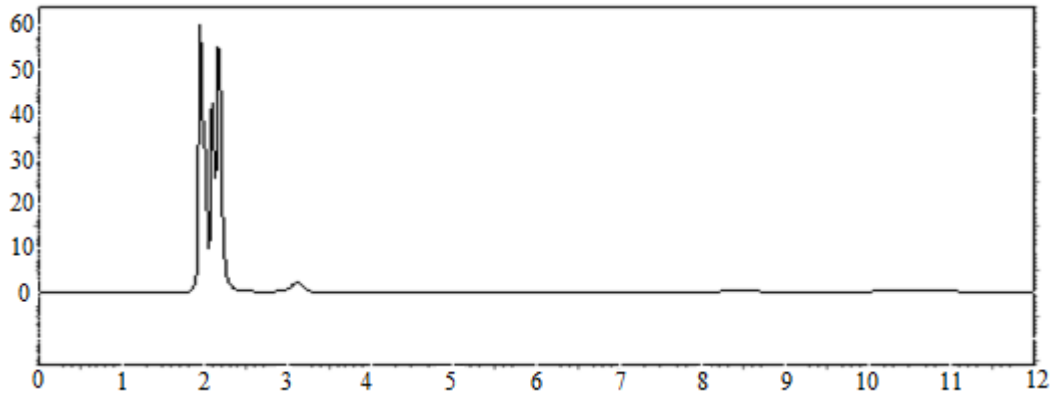
Çizelge 3.4. Gün-içi doğruluk ve kesinlik sonuçları

Nokodazol (ppm) (n=3)	Günler arası		
	Ölçülen Derişim	SH	%BSS
0.5	0.6	0.004	1.38
10	11.4	0.05	0.87
100	102.5	0.6	1.04

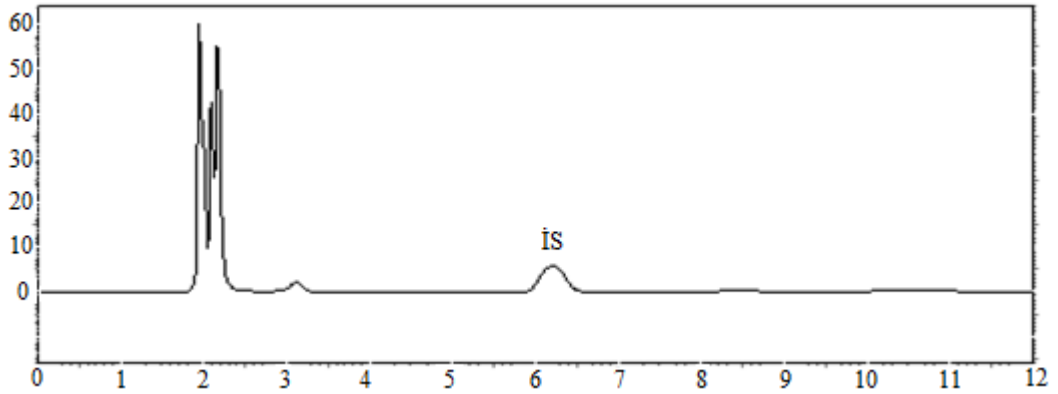
Çizelge 3.5. Günler-arası doğruluk ve kesinlik sonuçları

3.2.3. Seçicilik

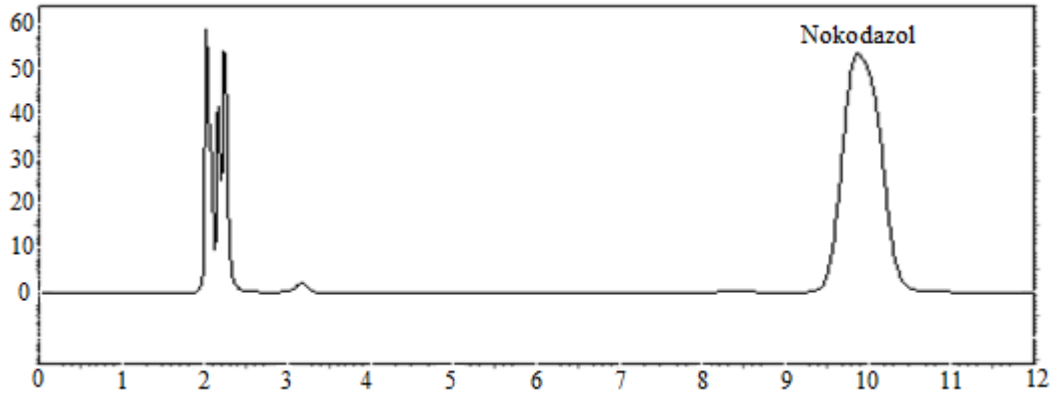
Seçicilik çalışması için hareketli faz, İS, Nokodazol standartından elde edilen kromatogramlar Şekil 3.4-3.7’de verilmiştir. Elde edilen kromatogramlar, nokodazol ve İS piklerinin birbirlerinden iyi bir biçimde ayrıldığını göstermektedir. Bu sonuçlara göre, yöntem seçici olduğu gösterilmiştir.



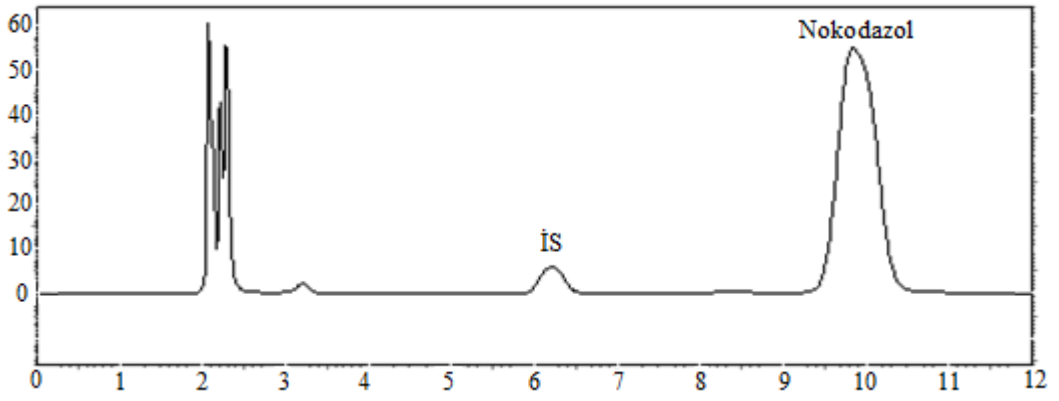
Şekil 3.4. BoşKLN faz kromatogramı



Şekil 3.5. İç standart madde kromatogramı



Şekil 3.6. Nokodazol kromotogramı



Şekil 3.7. İç standart madde ve nokodazol kromotogramı

3.2.3. Duyarlılık

Kullanılan analitik yöntemlerin düşük konsantrasyonları saptayabilme yeteneği olan duyarlılık çalışmasında, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır.

Saptama Sınırı

LOD, aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$LOD = \frac{3.3 \sigma}{S}$$

σ = cevabın standart sapması

S = kalibrasyon eğrisinin eğimi

Nokodazol ve İS içeren örneklerle kalibrasyon eğrisi çıkarılmıştır. Standart sapma olarak, regresyon doğrusunun y-kesişim değerlerinin standart sapması kullanılmıştır.

$$LOD = \frac{3.3 * 0.003747}{0.1909} = 0.06477$$

Miktar Tayini Sınırı

LOQ, aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S}$$

σ = cevabın standart sapması

S = kalibrasyon eğrisinin eğimi

$$LOQ = \frac{10 \times 0.003747}{0.1909} = 0.1962$$

Yöntemin duyarlılığı için kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte ölçülebilen en düşük konsantrasyon 0.2 ppm olarak belirlenmiştir. Hesaplanan LOD ve LOQ, bu değerlerin çok altındadır ve yöntemin duyarlılığının uygunluğunu göstermektedir.

Çalışma Aralığı

Doğrusallık için, 0.5 – 1000 ppm konsantrasyon aralığında hazırlanan kalibrasyon setleri ile çalışılmış ve doğrusal eşitlik oluşturulmuştur.

3.2.5. Sağlamlık/Tutarlılık

Yöntem parametrelerinin çeşitliliği denenerek, yöntemin güvenilir olduğu gösterilmiştir.

Hareketli Faz

Hareketli faz olarak 45:55 (metanol:su) kullanılmıştır. Nokodazol pikindeki morfolojik bozukluk (asimetri, kuyruklanma, geniş pik tabanı) nedeniyle tampon çözeltisi kullanılmaya karar verildi. Daha sonra 45: 42.5: 12,5 oranında (metanol:su:fosfat tamponu) kullanılmasına karar verildi.

Akış Hızı

Akış hızı, kolonun özelliklerine göre 0.8-1.5 mL.dk.⁻¹ aralığında denenmiştir. En uygun pik şekli ve alıkonma zamanı için 1mL.dk.⁻¹ akış hızında çalışılmasına karar verilmiştir. Karar verilen akış hızındaki uygun geri basınç 102 bar olarak görülmüştür.

Enjeksiyon Hacmi

Enjeksiyon hacmi kolonun koşullarına bağlı olarak, 5-20 µL aralığında denenmiştir. Çözücü front'u yaklaşık olarak 2. dakikada gelmiştir. Kolon hacmi, akış hızı ile çözücü front'unun çarpılmasıyla bulunmuştur.

$$\text{Kolon Hacmi} = 1\text{mL.dk.}^{-1} \times 2 \text{ dk.} = 2 \text{ mL}$$

Enjeksiyon hacmi olarak, kolon hacminin en fazla %1'i olan 20 µL uygun görülmektedir.

Kolon

İlk olarak, maddenin apolar yapısından dolayı 150×4.6 mm, 5µ C₁₈ Thermo kolon kullanılmıştır. Alıkonma zamanlarını azaltmak ve piklerin birbirinden ayrılmasını sağlamak için, ayrıca kolon uzunluğu daha uzun olan 250×4.6 mm, 5µ C₁₈ Thermo kolon ile de çalışmalar yapılmış fakat alıkonma zamanlarının arttığı, pik taban genişliğinin arttığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla tüm çalışmalar için 150×4.6 mm, 5µ C₁₈ Thermo kolon tercih edilmiş ve bu kolonda çalışmalar yapılmıştır.

İç Standart Madde

İç standart madde olarak naproksen, diklofenak, parasetamol gibi bazı maddeler denenmiştir. İS ile etken maddenin ayırım faktörü, alıkonma zamanları ve ortak bir dalga boyunda ikisinin de pik vermesi incelenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda, İS olarak, naproksen'in kullanılmasına karar verilmiştir.

3.2.6. Sistem Uygunluk Testi

Sistem uygunluk testinin ekipman bilgileri için, YPSK cihazının parçaları, marka ve modelleri Çizelge 3.6'da verilmiştir. YPSK yöntem validasyonu ve

miktar tayini işlemleri için, AÜBİBAM’da bulunan, Shimadzu marka cihaz kullanılmıştır.

Parçalar	Marka	Model
Sistem Kontrol	Shimadzu	SCL-10 A VP
Pompa	Shimadzu	LC-10 AT VP
Degazer	Shimadzu	DGU-14 A
Otoenjektör	Shimadzu	SIL-10 AD
Diode array dedektör	Shimadzu	SPD-MID A VP
Kolon fırını	Shimadzu	CTO-10 AC VP

Çizelge 3.6. YPSK cihazının parça, marka ve modelleri

Pik Morfolojisi

Yapılan analizlerden elde edilen kromatogramlardaki nokodazol ve İS’nin pik morfolojisi YPSK cihazının software’i kullanılarak hesaplanmıştır. Çizelge 3.7’de sistem uygunluk testi parametreleri verilmiştir.

Parametreler	Nokodazol
Kapasite Faktörü	3.98
Asimetri Faktörü	1.18
Teorik Tabaka Sayısı	2374.08

Çizelge 3.7. Sistem uygunluk testi parametreleri

3.3. Parçacık Büyüklüğü ve Dağılımı

Parçacık büyüklüğü ve büyüklük dağılımı, kolloidal taşıyıcı sistemlerin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan en önemli verilerden birisidir. Özellikle süspansiyon ve emülsiyon gibi taşıyıcı sistemlerin, fiziksel kararlılık ve etkinlik açısından başarılı formülasyonu, ürünün partikül büyüklüğüne bağlıdır (Takka ve ark., 2007).

Parçacık büyüklüğü geniş olan sistemlerde, küçük parçacıkların yüzeyindeki serbest enerji, büyük parçacıklardan daha fazladır. Bu tür sistemlerde küçük parçacıklar kristallenerek, daha büyük parçacıklar oluşturur. Polimorfizm, kristal ve amorf yapının birlikte kullanılması, sıcaklık değişiklikleri, aşırı miktarda yüzey

etken madde kullanılması da kristal büyümenin nedenleri arasındadır (Takka ve ark., 2007).

Nokodazol ve üretilen nokodazol yüklü KLN'ler, partikül büyüklüğü ve polidisperslik indisi açısından, Zeta sizer ile oda sıcaklığında, 90°'lik açı ile değerlendirildi (n=3). Örnekler değerlendirilmeden önce filtre edilmiş, 2.5 mL bidistile su (pH 7) ile seyreltilmiştir.

Boş KLN formülasyonlarının 0. gün ölçümlerinde 25°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 146.8 nm, 4°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 147.9 nm ve 40°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlarda 149.5 nm bulunmuştur. 30. gün de ölçüldüğünde bu değer, 25°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 172.7 nm 4°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 171.4 nm ve 40°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 174 nm'ye kadar arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, 90. günde ölçüldüğünde 25°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 172.8 nm, 4°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 146.9 nm ve 40°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 173.6 nm olduğu gözlemlenmiştir. Formülasyonların 0. gün ve 90.gün parçacık büyüklüğü bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış; 4°C, 25°C ve 40°C'lık ortamda bekletilen formülasyonların parçacık büyüklükleri arasında fark gözlemlenmemiştir.

Nokodazol içeren KLN formülasyonlarının 0. gün ölçümlerinde 25°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 141.4 nm, 4°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 140.5 nm ve 40°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlarda 146.8 nm bulunmuştur. 30. gün de ölçüldüğünde bu değer, 25°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 145.9 nm 4°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 141.5 nm ve 40°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 151.7 nm'ye kadar arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, 90. günde ölçüldüğünde 25°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 146.9 nm, 4°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 145.9 nm ve 40°C'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 159.2 nm olduğu gözlemlenmiştir. Formülasyonların 0. zaman ve 90.gün parçacık büyüklüğü bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış; 4°C, 25°C ve 40°C'lık ortamda bekletilen formülasyonların parçacık büyüklükleri arasında fark gözlemlenmemiştir.

Hazırlanan formülasyonlarda parçacık büyüklüklerinde değişimin olmaması, KLN'lerin 90. gün sonunda kararlılıklarının bozulmadıklarını ve bekleme sırasında içlerinde agregatların oluşmaması şeklinde yorumlanabilir.

Parçacık büyüklüğü dağılımını değerlendirmek için ayrıca 0-1 arasında değerler olan polidisperslik indisi verileri de kullanılmıştır (Schöler ve ark., 2001). Sıfıra yakın değerlerin homojen dağılımı gösterdiği polidisperslik indisi verileri değerlendirildiğinde, formülasyonların yaklaşık olarak 0.300 gibi düşük değerler alarak homojen bir dağılıma sahip olduğu gösterilmiştir (Çizelge 3.8-3.10, Şekil 3.8-3.11).

Formülasyonlar		Partikül Boyutu (nm)		Polidispers İndisi (PI)	
		Ortalama (n=3)	S.S.	Ortalama (n=3)	S.S.
Nokodazol	4°C	2281	±1,9651	0,163	±0,01
	25°C	2677	±2,0367	0,296	±0,06
	40°C	2754	±2,1257	0,318	±0,03
Boş KLN	4°C	147,9	±1,7692	0,399	±0,02
	25°C	146,8	±1,3503	0,369	±0,04
	40°C	149,5	±1,5631	0,360	±0,03
Nokodazol yüklü KLN	4°C	140,5	±1,6371	0,342	±0,04
	25°C	141,4	±1,2014	0,334	±0,01
	40°C	146,8	±0,5291	0,300	±0,05

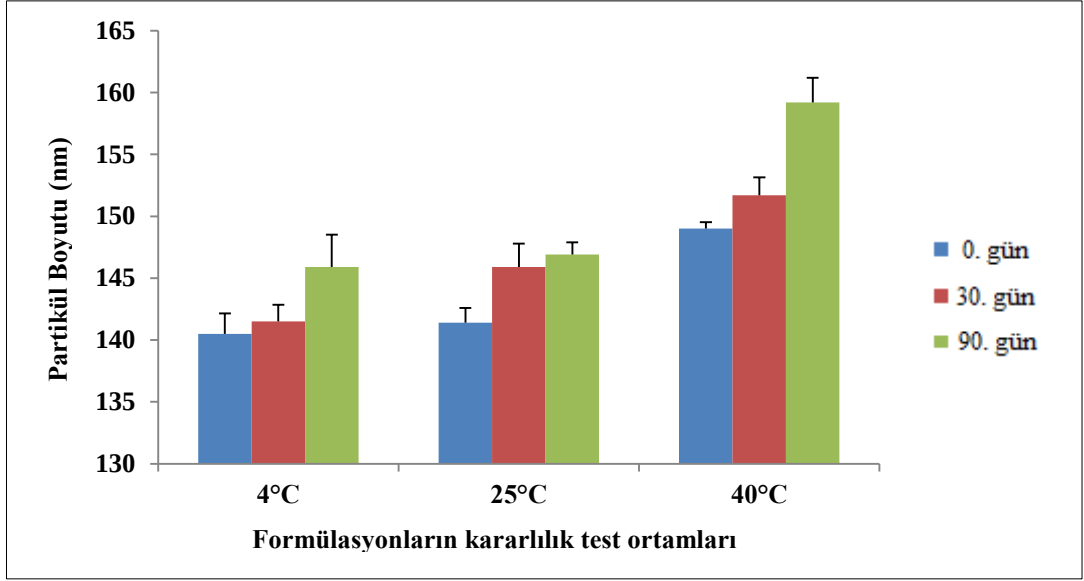
Çizelge 3.8. Nokodazol'ün, boş KLN'nin ve nokodazol yüklü KLN'lerin 0.gün farklı sıcaklıklardaki partikül boyutlarının ve polidispers indislerinin gösterilmesi

Formülasyonlar		Partikül Boyutu (nm)		Polidispers İndisi (PI)	
		Ortalama (n=3)	S.S.	Ortalama (n=3)	S.S.
Nokodazol	4°C	2304	±2,0456	0,172	±0,02
	25°C	2703	±1,9651	0,281	±0,04
	40°C	2921	±2,3420	0,324	±0,06
Boş KLN	4°C	171,4	±2,055	0,399	±0,04
	25°C	172,7	±1,4526	0,381	±0,01
	40°C	174,0	±0,8021	0,390	±0,05
Nokodazol yüklü KLN	4°C	141,5	±1,3503	0,396	±0,02
	25°C	145,9	±1,9000	0,351	±0,05
	40°C	151,7	±1,4525	0,372	±0,06

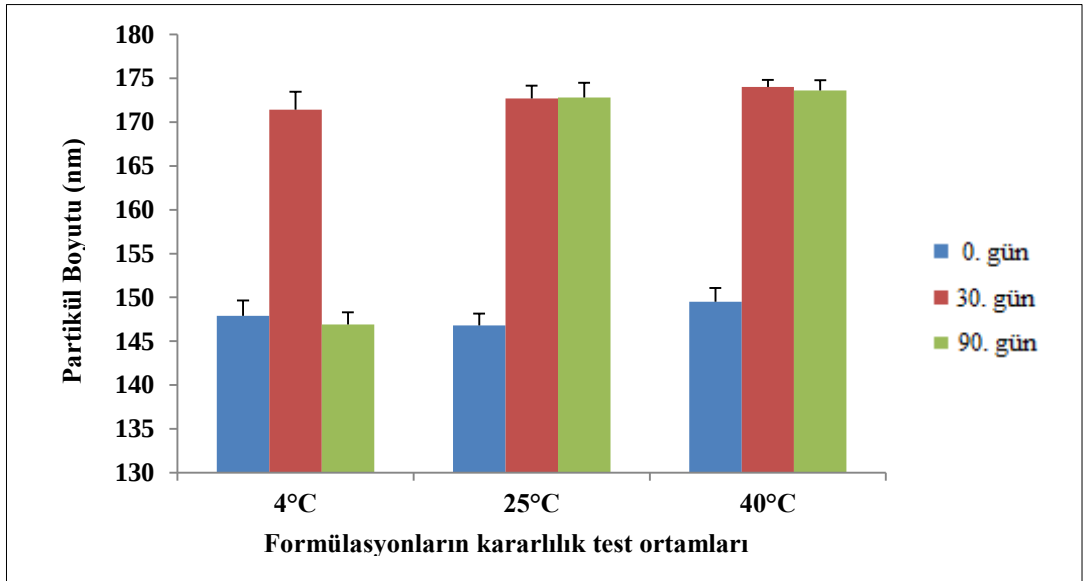
Çizelge 3.9. Nokodazol'ün, boş KLN'nin ve nokodazol yüklü KLN'lerin 30.gün farklı sıcaklıklardaki partikül boyutlarının ve polidispers indislerinin gösterilmesi

Formülasyonlar		Partikül Boyutu (nm)		Polidispers İndisi (PI)	
		Ortalama (n=3)	S.S.	Ortalama (n=3)	S.S.
Nokodazol	4°C	2281	±2,3245	0,196	±0,04
	25°C	2690	±2,7596	0,307	±0,01
	40°C	2965	±2,8420	0,389	±0,05
Boş KLN	4°C	146,9	±1,3868	0,451	±0,06
	25°C	172,8	±1,6703	0,402	±0,04
	40°C	173,6	±1,1590	0,436	±0,05
Nokodazol yüklü KLN	4°C	145,9	±2,6102	0,493	±0,04
	25°C	146,9	±1,0017	0,400	±0,06
	40°C	159,2	±1,9858	0,385	±0,05

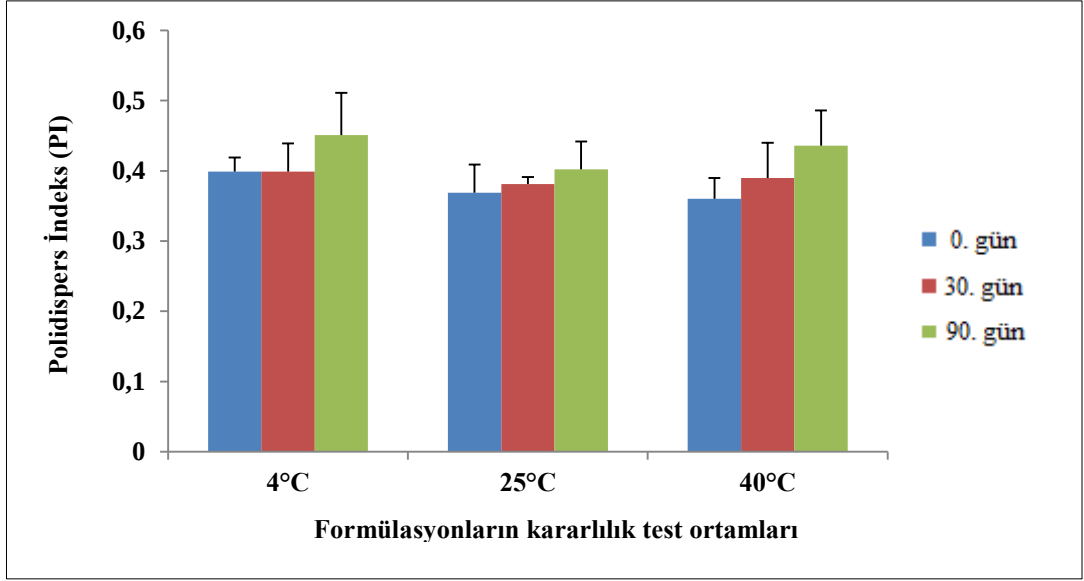
Çizelge 3.10. Nokodazol'ün, boş KLN'nin ve nokodazol yüklü KLN'lerin 90.gün farklı sıcaklıklardaki partikül boyutlarının ve polidispers indislerinin gösterilmesi



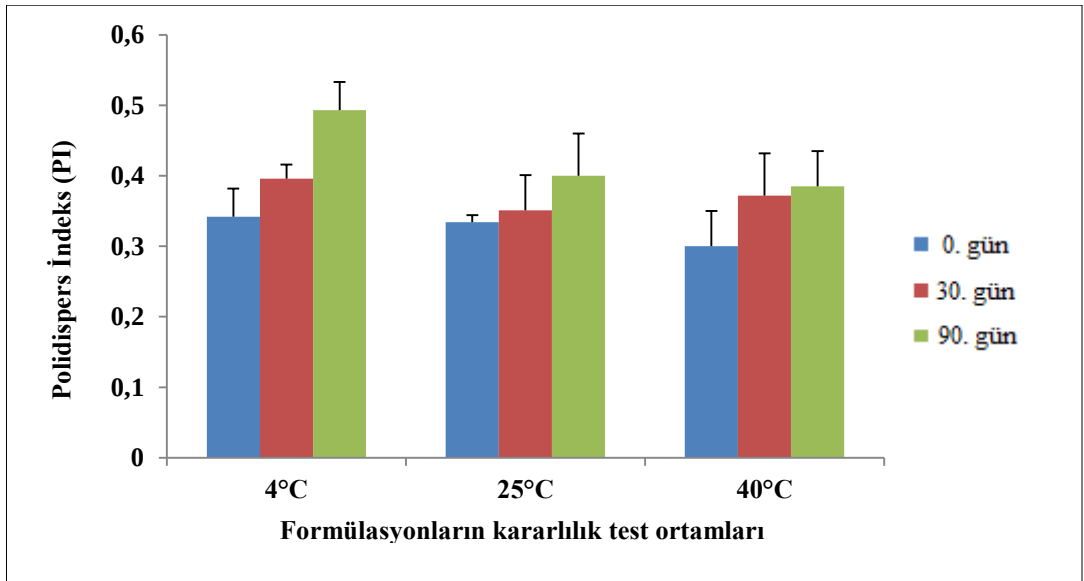
Şekil 3.8. Nokodazol yüklü KLN'lerin 0., 30. ve 90.günlerde farklı sıcaklıklardaki partikül boyutlarının grafiksel olarak gösterilmesi



Şekil 3.9. Boş KLN'lerin 0., 30. ve 90.günlerde farklı sıcaklıklardaki partikül boyutlarının grafiksel olarak gösterilmesi



Şekil 3.10. Boş KLN'lerin 0., 30. ve 90.günlerde farklı sıcaklıklardaki polidispers indekslerinin grafiksel olarak gösterilmesi



Şekil 3.11. Nokodazol yüklü KLN'lerin 0., 30. ve 90.günlerde farklı sıcaklıklardaki polidispers indekslerinin grafiksel olarak gösterilmesi

3.4. Zeta Potansiyeli

4°C, 25°C, 40°C'lık ortamlarda bekletilen boş KLN formülasyonlarının ve nokodazol yüklü KLN formülasyonlarının 0., 30. ve 90. günlerdeki zeta potansiyelleri ve elektriksel iletkenlikleri çizelge 3.11-3.13'de verilmiştir.

Kolloidal parçacıklar dispersiyon ortamında iyon adsorbe ederler. Pozitif ve negatif olarak yüklenirler. Zeta potansiyel, parçacığın yüzeyi üzerindeki net etkili yükü gösterir (Çelebi, 2007).

Formülasyonlar		Zeta Potansiyel (mV)			İletkenlik (mS.cm ⁻¹)		
		Ortalama (n=3)	%BSS	SH	Ortalama (n=3)	%BSS	SH
BoşKLN	4°C	-25	1.45	0.21	0.05	1.38	0.0004
	25°C	-25.7	1.82	0.28	0.06	0.86	0.0003
	40°C	-24.9	1.73	0,25	0.04	1.73	0.0004
Nokodazol yüklü KLN	4°C	-25.8	1.61	0.24	0.05	1.74	0.0005
	25°C	-27.7	1.98	0.32	0.07	1.97	0.0008
	40°C	-26.9	1.86	0.29	0.06	1.44	0.0005

Çizelge 3.11. Boş KLN'lerin ve nokodazol yüklü KLN'lerin 0.gün farklı sıcaklıklardaki zeta potansiyel değerlerinin ve iletkenlik değerlerinin gösterilmesi

Formülasyonlar		Zeta Potansiyel (mV)			İletkenlik (mS.cm ⁻¹)		
		Ortalama (n=3)	%BSS	SH	Ortalama (n=3)	%BSS	SH
BoşKLN	4°C	-25.8	1.94	0.29	0,07	1.48	0.0006
	25°C	-24.1	1.94	0.27	0.06	1.44	0.0005
	40°C	-24.3	1.78	0.25	0.04	0.86	0.0002
Nokodazol yüklü KLN	4°C	-26.2	1.98	0.30	0.05	1.98	0.0006
	25°C	-28.6	1.93	0.32	0.06	1.44	0.0005
	40°C	-27.5	1.82	0.29	0.06	1.15	0.0004

Çizelge 3.12. Boş KLN'lerin ve nokodazol yüklü KLN'lerin 30.gün farklı sıcaklıklardaki zeta potansiyel değerlerinin ve iletkenlik değerlerinin gösterilmesi

Formülasyonlar		Zeta Potansiyel (mV)			İletkenlik (mS.cm ⁻¹)		
		Ortalama (n=3)	%BSS	SH	Ortalama (n=3)	%BSS	SH
BoşKLN	4°C	-24.9	1.94	0.28	0.04	1.29	0.0003
	25°C	-24.2	1.79	0.25	0.06	1.44	0.0005
	40°C	-23.1	1.58	0.21	0.07	1.48	0.0006
Nokodazol yükü KLN	4°C	-24.1	1.87	0.26	0.06	1.44	0.0005
	25°C	-24.8	1.88	0.27	0.07	1.97	0.0008
	40°C	-25.2	1.99	0.29	0.05	1.03	0.0003

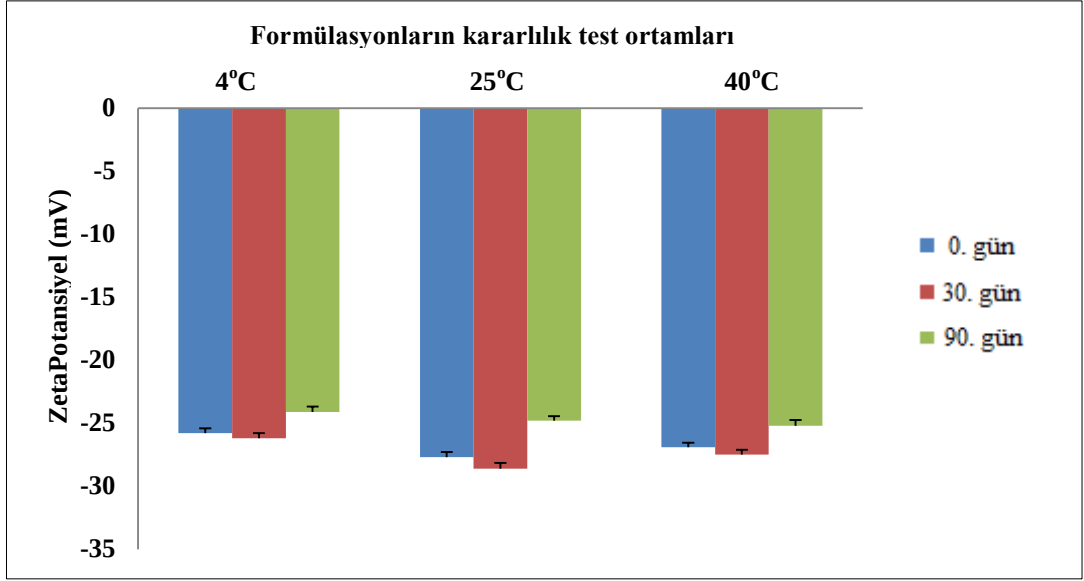
Çizelge 3.13. Boş KLN'lerin ve nokodazol yükü KLN'lerin 90.gün farklı sıcaklıklardaki zeta potansiyel değerlerinin ve iletkenlik değerlerinin gösterilmesi

KLN'lerin zeta potansiyelinin ölçümü, koloidal dispersiyonlarda saklama dayanıklılığı hakkında bilgi vermektedir (Kaş, 2004). Genel olarak yüksek zeta potansiyeline sahip sistemlerde agregatların oluşması daha zordur. (Müller ve ark., 2000).

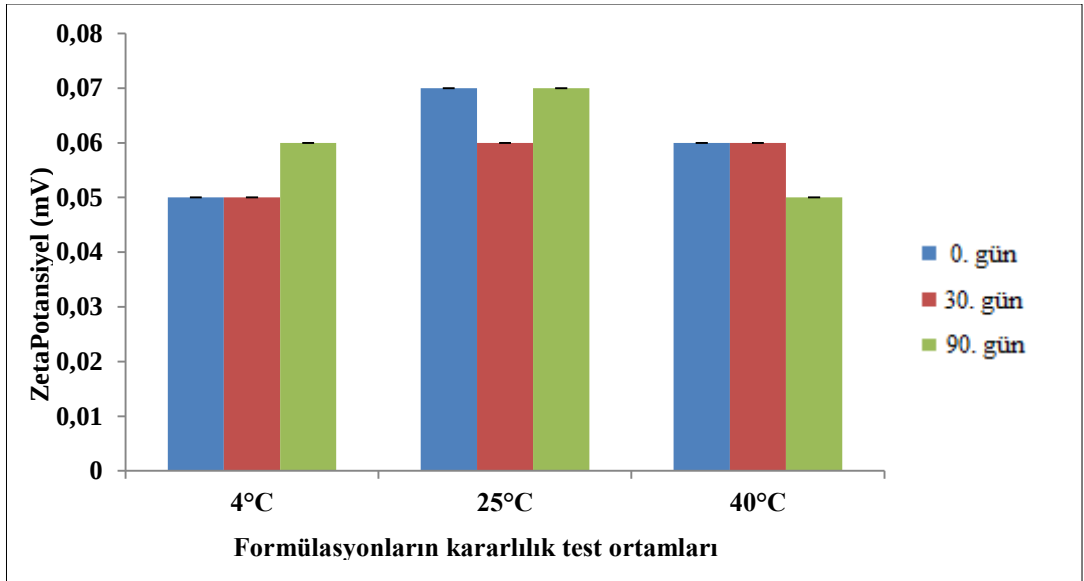
Elektriksel iletkenlikleri, -31 ile -60 mV aralığındaki formülasyonlar orta dereceli, -61 ile -80 mV aralığındaki formülasyonlar iyi ve -81 ile -100 mV aralığındaki formülasyonlarda mükemmel elektrostatik kararlılığa sahip sistemler olarak tanımlanmaktadır (Müller ve Heinemann, 1993).

Nokodazol içeren formülasyonların 0. gün ölçümlerinde ortalama zeta potansiyel -25 mV olarak bulunmuştur. 90. gün sonunda bu değer 25°C sıcaklıkta bekletilen formülasyonlar için -21 ile -31 mV, 4°C sıcaklıkta bekletilen formülasyonlar için -20 ile -30 mV ve 40°C sıcaklıkta bekletilen formülasyonlar için -13 ile -26 mV aralığında gözlemlenmiştir. Formülasyonların 0. zaman ve 90. gün zeta potansiyel bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış; 25°C, 4°C ve 40°C'lık ortamlarda bekletilen formülasyonlarda fark görülmemiştir.

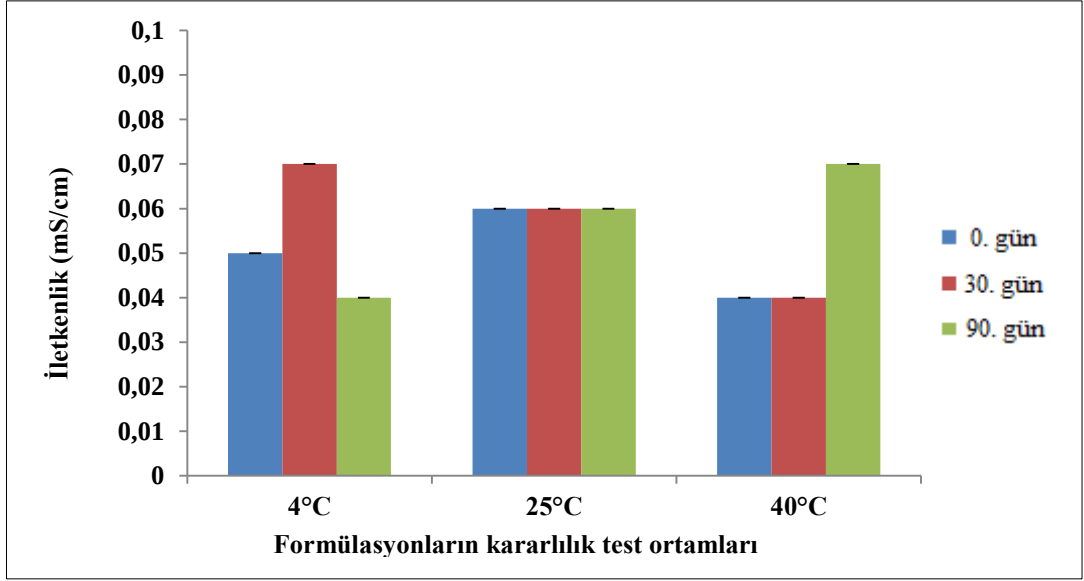
Saklama süresi boyunca zeta potansiyel değerleri arasında fark görülmemesinden dolayı, formülasyonların 90. gün ölçümlerinde kararlı bir yapıda kaldığı söylenebilir (Şekil 3.12-3.15).



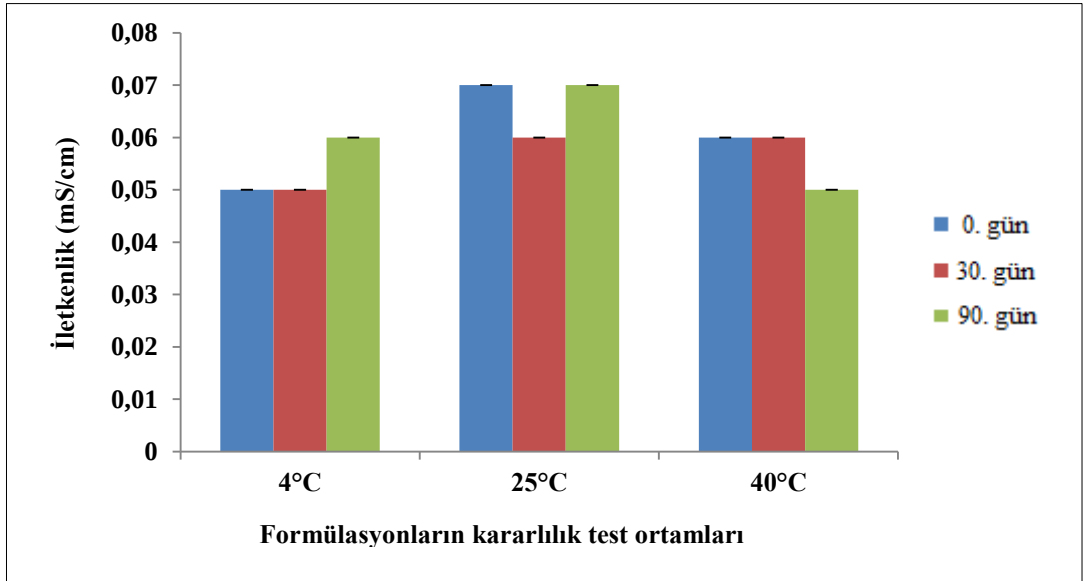
Şekil 3.12. Nokodazol yüklü KLN'lerin 0., 30. ve 90.günlerde farklı sıcaklıklardaki zeta potansiyellerinin grafiksel olarak gösterilmesi



Şekil 3.13. Boş KLN'lerin 0., 30. ve 90.günlerde farklı sıcaklıklardaki zeta potansiyel değerlerinin grafiksel olarak gösterilmesi



Şekil 3.14. Boş KLN'lerin 0., 30. ve 90.günlerde farklı sıcaklıklardaki elektriksel iletkenlik değerlerinin grafiksel olarak gösterilmesi



Şekil 3.15. Nokodazol yüklü KLN'lerin 0., 30. ve 90.günlerde farklı sıcaklıklardaki elektriksel iletkenlik değerlerinin grafiksel olarak gösterilmesi

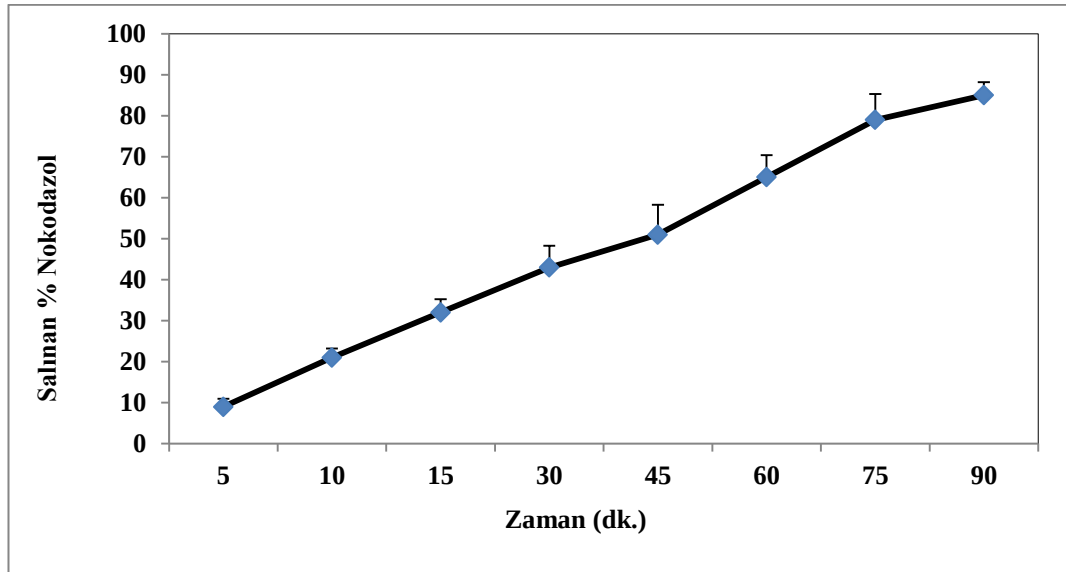
3.5. Etken Madde Yükleme Etkinliği

Nokodazol yüklü KLN'lerin etken madde yükleme kapasitesine bakıldığında yöntemler kısmında verilen formüle göre hesaplandığında %85

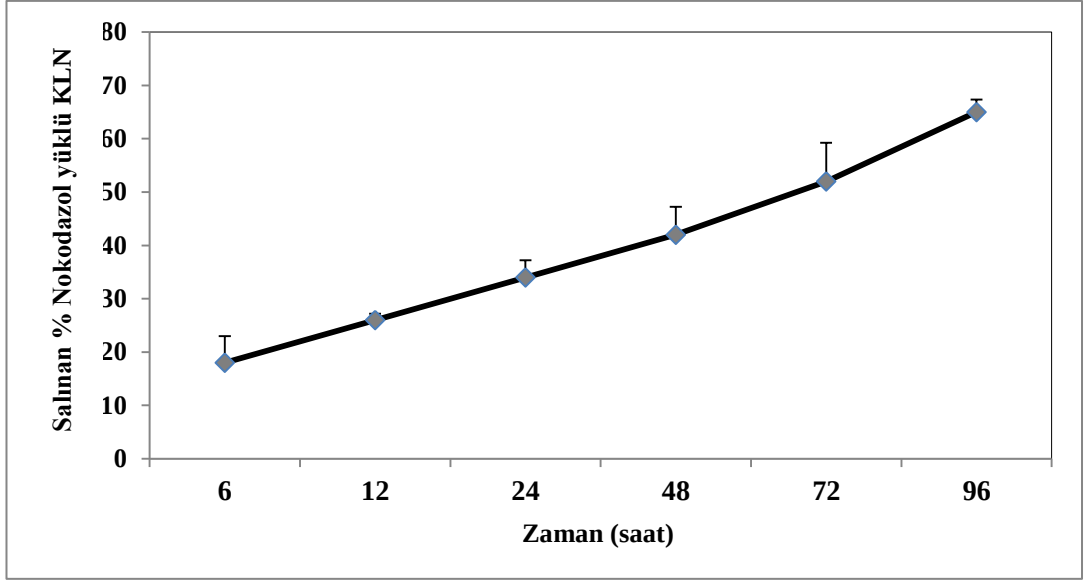
olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak; nokodazol yüklü KLN'lerin etken madde yükleme kapasitesi yüksek olduğu için uzun süre salım yapabilme kapasitesine sahip olduğu ve sıcak homojenizasyon tekniği ile üretilen bu nanopartiküllerin başarılı bir şekilde üretilip, yüksek oranda etken madde hapsettiği bulunmuştur.

3.6. İlaç Salımının Belirlenmesi

Elde edilen pik şiddetine göre salıverilen nokodazol miktarı doğru denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Salım bulguları zamana karşı yüzde salım grafiğine geçirildiğinde; nokodazol'un 1.5 saatte neredeyse tamamen salındığı görülürken (Şekil 3.16), nokodazol yüklü KLN'lerin en fazla %65 nokodazol'u salım yaptığı bulunmuştur (Şekil 3.17). Sonuç olarak; nokodazol yüklü KLN kontrollü salım yaptığı ve nokodazol'e göre salım süresinin daha uzun sürdüğü bulunmuştur. Ayrıca bekleme sırasında (3 ay) formülasyonlarda herhangi bir agregasyona olamaması ve zeta potansiyellerinin değişmemesi, hazırlanan KLN'lerin kararlı bir formülasyon olduğunu da göstermektedir.



Şekil 3.16. Nokodazol'un zamana bağlı salım grafiği (pH6.8)



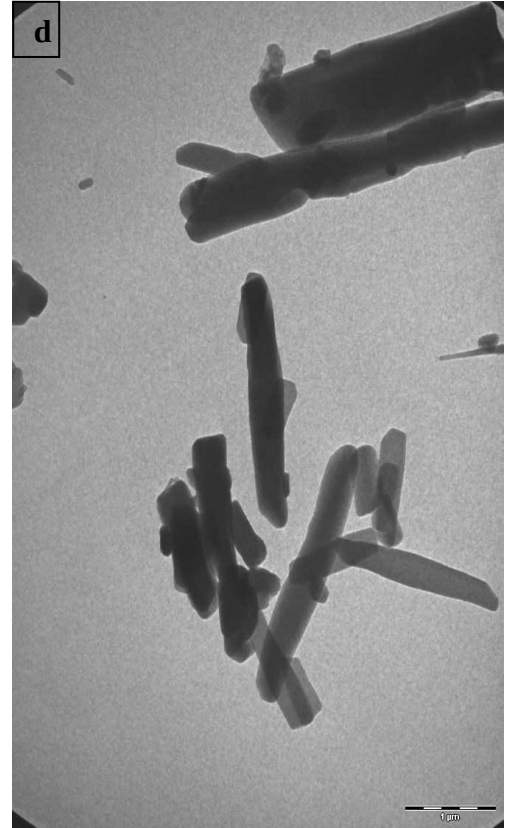
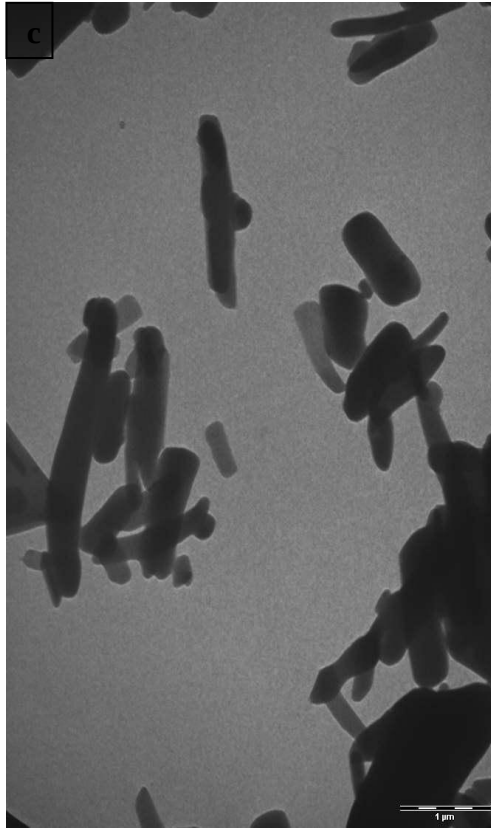
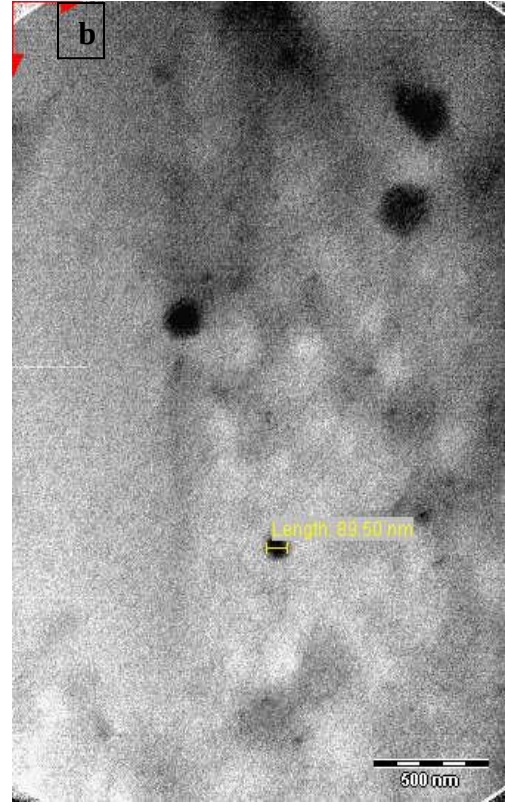
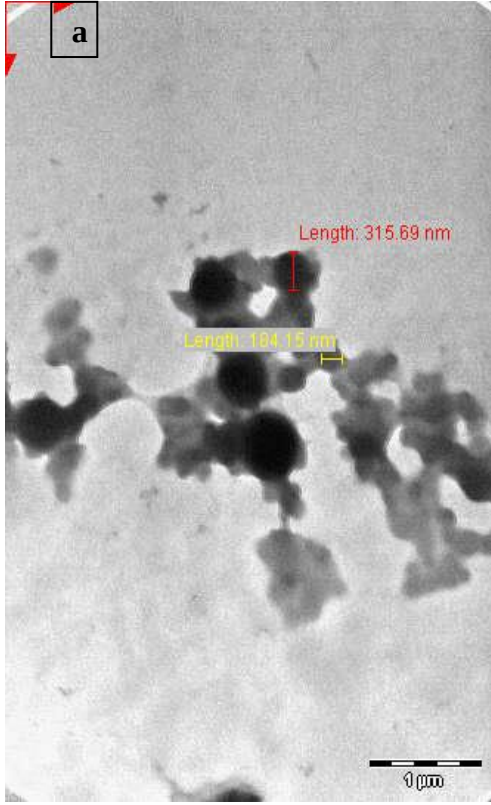
Şekil 3.17. Nokodazol yüklü KLN'lerin zamana bağlı salım grafiği (pH6.8)

3.7. Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi

KLN süspansiyonlarının morfolojik incelemesi için Leica DM100 ışık mikroskobu kullanılarak ön çalışmalar yapılmış, görüntü elde edilememiş ve bu yüzden taramalı elektron mikroskopunda incelemeler yapılmasına karar verilmiştir.

Hazırlanan KLN süspansiyonlarının morfolojik incelemesi taramalı elektron mikroskopu ve TEM ile yapılmış ve görüntüler şekil 29'da verilmiştir.

KLN'lerin morfolojik incelenmesi için ışık mikroskopunda başarısız sonuçlar alınmasından dolayı incelemeler TEM ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen görüntülere bakıldığında, nokodazol'un şeklinin kristal yapıda ve mikron boyutunda olmasına rağmen KLN formülasyonlarının küresel şekilde ve mikronaltı boyutta olduğunu göstermiştir (Şekil 3.18).



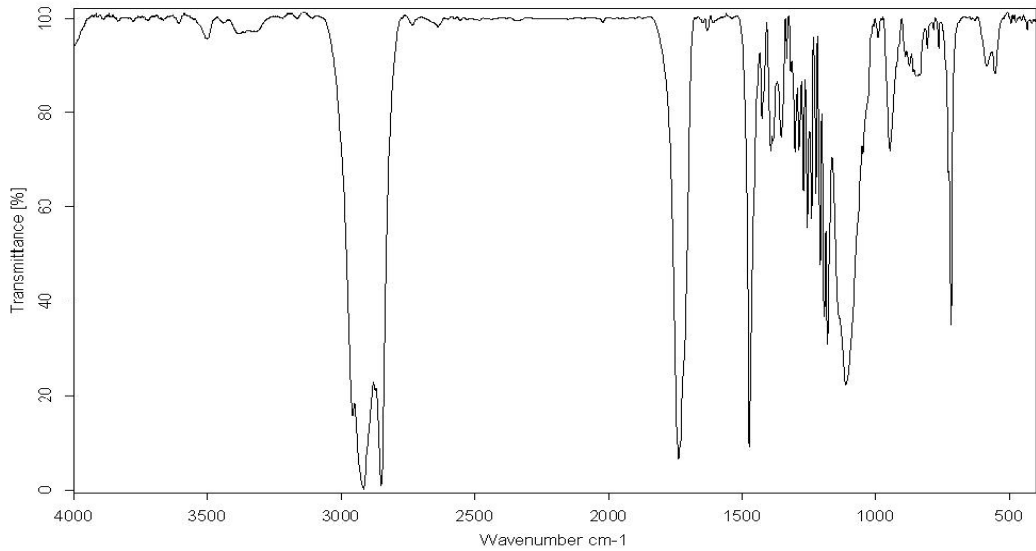
Şekil 3.18. a,b)Nokodazol yüklü KLN'lerin TEM görüntüleri, c,d) Nokodazol'ün TEM görüntüleri

3.8. FT-IR Spektrumu

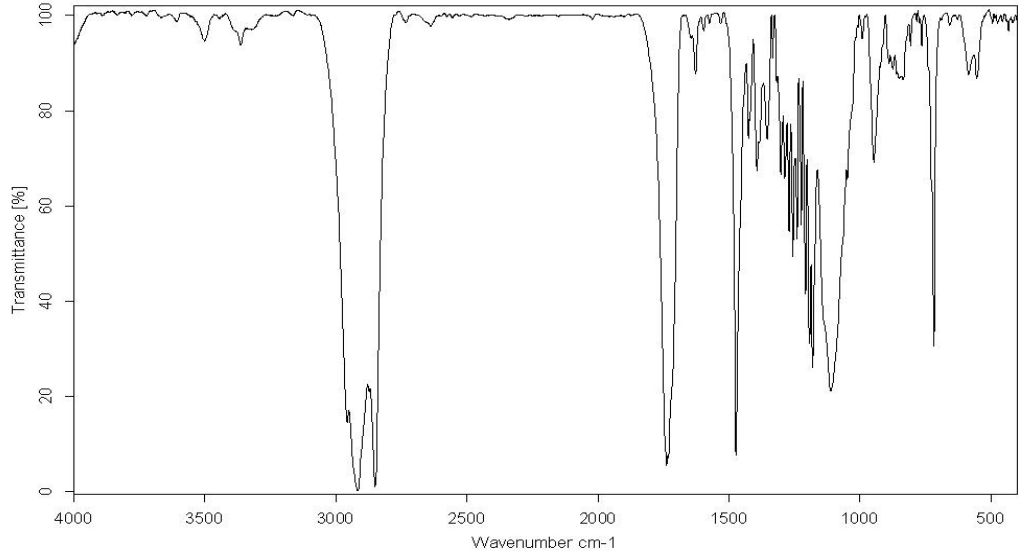
Nokodazol, boş KLN ve nokodazol yüklü KLN formülasyonlarının KBr kullanılarak FT-IR spektrumları alınmış, analizlerden elde edilen sonuçlar Şekil 3.19-3.21’de verilmiştir.

FT-IR spektrumlara bakıldığında boş KLN ve nokodazol yüklü KLN formülasyonunun spektrumlarında KLN formülasyonlarının spektrumlarında nokodazole ait olan karbonil piklerinin kaymaya uğradığı ve diğer piklerden ayrıldığı görülmüştür. Bu pik’in 3000 cm^{-1} ’de görülmediği için bu pikin su piki değil karbonil piki olduğuna karar verilmiştir. Bunu dışında her hangi farklı bir pik’in olmadığı ve çıkan piklerde her hangi bir kimyasal kaymanın olmadığı gözlemlenmiştir. Bunun sonucu olarak da etken madde ile kullanılan lipid arasında her hangi bir kimyasal etkileşimin olmadığı ve KLN yapımında kullanılan maddelerin nokodazolün kimyasal çevresini değiştirmedeği görülmüştür.

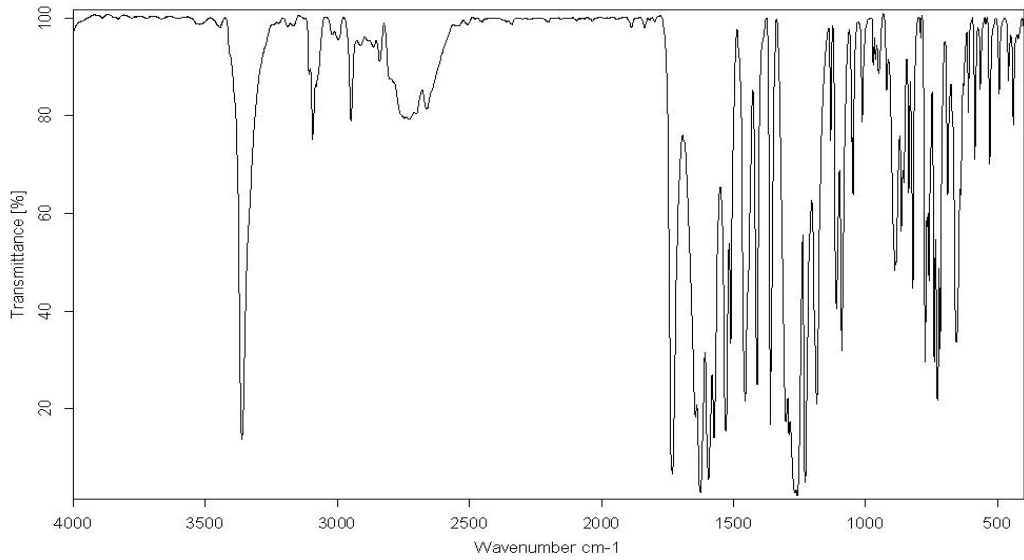
1600 cm^{-1} ’de beklenen karbonil piki 1738 cm^{-1} ’de gelmiştir. Nokodazol’ün yapısında iki tane karbonil grubu olmasına rağmen bu karbonil grubunun kimyasal çevrelerinin aynı olmasından dolayı karbonil pikinde yarıma görülmemiştir. Ayrıca, 400 cm^{-1} ’in altındaki dalga boylarını görmek raman spektroskopisine başvurulmuştur.



Şekil 3.19. Boş KLN’lerin FT-IR spektrumları



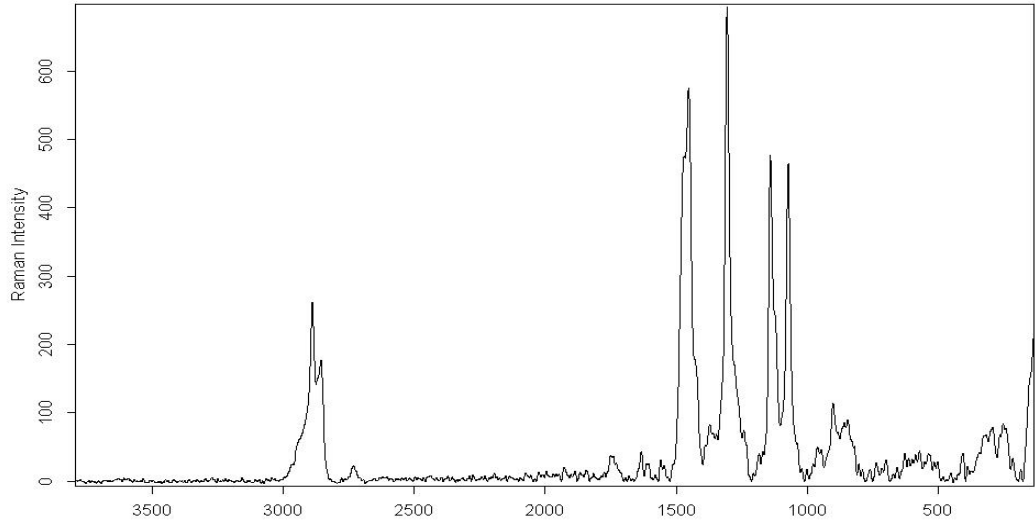
Şekil 3.20. Nokodazol yüklü KLN’lerin FT-IR spektrumları



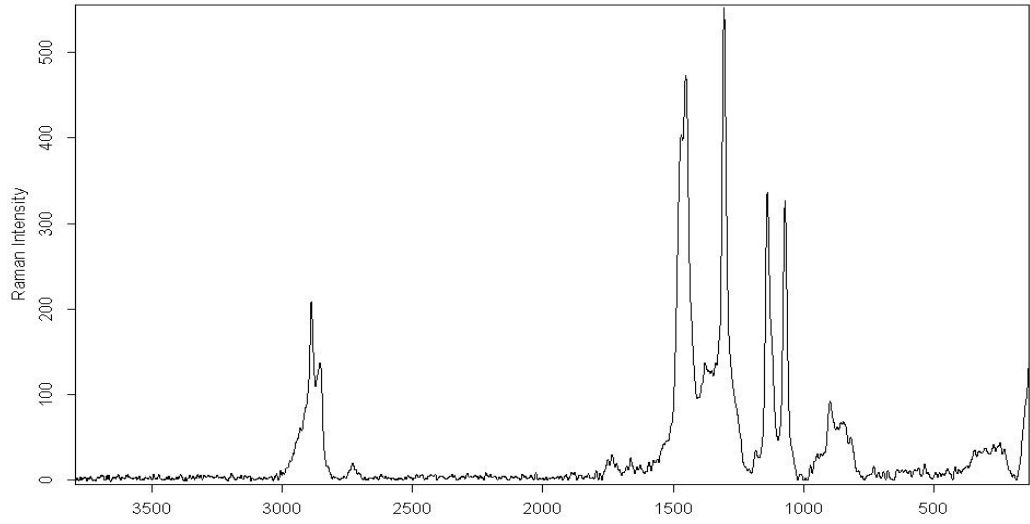
Şekil 3.21. Nokodazol’ün FT-IR spektrumu

3.9. Raman Spektrumu

Boş KLN ve nokodazol yüklü KLN formülasyonlarının Raman spektrumları alınmış, analizlerden elde edilen sonuçlar Şekil 3.22-3.23’de verilmiştir. Raman spektrumlarına bakıldığında da yeni piklerin olmadığı ve piklerde her hangi bir kimyasal kaymanın olmadığı dolayısıyla etken madde ve lipid arasında her hangi bir etkileşimin olmadığı görülmüştür.



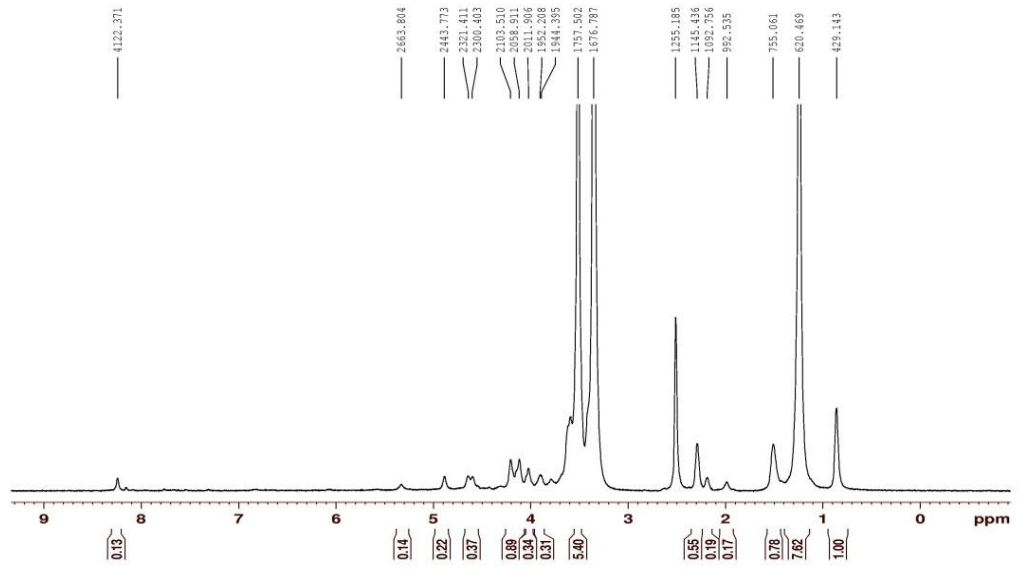
Şekil 3.22. Nokodazol yüklü KLN formülasyonlarının raman spektrumu



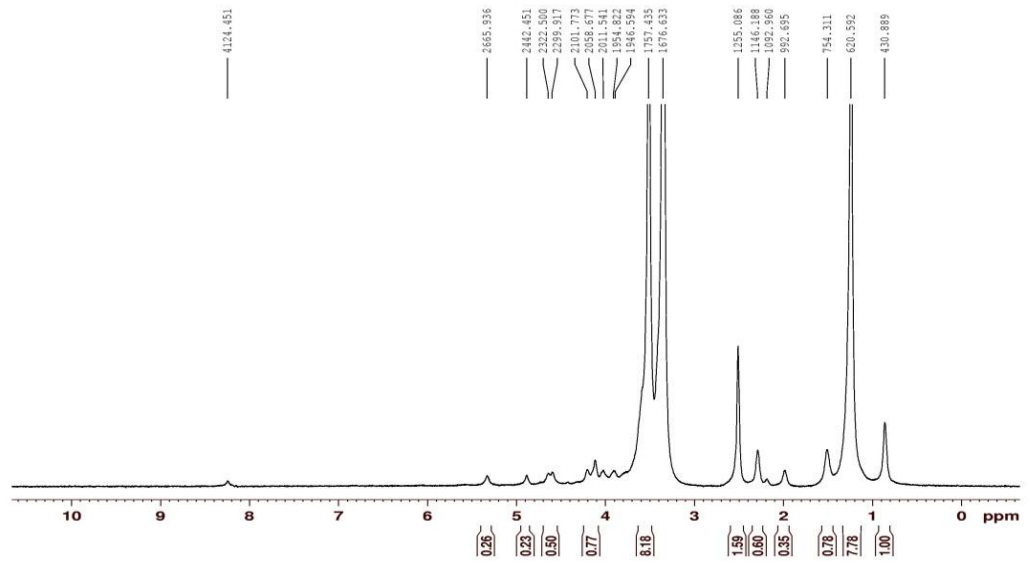
Şekil 3.23. Boş KLN formülasyonlarının raman spektrumu

3.10. NMR Spektrumu

40°C’de bekletilen formülasyonların 90. gün NMR analizlerinde çözücü olarak dötero-kloroform maddesi kullanılarak spektrumları alınmıştır (Şekil 3.24-3.25). Boş KLN ile nokodazol yüklü KLN’lerin spektrumları karşılaştırılmıştır. Nokodazol içeren KLN’lerin spektrumlarına bakıldığında incelenen bantlarda önemli bir kayma gözlemlenmemiştir. Elde edilen spektrumlar, formülasyonların 90. Gün sonunda kararlı olduğu şeklinde yorumlanmıştır.



Şekil 3.24. Nokodazol yüklü KLN'lerin NMR Spektrumu

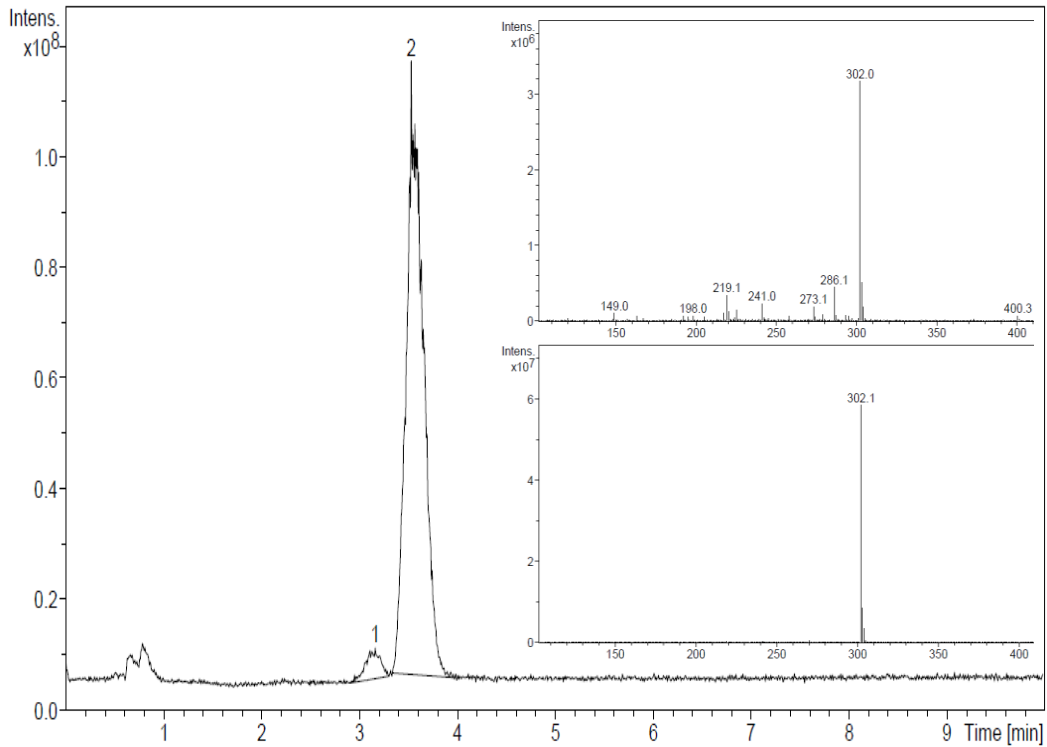


Şekil 3.25. Boş KLN'lerin NMR spektrumu

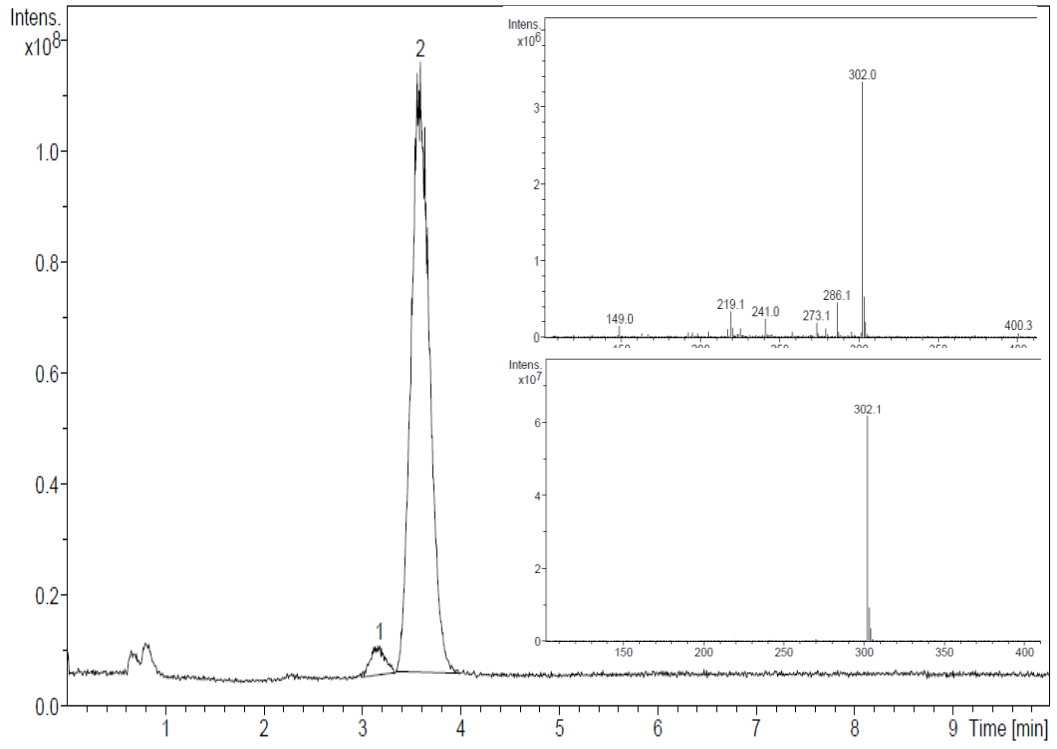
3.11. Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrumu (SK-KS)

SK-KS kullanılarak nokodazol yüklü KLN'lerin kararlılığına bakılmıştır. Yapılan analiz sonucunda standart olarak kullanılan nokodazol'un m/z (kütle/yük) sinyali 302'lik bir pozitif iyonizasyonu göstermiştir. Nokodazolün molekül kütesinin 301 olduğu düşünüldüğünde, alifatik sekonder amin grubu üzerinden +1 yüklenerek 302 m/z sinyalini oluşturduğu düşünülmektedir.

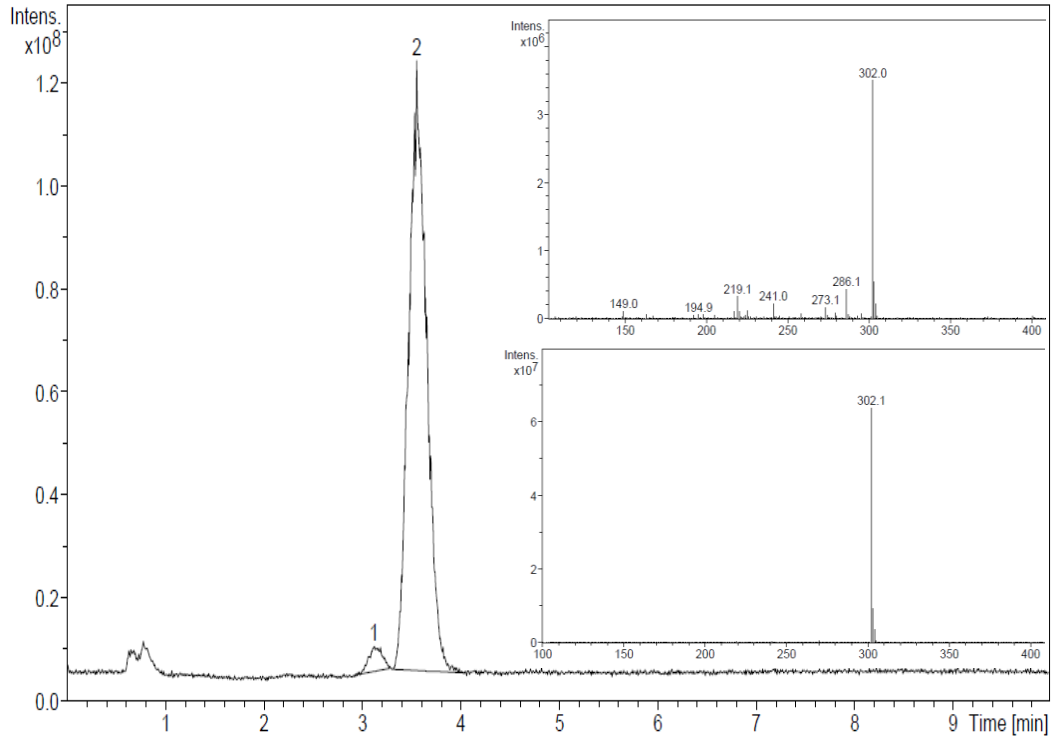
Oluşturulan farmasötik formülasyonun 4°C, 25°C ve 40°C'de 90 gün bekletilerek kararlılığı araştırılmıştır. Kararlılık çalışmalarında elde edilen SK-KS sinyallerinin alıkonma zamanı ve 302 m/z'leri, standart nokodazol'un alıkonma zamanı ve 302 m/z'leri ile karşılaştırılmıştır. Buna ek olarak, kararlılık çözeltilerinin kromatogramlarında, standart nokodazol'un kromatogramı esas alınarak bozunma ürünü aranmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda da elde edilen kromatogramlar ve kütle sinyalleri incelendiğinde, standart nokodazol'un kromatogramı ve kütle sinyali ile herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Böylelikle hazırlanan farmasötik preparatta belirtilen koşullarda herhangi bir kararlılık sorununun olmadığı gösterilmiştir (Şekil 3.26-3.29).



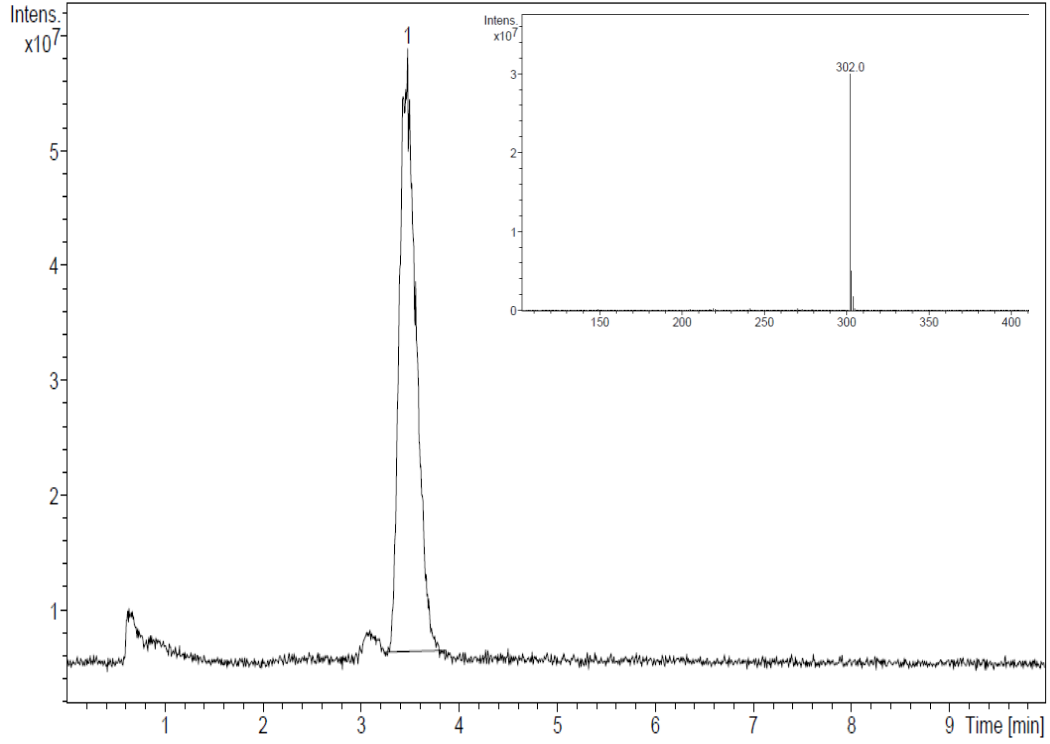
Şekil 3.26. 4°C'de bekletilen KLN formülasyonlarının SV-KS spektrumu



Şekil 3.27. 25°C’de bekletilen KLN formülasyonlarının SV-KS spektrumu



Şekil 3.28. 40°C’de bekletilen KLN formülasyonlarının SV-KS spektrumu



Şekil 3.29. Nokodazol'ün SV-KS spektrumu

3.12. Termal Analiz

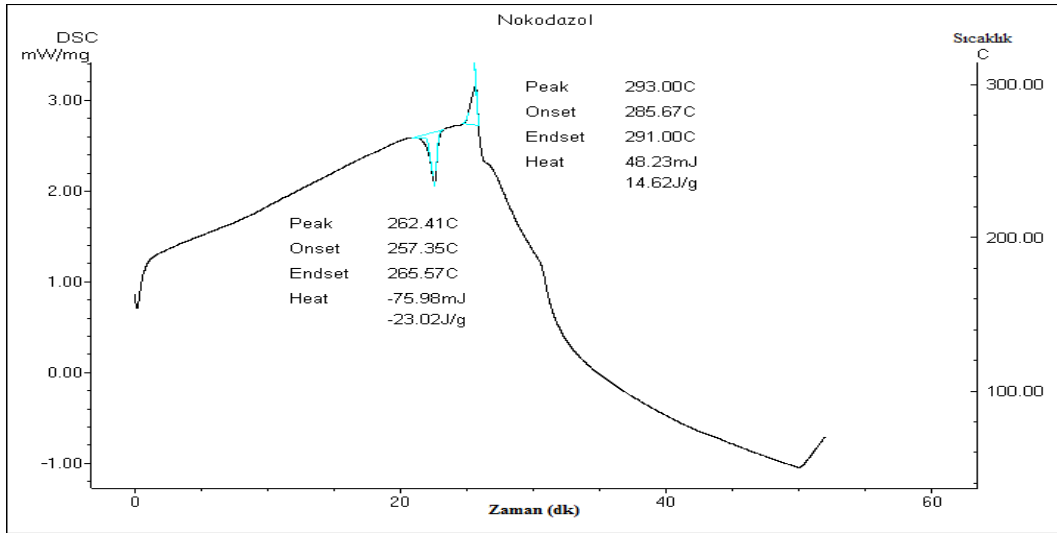
Nokodazol ve 25°C, 4°C, 40°C'lık ortamlarda bekletilen KLN formülasyonlarının erime derecesi ölçümü için, DSC kullanılmış, erime ve donma pikleri incelenmiştir (Şekil 3.30, Çizelge 3.14). Sonuçlara göre de nokodazol'ün erime derecesi 293°C bulunmuştur. 4 °C'de bekletilen KLN formülasyonlarının erime derecesi 74.02°C, tekrar kristallenme derecesinin 61.31°C olduğu, 25 °C bekletilen formülasyonların erime derecelerinin 74.26°C, tekrar kristallenme derecesi 60.15°C ve son olarak da 40 °C de bekletilen formülasyonun erime derecesinin 74.34°C ve tekrar kristallenme süresinin 60.38°C olduğu bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında 90 gün farklı sıcaklıklarda bekletilen KLN formülasyonları arasında erime ve tekrar kristallenme sıcaklıkları arasında önemli bir fark görülmemiştir. Bundan dolayı, 90 gün sonunda ve farklı sıcaklıklarda da bekletilen KLN formülasyonlarının kararlılıklarını sürdürdüğü, KLN içine

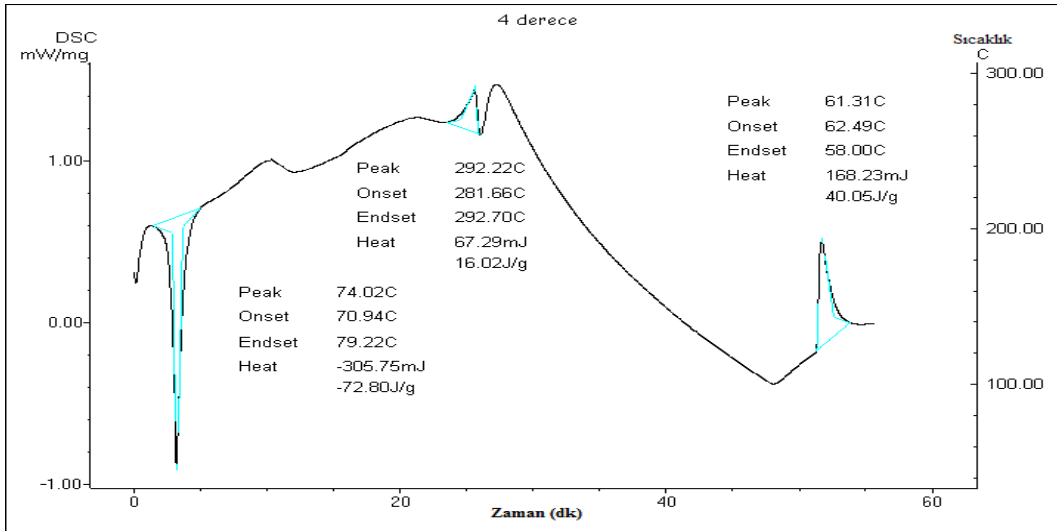
hapsedilmiş olan nokodazol'un de kararlılığını sürdürdüğü görülmüştür (Çizelge16, Şekil 41). Bu sonuçlar SK-KS ile desteklenmiştir.

Formülasyonlar	Erime		Donma	
	Sıcaklık (°C)	Isı (J.g ⁻¹)	Sıcaklık (°C)	Isı (J.g ⁻¹)
Nokodazol	293	14.62	-	-
4°C KLN	74.02	72.80	61.31	40.05
25°C KLN	74.26	67.49	60.15	37.41
40 °C KLN	74.34	62.16	60.38	37.80

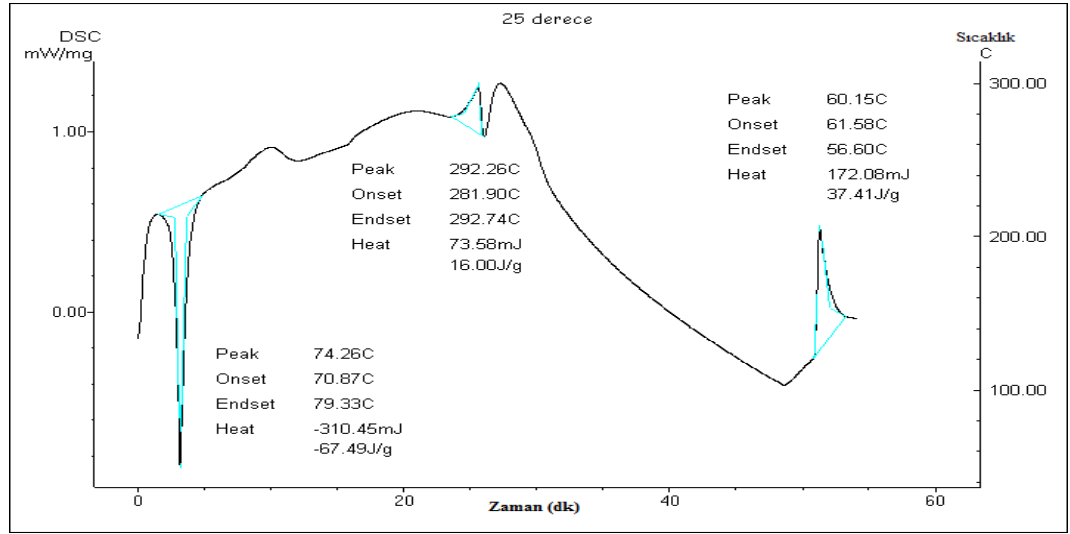
Çizelge 3.14. Nokodazol ve nokodazol yüklü KLN formülasyonlarının erime, donma sıcaklık ve ısı değerlerinin gösterilmesi



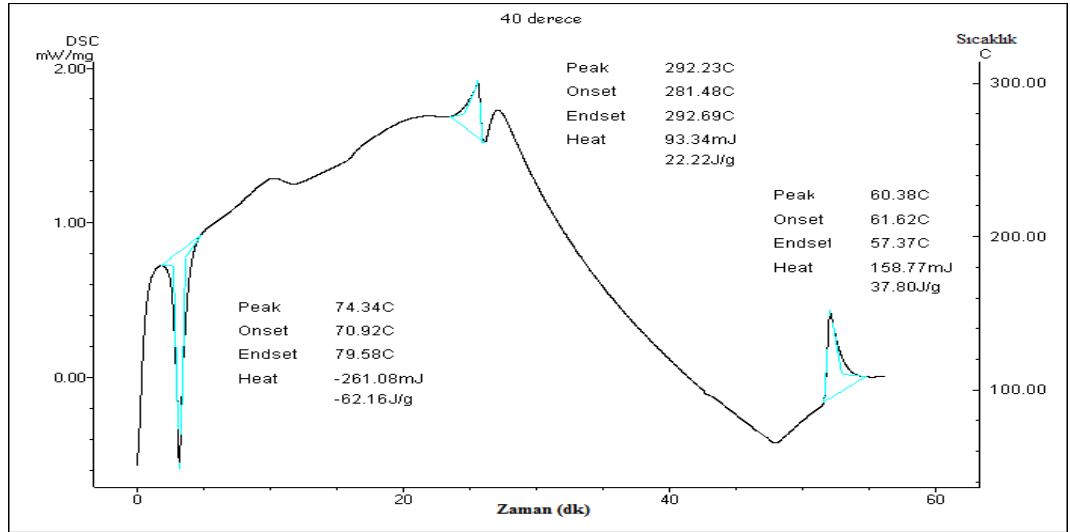
a.



b.



c.



d.

Şekil 3.30. Nokodazol ve nokodazol içeren katı lipid nanopartikül formülasyonlarının termal analizi

a. Nokodazol b. 90. gün, 4°C c. 90. gün, 25°C d. 90. gün, 40°C

TARTIŞMA

KLN'ler son zamanda alternatif bir taşıma sistemi olarak geliştirilen ilaç taşıyıcı bir sistemdir. Üretilen KLN formülasyonlarının partikül boyutu, zeta potansiyeli, stabilitesi, yüzey özellikleri gibi bir çok özelliklerini belirlemek için çeşitli karakterizasyon çalışmaları yapılmaktadır (Pal ve Nayak, 2010; Irache ve ark., 2011). Bu çalışmalarda, KLN'lerin ilacın salım süresini uzattığı, partikül boyutunu düşürdüğü, daha kolay hedefleme yapılabildiği tespit edilmiştir (Mariane, R. M. ve ark., 2005; Marx, K. A. ve ark., 2007; Wissing ve Müller, 2002; Schubert, M. A., ve Müller-Goymann C. C., 2005; Tiyafoonchai ve ark., 2007).

Çalışmanın ilk aşamasında, güvenilir ve kolay bir hazırlama yöntemi olan sıcak homojenizasyon yöntemi kullanılarak nokodazol yüklü KLN'ler hazırlanmıştır. KLN'ler hazırlanmadan önce nokodazol maddesi hakkında literatür bilgisi toplanmış bu bilgilere göre nokodazol'un erime sıcaklığının yüksek olmasından dolayı sıcak homojenizasyon yönteminin yapılmasının herhangi bir sorun yaratmayacağına karar verilmiştir.

Hazırlanan bu formülasyonun kalitesini kontrol etmek için partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçülmüştür. İdeal bir nanopartikül'ün zeta potansiyel değeri ± 30 mV değerleri arasında olması istenmektedir. Elde edilen sonuçlara göre nokodazol yüklü KLN'lerin zeta potansiyelleri -25.4 mV olduğu ve partikül boyutlarının da nokodazole göre daha düşük olduğu bulunmuştur. 90 gün sonra farklı sıcaklıklarda bekletilen nanopartiküller için bu ölçümler tekrarlanmış ve aynı sonuçlar elde edilmiştir. Bunun sonucunda da hazırlanan nanopartiküllerin uygun özelliklere sahip olduğu ve nanopartikül formülasyonlarının 90 gün sonunda farklı sıcaklık altında topaklanma yapmadığı, çökme yapsa dahi çalkalandığında eski homojenitenin sağlandığı gözlemlenmiştir.

Nokodazol'un ilk defa YPSK ile tam validasyon çalışmaları yapılmış olup, nokodazol yüklü KLN'lerin nokodazolü yükleme etkinliği ve in vitro salımı belirlenmiştir. Bu çalışmalar, nokodazol maddesinin KLN içine yüklenebileceğini ve nokodazolün bu nanopartiküler sistem aracılığı ile in vitro salım yapabileceği göstermiştir (Şekil 24). Hazırlanmış olan nokodazol yüklü KLN'in, nokodazol maddesine göre daha fazla zaman da salım yaptığı görülmüş dolayısıyla da

nokodazol yüklü KLN'lerin, nokodazolün kan dolaşımındaki kalış süresini uzattığı ve stabilitesini artırdığı düşünülmektedir. KLN formülasyonlarının ve nokodazol'ün salım zamanlarına bakıldığında nokodazol yaklaşık olarak 90 dk. sonunda tamamının salındığı, KLN içine yüklenmiş olan nokodazol'ün ise yaklaşık 96 saat sonunda tamamının salındığı görülmüştür. Bunun sonucunda da KLN'lerin etken maddelerin salım zamanını uzattığı görülmüştür.

Nokodazol yüklü KLN'in spektroskopik yöntemler kullanılarak yapılan karakterizasyon çalışmalarına baktığımızda, nokodazol yüklü KLN'in ve boş KLN'in FT-IR spektrumları karşılaştırıldığında aralarında pik artışı veya azalışı, bunun yanında da önemli derecede frekans kayması gözlemlenmemiştir. Sadece 1738 cm^{-1} 'de bir pik'in boş KLN spektrumunda gözlemlenip nokodazol yüklü KLN'in spektrumunda biraz daha kaydığı gözlemlenmiştir. Bu pikin su piki olduğu düşünülmüş olup 3000 cm^{-1} 'de başka bir pik olmadığı için 1738 cm^{-1} 'de gelen pik'in su piki değil nokodazolün yapısında olan karbonil gruplarına ait olan bir pik olduğu düşünülmüştür. Nokodazol'ün yapısında bulunan iki tane karbonil gruplarının kimyasal çevrelerinde bir fark olmadığı için gelen karbonil pikinde herhangi bir yarıma gözlemlenmemiştir. Ayrıca formülasyonların 400 cm^{-1} 'in altındaki bölgeler raman spektroskopisi yardımıyla taranmış fakat boş KLN ile nokodazol yüklü KLN arasında önemli bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Son olarak da boş KLN'lerin ve nokodazol yüklü KLN'in NMR spektrumları alınmış, bu iki spektrum karşılaştırıldığında aralarında önemli bir farkın olmadığı görülmüştür. Bu spektroskopik yöntemler sonucunda da nokodazol maddesinin çevresinin yağ ile kaplandığı, yağ ile nokodazol arasında her hangi zayıf veya güçlü bir bağın olmadığı yani nokodazol maddesinin bir yağ içine serbest halde hapsedildiği düşünülmüştür.

KLN'in yüzey özelliklerinin incelenmesi için TEM görüntüleri çekilmiştir. Nokodazol maddesinin ve nokodazol yüklü KLN'in TEM görüntüleri çekilmiş, nokodazol maddesinin partikül boyutunun yaklaşık olarak $1\mu\text{m}$ olduğu ve şeklinin kristal yapıda elips olduğu görülmüştür. Hazırlanan nokodazol yüklü KLN'in partikül boyutunun 185 nm 'ye kadar düştüğü ve şekillerinin küresel yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuca göre de, hem kontrollü salıma uygun ve kararlı hem de boyut açısından hücre içine daha kolay girebilecek formülasyon

hazırlandığı görülmüştür. Literatüre bakıldığında hazırlanan KLN'in şekillerinin içine yüklenen maddenin şekline bağlı olmadığı ve şekillerinin genellikle küresel yapıda olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalarda KLN'lere yüklenecek olan etken maddelerin erime noktalarının genellikle düşük olduğundan dolayı KLN formülasyonlarının hazırlık aşamasında yağ ile birlikte etken maddenin az da olsa eridiği, tekrar katı forma dönerken fiziksel etkilerden dolayı ayrıca KLN formülasyonları hazırlanırken yüksek hızda karıştırmadan dolayı ve e.m. parçacıklarının yüzeyindeki farklı yüklenmelerden dolayı küresel yapıda olduğu görülmüştür.

Çalışmanın son kısmında ise nokodazol yüklü KLN'in kararlılığının test edilmesinde SK-KS kullanılmıştır. Nokodazol maddesi ve 90 gün farklı sıcaklıklarda bekletilen nanopartikül formülasyonları enjekte edilerek kütle spektrumlarına bakıldığında nokodazolün molekül ağırlığı gözlemlenmiş, her hangi bir bozulma ürününün olmadığı görülmüştür. Ayrıca 40°C'de bekletilen KLN formülasyonlarının kütle spektrumu incelendiğinde sıcaklık artışının da nanopartikül formülasyonlarında bozulma ürünlerinin olmadığı ve kararlılıklarının hala devam ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca KLN formülasyonlarının kararlılıklarının incelenmesi için DSC analizi yapılmıştır. Bu analiz sonucunda da farklı sıcaklıklarda bekletilen formülasyonların erime ve tekrar kristallenme sıcaklıkları arasında önemli bir fark olmadığı, kullanılan yöntemde uygulanan sıcaklığın nokodazol'ü olumsuz yönde etkilemediği bulunmuş, KLN içine nokodazol yükleyebilmek için sıcak homojenizasyon yönteminin uygun olabileceği görülmüştür.

Bu çalışma; nokodazol yüklü KLN hazırlamak için; farklı yöntemlerin geliştirilmesiyle, ya da farklı miktarlarda yüzey etken madde, lipid, etken madde kullanılarak farklı formülasyonlar'ın yapılması, bu formülasyon yapılarının karakterizasyonu yapılarak elde etmiş olduğumuz formülasyon yapısı ile karşılaştırılıp değerlendirilmesi ile ayrıca, karakterizasyon çalışmalarında SEM, X-ışını, vb. gibi deneysel çalışmalar yapılarak son olarak da hazırlamış olduğumuz nokodazol yüklü KLN'ler, nokodazol maddesinin kromozomlar üzerindeki iğ ipliklerinde etkili olduğu bilinen iyi bir anti kanserojen bir ilaç olduğu bilindiği için, farklı kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik ve apoptotik

etkisi belirlenerek, bu hücrelerde meydana getirdiği yapısal ve ince yapısal değişiklikler incelenerek yapılacak olan çalışmalar ile geliştirilebilir.

KAYNAKÇA

- Abdelwahed W., Degobert G., Stainmesse S., Fessi H. (2006), "Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations," *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58**, 1688–1713.
- Alhaj, N. A., Abdullah, R., Ibrahim, S., Bustamam, A. (2008), "Tamoxifen Drug Loading Solid Lipid Nanoparticles Prepared by Hot High Pressure Homogenization Techniques," *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, **3**, 219-224.
- Attama, A. A., Igbonekwu, C. N. (2011), "In vitro properties of surface-modified solid lipid microspheres containing an antimalarial drug: halofantrine," *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **4**(4), 253-258.
- Attia, S. M., Badary, O. A., Hamada, F. M., Angelis, M. H., Adler, I. D. (2008), "The chemotherapeutic agents nocodazole and amsacrine cause meiotic delay and non-disjunction in spermatocytes of mice," *Mutation Research*, **651**, 105–113.
- Attia, A. B. E., Ong a, Z. Y., Hedrick, J. L., Lee, P. P., Ee, P. L. E., Hammond, P. T., Yang, Y. Y. (2011), "Mixed micelles self-assembled from block copolymers for drug delivery," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **16**, 182–194.
- Bae, Y., Diezi, T. A., Zhao, A., Kwon, G. S. (2007), "Mixed polymeric micelles for combination cancer chemotherapy through the concurrent delivery of multiple chemotherapeutic agents," *Journal of Controlled Release*, **122**, 324–330.
- Baumgartner, M., Tardieux, I., Ohayon, H., Gounon, P., Langsley, G. (1999), "The use of nocodazole in cell cycle analysis and parasite purification from *Theileria parva*-infected B cells," *Microbes and Infection*, **1**, 1181–1188.
- Beswick, R. W., Ambrose, H. E., Wagner, S. D. (2006), "Nocodazole, a microtubule depolymerising agent, induces apoptosis of chronic lymphocytic leukaemia cells associated with changes in Bcl-2 phosphorylation and expression," *Leukemia Research*, **30**, 427–436.
- Bharali, D. J., Khalil, M., Gurbuz, M., Simone, T.M., Mousa, S. A. (2009), "Nanoparticles and cancer therapy: A concise review with emphasis on dendrimers," *International Journal of Nanomedicine*, **4**, 1–7.

- Blasi, P., Giovagnoli, S., Schoubben, A., Puglia, C., Bonina, F., Rossi, C., Ricci, M. (2011). "Lipid nanoparticles for brain targeting I. Formulation optimization," *International Journal of Pharmaceutics*, Baskıda.
- Bondi, M. L., Fontana, G., Carlisi, B., Giammona, G. (2003), "Preparation and Characterization of Solid Lipid Nanoparticles Containing Cloricromene," *Drug Delivery*, **10**, 245–250.
- Borowska, K., Laskowska, B., Magon, A., Mysliwiec, B., Pyda, M., Wołowicz, S. (2010), "PAMAM dendrimers as solubilizers and hosts for 8-methoxypsoralene enabling transdermal diffusion of the guest," *International Journal of Pharmaceutics*, **398**, 185–189.
- Boudier, A., Pouëssel, A. A., Gérardin, C., Devoisselle, J. M., Bégu, S. (2009), "pH-sensitive double-hydrophilic block copolymer micelles for biological applications," *International Journal of Pharmaceutics*, **379**, 212–217.
- Brioschi, A., Zara, G. P., Calderoni, S., Gasco, M. R., Mauro, A. (2008), "Cholesterylbutyrate Solid Lipid Nanoparticles as a Butyric Acid Prodrug," *Molecules*, **13**, 230-254.
- Bunjes, H. (2011), "Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Baskıda.
- Buyukozturk F., Benneyan J. C., Carrier R. L. (2010), "Impact of emulsion-based drug delivery systems on intestinal permeability and drug release kinetics," *Journal of Controlled Release*, **142**, 22–30.
- Cai C., Bakowsky U., Rytting E., Schaper A. K., Kissel T. (2008), "Charged nanoparticles as protein delivery systems: A feasibility study using lysozyme as model protein," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **69**, 31–42.
- Caminade, A. M., Laurent, R., Turrin, C. O., Rebout, C., Nicot, B. D., Ouali, A., Zablocka, M., Majoral, J. P. (2010), "Phosphorus dendrimers as viewed by ³¹P NMR spectroscopy; synthesis and characterization," *Comptes Rendus Chimie*, **13**, 1006–1027.

- Castelli, D. D., Dastrù, W., Terreno, E., Cittadino, E., Mainini, F., Torres, E., Spadaro, M., Aime, S. (2010), "In vivo MRI multicontrast kinetic analysis of the uptake and intracellular trafficking of paramagnetically labeled liposomes," *Journal of Controlled Release*, **144**, 271–279.
- Chakraborty, S., Liao, I. C., Adler, A., Leong, K. W. (2009), "Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems," *Advanced Drug Delivery Reviews*, **61**, 1043–1054.
- Chang, Y. C., Chu, M. (2008), "Methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(valerolactone) diblock polymeric micelles for enhanced encapsulation and protection of camptothecin," *European Polymer Journal*, **44**, 3922–3930.
- Charcosset, C., El-Harati, A., Fessi, H. (2005), "Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor," *Journal of Controlled Release*, **108**, 112–120.
- Cho, S. G., Sihm, C. R., Yoo, S. J., Cho, K. K., Lee, H., Choi, Y. J., Kim, S. H. (2006), "Analysis of gene expression induced by microtubule-disrupting agents in HeLa cells using microarray," *Cancer Letters*, **241**, 110–117.
- Choi, H. C., Jung, Y. M., Kim, S. B. (2005), "Size effects in the Raman spectra of TiO₂ nanoparticles," *Vibrational Spectroscopy*, **37**, 33–38.
- Chonn, A. ve Cullis, P. R. (1995), "Recent advances in liposomal drug-delivery systems," *Current Opinion in Biotechnology*, **6**, 698-708
- Ciolkowski, M., Rozanek, M., Szewczyk, M., Klajnert, B., Bryszewska, M. (2011), "The influence of PAMAM-OH dendrimers on the activity of human erythrocytes ATPases," *Biochimica et Biophysica Acta*, Baskıda.
- Dahan, A., Hoffman, A. (2008), "Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery systems by an in vitro dynamic lipolysis model for improved oral bioavailability of poorly water soluble drugs," *Journal of Controlled Release*, **129**, 1–10.
- Das, S., Ng, W. K., Kanaujia, P., Kim, S., Tan, R. B. H. (2011). "Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: Effects of process variables," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **88(1)**, 483-489.

- Decordier, I., Cundari, E., Volders, M. K. (2008), "Survival of aneuploid, micronucleated and/or polyploid cells: Crosstalk between ploidy control and apoptosis," *Mutation Research*, **651**, 30–39.
- Delgado, D., Rodríguez, A. D. P., Solinís, M. A., Gascón, A. R. (2011), "Understanding the mechanism of protamine in solid lipid nanoparticle-based lipofection: The importance of the entry pathway" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Baskıda.
- Doğrukol-Ak, D., Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, Kromatografik Sistemler (Ed: Genç, L.), Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir, 2011.
- Duncan T. V. (2011), "Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors," *Journal of Colloid and Interface Science*, **363**, 1–24.
- Esposito, E., Fantin, M., Marti, M., Drechsler, M., Paccamiccio, L., Mariani, P., Sivieri, E., Lain, F., Menegatti, E., Morari, M., Cortesi, R. (2008), "Solid Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for Bromocriptine," *Pharmaceutical Research*, **7**, 1521-1530.
- Evjen, T. J., Nilssen, E. A., Fowler, R. A., Rognvaldsson, S., Brandl, M., Fossheim, S. L. (2011), "Lipid membrane composition influences drug release from dioleoylphosphatidylethanolamine-based liposomes on exposure to ultrasound," *International Journal of Pharmaceutics*, **406**, 114–116.
- Ford, J. I., Mann, T. E. (2011), "Fast-Scan DSC and Its Role in Pharmaceutical Physical Form Characterization and Selection," *Advanced Drug Delivery Reviews*, Baskıda.
- Gaucher, G., Dufresne, M. H., Sant, V. P., Kang, N., Maysinger, D., Leroux, J. C. (2005), "Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery," *Journal of Controlled Release*, **109**, 169–188.
- Gillies, E. R. Ve Fréchet, J. M. J. (2005), "Dendrimers and dendritic polymers in Drug Delivery," *Drug Discovery Today*, **1**, 35-43.
- Gou, M., Li, X., Dai, M., Gong, C., Wang, X., Xie, Y., Deng, H., Chen, L., Zhao, X., Qian, Z., Wei, Y. (2008), "A novel injectable local hydrophobic drug delivery system: Biodegradable nanoparticles in thermo-sensitive hydrogel," *International Journal of Pharmaceutics*, **359**, 228–233.

- Goyal, P., Goyal, K., Kumar, S. G. V., Singh, A., Katare, O. P., Mishra, D.N. (2005), "Liposomal drug delivery systems – Clinical applications," *Acta Pharmaceutica*, **55**, 1–25.
- Gualbert, J., Shahgaldian, P., Lazar, A., Coleman, A. W. (2004), "Solid Lipid Nanoparticles (SLNs): Preparation and Properties of Calix[4]resorcinarene-Derived Systems," *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **48**, 37–44.
- Gupta R. B., Fundamentals of Drug Nanoparticles, Nanoparticle Technology for Drug Delivery, (Ed: Gupta R. B. And Kompella V. B.), Taylor-Francis Group, New York, 1-12, 2006.
- Hallihosur S. A., Rangan L. (2011), "Dynamics of nanotechnology patenting: An Indian scenario," *Technology in Society*, **33**, 137–144.
- He, P., Davis, S.S., Illum, L. (1999), "Chitosan microspheres prepared by spray drying," *International of Journal Pharmaceutics*, **187**, 53–65.
- Hu, F.Q., Hong, Y., Yuan, H. (2004), "Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide," *International Journal of Pharmaceutics*, **273**, 29–35.
- Hu, F. Q., Yuan, H., Zhang, H. H., Fang, M. (2002), "Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization," *International Journal of Pharmaceutics*, **239**, 121–128.
- Hwang, T. L., Lee, W. R., Hua, S. C., Fang, J. Y. (2007), "Cisplatin encapsulated in phosphatidylethanolamine liposomes enhances the in vitro cytotoxicity and in vivo intratumor drug accumulation against melanomas," *Journal of Dermatological Science*, **46**, 11–20.
- Iannonea, M., Cosco, D., Cilurzo, F., Celia, C., Paolino, D., Mollace, V., Rotiroti, D., Fresta, M. (2010), "A novel animal model to evaluate the ability of a drug delivery system to promote the passage through the BBB," *Neuroscience Letters*, **469**, 93–96.
- Igartua, M., Saulnier, P., Heurtault, B., Pech, B., Proust, J.E., Pedraz, J.L., Benoit, J.P. (2002), "Development and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with magnetite," *International Journal of Pharmaceutics*, **233**, 149–157.

- Irache, J. M., Esparza, I., Gamazo, C., Agüeros, M., Espuelas, S. (2011), "Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary Therapeutics," *Veterinary Parasitology*, **180**, 47–71.
- Ishida, T., Ichihara, M., Wang, X. Y., Yamamoto, K., Kimura, J., Majima, E., Kiwada, H. (2006), "Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes," *Journal of Controlled Release*, **112**, 15–25.
- Jenning, V., Mader, K., Gohla, S. H. (2000), "Solid lipid nanoparticles (SLN™) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a ¹H-NMR study," *International Journal of Pharmaceutics*, **205**, 15–21.
- Jeong, B., Choi, Y. K., Bae, Y. H., Zentner, G., Kim, S. W. (1999), "New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems," *Journal of Controlled Release*, **62**, 109–114.
- Jenning, V., Korting, M. S., Gohla, S. (2000), "Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties," *Journal of Controlled Release*, **66**, 115–126.
- Jensen, L. B., Magnusson, E., Gunnarsson, L., Vermehren, C., Nielsen, H. M., Petersson, K. (2010), "Corticosteroid solubility and lipid polarity control release from solid lipid nanoparticles," *International Journal of Pharmaceutics*, **390**, 53–60.
- Jing H., Zuobing X., Rujun Z., Shuangshuang M., Mingxi W., Zhen L. (2011), "Properties of Aroma Sustained-release Cotton Fabric with Rose Fragrance Nanocapsule," *Chinese Journal of Chemical Engineering*, **19(3)**, 523–528.
- Joralemon, M. J., O'Reilly, R. K., Matson, J. B., Nugent, A. K., Hawker, C. J., Wooley, K. L. (2005), "Dendrimers Clicked Together Divergently," *Macromolecules*, **38**, 5436–5443.
- Jores, K., Mehnert, W., Bunjes, H., Drechsler, M., Mäder, K. (2003) "From solid lipid nanoparticles (SLN) to nanospoons. Visions and reality of colloidal lipid dispersions," *Controlled Release Society 30th Annual Meeting PROCEEDINGS*, 2003.
- Jores, K., Mehnert, W., Drechsler, M., Bunjes, H., Johann, C., Mäder, K. (2004), "Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded

solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy,” *Journal of Controlled Release*, **95**, 217– 227.

Justo, O. R., Moraes, A. M. (2010), “Analysis of process parameters on the characteristics of liposomes prepared by ethanol injection with a view to process scale-up: Effect of temperature and batch volume,” *Chemical Engineering Research and Design*, Baskıda.

Kacurakova, M. ve Wilson, R. H. (2001), “Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected Carbohydrates,” *Carbohydrate Polymers*, **44**, 291–303.

Kamboj, S., Bala, S., Nair, A. B. (2010), “Solid Lipid Nanoparticles: An Effective Lipid Based Technology For Poorly Water Soluble Drugs,” *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **2(5)**, 1-16.

Karcher B. D., Davies M. L., Delaney E. J., Venit J. J. (2005), “A 21st Century HPLC Workflow for Process R&D,” *Jala*, **10**, 381-393.

Kaş H. S. (2002). “İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler,” *Kontrollü Salım Sistemleri*, (Ed: Gürsoy A. Z.), Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj San. Tic. Ltd. Şti., İstanbul, 65-95.

Kaş H. S. ve Eldem T. (2002), “Kontrollü Salım Sistemlerinin Hedeflendirilmesi,” *Kontrollü Salım Sistemleri*, (Gürsoy A. Z.), Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj San. Tic. Ltd. Şti., İstanbul, 299-304.

Khalil, I. A., Kogure, K., Futaki, S., Harashima, H. (2008), “Octaarginine-modified liposomes: Enhanced cellular uptake and controlled intracellular trafficking,” *International Journal of Pharmaceutics*, **354**, 39–48.

Kheradmandnia, S., Farahani, E. V., Nosrati, M., Atyabi, F. (2010), “Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax,” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **6**, 753–759.

Killops, K. L., Campos, L. M., Hawker, C. J. (2008), “Robust, Efficient, and Orthogonal Synthesis of Dendrimers via Thiol-ene “Click” Chemistry,” *Journal of the American Chemical Society*, **130**, 5062–5064.

- Kim, S., Kim, J. Y., Huh, K. M., Acharya, G., Park, K. (2008), "Hydrotropic polymer micelles containing acrylic acid moieties for oral delivery of paclitaxel," *Journal of Controlled Release*, **132**, 222–229.
- Kovacevic, A., Savic, S., Vuleta, G., Müller, R. H., Keck, C. M. (2011), "Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure," *International Journal of Pharmaceutics*, **406**, 163–172.
- Kozubek, A., Gubernator, J., Przeworska, E., Stasiuk, M. (2000), "Liposomal drug delivery, a novel approach: PLARosomes," *Acta Biochimica Polonica*, **3**, 636-649.
- Lee, J., You, J., Kim, J., Hyun, S. H., Lee, E. (2010), "Postactivation treatment with nocodazole maintains normal nuclear ploidy of cloned pig embryos by increasing nuclear retention and formation of single pronucleus," *Theriogenology*, **73**, 429–436.
- Lee1, C. C., MacKay, J. A., Fréchet1, J. M. J., Szoka, F. C. (2005), "Designing dendrimers for biological Applications," *Nature Biotechnology*, **12**, 1517-1526.
- Li, X., Lin, X., Zheng, L., Yu, L., Lv, F., Zhang, Q., Liu, W. (2008), "Effect of poly(ethylene glycol) stearate on the phase behavior of monocaprate/Tween80/water system and characterization of poly(ethylene glycol) stearate-modified solid lipid nanoparticles," *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **317**, 352–359.
- Li, H., Kang, D. J., Blamire, M. G., Huck, W. T. S. (2002), "High-Resolution Contact Printing with Dendrimers," *Nano Letters*, **4**, 347-349.
- Li, D., Li, P., Li, G., Wang, J., Wang, E. (2009), "The effect of nocodazole on the transfection efficiency of lipid-bilayer coated gold nanoparticles," *Biomaterials*, **30**, 1382–1388.
- Licciardi, M., Giammona, G., Du, J., Armes, S. P., Tang, Y., Lewis, A. L. (2006), "New folate-functionalized biocompatible block copolymer micelles as potential anti-cancer drug delivery systems," *Polymer*, **47**, 2946–2955.

- Lin, H. M., Wang, W. K., Hsiung, P. A., Shyu, S. G. (2010), "Light-sensitive intelligent drug delivery systems of coumarin-modified mesoporous bioactive glass," *Acta Biomaterialia*, **6**, 3256-3263.
- Lindner, L. H., Hossann, M., Vogeser, M., Teichert, N., Wachholz, K., Eibl, H., Hiddemann, W., Issels R. D. (2008), "Dual role of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in thermosensitive liposomes: Active ingredient and mediator of drug release," *Journal of Controlled Release*, **125**, 112–120.
- Lippacher, A., Müller, R.H., Mader, K., (2001), "Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles," *International Journal of Pharmaceutical*, **214**, 9-12.
- Liu, J., Gong, T., Wang, C., Zhong Z., Zhang Z. (2007), "Solid lipid nanoparticles loaded with insulin by sodium cholate-phosphatidylcholine-based mixed micelles: Preparation and characterization," *International Journal of Pharmaceutics*, **340**, 153–162,.
- Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., Zhang, Z. (2008), "Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems," *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60**, 1650–1662.
- Liu, J., Zeng, F., Allen, C. (2005), "Influence of serum protein on polycarbonate-based copolymer micelles as a delivery system for a hydrophobic anti-cancer agent," *Journal of Controlled Release*, **103**, 481–497.
- Linazasoro G. (2008), "Potential applications of nanotechnologies to Parkinson's disease therapy," *Parkinsonism and Related Disorders*, **14**, 383-392.
- Lukyanov, A. N., Torchilin, V. P. (2004), "Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs," *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56**, 1273– 1289.
- Mariante, R. M., Vancini, R. G., Melo, A. L., Benchimol, M. (2005), "*Giardia lamblia*: Evaluation of the in vitro effects of nocodazole and colchicine on trophozoites," *Experimental Parasitology*, **110**, 62–72.
- Marx, K. A., Zhou, T., Montrone, A., McIntosh, D., Braunschuetz, S. J. (2007), "A comparative study of the cytoskeleton binding drugs nocodazole and taxol with a mammalian cell quartz crystal microbalance biosensor: Different dynamic responses and energy dissipation effects," *Analytical Biochemistry*, **361**, 77–92.

- Mehnert, W., Mader, K. (2001). "Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*, **47**, 165-196.
- Mei, Z., Chen, H., Weng, T., Yang, Y., Yang, X. (2003), "Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **56**, 189–196.
- Montenegro, L., Sarpietro, M. G., Ottimo, S., Puglisi, G., Castelli, F. (2011), "Differential scanning calorimetry studies on sunscreen loaded solid lipid nanoparticles prepared by the phase inversion temperature method," *International Journal of Pharmaceutics*, **415**, 301– 306.
- Morgan, M. T., Nakanishi, Y., Kroll, D. J., Griset, A. P., Carnahan, M. A., Wathier, M., Oberlies, N. H., Manikumar, G., Wani, M. C., Grinstaff, M. W. (2006), "Dendrimer-Encapsulated Camptothecins: Increased Solubility, Cellular Uptake, and Cellular Retention Affords Enhanced Anticancer Activity In vitro," *Cancer Research*, **66**, 11913-11921.
- Mukherjee, S., Ray, S., Thakur, S. (2009), "Solid Lipid Nanoparticles: A Modern Formulation Approach in Drug Delivery System," *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **71**, 349-358.
- Müller, R. H., Runge, S., Ravelli, V., Mehnert, W., Thünemann, A. F., Souto, E. B. (2006), "Oral bioavailability of cyclosporine: Solid lipid nanoparticles (SLN[®]) versus drug nanocrystals," *International Journal of Pharmaceutics*, **6**, 82-89.
- Müller, R. H., Runge, S. A., Ravelli, V., Thünemann, A. F., Mehnert, W., Souto, E. B. (2008), "Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN[®]): Drug–lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **3**, 535-544.
- Müller, R. H., Mader, K., Gohla, S. (2000), "Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **50**, 161-177.
- Müller, R. H., Radtke, M., Wissing, S. A. (2002), "Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations," *Advanced Drug Delivery Reviews*, **54**, 131–155.

- Müller, R.H. ve Keck, C.M. (2004), “Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles” *Journal of Biotechnology*, **113**, 151-170.
- Müller, R. H., Wissing, S. A.: “ SLN and lipopearls for topical delivery of active compounds and controlled release, Modified Release Drug Delivery Technology, M. Rathbone, Marcel Dekker Inc., New York, 570-585.
- Naha, P. C., Davoren, M., Lyng, F. M., Byrne, H. J. (2010), “Reactive oxygen species (ROS) induced cytokine production and cytotoxicity of PAMAM dendrimers in J774A.1 cells,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, **246**, 91–99.
- Numanoğlu, O., Tarımcı, N. (2006), “Katı Lipid Nanopartiküllerin (SLNTM) Özellikleri, Farmasötik ve Kozmetik Alandaki Uygulamaları,” *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **35**, 211 – 235.
- Obata, Y., Tajima, S., Takeoka, S. (2010), “Evaluation of pH-responsive liposomes containing amino acid-based zwitterionic lipids for improving intracellular drug delivery in vitro and in vivo,” *Journal of Controlled Release*, **142**, 267–276.
- Ochekpe, N. A., Olorunfemi, P. O., Ngwuluka, N. C. (2009), “Nanotechnology and Drug Delivery Part 2: Nanostructures for Drug Delivery,” *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **8**, 275-287.
- Oliveira, J. M., Salgado, A. J., Sousa, N., Mano, J. F., Reis, R. L. (2010), “Dendrimers and derivatives as a potential therapeutic tool in regenerative medicine strategies-A review,” *Progress in Polymer Science*, **35**, 1163–1194.
- Osada, K., Christie, R. J., Kataoka, K. (2009), “Polymeric micelles from poly(ethylene glycol)-poly(amino acid) block copolymer for drug and gene delivery,” *Journal of the Royal Society Interface*, **6**, 325–339.
- Padois, K., Cantiéni, C., Bertholle, V., Bardel, C., Pirot, F., Falson, F. (2011), “Solid lipid nanoparticles suspension versus commercial solutions for dermal delivery of minoxidil,” *International Journal of Pharmaceutics*, Baskıda.
- Pan, B.F., Cui, D. X., Xu, P., Huang, T., Li, Q., He, R., Gao, F. (2007), “Cellular Uptake Enhancement of Polyamidoamine Dendrimer Modified Single Walled

Carbon Nanotubes,” *Journal of Biomedical & Pharmaceutical Engineering*, **1**, 13-16.

Parveen, S., Misra, R., Sahoo, S. K. (2011), “Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging,” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, Baskıda.

Patri, A. K., Myc, A., Beals, J., Thomas, T. P., Bander, N. H., Baker, J. R. (2004), “Synthesis and in Vitro Testing of J591 Antibody-Dendrimer Conjugates for Targeted Prostate Cancer Therapy,” *Bioconjugate Chemistry*, **15**, 1174-1181.

Park, K. “Nanotechnology: What it can do for drug delivery, (2007),” *Journal of the Control Release*, **120**, 1–3.

Peres, I., Rocha, S., Pereira, M. D. C., Coelho, M., Rangel, M., Ivanova, G. (2010), “NMR structural analysis of epigallocatechin gallate loaded polysaccharide Nanoparticles,” *Carbohydrate Polymers*, **82**, 861–866.

Perumal, O. P., Inapagolla, R., Kannan, S., Kannan, R. M. (2008), “The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers,” *Biomaterials*, **29**, 3469–3476.

Pillai, O. Ve Panchagnula R. (2001), “Polymers in drug delivery,” *Current Opinion in Chemical Biology*, **5**, 447-451.

Porter, C. J. H., Pouton, C. W., Cuine, J. F., Charman, W. N. (2008), “Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60**, 673–691.

Rao J. P. Ve Geckeler K. E. (2011), “Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control Parameters,” *Progress in Polymer Science*, **36**, 887–913.

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

Rijcken, C. J., Snel, C. J., Schiffelers, R. M., Nostrum, C. F. V., Hennink, W. E. (2007), “Hydrolysable core-crosslinked thermosensitive polymeric micelles: Synthesis, characterisation and in vivo studies,” *Biomaterials*, **28**, 5581–5593.

- Rong M. Z., Zhang, M. Q., Shi G., Ji Q. L., Wetzel B., Friedrich K. (2003), "Graft polymerization onto inorganic nanoparticles and its effect on tribological performance improvement of polymer composites," *Tribology International*, **36**, 697–707.
- Saraf, A. S. (2010), "Applications of novel drug delivery system for herbal formulations," *Fitoterapia*, **81**, 680–689.
- Sahoo, S. K., Dilnawaz, F., Krishnakumar, S. (2008), "Nanotechnology in ocular drug delivery," *Drug Discovery Today*, **3**, 144-151.
- Sahoo S. K., Parveen S., Panda J. J. (2007), "The present and future of nanotechnology in human health care," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **3**, 20– 31.
- Schubert, M. A. ve Müller-Goymann A. A., (2005) "Characterization of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **61**, 77-86.
- Schwarz, C. ve Mehnert, W. (1999), "Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery II. drug incorporation and physicochemical characterization," *Journal of the microencapsulation*, **2**, 205- 213.
- Seetapan, N., Bejrapha, P., Srinuanchai, W., Ruktanonchai, U. R. (2010), "Rheological and morphological characterizations on physical stability of gamma-oryzanol-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs)," *Micron*, **41**, 51–58.
- Serpe, L., Catalano, M. G., Cavalli, R., Ugazio, E., Bosco, O., Canaparo, R., Muntoni, E., Frairia, R., Gasco, M. R., Eandi, M., Zara, G. P. (2004), "Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **58**, 673–680.
- Sezgin, Z., Yuksel, N., Baykara, T. (2006), "Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **64**, 261–268.
- Shao, K., Hou, Q., Duan, W., Go, M. L., Wong, K. P., Li, Q. T. (2006), "Intracellular drug delivery by sulfatide-mediated liposomes to gliomas," *Journal of Controlled Release*, **115**, 150–157.

- Shegokar, R., Singh, K. K., Müller, R. H. (2010), "Production & stability of stavudine solid lipid nanoparticles—From lab to industrial scale," *International Journal of Pharmaceutics*, Baskıda.
- Shen, Y., Betzendahl, I., Sun, F., Tinneberg, H. R., Ritter, U. E. (2005), "Non-invasive method to assess genotoxicity of nocodazole interfering with spindle formation in mammalian oocytes," *Reproductive Toxicology*, **19**, 459–471.
- Shin, H. C., Alani, A. W. G., Rao, D. A., Rockich, N. C., Kwon, G. S. (2009), "Multi-drug loaded polymeric micelles for simultaneous delivery of poorly soluble anticancer drugs," *Journal of Controlled Release*, **140**, 294–300.
- Siekman, B., Westesen, K., (1996), "Investigation on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **43**, 104-109.
- Sihorkar, V. ve Vyas, S.P. (2001), "Potential of polysaccharide anchored liposomes in drug delivery, targeting and immunization," *Journal of Pharmacy&pharmaceutical Science*, **4**, 138-158.
- Silva, A. C., Mira, E. G., García, M.L., Egea, M.A., Fonseca, J., Silva, R., Santos, D., Souto, E. B., Ferreira, D. (2011), "Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **86**, 158–165.
- Sitterberg, J., Özçetin, A., Ehrhardt, C., Bakowsky, U. (2010), "Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **74**, 2–13.
- Soga, O., Nostrum, C. F. V., Fens, M., Rijcken, C. J. F., Schiffelers, R. M., Storm, G., Hennink, W. E. (2005), "Thermosensitive and biodegradable polymeric micelles for paclitaxel delivery," *Journal of Controlled Release*, **103**, 341–353.
- Srivastava, M., Vyas, N., Ojha, A. K. (2011), "Size dependent electron–phonon coupling in $\text{Li}_{0.5}\text{Co}_{0.1}\text{Fe}_{2.4}\text{O}_4$ nanoparticles investigated by Raman spectroscopy," *Vibrational Spectroscopy*, **56**, 19–25.

- Subedi, R. K., Kang, K., Choi, H. K. (2009), "Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **37**, 508–513.
- Sun, H., Guo, B., Cheng, R., Meng, F., Liu, H., Zhong, Z. (2009), "Biodegradable micelles with sheddable poly(ethylene glycol) shells for triggered intracellular release of doxorubicin," *Biomaterials*, **30**, 6358–6366.
- Sun, P., Zhou, D., Gan, Z. (2010), "Novel reduction-sensitive micelles for triggered intracellular drug release," *Journal of Controlled Release*, Baskıda.
- Sun, Y., Yan, X., Yuan, T., Liang, J., Fan, Y., Gu, Z., Zhang, X. (2010), "Disassemblable micelles based on reduction-degradable amphiphilic graft copolymers for intracellular delivery of doxorubicin," *Biomaterials*, **31**, 7124–7131.
- Suresh, G., Manjunath, K., Venkateswarlu, V., Satyanarayana, V. (2007), "Preparation, Characterization, and In Vitro and In Vivo Evaluation of Lovastatin Solid Lipid Nanoparticles," *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **8**, E1-E9.
- Tintaru, A., Chendo, C., Monnier, V., Bouillon, C., Quéléver, G., Peng, L., Charles, L. (2011), "Electrospray tandem mass spectrometry of poly(amino)ester dendrimers: Dissociation rules and structural characterization of defective molecules," *International Journal of Mass Spectrometry*, Baskıda.
- Tiyaboonchai, W., Tungpradit, W., Plianbangchang, P. (2007), "Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles," *International Journal of Pharmaceutics*, **337**, 299–306,
- Tomalia, D. A. (2005), "Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry," *Progress in Polymer Science*, **30**, 294–324.
- Tomalia, D. A., Reyna, L. A., Svenson, S. (2007), "Dendrimers as multi-purpose nanodevices for oncology drug delivery and diagnostic imaging," *Biochemical Society Transactions*, **1**, 61-67.
- Trubetskoy, O. V., Finel, M., Burke, T. J., Trubetskoy, V.S. (2006), "Evaluation of synthetic polymeric micelles as a stabilization medium for the handling of membrane proteins in pharmaceutical drug discovery," *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science*, **9**, 271-280.

Urbán-Morlán, Z., Ganem-Rondero, A., Melgoza- Contreras, L. M., Escobar-Chávez, J. J., Nava- Arzaluz, M. G., Quintanar-Guerrero, D. (2010), "Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing cyclosporine by the emulsification-diffusion method," *International Journal of Nanomedicine*, **5**, 611–620.

Uskoković, V. ve Drofenik, M. (2007), "Reverse micelles: Inert nano-reactors or physico-chemically active guides of the capped reactions," *Advances in Colloid and Interface Science*, **133**, 23–34.

Üner, M., Yener, G. (2007), "Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives," *International Journal of Nanomedicine*, **2**, 289–300.

Venkateswarlu, V. ve Manjunath, K. (2004), "Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles," *Journal of Controlled Release*, **95**, 627– 638.

Vighi, E., Montanari, M., Ruozi, B., Tosi, G., Magli, A., Leo, E. (2010), "Nuclear localization of cationic solid lipid nanoparticles containing Protamine as transfection promoter," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **76**, 384–393.

Vitorino, C., Carvalho, F. A., Almeida, A. J., Sousa, J. J., Pais, A. A. C. C. (2011), "The size of solid lipid nanoparticles: An interpretation from experimental design," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **84**, 117–130.

Weyhers, H., Ehlers, S., Hahn, H., Souto, E. B., Muller, R. H. (2006), "Solid Lipid Nanoparticles (SLN) – Effects of lipid composition on in vitro degradation and in vivo toxicity," *Pharmazie*, **61**, 539-544.

Wissing, S. A., Kayser, O., Muller, R. H. (2004), "Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56**, 1257– 1272.

Mehnert, W. ve Mader, K. (2001), "Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*, **47**, 165–196.

- Wissing, S.A., Müller, R.H. (2002), "Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration," *Journal of Controlled Release*, **81**, 225–233.
- Wu, L., Zhang, J., Watanabe, W. (2011), "Physical and chemical stability of drug nanoparticles," *Advanced Drug Delivery Reviews*, **63**, 456–469.
- Wolinsky, J. B. ve Grinstaff, M.W. (2008), "Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment," *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60**, 1037–1055.
- Wu, X. C., Bittner, A. M., Kern, K. (2002), "Spatially Selective Electroless Deposition of Cobalt on Oxide Surfaces Directed by Microcontact Printing of Dendrimers," *Langmuir*, **18**, 4984–4988.
- Wu Y., Yang W., Wang C., Hu J., Fu S. (2005), "Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate" *International Journal of Pharmaceutics*, **295**, 235–245.
- Xie, S., Zhu, L., Dong, Z., Wang, X., Wang, Y., Li, X., Zhou, W. Z. (2011), "Preparation, characterization and pharmacokinetics of enrofloxacin-loaded solid lipid nanoparticles: Influences of fatty acids," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **83**, 382–387.
- Yamamoto, T., Yokoyama, M., Opanasopit, P., Hayama, A., Kawano, K., Maitani, Y. (2007), "What are determining factors for stable drug incorporation into polymeric micelle carriers? Consideration on physical and chemical characters of the micelle inner core," *Journal of Controlled Release*, **123**, 11–18.
- Yamauchi, M., Kusano, H., Saito, E., Abe, M., Tsutsumi, K., Uosaki, Y., Nakakura, M., Kato, Y., Aoki, N. (2008), "Controlled release of a protein kinase inhibitor UCN-01 from liposomes influenced by the particle size," *International Journal of Pharmaceutics*, **351**, 250–258.
- Yang, S. C. ve Zhu, J. B. (2002), "Preparation and Characterization of Camptothecin Solid Lipid Nanoparticles," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **28**, 265–274.

- Yang, X., Chen, Y., Yuan, R., Chen, G., Blanco, E., Gao, J., Shuai, X. (2008), "Folate-encoded and Fe₃O₄-loaded polymeric micelles for dual targeting of cancer cells," *Polymer*, **49**, 3477–3485.
- Ye, Y. Q., Yang, F. L., Hu, F. Q., Du, Y. Z., Yuan, H., Yu, H. Y. (2008), "Core-modified chitosan-based polymeric micelles for controlled release of doxorubicin," *International Journal of Pharmaceutics*, **352**, 294–301.
- Ying, X. Y., Cui, D., Yu, L., Du, Y. Z. (2011), "Solid lipid nanoparticles modified with chitosan oligosaccharides for the controlled release of doxorubicin," *Carbohydrate Polymers*, **84**, 1357–1364.
- Yokoyama, S., Inagaki, A., Imura, T., Ohkubo, T., Tsubaki, N., Sakai, H., Abe, M. (2005), "Membrane properties of cationic liposomes composed of Dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoyldimethylammonium bromide," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **44**, 204–210.
- You, J., Li, X., Cui, F. D., Du, Y. Z., Yuan, H., Hu, F. Q. (2008), "Folate-conjugated polymer micelles for active targeting to cancer cells: preparation, *in vitro* evaluation of targeting ability and cytotoxicity," *Nanotechnology*, **19**, 1-9.
- Zant-Przeworska, E., Stasiuk, M., Gubernator, J., Kozubek, A. (2010), "Resorcinolic lipids improve the properties of sphingomyelin–cholesterol Liposomes," *Chemistry and Physics of Lipids*, **163**, 648–654.
- Zamboni, W. C. (2005), "Liposomal, Nanoparticle, and Conjugated Formulations of Anticancer Agents," *Clinical Cancer Research*, **11**, 8230-8234.
- Zhu, R. R., Qin, L. L., Wang, M., Wu, S. M., Wang, S. L., Zhang, R., Liu, Z. X., Sun, X. Y., Yao, S. D. (2009), "Preparation, characterization, and anti-tumor property of podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles," *Nanotechnology*, **20**, 1-7.
- Zhu, S., Hong, M., Zhang, L., Tang, G., Jiang, Y., Pei, Y. (2010), "PEGylated PAMAM Dendrimer-Doxorubicin Conjugates: In Vitro Evaluation and In Vivo Tumor Accumulation," *Pharmaceutical Research*, **1**, , 161-174.