ETKİN MADDE YÜKLÜ PLGA NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMASI VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Emrah ÖZAKAR

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Meltem ÇETİN

Yüksek Lisans Tezi-2014

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETKİN MADDE YÜKLÜ PLGA NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMASI VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Emrah ÖZAKAR

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Meltem ÇETİN

ERZURUM
2014

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ETKİN MADDE YÜKLÜ PLGA NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMASI VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ.

Emrah ÖZAKAR

Tez Savunma Tarihi : 25.12.2014

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Meltem ÇETİN (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Abdulkadir ÖZER (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Mine GÜLABOĞLU (Atatürk Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM-2014

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR…….. IV

ÖZET…..…… V

ABSTRACT…….. VI

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ……..... VII

ŞEKİLLER DİZİNİ……. VIII

TABLOLAR DİZİNİ……... X

1. GİRİŞ…… 1

2. GENEL BİLGİLER……. 3

2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar…....…… 3

2.1.1. Hipertansiyon…..…….……..……. 3

2.1.1.1. Hipertansiyon Tanısı ve Tedavi Yaklaşımları……..... 8

2.2. Nifedipin…… ……..... 15

2.3. İlaç Taşıyıcı Yeni Sistemler …….. 20

2.3.1. Polimerik İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanmasında

Kullanılan Polimerler …….…. 23

2.3.1.1. PLGA ……..……... 25

2.3.2. Nanopartiküler Sistemler ……..…….. 27

3. MATERYAL VE METOT…….…… 33

3.1. Materyal……..... 33

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler…….….. 33

3.1.2. Kullanılan Cihazlar…….…… 34

3.2. Metotlar……..… 35

3.2.1. NF'nin UV-Spektrofotometrik Yöntemle Miktar Tayini……..… 35

3.2.1.1. NF'ye ait Kalibrasyon Doğrusunun Elde Edilmesi …….…….. 35

3.2.1.2. Analitik Yöntem Validasyonu…….. 35

3.2.2. Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması……... 38

3.2.2.1. Boş PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması……..…… 38

3.2.2.2. NF yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması……. 39

3.2.3. Hazırlanan Nanopartiküler Sistemlerin Karakterizasyonu ……. 39

3.2.3.1. Yüzey Özellikleri…….. 39

3.2.3.2. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Tayini……..... 40

3.2.3.3. Hazırlama Verimi……. 40

3.2.3.4. Nanopartiküllere Yüklenen NF Miktarının Saptanması…….. 40

3.2.3.5. *İn Vitro* Salım Çalışması……... 41

3.2.3.6. NF, PLGA, Boş ve NF-yüklü Nanopartikül Formülasyonlarına Ait FT-IR Analizi……..…….……..….... 41

3.2.3.7. NF, PLGA, Boş ve NF-yüklü Nanopartikül Formülasyonlarına Ait DSC Analizi…….…..... 41

3.2.3.8. İstatistiksel Yöntem…….. 42

4. BULGULAR…… 43

4.1. NF'nin UV-Spektrofotometrik Yöntemle Tayini……..……. 43

4.1.1. NF'ye ait Kalibrasyon Doğrusunun Elde Edilmesi …….……... 43

4.2. Analitik Yöntem Validasyonu Bulguları…….… 44

4.3. Nanopartiküler Sistemlerin Özelliklerine Ait Bulgular…….. 45

4.3.1. Yüzey Özellikleri…….……. 45

4.3.2. Nanopartiküler Sistemlerin Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyellerine Ait Bulgular…….……..…… 46

4.3.3. Nanopartiküler Sistemlere Ait Hazırlama Verimi ve NF Yükleme Etkinliği Bulguları……..……..... 46

4.3.5. *İn Vitro* Salım Çalışmalarına Ait Bulgular ……..…….. 47

4.3.6. NF, PLGA, Boş Nanopartikül ve Etkin Madde Yüklü

Formülasyonlara Ait DSC Termogramları……..…….. 48

4.3.7. NF, PLGA, Boş Nanopartikül ve Etkin Madde Yüklü

Formülasyonlarına Ait FT-IR Diyagramları……...……..…… 51

5. TARTIŞMA…….. 55

6. SONUÇ VE ÖNERİLER...……... 69

KAYNAKLAR…….. 70

EKLER……... 92

EK-1 ÖZGEÇMİŞ……. 92

EK-2 ETİK KURUL ONAY FORMU……....…….……... 93

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, hem değerli bilgi, tecrübe ve katkılarından hem de bizlere sunmuş olduğu laboratuvar imkânlarından ötürü hocam Sayın Doç. Dr. Meltem ÇETİN'e saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez kapsamında zeta potansiyel ve partikül büyüklüğü ölçümlerini almamızda bize imkan sağlayan Prof. Dr. Süheda HEKİMOĞLU'na, Prof. Dr. İmran VURAL'a ve Prof. Dr. Selma ŞAHİN'e (Hacettepe Üniversitesi, Ankara), eczacılık mesleğini edinmemde emeği geçen tüm hocalarıma, çalışmalarım sırasındaki desteklerinden ötürü ailem ve sevgili eşim Arş. Gör. Rukiye SEVİNÇ ÖZAKAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Ecz. Emrah ÖZAKAR

ÖZET

Etkin Madde Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve *in vitro* Değerlendirilmesi.

Amaç: Bu çalışmanın amacı, nifedipin etkin maddesinin (NF) sürekli salımını gerçekleştirmek ve istenmeyen yan etkilerini azaltmak üzere NF yüklü-PLGA nanopartiküllerini hazırlamak ve bu nanopartiküllerin *in vitro* özelliklerini incelemektir.

Materyal ve Metot: İki farklı hazırlama yöntemi (nanopresipitasyon ve emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma) kullanılarak PLGA nanopartikülleri hazırlanmıştır. UV-Spektrofotometrik yöntemle NF miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, FT-IR, DSC ve SEM bu sistemleri karakterize etmek için kullanılmıştır. Nanopartiküler sistemlerin yüzey morfolojisi, partikül büyüklüğü ve dağılımı, enkapsülasyon etkinliği ve *in vitro* salım özellikleri (PB pH 7.4 ortamında) incelenmiştir.

Bulgular: Nanopartiküler sistemlerin SEM görüntülerinden yaklaşık olarak küresel oldukları saptanmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin ortalama partikül boyutları 294.27±7.93-424.92±4.96 nm aralığındadır. Nötral PLGA nanopartikülleri elde edilmiştir (yaklaşık 0 mV). Nanopresipitasyon (N-2) ve emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemleri (N-4) kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin yükleme etkinliği değerleri sırasıyla, % 13.03±1.82 ve % 18.96±1.95 (p=0.05)'dir. PB pH 7.4 ortamında N-2 ve N-4 formülasyonları için % 100 kümülatif salım sırasıyla 38. ve 22. günde elde edilmiştir.

Sonuç: PLGA nanopartikülleri, NF'nin sürekli salımının sağlanması ve böylece NF'nin yan etkilerinin, tekrarlayan uygulamalarının azaltılması ve hasta uyuncunun artırılması için faydalı sistemlerdir.

Anahtar Kelimeler: DSC, FT-IR, *in vitro* çalışmalar, nanopartikül, nifedipin, PLGA

ABSTRACT

Preparation and *in vitro* Evaluation of Active Substance-Loaded PLGA Nanoparticles

Aim: The main purpose of this study was to prepare Nifedipine (NF) loaded-PLGA nanoparticles to achieve sustained release of NF and reduce its side effects and also to investigate their *in vitro* characteristics.

Material and Method: The PLGA nanoparticles were prepared by using two different preparation methods (nanoprecipitation method and emulsion-solvent evaporation method). The amount assay of NF was carried out using UV-spectrophotometric method. Furthermore, FT-IR, DSC and SEM were used to characterize these systems. The surface morphology, particle size and size distribution, encapsulation efficiency and *in vitro* release characteristics (in PB pH 7.4) of nanoparticles were investigated.

Results: SEM images of nanoparticles revealed their approximately spherical shape. The mean particle sizes of prepared nanoparticles ranged from 294.27±7.93 to 424.92±4.96 nm. PLGA nanoparticles were almost neutral (close to 0 mV). The percent encapsulation efficiency values of nanoparticles prepared by using nanoprecipitation method (N-2) and emulsion-solvent evaporation method (N-4) 13.03±1.82 % and 18.96±1.95 % (p=0.05), respectively. The extents of cumulative drug release from N-2 and N-4 in PB pH 7.4 medium were up to about 100 % at 38 days and 22 days, respectively.

Conclusion: PLGA nanoparticles are useful systems for sustained release of NF, and hence for reducing its side-effects and the necessity of repeated administrations of NF and increasing patient compliance.

Key words: DSC, FT-IR, *in vitro* studies, nanoparticle, nifedipine, PLGA.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

a/a : Ağırlık/Ağırlık oranı
a/h : Ağırlık/Hacim oranı
AV : Atriyoventriküler
DCM : Diklorometan
DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü
DMSO : Dimetilsülfoksit
DSC : Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
EMA : Avrupa İlaç Ajansı
ESC : Avrupa Kardiyoloji Derneği
ESH : Avrupa Hipertansiyon Derneği
FDA : Amerikan İlaç ve Gıda Kurumu
FT-IR : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
h/h : Hacim/Hacim oranı
KKB : Kalsiyum Kanal Blokerleri
KVH : Kardiyovasküler hastalıklar
LOD : Saptama sınırı
LOQ : Miktar tayin sınırı
NF : Nifedipin
PB : Fosfat tamponu
PGA : Poli(glikolik asit)
PLA : Poli(laktik asit)
PLGA : Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PVA : Polivinil alkol
R^2 : Belirlilik katsayısı
rpm : Dakikadaki devir sayısı
SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu
SS : Standart sapma
USP/NF35 : Amerikan Farmakopesi
X : Ortalama
VK : Varyasyon katsayısı
λmax : Maksimum dalga boyu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa No
Şekil 2.1.	NF'nin kimyasal yapısı ……..……..	17
Şekil 2.2.	NF'nin fotodegradasyon ürünleri (nitrozo ve nitro-piridin).	17
Şekil 2.3.	PLGA hidrolizi…….....	26
Şekil 3.1.	Doğruluk hesabında kullanılan eşitlik ……..…….	36
Şekil 3.2.	NF-yüklü nanopartiküler sistemlerin hazırlanmasında kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi ……...……	39
Şekil 3.3.	Hazırlama veriminin hesaplanmasında kullanılan eşitlik….	40
Şekil 4.1.	NF'ye ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi ..…….	43
Şekil 4.2.	NF yüklü formülasyonlara ait SEM fotoğrafları……...	45
Şekil 4.3.	N-2 ve N-4 formülasyonlarının PB pH 7.4 içindeki salım profilleri …….……..	47
Şekil 4.4.	PLGA (75:25)'ya ait DSC diyagramı……..…….....	48
Şekil 4.5.	NF'ye ait DSC diyagramı. ……..…...…..	48
Şekil 4.6.	N-1 Formülasyonuna ait DSC diyagramı.……..…..…….	49
Şekil 4.7.	N-3 Formülasyonuna ait DSC diyagramı.……..…….	49
Şekil 4.8.	N-2 Formülasyonuna ait DSC diyagramı...…...……...	50
Şekil 4.9.	N-4 Formülasyonuna ait DSC diyagramı.……	50
Şekil 4.10.	NF, PLGA ve hazırlanan formülasyonların DSC diyagramları …….…….….	51
Şekil 4.11.	PLGA'ya ait FT-IR spektrumu.…….……..	52
Şekil 4.12.	NF'ye ait FT-IR spektrumu.……	52
Şekil 4.13.	N-1 Formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.……	53
Şekil 4.14.	N-3 Formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.……...	53

Şekil 4.15. N-2 Formülasyonuna ait FT-IR spektrumu. …… 54

Şekil 4.16. N-4 Formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.……. 54

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No **Sayfa No**

Tablo 2.1. Yetişkinler için ofis ölçümlerinde elde edilen kan basıncı değerlerinin tanımı ve sınıflandırılması..……... 4

Tablo 2.2. ESH/ESC tarafından yayınlanan kılavuza göre kan basıncı değerlerinin tanımlanması ve sınıflandırılması ……..……... 5

Tablo 2.3. Hipertansiyon tanımlanmasında ofis ve ofis dışı ölçümlerle elde edilen eşik kan basıncı değerleri……..... 5

Tablo 2.4. Oral antihipertansif ilaçlar …… 11

Tablo 2.5. Kalsiyum kanal blokerleri ……..... 16

Tablo 2.6. Nanopartikül hazırlama yöntemleri, bazı özellikleri ve çoğunlukla kullanılan polimer örnekleri …….…….. 29

Tablo 4.1. NF miktar tayini yöntemi için gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri …….……..... 44

Tablo 4.2. Hazırlanan formülasyonlara ait ortalama partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri ……..…… 46

Tablo 4.3. Formülasyonlara ait hazırlama verimi bulguları……..…... 47

1. GİRİŞ

Değiştirilmiş salım sistemleri, terapötik etkinliğin artırılması, etkin madde salım hızı/yerinin kontrol edilmesine imkân sağlaması [geciktirilmiş salım ve uzatılmış salım (kontrollü salım, sürekli salım)], yan ve istenmeyen etkilerin azaltılması, hasta uyuncunun artırılması ve dozlama sıklığının düşürülmesi gibi pek çok üstünlüğe sahiptir. Ekonomik gelişmeler, kentleşme, sanayileşme ve küreselleşme insanların yaşam tarzlarını değiştirmektedir. Özellikle, fiziksel aktivitenin azalması, sağlıksız beslenme sonucu oluşan obezite ve sigara kullanımı gibi faktörler kardiyovasküler hastalıklar (KVH)'ın oluşma riskini artırmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 2008 yılında tahminen 17.3 milyon kişinin KVH nedeniyle öldüğü, yıllık 23 milyondan fazla insanın 2030 yılına kadar kalp krizi ve felç başta olmak üzere KVH nedeniyle hayatını kaybedeceği ve bu ölümlerin % 80 veya daha fazlasının orta ve az gelişmiş ülkelerde olacağı bildirilmiştir. KVH içinde hipertansiyon, toplumda sık görülmesi, kalp krizi, felç ve böbrek yetmezliği riskini artırması nedeniyle önemlidir. Kontrolsüz hipertansiyon, kalp ritminde düzensizliklere, kalp yetmezliğine ve körlüğe de neden olabilmektedir. Hipertansiyon tedavisinde etkili yöntemler olmasına rağmen kontrollü bir kan basıncı düşüşünü sağlamak, kan basıncı kontrol oranlarını artırmak, kardiyovasküler riskleri azaltmak, dirençli hipertansiyonu etkin bir şekilde tedavi etmek, istenmeyen ilaç yan etkilerini ve özellikle hipotansiyon riskini azaltmak amacıyla yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Antianjinal ve antihipertansif etkilerinden dolayı Nifedipin (NF) başta Prinzmetal Anjina Pektoris ve hipertansiyon tedavisinde olmak üzere Raynaud Sendromu, özefagusun ağrılı spazmı, pulmoner hipertansiyon, kronik anal fissür, hemoroid, erken (preterm) doğumun engellenmesi ve cilt yaralanmalarında da kullanılan bir etkin maddedir. Ayrıca, topikal olarak göze uygulandığında doza bağımlı olarak 4 saat veya daha uzun süreli olarak göz içi

basıncını düşürmektedir. NF, voltaja bağımlı L-tipi (yavaş) kalsiyum kanallarını bloke ederek kalp ve damar düz kaslarında kalsiyum iyonunun hücre içine girişini inhibe eder ve böylece koroner ve periferik arterlerde vazodilatasyon gerçekleşir ve kalp kası fonksiyonları için de gerekli enerji tüketimi/oksijen gereksinimi azaltılmış olur.

NF'nin hemen salım yapan dozaj şekillerinin kullanılması sonucu kontrolsüz bir hipotansiyon, senkop, kalp bloğu, inme, sinüs aresti, serebral iskemi, ventriküler fibrilasyon, baş dönmesi, halsizlik ve taşikardi gibi yan etkiler görülmektedir. Söz konusu bu yan etkileri azaltmak ve terapötik etkinliği uzatmak amacıyla NF'nin değiştirilmiş salım yapan dozaj şekilleri çoğunlukla tercih edilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, NF'nin uzun süreli salımını gerçekleştirmek, istenmeyen yan etkilerini azaltmak ve farklı endikasyonlarında da kullanımını sağlamak üzere NF-yüklü PLGA nanopartiküllerini hazırlamak ve bu nanopartiküllerin *in vitro* özelliklerini (yüzey morfolojisi, partikül büyüklüğü ve dağılımı, enkapsülasyon etkinliği, PB pH 7.4 ortamındaki *in vitro* ilaç salımı) incelemektir. Ayrıca, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) de bu sistemlerin karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar

Ekonomik gelişmeler, kentleşme, sanayileşme ve küreselleşme insanların yaşam tarzlarını değiştirmektedir. Özellikle, fiziksel aktivitenin azalması, sağlıksız beslenme sonucu oluşan obezite ve sigara kullanımı gibi faktörler kardiyovasküler hastalıkların oluşma riskini artırmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde insanların yaşam süreleri ve bu risk faktörlerine maruz kalma olasılıkları da artmaktadır. Düşük sosyoekonomik gruplarda bu hastalıkların görülme sıklığı ve bu hastalıklara bağlı ölüm riski daha yüksektir.[1]

Kalp ve kan damarlarının hastalıkları olan kardiyovasküler hastalıklar koroner kalp hastalığı, periferik damar hastalığı, serebrovasküler hastalıklar (inme), romatizmal kalp hastalığı, konjenital kalp hastalığı, pulmoner embolizm, derin ven trombozu ve hipertansiyon olarak sınıflandırılabilir. KVH içinde hipertansiyon toplumda sık görülmesi, kalp krizi, felç ve böbrek yetmezliği riskini artırması nedeniyle önemlidir. Kontrolsüz hipertansiyon kalp ritminde düzensizliklere, kalp yetmezliğine ve körlüğe de neden olabilmektedir.[1] Hipertansiyon tedavisinde etkili yöntemler olmasına rağmen kontrollü bir kan basıncı düşüşünü sağlamak, kan basıncı kontrol oranlarını artırmak, kardiyovasküler riskleri azaltmak, dirençli hipertansiyonu etkin bir şekilde tedavi etmek, istenmeyen ilaç yan etkilerini ve özellikle hipotansiyon riskini azaltmak amacıyla yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.[2]

2.1.1. Hipertansiyon

Hipertansiyon, arteriyel kan basıncının kabul edilen normal değerin üzerine çıkması olarak tanımlanmaktadır. Yüksek kan basıncı dünya çapında milyonlarca insanda inme, miyokart enfarktüsü, kalp yetersizliği gibi kardiyovasküler hastalık riskini artırmaktadır. Dolayısıyla, hipertansiyon ile KVH, böbrek yetersizliği ve ölüm

oranları arasında güçlü pozitif bir korelasyon olduğu ifade edilmektedir.[3-5]

Kan basıncının düzenlenmesi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem, renal sistem ve endokrin sistem arasındaki etkileşimle sağlanmaktadır.[6] Yetişkinlerde ölçülen kan basıncı değerlerinin nasıl tanımlanarak sınıflandırıldığı Amerikan Kardiyoloji Koleji ve Amerikan Kalp Cemiyeti tarafından yayınlanan yedinci Birleşik Ulusal Komite (Joint National Committee; JNC) raporunda yayınlanmıştır (Tablo 2.1).[7]

Tablo 2.1. Yetişkinler için ofis ölçümlerinde elde edilen kan basıncı değerlerinin tanımı ve sınıflandırılması.[7]

Kategori	Kan Basıncı Değerleri		
	Sistolik (mmHg)		**Diyastolik (mmHg)**
Normal	<120	ve	<80
Prehipertansiyon (öncü hipertansiyon)	120-139	veya	80-89
Evre 1, Hipertansiyon	140-159	veya	90-99
Evre 2, Hipertansiyon	≥160	veya	≥100

Avrupa Hipertansiyon Derneği (ESH) ve Avrupa Kardiyoloji Derneği (ESC) tarafından hazırlanan 2013 tarihli kılavuzda ofis (muayenehane/klinik) ölçümlerine göre yapılan kan basıncı tanımlanması ve sınıflandırılması Tablo 2.2'de verilmiştir. Bu kılavuzda, hipertansiyon tanı ve tedavisinde ofis ölçümlerinin yanı sıra ofis dışı (ayaktan ve evde) ölçümlerinde önemli katkılar sağlayacağı vurgulanmış ve hipertansiyonun tanımlanmasında kullanılan ofis ve ofis dışı ölçüm değerleri verilmiştir (Tablo 2.3).[8, 9]

Tablo 2.2. ESH/ESC tarafından yayınlanan kılavuza göre kan basıncı değerlerinin tanımlanması ve sınıflandırılması.[8, 9]

Kategori	Kan Basıncı Değerleri		
	Sistolik (mmHg)		Diyastolik (mmHg)
Optimum (ideal)	<120	ve	<80
Normal	120-129	ve/veya	80-84
Yüksek normal	130-139	ve/veya	85-89
Evre 1, Hipertansiyon	140-159	ve/veya	90-99
Evre 2, Hipertansiyon	160-179	ve/veya	100-109
Evre 3, Hipertansiyon	≥180	ve/veya	≥110
İzole sistolik hipertansiyon	≥140	ve	<90

Yukarıda verilen kılavuza göre tüm yaş ve risk grupları için hipertansiyon sistolik kan basıncının 140 mmHg'e eşit veya daha yüksek ve/veya diyastolik kan basıncının ise 90 mmHg'e eşit veya daha yüksek olması durumudur.[10] İdeal kan basıncı değerlerinin ise 120 (sistolik)/80 (diyastolik) mmHg değerlerinin altında olması istenir.[9]

Tablo 2.3. Hipertansiyon tanımlanmasında ofis ve ofis dışı ölçümlerle elde edilen eşik kan basıncı değerleri.[8, 9]

Kategori	Kan Basıncı Değerleri		
	Sistolik (mmHg)		Diyastolik (mmHg)
Ofis (Muayenehane/klinik)	≥140	ve/veya	≥90
Ambulatuvar			
Gündüz (veya uyanık)	≥135	ve/veya	≥85
Gece (veya uykuda)	≥120	ve/veya	≥70
24 saat	≥130	ve/veya	≥80
Evde	≥135	ve/veya	≥85

Yine, ESH/ESC tarafından yayınlanan 2013 kılavuzunda yaşlı hastalar ile ilgili değişiklikler yapılmış ve yaşlı hastaların sistolik kan basıncı değeri 160 mmHg üzerinde ise antihipertansif ilaçlara başlanması gerektiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, özellikle 80 yaşın altında, evre 1 hipertansiyon hastalarında ise verilen ilaçlara yaşlı hasta dayanabiliyorsa ilaç verilebileceği belirtilmiştir. Aynı kılavuzda, diyabet, kronik böbrek yetmezliği, KVH nedeniyle yüksek risk grubuna dâhil olan hipertansiyon hastalarında önceki kılavuzlarda kan basıncı değerleri yüksek normal kategorisinde olduğunda ilaç tedavisine başlanmıştır. 2013 kılavuzunda ise bu hastalar için ilaç başlama sınırı >140/90 mmHg olarak belirlenmiş ve yüksek normal kan basıncı değerlerinde ilaç verilmesi önerilmemiştir.[9]

2000 yılında, dünya genelinde 970 milyondan fazla insanın yüksek kan basıncına sahip olduğu saptanmış ve bu sayının 2025 yılına kadar % 60 oranında artacağı tahmininde bulunulmuştur. DSÖ'ye göre her yıl 7.1 milyon insan arteriyel hipertansiyon nedeniyle ölmektedir ve bu sayının gelecekte artacağı ifade edilmiştir.[11]

Hipertansiyon riski yaşla birlikte artmakta, dislipidemi, diyabet, obezite, fiziksel aktivitenin az olması/olmaması gibi risk faktörleri ile görülme sıklığı artmaktadır.[6] Hipertansiyon görülme sıklığı üzerinde ırk ve coğrafik faktörlerde etkilidir. Amerika ve Avrupa ülkelerinin çoğunda yetişkinlerin % 25-30'unda hipertansiyon görülmektedir. Kanada, Amerika ve İngiltere'de hipertansiyon görülme sıklığı sırasıyla % 19.5, % 29 ve % 30'dur.[6, 12] Türkiye'de erişkinlerde kalp hastalığı ve risk faktörleri sıklığı taraması (TEKHARF) çalışmasında ülkemizdeki hipertansiyon görülme sıklığının ise % 33.7 olduğu ve yaşla birlikte arttığı bulunmuştur.[6, 13]

Hipertansiyon sınıflandırılmasında kan basıncı düzeyleri dışında etiyolojilerine ve hedef organ hasarına göre de sınıflandırma yapılmaktadır.[14]

Etiyolojilerine göre:

a. “Primer” (esansiyel, idiopatik veya birincil) hipertansiyon: Bilinmeyen nedenlere bağlı olarak gelişen sistemik hipertansiyondur.[14, 15] Hipertansiyon vakalarının % 95’inden fazlasını primer hipertansiyon hastaları oluşturur.[10] Yaş (yaş ilerledikçe hipertansiyon oluşma riski artar), ırk, aile ve genetik faktörler (hipertansiflerin birinci derecedeki akrabalarında hipertansiyon gelişme riski fazladır), beslenme tarzı, diyetteki yüksek tuz miktarı, fiziksel aktivitede bulunmama, yüksek miktarda alkol tüketimi, sigara kullanımı (hipertansiyon, koroner arter hastalığı ve inme riski sigara kullanmayanlara göre daha yüksektir), obezite (hipertansiyon gelişiminde, beslenme ve metabolizmayla ilişkili olarak en sık karşılaşılan risk faktörüdür) primer hipertansiyon gelişme riskini artıran faktörlerdir.[10, 14, 16]

b. “Sekonder” (ikincil) hipertansiyon: Bir hastalığın çeşitli bulgularından biri olarak karşımıza çıkan hipertansiyondur. Hipertansiyon vakalarının % 5’inden azını kapsamaktadır.[10]

Sekonder hipertansiyona neden olan faktörler:[16, 17]

- **Renal Hipertansiyon:**
  - **Parankimatöz Renal Hastalıklara Bağlı** (Akut/kronik glomerülonefrit, polikistik böbrek hastalığı, diyabetik nefropati, hidronefroz, amiloidoz, üreter tıkanıklıklar)
  - **Böbrek Tümörlerine Bağlı** (Wilms tümörü, renin salgılayan tümör)
  - **Renovasküler Hipertansiyon** (renal arter fibröz displazisi, aterosklerotik renal arter hastalığı, renal arter embolisi, perinefritik kese)
- **Endokrin hipertansiyon:**
  - **Sürrenal hastalıklar** (Feokromasitoma, Cushing Sendromu, adrenal enzim eksiklikleri, Conn Sendromu)

- **Akromegali**
- **Troid Hastalıkları** (Hipertroidi, Hipotroidi)
- **Karsinoid Sendrom**
- **Eksojen Hormon Etkisi**

- **Nörolojik hastalıklar** (psikojenik, poliomyelit, polinevrit, artmış kafa içi basıncı, Guillian-Barre Sendromu)
- **Akut Stresler** (psikolojik, metabolik, cerrahi, travmatik, yoksunluk krizleri)
- **İyatrojenik** (steroid tedavisi, soğuk algınlığı ilaçları, antidepresan ilaçlar, aşırı D vitamini alımı, kontraseptifler, siklosporin, sempatomimetik tedavi, eritropoetin, kokain)
- **Gebeliğe Bağlı Hipertansiyon**

2.1.1.1. Hipertansiyon Tanısı ve Tedavi Yaklaşımları

Hipertansiyonun tedavi edilebilmesi öncelikle tanının doğru olarak konması ile mümkündür. Bu amaçla, kan basıncını saptamak için gerekli donanımsal çevre koşullarının sağlanması ve doğru bir teknik ile ölçüm yapılması gerekmektedir. Kan basıncının doğru ölçülmesi hipertansiyonun önlenmesi, tespiti, değerlendirilmesi ve tedavisi açısından en önemli noktayı oluşturur. JNC-7'de kan basıncının ofis şartlarında, hasta oturur pozisyonda iken 5 dakikalık dinlenme sonrasında ayakları yere basar şekilde ve kolu kalp hizasında desteklenmiş durumda iken uygun olarak ölçülebileceği bildirilmiştir.[18] Hipertansiyon tanısı genellikle, en az son iki muayenehane/klinik ziyaretinde ölçülen 2 veya daha fazla kan basıncı ölçümünün ortalaması esas alınarak konmaktadır. Bununla birlikte şiddetli vakalarda ise tek bir ziyarette elde edilen ölçüm sonrası tanı konabilir. Ayrıca son kılavuzlara göre, tanı konmasında ofis dışı ölçümler de önemlidir ve değerlendirilmelidir.[4, 6] Hipertansiyonun klinik değerlendirilmesinde göz önünde bulundurulması gereken 4 temel amaç:[19, 20]

1- Kan basıncının kronik olarak yüksek olduğunun doğrulanıp düzeyinin tespit edilmesi,

2- Sekonder hipertansiyon varlığının araştırılması,

3- Organ hasarı varlığının değerlendirilmesi,

4- Prognozu ve tedaviyi etkileyebilecek kardiyovasküler risklerin ve klinik özelliklerin araştırılmasıdır.

Klinik değerlendirmede kan basıncı ölçülmesinin yanı sıra hasta öyküsünün tam alınması ve tam bir fizik muayene yapılması hipertansiyon tipinin belirlenmesi açısından önemlidir. Olası organ hasarı ve ikincil nedenleri tespit etmek üzere laboratuvar testleri ve radyolojik incelemeler (tam idrar tetkiki, hematokrit, plazma glukozu, potasyum, kreatinin, serum kolesterol ve trigliseridleri, kalsiyum, ürik asit, göğüs grafisi ve EKG) yapılmalı ve ilgili parametreler değerlendirilmelidir.[4, 14]

ESH/ESC tarafından yayınlanan 2013 kılavuzunda yaşlılar dışında tüm hipertansiyon hastaları için sistolik kan basıncının 140 mmHg'nın ve diyastolik kan basınıcının ise 90 mmHg'nın altında tutulması gerektiği belirtilmiştir. Diyabet ve böbrek yetmezliği olanlardaki diyastolik kan basıncı hedefi ise 85 mmHg'nin altında olmalıdır. Sistolik kan basıncı değerleri >160 mmHg olan 80 yaşın altındaki yaşlı hastalar için hedefin 140-150 mmHg olması gerektiği, ancak hasta fiziksel olarak iyi ve aktif bir durumda ise sistolik kan basıncının 140 mmHg'nin altına indirilebileceği ifade edilmiştir. 80 yaş üzeri ve sistolik kan basıncı değerleri >160 mmHg olan hastalar içinse hedef 140-150 mmHg aralığıdır.[9]

ESH/ESC tarafından yayınlanan 2003, 2007 ve 2013 tüm kılavuzlarda hipertansiyon tedavisinde sadece kan basıncı değeri yerine "toplam kardiyovasküler riskin" belirlenmesi gerekliliği vurgulanmıştır.[9] Bundan dolayı, hipertansiyon tedavisindeki temel amaç, kardiyovasküler morbidite ve mortalite riskinin en aza indirilmesidir. Hipertansiyonun tedavisinde, ilaç kullanılarak veya ilaç kullanılmadan ve

yaşam tarzı değişikliğiyle (tuz kısıtlaması, alkol kısıtlaması, diyet, kilo kaybı, egzersiz, sigaranın bırakılması, sodyum alımının azaltılması gibi) kan basıncının düşürülmesi hedeflenmektedir.[10]

ESH/ESC tarafından yayınlanan 2013 kılavuzunda düşük riskli evre 1 hipertansiyon hastalarının birkaç ay ilaç verilmeden sadece yaşam şekli değişikliği yapılarak hastanın kan basıncı takibinin yapılması önerilmiş, şayet kan basıncı bu değişiklikler ile kontrol altına alınamazsa bu durumda değişikliklerin yanı sıra ilaçlı tedaviye geçilmesi gerektiği ifade edilmiştir.[9, 10] Yüksek risk faktörleri taşıyan hastalarda ise yaşam tarzı değişiklikleri ile ilaç tedavisi birlikte başlanabilmektedir.[6] Yaşam tarzı değişiklikleri ile sistolik ve diyastolik kan basıncı değerlerinde düşme sağlandığı, kardiyovasküler risklerin azaldığı ve antihipertansif ilaçların etkinliğinde artış sağlandığı ifade edilmiştir.[10]

Kan basıncı düzeyinin yanı sıra organ hasarı, kardiyovasküler hastalık/risk faktörlerinin varlığı hipertansiyonda ilaç tedavisine başlanılmasında etkili olan temel faktörlerdir.[10] ESH/ESC tarafından yayınlanan 2013 kılavuzunda da belirtilen ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan beş ilaç grubu; diüretikler, kalsiyum kanal blokerleri (KKB, kalsiyum antagonistleri), beta blokerler, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri ve anjiyotensin reseptör blokerleridir. Ancak, JNC 8 kılavuzunda ise bazı olumsuzluklar (yaşlı hastalar başta olmak üzere bazı hastalarda inme gibi kardiyovasküler riskler açısından sonuçların daha olumsuz olması, kan basıncının yeterince düşürülememesi ve diüretiklerle birlikte yeni diyabet sıklığının artması) nedeniyle ilk seçilecek ilaçlar grubuna beta blokerler dâhil edilmemiştir. Ayrıca, yayınlanan son kılavuzlarda böbrek yetersizliği olan ve proteinürili hastalarda anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri-anjiyotensin reseptör blokerlerinin birlikte kullanımının kesinlikle önerilmemesi gerektiği ifade edilmiştir.[9]

Tablo 2.4 Oral Antihipertansif ilaçlar[18, 21, 22]

Sınıf	Etkin madde	Doz aralığı, mg/d	Kullanımı hipertansiyona eşlik eden aşağıdaki durumlarda faydalıdır	Kullanımı hipertansiyona eşlik eden aşağıdaki durumlarda zararlıdır
Tiyazid diüretikler	Klorotiyazid	125-500	İzole sistolik hipertansiyon	Gut (kontrendike)
	Klortalidon	12.5-25	(yaşlı hastalarda)	Böbrek yetersizliği (Potasyum tutucu
	Hidroklorotiyazid	12.5-50	Kalp yetmezliği	diüretikler) (kontrendike)
	Politiyazid	2-4	Yaşlı hastalar Siyah ırk	Hiperkalemi (Potasyum tutucu
	İndapamid	1.25-2.5	Tip 2 diyabet (düşük dozda)	diüretikler) (kontrendike)
	Metolazon	0.5-5	Osteoporoz (tiyazid grubu diüretikler)	Dislipidemi (yüksek dozda)
				Diyabet (yüksek dozda)
Loop diüretikleri	Bumetanid	0.5-2		
	Furosemid	20-80		
	Torsemid	2.5-10		
Potasyum-tutucu diüretikler	Amilorid	5-10		
	Triamteren	50-100		
Aldosteron reseptör antagonistleri	Eplerenon	50-100		
	Spironolakton	25-50		

Sınıf	Etkin madde	Doz aralığı, mg/d	Kullanımı hipertansiyona eşlik eden aşağıdaki durumlarda faydalıdır	Kullanımı hipertansiyona eşlik eden aşağıdaki durumlarda zararlıdır
Beta Blokerler	Atenolol	25-100	Taşiaritmiler	Bronkospastik hastalık (kontrendike)
	Betaksolol	5-20	Anjina	2.-3. derece AV blok (kontrendike)
	Bisoprolol	2.5-10	Tip 2 diyabet	Depresyon
	Metoprolol	50-100	Esansiyel tremor (kardiyoselektif	Periferik damar hastalığı
	Nadolol	40-120	olmayan beta blokerler)	Diyabet
	Propranolol	40-180	Kalp yetmezliği	Atletler ve fiziksel olarak aktif hastalar
	Timolol	20-40	Hipertiroidi	Kalp yetmezliği (Beta blokerler
			Migren (kardiyoselektif olmayan beta	(metoprolol, bisoprolol dışında)
			blokerler)	Dislipidemi
			Miyokard infarktüsü	
			Preoperatif hipertansiyon	
İntrinsik sempatomimetik etkili Beta blokerler	Asebutolol	200-800	Miyokard infarktüsü sonrası	Şok, Konjestif kalp yetmezliği,
			Taşiaritmiler	2.-3. derece AV blok,
	Penbutolol	10-40	Anjina	İlerlemiş periferik damar hastalığı,
	Pindolol	10-40		Obstrüktif solunum yolu hastalıkları

Sınıf	Etkin madde	Doz aralığı, mg/d	Kullanımı hipertansiyona eşlik eden aşağıdaki durumlarda faydalıdır	Kullanımı hipertansiyona eşlik eden aşağıdaki durumlarda zararlıdır
Alfa ve Beta blokerlerin kombinasyonu	Karvedilol	12.5-50	Kalp Yetmezliği Anjina	Ağır bradikardi Ağır hipotansiyon Kardiyojenik şok Bronkospazm Karaciğer hastalığı
	Labetalol	200-800		
ACE inhibitörleri	Benazepril	10-40	Miyokard infarktüsü sonrası (sistolik disfoksiyonda) Proteinürili diyabet Kalp yetmezliği Diyabetik nefropati Sol ventrikül disfonksiyonu Tip 2 diyabet Böbrek yetersizliği	Gebelik (kontrendike) Hiperkalemi (kontrendike) Çift taraflı renal arter darlığı (kontrendike) Anjiyonörotik ödem (kontrendike)
	Kaptopril	25-100		
	Enalapril	2.5-40		
	Fosinopril	10-40		
	Lisinopril	10-40		
	Moeksipril	7.5-30		
	Perindopril	4-8		
	Quinapril	10-40		
	Ramipril	2.5-20		
	Trandolapril	1-4		
Anjiyotensin II antagonistleri	Kandesartan	8-32	Kalp yetmezliği ACE inhibitörüne bağlı öksürük	Gebelik (kontrendike) Hiperkalemi (kontrendike) Çift taraflı renal arter darlığı (kontrendike)
	Eprosartan	400-800		
	İrbesartan	150-300		
	Losartan	25-100		
	Olmesartan	20-40		
	Telmisartan	20-80		
	Valsartan	80-320		

Sınıf	Etkin madde	Doz aralığı, mg/d	Kullanımı hipertansiyona eşlik eden aşağıdaki durumlarda faydalıdır	Kullanımı hipertansiyona eşlik eden aşağıdaki durumlarda zararlıdır
Dihidropiridin grubu dışındaki KKB	Diltiazem	180-420 (ER)	Yaşlı hastalar	2-3. derece AV blok (kontrendike)
			Taşiaritmiler	
		120-540 (ER)	Anjina	
			Proteinürili diyabet	
	Verapamil	80-320 (IR)	Migren	
		120-360 (SR)	Miyokard infarktüsü	
			Periferik damar hastalığı	
			Siklosporin'e bağlı hipertansiyon	
KKB-Dihidropiridin	Amlodipin	2.5-10	İzole sistolik hipertansiyon	
	Felodipin	2.5-20	(yaşlı hastalarda)	
	İsradipin	2.5-10	Yaşlı hastalar	
	Nikardipin	60-120 (SR)	Siyah ırk	
	Nifedipin	30-60 (XL)	Anjina	
	Nisoldipin	10-40	Proteinürili diyabet	
			Periferik damar hastalığı	
			Siklosporin'e bağlı hipertansiyon	
$Alfa_1$-Blokerler	Doksazosin	1-16	Prostat hipertrofisi	Ortostatik hipotansiyon
	Prazosin	2-20	Glukoz intoleransı	
	Terazosin	1-20	Dislipidemi	
Bazı diğer Antihipertansifler	Klonidin	0.1-0.8		Mentaldepresyon riski varsa (kontrendike)
	Metildopa	250-1000		Karaciğer hastalığı (kontrendike)
	Hidralazin	25-100		

Çalışmamızda antihipertansif etkin madde olarak Nifedipin kullanıldığı için bu kısımda Nifedipin hakkında bilgi verilecektir.

2.2. Nifedipin

Hücresel fonksiyonların gereksinimi için iyon kanalları son derece önemlidir. Hücrelerin membranları boyunca bu iyonik kanallar faaliyet halindedir. Birtakım kimyasal ve fiziksel uyarılar sonucunda Na^{+},Ca^{+2}, K^{+} ve Cl^{-} iyonları özgün iyon kanalları aracılığıyla hücre içine ve/veya hücre dışına hareket etmektedirler. Bu sayede hücreler için hayati öneme sahip tüm işlevler yerine getirilmiş olur. İşte bu hayati işlevlerden biri olan hipertansiyonun önlenmesi açısından Ca^{+2} kanalları önemli bir tedavi yolunu oluşturmaktadır. Memelilerde, 6 tip (T, L, N, P/Q ve R) voltaj-bağımlı kalsiyum kanalı tanımlanmıştır. Bu kanallar heterojen yapıdadır ve birbirlerinden yerleşim bölgeleri ve elektrofizyolojik karakterleri açısından farklılık gösterirler. L-tipi (uzun süreli) kalsiyum kanalları kalp ve düz kaslar başta olmak üzere dokularda yaygın bir şekilde dağılım gösterirler ve bundan dolayı, kalp kası ve vasküler düz kasların kasılmasında önemlidirler. KKB bu kanalların alfa-1 alt ünitiesine bağlanır. Ayrıca, T-tipi (kısa süreli, geçici veya düşük voltaj) kalsiyum kanalları başlıca sinoatriyal (sinüs nodu, SA) ve atriyoventriküler (AV) nodlarında, kardiyak purkinje hücrelerinde ve merkezi sinir sisteminde, N-tipi (sinirsel) kalsiyum kanalları yaygın bir şekilde sinir dokularında, P-tipi kalsiyum kanalları ise beyincik Purkinje hücrelerinde bulunmaktadır. Q ve R tipleri ise nöronlarda yer alır.[23-26]

Kalsiyum, kalp kası ve damar düz kaslarının kasılması/gevşemesi, hücre bölünmesi, hücresel hareketlilik, sinir sisteminin işleyişi, hormon sekresyonu, metabolizma, gen ekspresyonu, protein döngüsü ve apoptozis gibi süreçlerde işlevsel öneme sahiptir.[27]

KKB damar düz kası ve kalp kası hücrelerine kalsiyum girişini inhibe ederler.

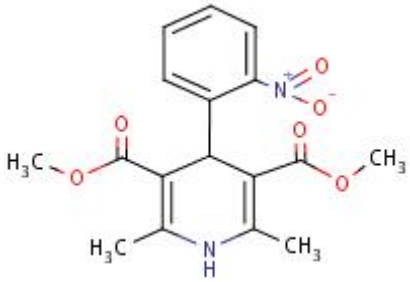
İnhibisyon sonucu oluşan arteriyel dilatasyon ve periferik direncin azalması sonucunda antihipertansif etkiler görülür. KKB, dihidropiridinler (nifedipin, amlodipin vb.) ve dihidropiridin yapısında olmayanlar (verapamil, diltiazem) şeklinde iki ana grupta toplanmaktadır (Tablo 2.5).[28, 29]

Tablo 2.5. Kalsiyum kanal blokerleri (antagonistleri).[29]

Birinci Kuşak	İkinci Kuşak	Üçüncü Kuşak
Verapamil	Felodipin	Amlodipin
Diltiazem	Isradipin	
Nifedipin	Nikardipin	
	Nimodipin	
	Nisoldipin	
	Nitrendipin	

Not: Birinci kuşak kalsiyum antagonistleri için yavaş salım formülasyonları tercih edilir. Aksi takdirde istenmeyen farmakokinetik parametreler elde edilmektedir. Birinci kuşak etkin maddelere karşı artmış doku seçiciliğine sahip olan ikinci kuşak kalsiyum antagonistlerinin de plazma seviyelerindeki büyük dalgalanmaların önlenmesi için yavaş salım formülasyonları tercih edilmektedir. Doku seçiciliğini koruyan üçüncü kuşak antagonistler ise sahip oldukları kimyasal özelliklerinden dolayı uygun farmakokinetik parametrelere sahiptirler.[29]

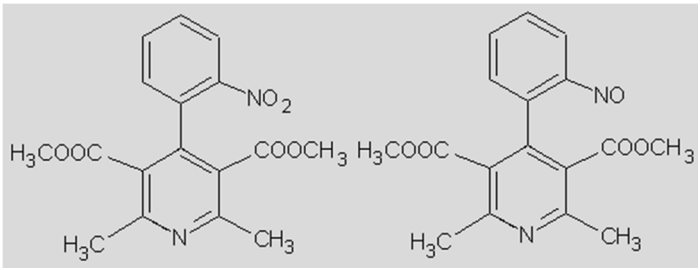
Nifedipin, dimetil 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-piridin-3,5-dikarboksilat kimyasal yapısına sahiptir (Şekil 2.1). Erime derecesi 172 °C-174 °C aralığında olan NF molekül ağırlığı 346.3 olan sarı renkli, kokusuz, pKa'sı 3.93 olan kristal yapılı lipofilik özellikte bir etkin maddedir.[30-33]



Şekil 2.1 NF'nin kimyasal yapısı[30]

NF üzerinde yapılan kimyasal değişikliklerle yeni kuşak dihidropiridin grubu KKB hazırlanmıştır. Vasküler seçicilik ve voltaj-bağımlı bağlanma için 1,4-dihidropiridin yapısı temeldir. Kimyasal yapıda değişiklikler çoğunlukla 3 ve 5 nolu konumlarda bulunan ester grupları üzerinden (açil, amit, sülfonil, nitril gibi çeşitli karbonil fonksiyonel grupları) olmaktadır. Bu konumlarda yapılan değişikliklerin etki ve seçicilik üzerindeki etkileri önemlidir. Yapılan çalışmalarda, C-6 pozisyonuna fenil benzeri gruplar bağlandığında etkinlik ve seçiciliğin arttığı belirtilmiştir.[34-37]

Işığa maruz kalan NF kimyasal degredasyona uğrar. Gün ışığı altında nitrozo türevlerine, UV ışığı altında da nitro türevlerine dönüşmektedir (Şekil 2.2). Oluşan bu ürünler oldukça polar yapılardır. Nitrozo türevleri Ca^{+2} kanal inhibisyonunu tersine çevirir, nitro türevleri ise ciltteki ışığa duyarlılığı tetikler.[38-40]



Şekil 2.2. NF'nin fotodegradasyon ürünleri (nitrozo ve nitro-piridin)[40]

Sudaki çözünürlüğü (<10 mg/L) oldukça düşük olan NF'nin çözünürlüğünü, çözünme hızını artırmak üzere sodyum lauril sülfat gibi yüzey aktif maddelerle

çalışılmış, çeşitli siklodekstrin türevleriyle inklüzyon kompleksleri, katı dispersiyonlar, nanokristaller ve sıvı-katı kompakt yapıları hazırlanmıştır.[41-46]

NF, gastrointestinal sistemden hızlı ve neredeyse tamamen emilmektedir. Ancak, yoğun bir hepatik ilk geçiş etkisine uğradığından yumuşak jelatin kapsülleri halinde oral uygulanan NF'nin biyoyararlanımı % 45-75 oranında olmakta ve maksimum plazma konsantrasyonuna 30 dakikada ulaşılmaktadır. NF, 30-180 mg'lık doz aralığında kullanıldığında sıfırıncı derece kinetik sergilemektedir. NF, yaklaşık % 92-98 oranlarında plazma protenlerine bağlanmaktadır. Eliminasyon yarı ömrü dozaj formuna bağlı olarak i.v. uygulama sonrası 1.3-1.8 saat, oral kapsül için 2-3.4 saat ve oral uzatılmış salım tabletleri içinse 6-11 saat olarak saptanmıştır. Karaciğer fonksiyon yetersizliğinde eliminasyon yarı-ömrü belirgin bir şekilde uzar, ciddi vakalarda doz azaltılması gerekebilir.[30, 41, 47-49]

NF, emilim sonrası oksidatif mekanizmalarla (CYP 3A izoenzimini içeren) farmakolojik olarak etkili olmayan, polar nitropiridin analoglarına metabolize edilir. Başlıca, karaciğer olmak üzere bağırsak duvarında da metabolizasyona uğrar.[50] NF, metabolitleri halinde çoğunlukla böbrekler (% 60-80) yoluyla, geri kalanı ise feçesle atılır. Çok az miktarı (<% 0.1) ise değişmemiş olarak idrar yoluyla atılır. NF, Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (Biopharmaceutics Classification System-BCS)'ne göre Sınıf II (düşük çözünürlük/yüksek permeabilite) ve düşük çözünürlük ve yüksek metabolizasyon özelliklerinden dolayı ise Biyofarmasötik İlaç Dispozisyon Sınıflandırma Sistemi (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System-BDDCS)'ne göre Sınıf II'de yer almaktadır.[49, 51, 52]

Kalsiyum antagonisti olan NF, özellikle miyokard hücreleri, koroner arterler ve periferik direnç damarlarının düz kas hücreleri üzerinde etkilidir. NF, voltaja bağımlı L-tipi kalsiyum kanallarına bağlanarak kalp ve damar düz

kaslarında kalsiyum iyonunun hücre içine girişini düşük dozlarda dâhi inhibe eder.[47, 53-55] Hücre içi kalsiyum iyonu derişimindeki değişiklikler çok çeşitli hücresel fonksiyonların (damar düz kasının kasılması/gevşemesi, hücre bölünmesi vb) gerçekleşmesini sağlar. Kalsiyumun hücre içine girişinin engellenmesi sonucu kalsiyum-bağımlı ATPaz enzimi aktivasyonu gerçekleşemez, buna bağlı olarak ATP tüketimi azalır. Sonuç olarak, NF arteriyel tonusu düşürerek koroner ve periferik arterlerde vazodilatasyona neden olur, koroner arter spazmı önlenir/ortadan kaldırılır, kalp kası kasılması önlenir ve kalp kası fonksiyonları için gerekli enerji tüketimi/oksijen gereksinimi azaltılmış olur.[30, 56] Bu nedenle, NF antianjinal ve antihipertansif etkilere sahiptir ve öncelikle Prinzmetal anjina pektoris ve hipertansiyon tedavisinde kullanılır. Ayrıca, pulmoner hipertansiyon, Raynaud Sendromu, özefagusun ağrılı spazmı, kronik anal fissür, hemoroid ve cilt yaralanmalarında da kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, göze topikal uygulandığında göz içi basıncını uygulanan doza göre 4 saat veya daha uzun süreli olarak düşürmektedir. NF etkili bir tokolitik ajan olarak erken (preterm) doğumun engellenmesinde kullanılmak üzere DSÖ'nün esansiyel ilaçlar listesinde yer almaktadır.[30-33, 57, 58] Ishizawa ve ark.[59] tarafından yapılan bir çalışmada ise nifedipinin kısmi bozunma ürünlerinden olan nitrozonifedipinin endotel hücre hasarlarında iyileştirici etkisi olduğu ve kronik böbrek rahatsızlığı tedavisinde faydalı olabileceği bildirilmiştir.

Bununla birlikte, NF kardiyojenik şok, gelişmiş aort darlığı, kararsız anjina pektoris durumlarında, miyokard infaktüsün ikincil olarak önlenmesinde, karaciğer bozukluğu olan kişilerde, gebeliğin 20. haftasından önce ve emzirme dönemlerinde kullanılmamalıdır. Ayrıca, rifampin, rifabutin, fenobarbital, fenitoin, karbamazepin gibi güçlü CYP3A izoenzim uyarıcıları NF'nin biyoyaarlanımını ve etkinliğini önemli derecede azaltırlar, bundan dolayı NF ile birlikte kullanılmamalıdırlar. Ketokonazol,

flukonazol, itrakonazol, klaritromisin, eritromisin, nefazodon, fluoksetin, saquinavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir gibi CYP3A izoenzim inhibitörleri ise NF etkinliğini artırırlar. Bu nedenle, bu ilaçlarla birlikte kullanım durumunda doz ayarlanması ve hastanın dikkatli şekilde takip edilmesi gerekmektedir.[30, 60-62] Ayrıca, NF, CYP3A izoenzim inhibitörü olan greyfurt suyuyla aynı anda alındığında plazma konsantrasyonu önemli derecede yükseldiğinden, nifedipin kullanan hastaların greyfurt suyundan kaçınmaları gerekmektedir.[63, 64]

NF'nin hemen salan (immediate-release; IR) dozaj şekillerinin kullanılması sonucu kontrolsüz bir hipotansiyon, senkop, kalp bloğu, inme, sinüs aresti, serebral iskemi, ventriküler fibrilasyon, baş dönmesi, halsizlik ve taşikardi gibi yan etkiler oluşmaktadır.[41, 65, 66] NF'nin kronik yan etkileri arasında ise diş eti büyümesi dikkat çekmektedir.[67] NF'nin akut yan etkilerinin azaltılmasına yönelik değiştirilmiş salım yapan dozaj şekillerinin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmış ve ticari ürün olarak piyasaya sunulmuştur.[41] NF'nin uzun süreli salım yapan formülasyonları, refleks sempatik sinir sistemi aktivasyonunu önlemek ve terapötik etkinliği uzatmak amacıyla yoğun bir şekilde tercih edilmektedir.[47]

NF'nin yan etkilerini azaltmak, hasta uyuncunu ve stabilitesini artırmak üzere farklı ilaç taşıyıcı sistemler (mikroboncuk, mikrokapsül, mikropartikül, nanopartikül, katı lipid nanopartikülü vb.) geliştirilmiştir.[39, 68-95]

2.3. İlaç Taşıyıcı Yeni Sistemler

Yeni bir ilaç molekülünün geliştirilmesi yüksek maliyetli ve zaman alıcı bir süreçtir. Bu nedenle, var olan etkin maddelerin etkinliğini ve güvenilirliğini artırmak üzere etkin madde/maddelerin salım hızını/salım yerini kontrol etmek, dozunu/dozlama sayısını azaltmak, dayanıklılığını artırmak (fotodegredasyon, pH değişiklileri gibi çevre koşullarına karşı korur) vb. farklı yaklaşımları gerçekleştirmek üzere ilaç taşıyıcı yeni

sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemler, hasta uyuncunun ve yaşam kalitesinin artırılmasında çok önemli faydalar sağlamaktadırlar.[96, 97]

Uygun bir ilaç taşıyıcı sistem, etkin maddeyi istenen doku ve/veya organa istenen hızda ve sürede taşımalıdır. Etkin maddeyi istenen doku ve/veya organa taşıyan sistemlere hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler, etkin maddenin salım hızını kontrol eden sistemlere ise kontrollü salım sistemleri denir.[98, 99]

Salım hızının değiştirilmesi amacıyla geliştirilmiş modifiye salım sistemlerini Amerikan Farmakopesi (USP/NF35) iki ana başlık altında toplamaktadır. Bunlar, geciktirilmiş ve uzatılmış salım sistemleridir.[100]

Geciktirilmiş salım sistemleri, genellikle, iritasyon gibi yan etkileri önlemek veya asit pH'ya duyarlı etkin maddelerin korunmasını sağlamak amacıyla enterik kaplama halinde hazırlanırlar.[100]

Uzatılmış salım sistemleri ("prolonged-release systems", "extended-release systems"), etkin maddelerin uzun bir süre salınmasını sağlamak amacıyla hazırlanırlar. Bu salım sistemleri, "repeat-action", "controlled-release", "sustained-release" olarak da ifade edilmektedir.[100]

Sürekli Salım Sistemleri (Sustained-Release Systems)

Etkin madde plazma veya doku düzeylerini konvansiyonel ilaç şekillerine göre daha uzun süre devam ettirebilen sistemlerdir. Genellikle salım birinci derece kinetikle gerçekleşir.[100-102]

Tekrarlanan Etkili Sistemler ("Repeat-Action Systems")

Birden fazla etkin madde dozu içeren sistemlerdir. Belli zaman aralıkları ile bu dozların salımı gerçekleşir.[100-102]

Kontrollü Salım Sistemleri ("Controlled-Release Systems")

Kontrollü salım sistemleri, etkin maddeyi uygun olarak taşır ve taşıdıkları etkin

maddenin istenen süre ve hızda salımını sağlarlar. Bu sistemlerin, salım hızlarının önceden planlanarak sıfırıncı derece kinetikle etkin madde salımını gerçekleştirebilmeleri önemli üstünlükleridir.[101]

Kontrollü salım sağlayan sistemler, hedef bölgede uzun süre sabit ilaç konsantrasyonu sağlarlar.[103] Hedeflendirilmiş kontrollü etkin madde salımı sağlayan sistemler, klasik dozaj formları ile karşılaştırıldığında; düzeltilmiş etkinlik, azaltılmış toksisite, hasta uyuncu ve hasta rahatlığı açısından çok sayıda üstünlüklere sahiptirler.[103, 104]

Bu sistemlerin üstünlükleri aşağıdaki şekilde özetlenebilir:[101, 102]

- İlaç alındıktan sonra istenilen süre boyunca etkin madde plazma konsantrasyonu sabit kalır. Hasta daha az sıklıkla ilaç alır ve küçük dozlarda tedavi sağlanır.
- Tedavi düşük dozlarla sağlandığı için etkin madde/maddelerinin yan ve toksik etkileri azaltılır/görülmez.
- Etkin madde/maddelerinin parçalanmasını önleyerek yarılanma ömürlerini uzatır.
- Kontrollü salım sistemlerinde hedeflendirme olanağı sayesinde etkin madde istenen doku ve organlara yönlendirilebilir.
- İlaç kullanımı sırasında yaşanan sorunlar (gece ilaç kullanma, unutma riski, kısa zaman aralıklarında ilaç kullanma durumları) ortadan kalkar.
- Terapötik indeksi dar olan etkin maddeler için uygundur.
- Uygulanan hastalarda yaşam kalitesi artar ve hasta bakımı kolaylaşır.

Ancak, bu sistemlerle ilgili bir takım sakıncalarda mevcuttur. Bunlar; sistemin hazırlanmasında kullanılan polimer veya parçalanma ürünlerinin toksik etki veya

biyolojik uyuşmazlık gösterebilme olasılığı, sistem vücut içerisinde iken ilaç salınmasının istenilen sürede durdurulamaması, formülasyon geliştirme maliyetinin yüksek olması, birden fazla hazırlama yönteminin bulunması ve her etkin maddenin kontrollü salım sisteminin hazırlanamaması vb. şeklinde özetlenebilir.[103, 104]

Nanopartiküller, mikropartiküler ve lipozomlar başta olmak üzere Farmasötik Teknoloji açısından önemli olan ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır ve yapılmaya da devam edilmektedir. Polimerik partiküller, çok yönlü ve çok farklı yollarla (intravasküler, oral, pulmoner, subkütan vb.) kullanıma imkân sağlayan, her uygulama yolu için farklı tasarım gereksinimlerine ihtiyaç duyan sistemlerdir.[105] Bu kısımda, polimerler ve bu tezin konusu olan polimerik nanopartiküler sistemler hakkında kısaca bilgi verilecektir.

2.3.1 Polimerik İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında sentetik ve doğal polimerler kullanılmaktadır. Kullanılan polimerlerin seçiminde, kullanılış yolu, etkin maddenin cinsi, dozu ve salım süresi dikkate alınmalıdır.[106]

Polimerler genel olarak başlıca iki grup altında incelenebilir:

* Biyoparçalanabilen polimerler
* Biyoparçalanmayan polimerler

Biyoparçalanabilen Polimerler- Biyoparçalanabilen doğal ve sentetik polimerlerdir. Toksisitelerinin olmaması/düşük olması, biyolojik sistemle geçimli olmaları ve biyolojik sistemden parçalanarak uzaklaştırılabilmeleri nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar.[107] Sentetik ve doğal polimerlere aşağıdaki örnekler verilebilir:[98, 106, 108]

Sentetik Polimerler:

- ✓ ***Poliesterler:*** Poli(hidroksi bütirat), poli(laktik asit), poli(glikolik asit), poli(laktik-ko-glikolik asit), poli(ε-kaprolakton), poli(β-malik asit)
- ✓ ***Poliamidler:*** Poli(amino asitler), poli(imino karbonatlar)
- ✓ ***Polianhidritler:*** Poli[bis(p-karboksifenoksi propan-ko-sebasik asit)], poli(yağ asidi dimer-kosebasik asit)

Doğal Polimerler:

- ✓ ***Polisakkaritler:*** Kitosan, kitin, agaroz, dekstran, aljinat, hiyaluronik asit.
- ✓ ***Protein yapısında olan polimerler:*** Albümin, jelatin, kollajen (antijenik yanıt oluşturabilirler).

Polimerlerin parçalanması, hidrolitik veya enzimatik mekanizmalarla veya her iki mekanizmanın da etkisiyle gerçekleşmektedir.[106, 107] Polimerin amorf, kristal ya da yarı kristal yapıda olması, molekül ağırlığı, parçalanma mekanizması, hangi koşullarda üretildiği, sertleştirme ve saklama şartları, sterilizasyon işlemi (gerektiğinde), taşıyıcı sistemin uygulama yolu ve etki bölgesi parçalanmayı etkileyen faktörlerdir.[108]

Biyoparçalanmayan Polimerler- Bu polimerler biyolojik ortamda parçalanmazlar. Hidrofil veya hidrofob yapıdadırlar.[106] Bu polimerlerin en önemli dezavantajı kronik toksisite riskidir.[98] Taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılan biyoparçalanamayan polimerler:[106, 108]

Selüloz Türevleri: Selüloz asetat, selüloz asetat bütirat, etil selüloz.

Akrilik Polimerler: Poli(hidroksi-etil-metakrilat), poli(hidroksietoksi-etil-metakrilat), poli(metoksi-etil-metakrilat), poli(metakrilik asit) v.b.

Silikonlar, polivinil prolidon, poli(etilen-vinil asetat) kopolimeri bu grupta yer alan diğer polimerlerdir.

2.3.1.1. PLGA

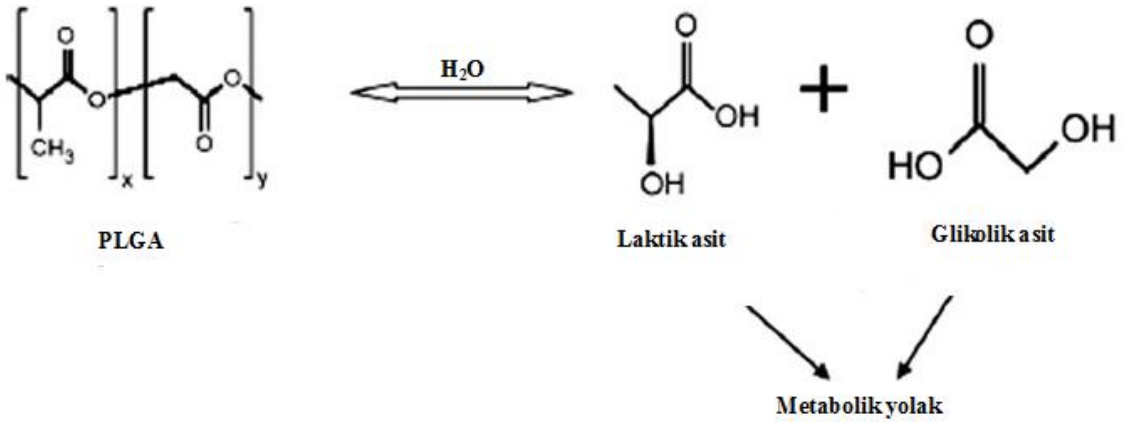
Biyoparçalanabilir bir polimer olan PLGA ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında ve doku mühendisliği alanında çok önemli bir potansiyele sahiptir. Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration; FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (European Medicine Agency (EMA)) tarafından onaylı olması, DNA, RNA, peptid ve proteinler dâhil çok farklı yapıdaki maddelerin taşıyıcı sistemlerinin hazırlanmasında kullanılması, uzun süreli klinik deneyimin kazanılmış olması, biyouyumlu ve biyoparçalanabilir olması PLGA'nın önemli üstünlükleridir.[109, 110] Bununla birlikte, yapılan çalışmalar PLGA'nın degradasyon özelliklerinin sürekli salım sistemlerinin hazırlanması için uygun olduğunu ortaya koymaktadır.[109]

PLA ve PGA polimerlerinden oluşan poliester yapıdaki PLGA kopolimeri özellikleri en iyi tanımlanmış biyomateryaldir. Laktid yapısı asimetrik bir karbon içerir, D ve L olmak üzere iki optik izomeri bulunmaktadır. Sonuç olarak, optikçe aktif olan L-laktid ve D-laktid, ayrıca optikçe aktif olmayan DL-laktid olmak üzere üç faklı laktid oluşmaktadır.[109, 111]

PLA yapısındaki metil yan grubundan dolayı hidrofobik bir polimerdir ve metil grubunun sterik engel oluşturmasından dolayı PGA'ye göre hidrolize daha dayanıklıdır. Poli(L-laktid) yarı-kristal (yaklaşık % 37 oranında kristalinite) yapıda iken poli(DL-laktid) ise yapısındaki düzensizliklerden dolayı amorf yapıdadır. PLA, kırılganlık ve düşük termal stabilite sakıncalarına sahiptir. PGA ise metil yan grubu içermez ve % 45-55 oranında kristalin yapı göstermektedir. Bu yapısından dolayı, birçok organik çözücüde çözünmez. PLGA'nın elde edilmesinde glikolid ile kopolimerizasyon yapmak üzere L-laktid veya DL-laktid kullanılmaktadır. Glikolid:laktid oranları farklılaştırılarak PLGA'nın kristalinite derecesi kontrol edilebilmektedir.[109, 112] Farklı molekül ağırlıklarına ve kopolimer bileşimlerine sahip PLGA örnekleri piyasada mevcuttur.

PLGA 50:50, 25:75 gibi genellikle, monomer oranları ile PLGA'nın tipleri tanımlanmaktadır. PLGA 50:50, yapısında % 50 oranında laktid % 50 oranında glikolid içeren kopolimerdir. Ayrıca, PLGA 25:75 (laktid:glikolid) amorf bir yapıda iken PLGA (80:20) (laktid:glikolid) ise yarı-kristalin yapıdadır.[110, 112] PLGA su varlığında ester bağları üzerinden hidrolize uğrar (Şekil 2.3). Hidroliz yolu ile monomerik asitlere parçalanır ve krebs döngüsü aracılığı ile CO_2 ve su halinde idrarla atılırlar.[107, 110] PLGA'nın biyoparçalanması üzerinde molekül ağırlığı, laktid:glikolid oranları, kritalinite derecesi ve camsı geçiş sıcaklığı (Tg) etkilidir. Laktid içeriği yüksek olan PLGA, daha az hidrofiliktir, daha az su absorplar ve daha yavaş bir şekilde hidrolize olur. PLGA'nın özellikleri (molekül ağırlığı, laktid:glikolid oranları (taşıyıcı sistemden etkin madde salım hızı: 50:50>65:35>75:25>80:20) vb.), hazırlanan taşıyıcı sistemlerin partikül büyüklükleri, yüzey özellikleri gibi faktörler etkin madde salımı üzerinde etkili olan değişkenlerdir.[109]

PLGA kullanılarak hazırlanan nanopartiküller hücre içerisine kısmen pinositoz ve ayrıca klatrin aracılı endositoz ile alınmaktadır.[110]



Şekil 2.3. PLGA hidrolizi.[110]

Sonuç olarak, FDA onayı, üretim kolaylığı, karakteristiklerindeki çok yönlülük, biyouyumlu, biyoparçalanabilir olmaları, toksik ve immünojenik özellik göstermemeleri

bu polimerlerin yoğun bir şekilde taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılmasına imkân sağlamaktadır.[113, 114]

2.3.2. Nanopartiküler Sistemler

Nanopartiküler sistemler, büyüklükleri 10-1000 nm arasında değişen, hapsedilmiş veya adsorbe edilmiş şekilde içerdiği etkin maddeyi kontrollü bir şekilde salmak üzere geliştirilen katı kolloidal partiküllerdir.[98] İlk defa 1974 yılında, Tokyo Üniversitesi'nden Norio Taniguchi tarafından nanoboyutlu materyalleri ifade etmek üzere nanoteknoloji terimi kullanılmıştır. Materyallerin boyutları nano düzeyine indikçe önceki durumlarına göre nanomateryallerin farklı ve gelişmiş özellikler gösterdikleri saptanmıştır.[115, 116] Eczacılık alanında, nanopartiküler sistemlerle ilgili ilk çalışmalar antikanserojen ilaçlar ve aşılar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküler sistemlerle, etkin madde/maddelerin etkinliğinin artırılması, yan etki/toksisitenin azaltılması, stabilitenin sağlanması/artırılması, hasta uyuncunun artırılması konularında olumlu sonuçlar elde edilmiştir.[103, 117, 118] Hazırlanan nanopartiküler sistemlerden fizyolojik ortamda parçalanması, parçalanma ürünlerinin toksik olmaması, etkin madde/maddeleri çevresel etkilere karşı koruması, etkin maddeyi hedef bölgeye taşıması ve kontrollü bir şekilde salması beklenmektedir. Ayrıca, bu sistemler dayanıklı olmalı ve gerektiğinde sterilize edilebilmelidirler.[98, 119]

Partikül boyutu, ilaç taşıyıcı sistemlerin uygulanması ve özellikle pasif hedeflendirilmesi açısından önemli bir faktördür. Hazırlanan sistemlerin stabilitesi, salım özellikleri, biyodağılımı, etkinliği ve toksisitesi açısından partikül büyüklüğü, dağılımı ve yüzey özellikleri uygun olmalıdır.[120]

Nanopartiküler sistemlerin faydalı teknolojik üstünlükleri aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:[121]

- ✓ Etkin maddenin stabilitesinin sağlanması

- ✓ Oral biyoyararlanımın iyileştirilmesi/artırılması
- ✓ İlaç etkinliğinin artırılması, istenmeyen yan etkilerinin/toksisitesinin azaltılması
- ✓ Yüksek taşıma kapasitesine sahip olması ve alan spesifik hedeflendirme yapılabilmesi
- ✓ Hem hidrofobik ve hem de hidrofilik etkin maddelerin nanopartiküllere hapsedilebilmesi
- ✓ Kan beyin bariyerinin aşılabilmesi için uygun nanopartiküler sistemlerin hazırlanabilmesi
- ✓ Oral, pulmoner, parenteral ve nazal yol gibi farklı yollarla uygulanabilmesi

Nanopartiküler sistemlerin hazırlanması için farklı hazırlama yöntemleri kullanılmaktadır (Tablo 2.6).[122]

Tablo 2.6. Nanopartikül hazırlama yöntemleri, bazı özellikleri ve çoğunlukla kullanılan polimer örnekleri[122]

Yöntem	Çoğunlukla Ortamda Oluşturulan/Hazır Kullanılan Polimerler	Yöntemin Kolaylığı	Saflaştırma Gereksinimi
	Monomerden hareketle ortamda elde edilen polimerler		
Emülsiyon polimerizasyonu			
- Devamlı sulu faz	Poli(metilmetakrilat) Poli(metilmetakrilat) kopolimeri Poli(metilsiyanoakrilat) Poli(etilsiyanoakrilat) Poli(bütilsiyanoakrilat) Poli(izobütilsiyanoakrilat) Poli(hekzilsiyanoakrilat) Poli(izohekzilsiyanoakrilat) Poli(dialkilmetiliden malonat)	Yüksek	Yüksek
- Devamlı organik faz	Poliakrilamid Poli(metilsiyanoakrilat)	Düşük	Yüksek
	Diğer polimerler		
	Poli(stiren) Poli(vinilpiridin) Poli(akrolein)		
Yüzeyler arası polimerizasyon	Poli(etilsiyanoakrilat) Poli(izobütilsiyanoakrilat) Poli(izohekzilsiyanoakrilat Poliamid Poli(fenilester) Poli(üretan)	Düşük	Yüksek
Yüzeyler arası Polikondenzasyon	Poli(üretan) Poli(eterüretan)	-	
	Doğrudan polimer halinde kullanılanlar		

Emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma	PLA PLGA PCL Poli(β-hidroksibütirat) (PHB)	Yüksek	Düşük
Çözücü yer değişimi	PLGA PLA PCL β-siklodekstrin inklüzyon kompleksleri Poli(metil vinil eter-ko-maleik anhidrit) (PVM/MA) Poli(alkilmetakrilat)	Yüksek	-
Yüzeyler arası depozisyon	PLA	Yüksek	-
Tuzla çöktürme	PLA Poli(alkilmetakrilat) Etilselüloz	Yüksek	Yüksek
Emülsifikasyon-Çözücü Difüzyon Yöntemi	PLGA PLA PCL	Orta	Orta
	Doğal Polimerler	Genel olarak Yüksek	Yüksek-Orta
* **S/Y Emülsiyonunda ısı denatürasyonu ve çapraz bağlanma** * **Sulu ortamda desolvasyon ve çapraz bağlanma** * **Sulu ortamda çapraz bağlanma** * **Organik çözücüden polimer çöktürmesi**	Albümin Jelatin Aljinat Kitosan Dekstran		
Nebülizasyon Teknikleri	PLA		

Bu bölümde, tez çalışmamızda kullandığımız nanopartikül hazırlama yöntemlerinden olan emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi ve nanopresipitasyon yöntemi hakkında kısaca bilgi verilecektir.

Emülsiyon Oluşturma-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi[122-124]

Bu yöntem, polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılır ve iki basamaktan oluşur: (1). Polimer çözeltisinin sulu faz içerisinde homojenize edilmesiyle tekli emülsiyon hazırlanması, (2). Emülsifikasyon sonrası organik çözücünün ortamdan uzaklaştırılmasıyla nanopartiküllerin elde edilmesidir. Bu yöntemle, nanoboyutlu taşıyıcı sistem hazırlanabilmesi için stabilize edici ajan ve yüksek enerjili homojenizasyon gerekmektedir. Polimer (genellikle, PLA, PLGA, PCL, Eudragit® vb. polimerler), diklorometan veya kloroform gibi suyla karışmayan uçucu çözücülerde çözündürülür ve daha sonra stabilize edici ajan (polivinil alkol (PVA), sodyum dodesil sülfat, Pluronic F68, Tween 80, sodyum taurodeoksikolat gibi yüzey aktif maddeler) içeren sulu faz ile karıştırılarak homojenize edilir. Emülsiyon oluşumu sonrası organik faz alçak basınç altında uzaklaştırılır ve böylece nanopartiküler sistemler elde edilir. Bu yöntemle hazırlanan polimerik taşıyıcıların boyutu; karıştırma hızı, stabilize edici ajanın tipi, ajanın miktarı, organik ve sulu fazın viskozitesi, sıcaklık ayarı gibi parametreler değiştirilerek kontrol altında tutulabilir.

Nanopresipitasyon Yöntemi[123-125]

Basit, düşük enerji gerektiren ve hazırlama koşulları etkin madde açısından uygun olan bir yöntemdir. Hızlı, ekonomik ve tekrarlanabilir olması bu yöntemin üstünlükleridir. Bu yöntemin esası, polimerin (genellikle PLA, PLGA, PCL, Eudragit® vb. polimerler) suyla tamamen karışabilir bir organik çözücüde çözündürülmesi ve sonra iki fazın karıştırılması sonucu çözülmüş materyalin nanoboyutta presipitasyonuna (çökelmesine) dayanmaktadır. Kullanılan organik çözücünün suyla tamamen karışabilir

olması ve alçak basınç altında, sıcaklık ve karıştırma uygulanmasıyla ortamdan uzaklaştırılabilmesi önemlidir. Genellikle, çözücü olarak aseton, aseton-küçük miktarda su karışımı veya etanol-aseton karışımı kullanılabilmektedir. Partikül boyutu, polimer konsantrasyonu ve kullanılan çözücülerin oranları değiştirilerek ayarlanabilir. Bu yöntemde, sürfaktan kullanılmasına da gerek yoktur.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Maddeler	**Firma**
Nifedipin	Sigma-Aldrich Co., ABD
Poli (D,L-laktid-ko-glikolid) (PLGA) (Resomer® RG 756 S, ort. Mw 76000-115000)	Sigma-Aldrich Co., ABD
Polivinil Alkol (PVA, MW 30000-70000)	Sigma-Aldrich Co., ABD
Monobazik Potasyum Fosfat	Merck, Almanya
Sodyum Hidroksit	Merck, Almanya
Hidroklorik Asit	Riedel-de Haën., Almanya
Diklorometan (DCM)	Sigma-Aldrich Co., ABD
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck, Almanya
Aseton	Sigma-Aldrich Co., ABD

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan Cihazlar	Firma
Ultrasonik Prob	Sonoplus, HD 2070; Bandelin Electronics, Almanya
Liyofilizatör	Alpha 1-2 LD plus LT, Martin Christ, Almanya
Taramalı Elektron Mikroskobu	NOVA NanoSEM 430, FEI, Çek Cumhuriyeti
Zetasizer 3000HS	Malvern Instruments, İngiltere
Diferansiyel Taramalı Kalorimetre	Setaram Labsys Evo®, Fransa
FT-IR Spektrofotometresi	Bruker® Marka, Almanya
Soğutmalı Santrifüj (Kubota 3780)	Kubota Co., Japonya
Çoklu Manyetik Karıştırıcı (WisestirR MS-MR4)	Wisd Lab. Instruments, Almanya
Vorteks (MS 3) ve İlave Aksesuarları	IKA®-Werke GmbH & Co., Almanya
Çalkalamalı Su Banyosu	Memmert GmbH & Co., Almanya
Hassas Terazi	Shimadzu AUW220D, Japonya
Rotavapor (Heidolph 4001)	Heidolph Instruments GmbH & Co., Almanya
Ultra Saf Su Cihazı (Easypure®RF)	Barnstead/Thermolyne Co., ABD
UV- Spektrofotometre	Beckman Coulter-DU® 730., ABD
Etüv	Memmert GmbH & Co., Almanya
pH Metre	Orion 3 Star, ABD
Ultrasonik Banyo	Bandelin Electronics, Almanya
Azot Evaporatörü	AVP-K12, Türkiye
Mikrosantrifüj	Mikro 200, Hettich, Almanya
Çoklu Manyetik Karıştırıcı	Mix. 15 eco, 2 Mag, Almanya

3.2. Metodlar

3.2.1. NF'nin UV-Spektrofotometrik Yöntemle Miktar Tayini

NF'nin fosfat tamponu (PB pH 7.4; USP30/NF25):DMSO (85:15, h/h) karışımı içinde stok çözeltisi (100 μg/mL) hazırlanmış ve bu çözeltiden hareketle 1, 5 ve 10 μg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan seyreltik çözeltilerin UV spektrumları 200-400 nm dalga boyu aralığında alınmıştır. Maksimum absorbansın elde edildiği dalga boyu (λmax) tespit edilmiştir.[100] NF'nin ışıktan korunması amacıyla tez kapsamındaki tüm deneysel çalışmalar karanlık ortamda gerçekleştirilmiş ve ayrıca azot gazı altında çalışılarak oksijen etkisine karşı koruma sağlanmıştır.[30, 126]

3.2.1.1. NF'ye ait Kalibrasyon Doğrusunun Elde Edilmesi

NF'nin kalibrasyon doğrusunu hazırlamak üzere PB pH 7.4:DMSO (85:15, h:h) karışımında 100 μg/mL konsantrasyona sahip stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden hareketle uygun seyreltmeler yapılarak 1-6 μg/mL konsantrasyon aralığında altı farklı konsantrasyonda ve her bir konsantrasyon için 6'şar adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve λmax'da absorbansları okunmuştur. Deney süresince, karanlık ortamda ve azot gazı altında çalışılmıştır.

Her bir konsantrasyon ve bu konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek regresyon analizi yardımıyla kalibrasyon doğrusu ve yapılan tüm analizlerde kullanılmak üzere doğru denklemi elde edilmiştir.

3.2.1.2. Analitik Yöntem Validasyonu

Etkin madde miktar tayini için kullanılacak yöntem öncelikle güvenilir olmalıdır. Analitik yöntem validasyonu bunun sağlanması için gerçekleştirilmesi gereken en temel işlemdir. Analitik yöntem validasyonu, analizi yapılacak etkin maddenin tayininde kullanılacak olan analitik yöntemin belirlenen koşullarda doğru, özgün ve tekrarlanabilir olduğunu garanti altına alır.[127]

Analitik yöntem validasyonu için incelenmesi gereken kriterler özgünlük, duyarlılık, doğrusallık, doğruluk, kesinlik (tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik), stabilite ve tutarlılıktır.[128]

Doğrusallık: Bu çalışma, elde edilen deney sonuçları ile analizi yapılan, etkin madde konsantrasyonları arasında doğrusal bir ilişkinin olduğu aralığı saptamak için gerçekleştirilir.[127] Bu amaçla, NF'nin PB pH 7.4:DMSO (85:15, h/h) karışımında stok çözeltisi (100 µg/mL) hazırlanmış, bu çözeltiden hareketle ilgili çözücü karışımı kullanılarak seyreltmeler yapılarak 6 farklı konsantrasyonda ve her bir konsantrasyondan 6'şar adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerin absorbansları ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerleri ilgili çözelti konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilerek doğru denklemi elde edilmiştir.

Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk

Analitik yöntem ile elde edilen test sonuçlarının gerçek değerlere yakınlık derecesini ortaya koyan önemli bir parametredir.[127] Yöntemin gün içi (intra-assay) ve günler arası (inter-assay) doğruluğunu değerlendirmek üzere aşağıda verilen eşitlik kullanılmıştır (Şekil 3.1).[129]

Doğruluk = [(a-b)/b]x100

a= Ortalama tayin edilen konsantrasyon (µg/mL)

b= Hazırlanan konsantrasyon (µg/mL)

Şekil 3.1. Doğruluk hesabında kullanılan eşitlik.[129]

Kesinlik

Analitik yöntemin tekrarlanabilirlik derecesinin veya bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının bir göstergesidir.[127, 130]

Gün içi kesinlik ve doğruluğunun tespiti için kalibrasyon doğrusu aralığında yer alan 3 farklı konsantrasyon (2.5, 4.5, 5.5 µg/mL PB pH 7.4:DMSO (85:15, h/h) karışımında hazırlanmış) seçilerek her bir konsantrasyondan 6'şar adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Günler arası kesinlik ve doğruluğun tespiti içinde aynı konsantrasyonlar seçilerek her bir konsantrasyondan 6'şar adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve birbirini takip eden 3 gün boyunca absorbansları ölçülmüştür.

Yöntemin kesinliğinin tespiti için aynı konsantrasyondaki standart çözeltiler için ortalama (X), standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı (VK) hesaplanmıştır.[131]

Saptama ve Miktar Tayini Sınırı

Saptama Sınırı (Limit of Detection, LOD)

Deneysel koşullar altında analizi yapılan maddenin saptanabilecek en küçük konsantrasyonunu ifade eder. Bilinen en düşük konsantrasyonda analit içeren örnek sonuçlarının kör sonuçları ile karşılaştırılmasıyla (sinyal/gürültü oranı; 3:1) belirlenebilmektedir.[130] Bu sınır, düşük konsantrasyona sahip bir seri örneğin analiz edilmesiyle belirlenmektedir. Elde edilen cevapların standart sapmasının kalibrasyon doğrusu eğimine oranlanması ve bu oranın 3.3'le çarpılmasıyla da hesaplanabilmektedir.[132]

Miktar Tayini Sınırı (Limit of Quantification, LOQ)

Deneysel koşullar altında örnekteki maddenin kabul edilebilir kesinlik ve doğrulukla tayin edilebildiği en düşük miktarıdır.[130, 133] Bu sınır, düşük konsantrasyona

sahip bir seri örneğin analiz edilmesiyle belirlenmiştir. Sinyal/gürültü oranı (10:1) veya elde edilen cevapların standart sapmasının kalibrasyon doğrusu eğimine oranlanması ve bu oranın 10'la çarpılmasıyla hesaplanabilmektedir.[132] Bu çalışmada, miktar tayini sınırı olarak kalibrasyon doğrusunun en alt noktasında bulunan konsantrasyon seçilmiştir.

Özgünlük

Özgünlük, bir analitik yöntemin sadece amaçlanan maddeyi tayin edebilme yeteneğini gösterir.[130]

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında kullanılan maddelerin (PLGA ve PVA gibi), kullanılan ortamların içerdiği bileşenlerin ilgili dalga boyunda NF'nin absorbansını etkileyip etkilemediğini ve analitik yöntemin etkin maddeye özgün olup olmadığını göstermek üzere boş (etkin madde içermeyen) nanopartiküler sistemler uygun ortamda çözündürülerek süpernatantları elde edilmiştir. Süpernatantların ve ortamların UV spektrumları alınarak incelenmiştir.

3.2.2. Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması

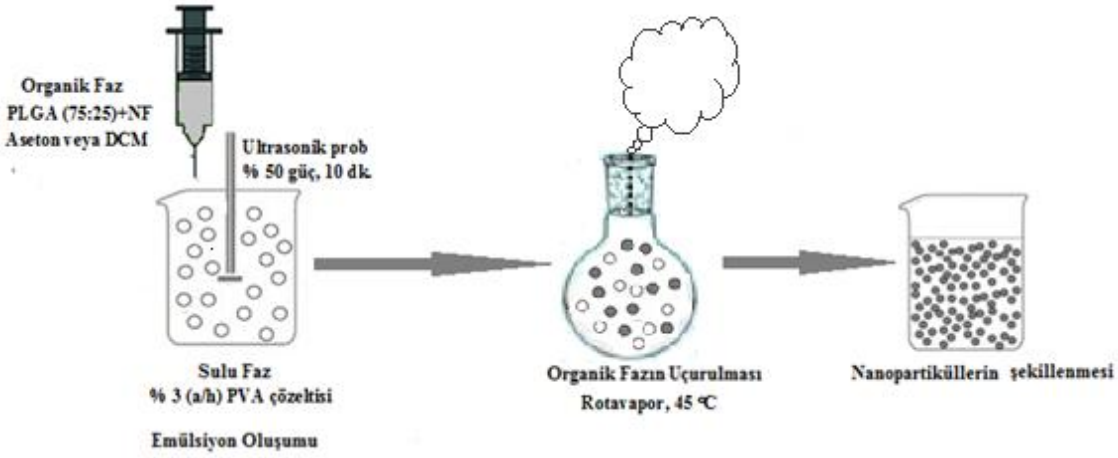
3.2.2.1. Boş PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması

100 mg PLGA'nın 9 mL aseton (kısmen modifiye edilmiş nanopresipitasyon yöntemi için)[134] veya DCM (emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma) içerisinde çözeltisi hazırlanmıştır. Bu organik faz, 18 mL % 3'lük (a/h) PVA'nın sulu çözeltisine (PB pH 7.4 kullanılarak hazırlanmış) bir enjektör yardımıyla damla damla damlatılırken ultrasonik prob (% 50 güç, 10 dakika) kullanılarak homojenizasyonu sağlanmıştır. Bu işlemin ardından aseton veya DCM rotavapor (45°C ve 15 dakika) kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süspansiyon için 5000 rpm'de, 5 dakika 15°C de ön santrifüj yapılmış ve süpernatant alınarak 12000 rpm'de 50 dakika (15°C) santrifüj edilmiştir. Elde edilen çökelek saf su içinde süspande edilmiş, dondurulduktan sonra 0.021 mbar ve -55°C'de 24 saat süreyle liyofilize edilmiştir. Aseton kullanılarak

hazırlanan boş nanopartikül formülasyonu N_1, DCM kullanılarak hazırlanan boş nanopartikül formülasyonu ise N_3 olarak kodlanmıştır. Her bir formülasyon en az üçer kez hazırlanmıştır.

3.2.2.2. NF yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması

100 mg PLGA'nın 9 mL aseton veya DCM'deki çözeltisi üzerine 12.5 mg NF ilave edilerek karıştırılmış (700 rpm, 15 dakika) ve organik faz hazırlanmıştır. Organik fazın hazırlanması dışında NF-yüklü PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması Bölüm 3.2.2.1'de açıklanan yöntemin aynen tekrarlanmasıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Aseton kullanılarak hazırlanan NF-yüklü nanopartikül formülasyonu N_2, DCM kullanılarak hazırlanan NF-yüklü nanopartikül formülasyonu ise N_4 olarak kodlanmıştır. Her bir formülasyon en az üçer kez hazırlanmıştır.



Şekil 3.2. NF-yüklü nanopartiküler sistemlerin hazırlanmasında kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi.

3.2.3. Hazırlanan Nanopartiküler Sistemlerin Karakterizasyonu

3.2.3.1. Yüzey Özellikleri

Hazırlanan nanopartiküllerin şekilleri ve yüzey özellikleri SEM (NOVA NanoSEM 430) kullanılarak incelenmiştir. Formülasyonlar, iki tarafı yapışkan bant

aracılığı ile metal levhalar üzerine sabitlenmiş, 100 Å kalınlıkta altın ile kaplanarak incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.3.2. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Tayini

Taze hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri Zetasizer 3000 HS cihazı kullanılarak saptanmıştır. Ölçümler, formülasyonların saf su ile seyreltilmeleri (% 25 oranında) sonrası 25°C'de gerçekleştirilmiştir (n=3).

3.2.3.3. Hazırlama Verimi

Hazırlama verimi hesabı, nanopartikül hazırlanmasında kullanılan yöntemlerin etkinliğini değerlendirmek amacıyla yapılmaktadır. Hazırlama verimi hesaplanmasında kullanılan eşitlik Şekil 3.3'te verilmiştir.

$$\text{Verim} = (A/B)x100$$

A: Elde edilen toplam nanopartikül ağırlığı (mg)

B: Etkin madde + Polimer ağırlığı (mg)

Şekil 3.3. Hazırlama veriminin hesaplanmasında kullanılan eşitlik.

3.2.3.4. Nanopartiküllere Yüklenen NF Miktarının Saptanması

Liyofilize haldeki boş ve NF-yüklü nanopartikül formülasyonlarından 10'ar mg tartılmıştır (her bir formülasyon için n=3). Her bir örneğe 1,5 mL DMSO ilave edilerek çok noktalı manyetik karıştırıcıda (600 rpm, 30 dakika) karıştırılmıştır. Daha sonra, ultrasonik banyoda 10 dakika bekletilmiş (25°C) olan bu karışımlara 8,5 mL PB (pH 7.4) ilave edilerek çok noktalı karıştırıcıda (600 rpm, 10 dakika) karıştırılmıştır. Örnekler, 12000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve valide edilmiş UV-spektrofotometrik yöntem kullanılarak 238 nm dalga boyunda elde edilen

süpernatantlardaki etkin madde miktarı tayin edilmiştir. Boş PLGA nanopartikül süpernatantları UV ölçümlerinde kör olarak kullanılmıştır. NF içeren formülasyonlar için % yükleme etkinliği ve % yükleme kapasitesi değerleri hesaplanmıştır.

3.2.3.5. *İn Vitro* Salım Çalışması

Hassas terazide, renkli cam şişelere tam olarak 10 mg olarak tartılan NF-yüklü nanopartikül formülasyonları üzerine 20 mL PB (pH 7.4) ortamı ilave edilmiş ve salım çalışması yatay çalkalayıcılı su banyosunda (37±0.5°C, 50 rpm) gerçekleştirilmiştir. Aynı işlemler, boş nanopartikül formülasyonlarına da uygulanmıştır. Her bir formülasyon için n=3 olacak şekilde çalışılmıştır. Belirli zaman aralıklarında (0.5., 1., 3., 6., 12., 24., 48., 72., 96., 120., 144., 168. ve devam eden saatlerde olmak üzere) salım ortamlarından üçer mL örnek alınmış ve alınan örnek yerine aynı hacimde taze ortam konmuştur. Alınan örnekler, 12500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlardaki etkin madde miktar tayini UV-spektrofotometrik yöntem kullanılarak (238 nm) gerçekleştirilmiştir. % Kümülatif salım değerleri hesaplanmış ve veriler grafikler halinde sunulmuştur.

3.2.3.6. NF, PLGA, Boş ve NF-yüklü Nanopartikül Formülasyonlarına Ait FT-IR Analizi

NF, PLGA, boş ve etkin madde yüklü nanopartikül formülasyonlarının KBr diskleri hazırlanmış ve FT-IR kullanılarak infrared spektrumları alınmıştır.

3.2.3.7. NF, PLGA, Boş ve NF-yüklü Nanopartikül Formülasyonlarına Ait DSC Analizi

NF, PLGA, boş ve etkin madde yüklü nanopartikül formülasyonlarına ait DSC diyagramları diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılarak alınmıştır. DSC deneylerinin tümü azot atmosferinde 60 mL/dakika gaz akış hızında ve 20-400°C sıcaklık aralığında

(10 °C/dakika ısıtma hızı) gerçekleştirilmiştir. Bütün analizlerde bir dizi standart (In, Sn, Pb, Al, Pd, Ni, Au, Zn) ve referans olarak da alumina kullanılmıştır.

3.2.3.8. İstatistiksel Yöntem

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS Statistics 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) programı ile yapılmıştır. Mann-Whitney U testi kullanılarak formülasyonlar arasında partikül büyüklüğü, yükleme etkinliği ve *in vitro* salım verileri açısından farklılığın anlamlı olup olmadığı saptanmış ve $p<0.05$ olduğunda fark anlamlı kabul edilmiştir.

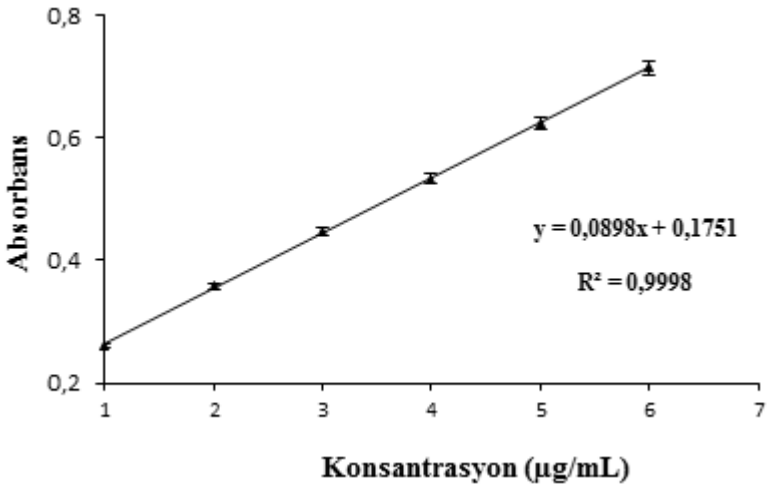
4. BULGULAR

4.1. NF'nin UV-Spektrofotometrik Yöntemle Tayini

Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde PB (pH 7.4):DMSO (85:15, h/h) içinde hazırlanan NF çözeltilerinin UV spektrumları (200-400 nm dalga boyu aralığında) alınmış ve λmax 238 nm olarak tespit edilmiştir.

4.1.1. NF'ye ait Kalibrasyon Doğrusunun Elde Edilmesi

Bölüm 3.2.1.1.'de belirtildiği gibi NF'nin stok çözeltisinden (100 µg/mL; PB pH 7.4:DMSO (85:15, h/h)) uygun seyreltmeler yapılarak 1-6 µg/mL konsantrasyon aralıklarında standart çözeltiler hazırlanmış ve absorbansları ölçülmüştür. Altı seri üzerinden çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ölçülen absorbans değerleri ilgili konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe geçirilmiş, kalibrasyon doğruları ve lineer regresyon ile doğru denklemleri elde edilmiştir. Her seri için elde edilen kalibrasyon doğrusuna ait eğimler karşılaştırılmış, VK değeri <% 1 olarak bulunmuştur. NF'nin kalibrasyon doğru ve denklemi Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. NF'ye ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi (X±SS; n=6, X=ortalama, SS=standart sapma).

4.2. Analitik Yöntemin Validasyon Bulguları

Analitik yöntem için gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerlerini tespit etmek üzere Bölüm 3.2.1.2'de anlatıldığı şekilde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, kalibrasyon doğrusu aralığında yer alan 2.5, 4.5, 5.5 μg/mL konsantrasyonları seçilerek standart çözeltileri hazırlanmış (her bir konsantrasyon için n=6) ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilerek gün içi değerler saptanmıştır. Günler arası doğruluk ve kesinliğinin tespiti için de aynı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak (her bir konsantrasyon için n=6) birbirini takip eden 3 gün içinde absorbansları ölçülmüştür. Gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. NF miktar tayini yöntemi için gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.

	Konsantrasyon (μg/mL)	**Hesaplanan Konsantrasyon (μg/mL) (X±SS)**	**[a]Doğruluk**	**[b]Kesinlik**
[c]Gün içi	2.5	2.532 ± 0.036	1.292	1.431
	4.5	4.542 ± 0.051	0.940	1.118
	5.5	5.413 ± 0.052	-1.586	0.969
[d]Günler arası	2.5	2.506 ± 0.043	0.228	1.720
	4.5	4.515 ± 0.060	0.335	1.336
	5.5	5.559 ± 0.058	1.080	1.046

[a] Bağıl Hata (%); [b] Varyasyon katsayısı (%); [c] Her bir konsantrasyon için n=6; [d]Her bir konsantrasyon için n=6/gün

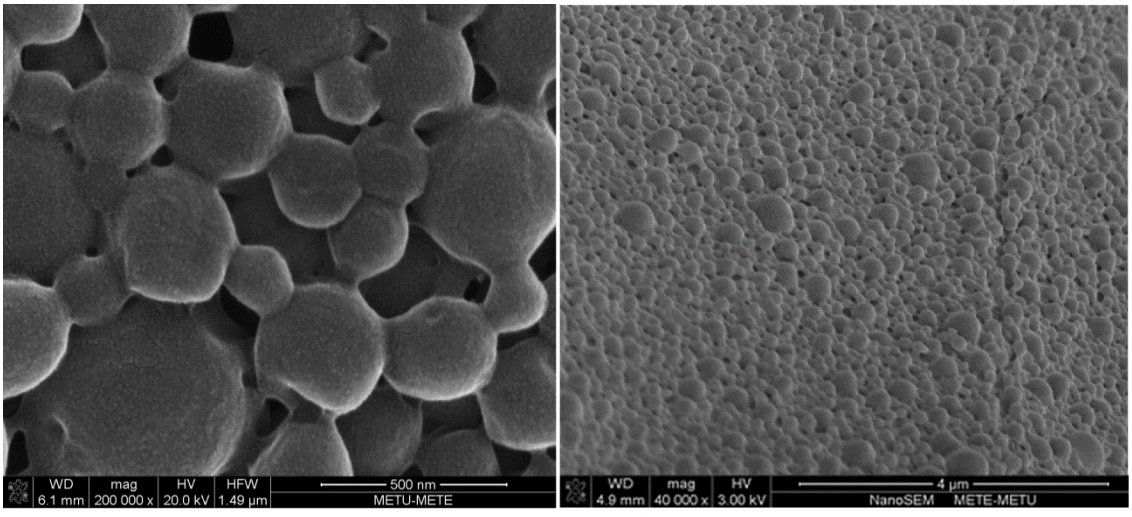
Analitik yöntemin duyarlılığı ise Bölüm 3.2.1.2'de belirtildiği şekilde standart sapma ve eğime göre değerlendirilerek teşhis sınırı 0.079 μg/mL ve miktar tayini sınırı ise 0.240 μg/mL olarak tespit edilmiştir.

Miktar tayini yönteminin özgünlüğü Bölüm 3.2.1.2'de açıklandığı şekilde hazırlanan formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddelerin etkin madde ile aynı şartlarda absorbans verip vermediğinin belirlenmesi amacıyla UV spektrumları alınarak tespit edilmiştir. Aynı şekilde, ilaç yükleme ve *in vitro* salım çalışmalarında etkin madde yüklü formülasyonlara uygulanan işlemler boş formülasyonlara da uygulanarak karşılaştırılmaları yapılmıştır. NF'nin maksimum absorbans verdiği dalga boyunda ortam bileşenleri ve formülasyona giren yardımcı maddelerin absorbans vermedikleri gözlenmiştir.

4.3. Nanopartiküler Sistemlerin Özelliklerine Ait Bulgular

4.3.1. Yüzey Özellikleri

Nanopartiküler sistemlerin yüzey özelliklerinin incelenmesi amacıyla SEM görüntüleri alınmış ve hazırlanan sistemlerin nano-boyutlu yaklaşık küresel yapılar olduğu görülmüştür (Şekil 4.2).



N_2 **N_4**

Şekil 4.2. NF yüklü formülasyonlara ait SEM fotoğrafları. **N_2:** Aseton kullanılarak hazırlanan NF-yüklü nanopartikül formülasyonu; **N_4:** DCM kullanılarak hazırlanan NF-yüklü nanopartikül formülasyonu.

4.3.2. Nanopartiküler Sistemlerin Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyellerine Ait Bulgular

Hazırlanan boş ve etkin madde yüklü nanopartiküler formülasyonların partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel tayinleri Bölüm 3.2.3.2'de belirtildiği gibi Zetasizer 3000 HS cihazı kullanılarak saptanmış ve sonuçlar Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Hazırlanan formülasyonlara ait ortalama partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (X±SS).

Formülasyon Kodu	Zeta Potansiyel (mV; n=6)	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm; n=6)
N-1	-0.541±0.34 (n=3)	352.11±7.75
N-2	0.417±0.19 (n=6)	424.92±4.96
N-3	0.292±0.21 (n=6)	294.27±7.93
N-4	0.289±0.05 (n=6)	304.88±6.03

N_1: Aseton kullanılarak hazırlanan boş nanopartikül formülasyonu; **N_2:** Aseton kullanılarak hazırlanan NF-yüklü nanopartikül formülasyonu; **N_3:** DCM kullanılarak hazırlanan boş nanopartikül formülasyonu; **N_4:** DCM kullanılarak hazırlanan NF-yüklü nanopartikül formülasyonu.

4.3.3. Nanopartiküler Sistemlere Ait Hazırlama Verimi ve NF Yükleme Etkinliği Bulguları

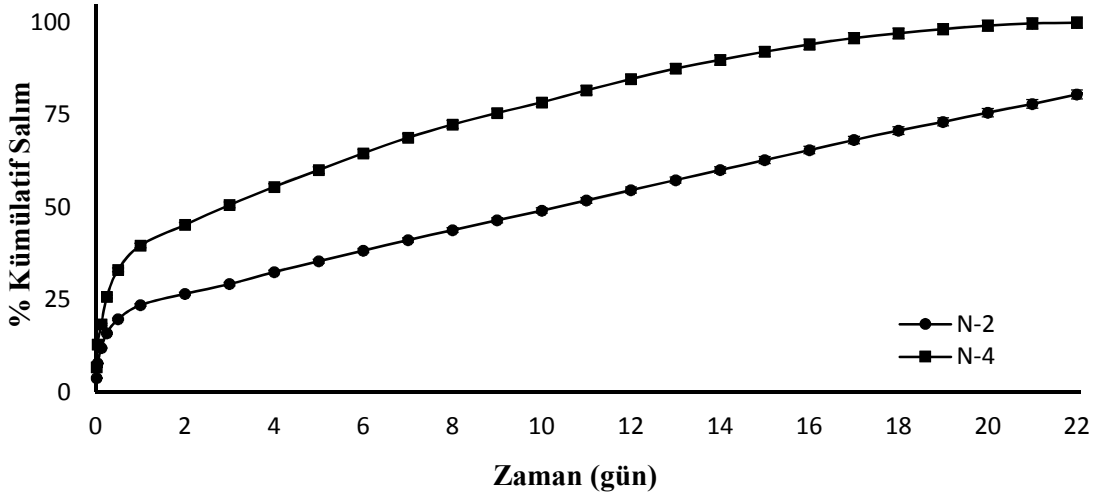
Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait hazırlama verimi bulguları Tablo 4.6'da gösterilmiştir. Ayrıca, nanopartiküler sistemlere yüklenen NF miktarı Bölüm 3.2.3.4'de açıklandığı şekilde tespit edilmiş, hesaplanan yükleme etkinliği ve yükleme kapasitesi değerleri Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3. Formülasyonlara ait hazırlama verimi bulguları (n=3; X±SS).

Formülasyon Kodu	Verim (%)	Yükleme Etkinliği (%)	Yükleme Kapasitesi (%)
N-1	79.18±5.66	-	-
N-2	65.87±1.41	13.03±1.82	2.20±0.30
N-3	71.93±3.73	-	-
N-4	74.87±4.38	18.96±1.95	2.63±0.36

4.3.5. *İn Vitro* Salım Çalışmalarına Ait Bulgular

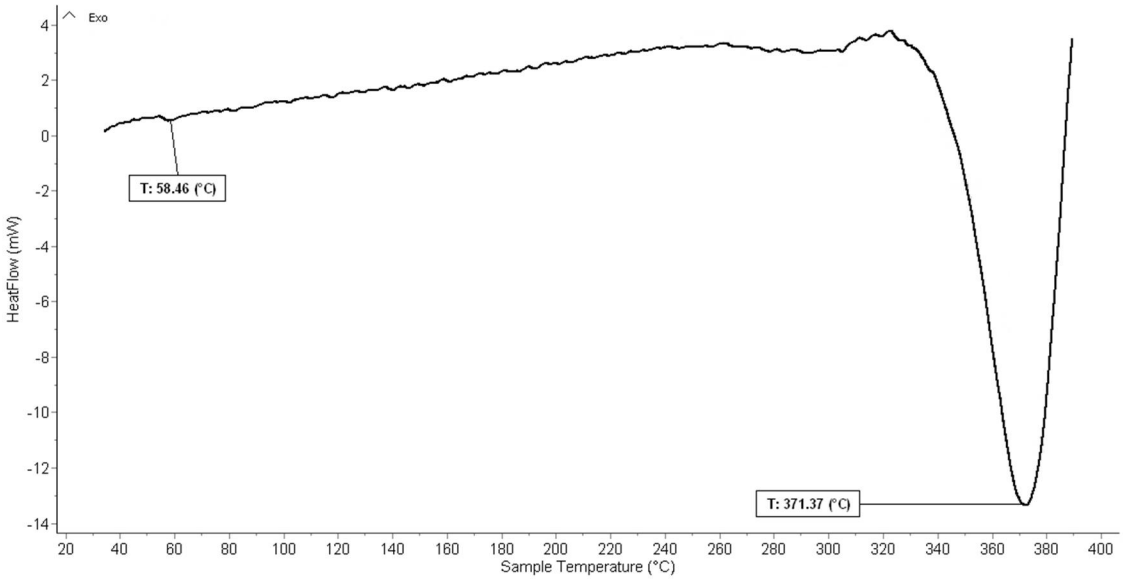
İn vitro salım çalışmaları PB pH 7.4 içerisinde gerçekleştirilmiş ve elde edilen salım grafikleri Şekil 4.3'te verilmiştir. N-2 formülasyonundan 24 saatte ~% 25 NF salımı gerçekleşirken ~% 80'i ise 22 günde salımmış ve NF salımı yaklaşık 38 günde tamamlanmıştır (Şekil 4.3). Bunun yanı sıra N-4 formülasyonundan 6 saat içerisinde yaklaşık % 25 ve 14 günde ise ~% 90 NF salımmış ve salım 22. güne kadar devam etmiş ve yaklaşık % 100 NF salımı gerçekleşmiştir (Şekil 4.3).



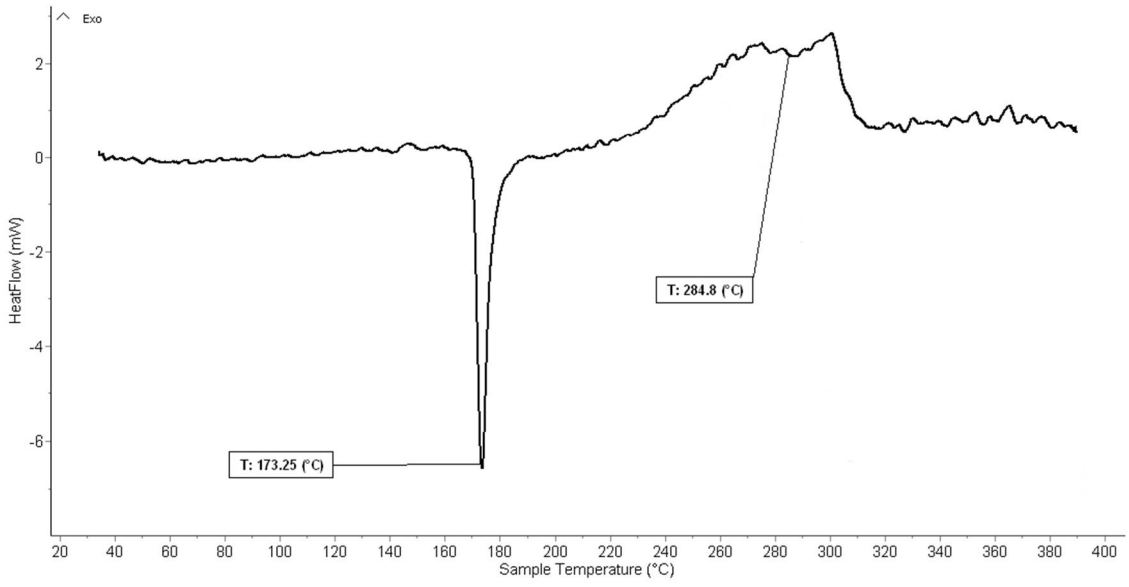
Şekil 4.3. N-2 ve N-4 formülasyonlarının PB pH 7.4 içindeki salım profilleri (n=3; X±SS).

4.3.6. NF, PLGA, Boş Nanopartikül ve Etkin Madde Yüklü Formülasyonlara Ait DSC Termogramları

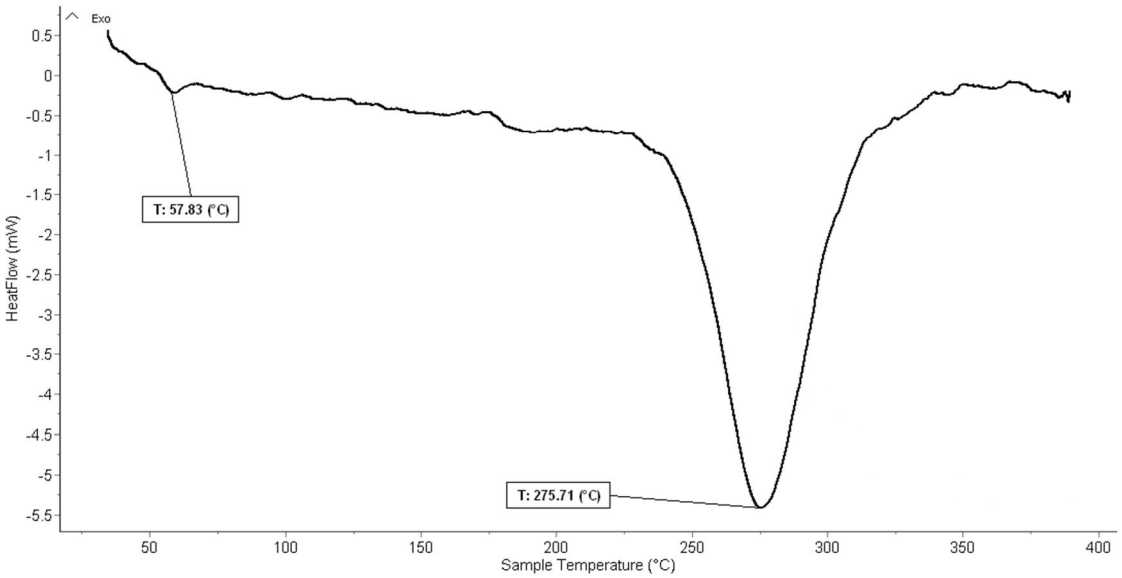
DSC cihazı kullanılarak hazırlanan etkin madde yüklü formülasyonların, bu formülasyonların hazırlanması sırasında kullanılan etkin madde ve polimerlerin termogramları alınmış ve bunlar Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



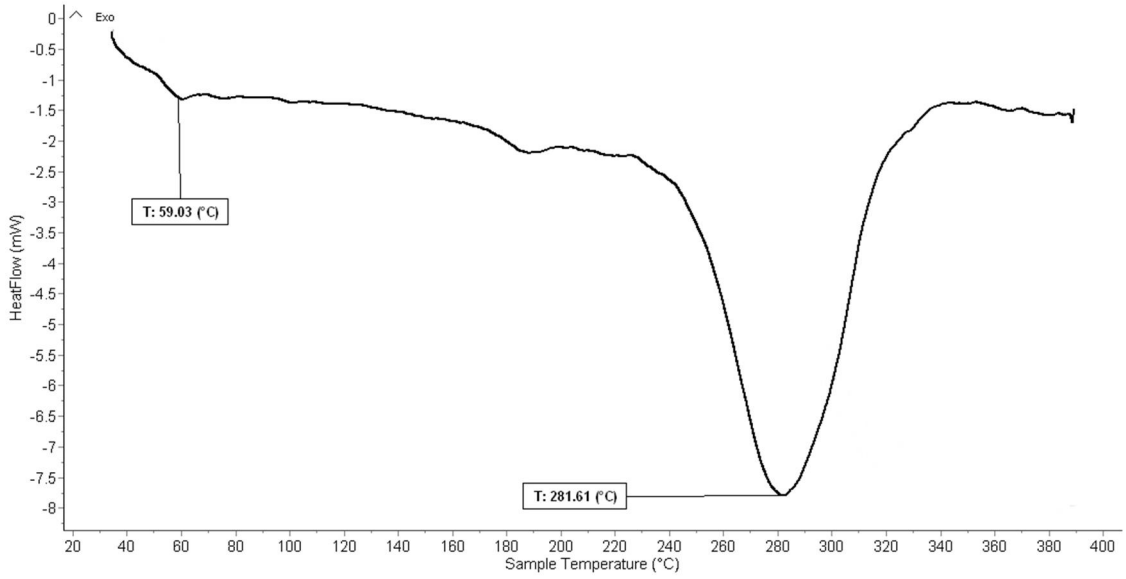
Şekil 4.4. PLGA (75:25)'ya ait DSC diyagramı.



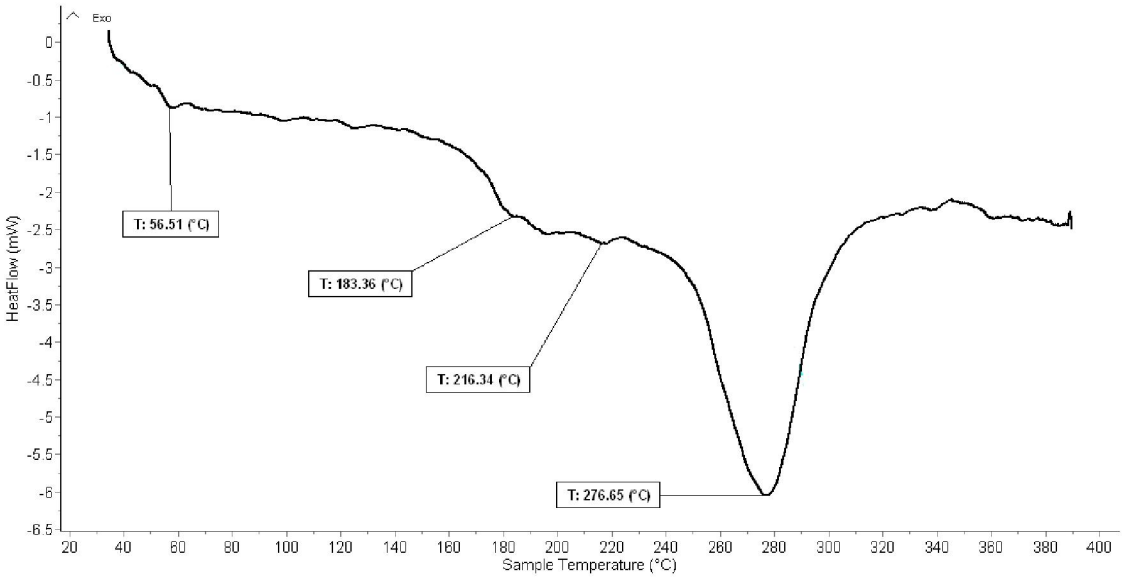
Şekil 4.5. NF'ye ait DSC diyagramı.



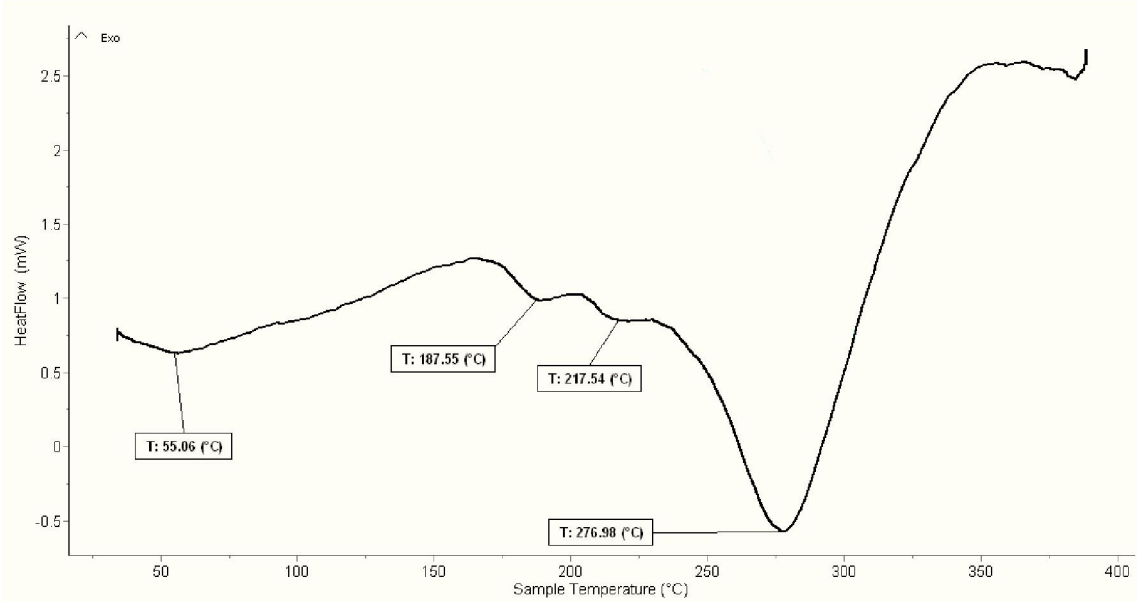
Şekil 4.6. N-1 Formülasyonuna ait DSC diyagramı.



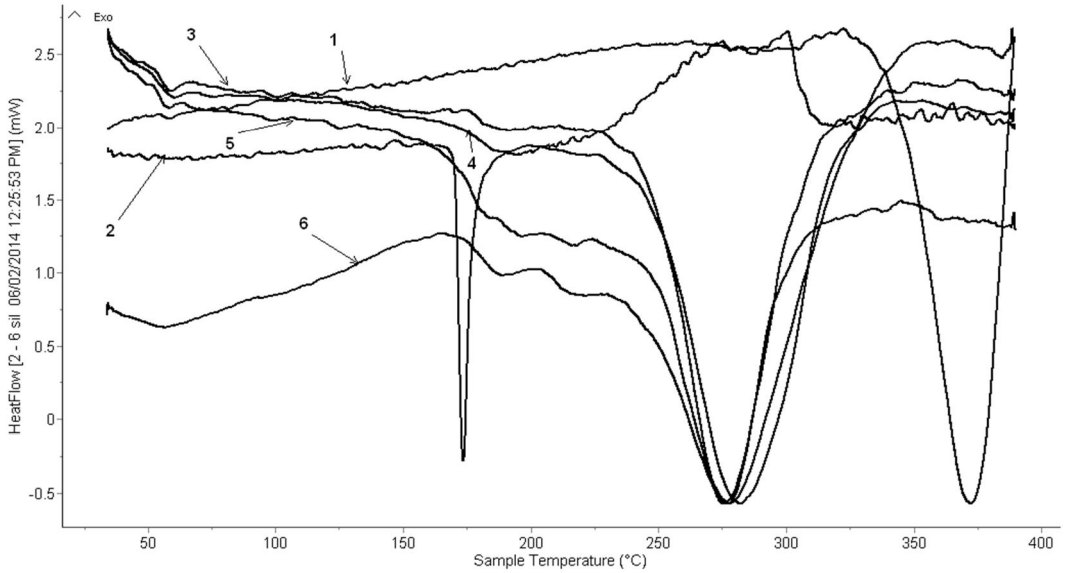
Şekil 4.7. N-3 Formülasyonuna ait DSC diyagramı.



Şekil 4.8. N-2 Formülasyonuna ait DSC diyagramı.



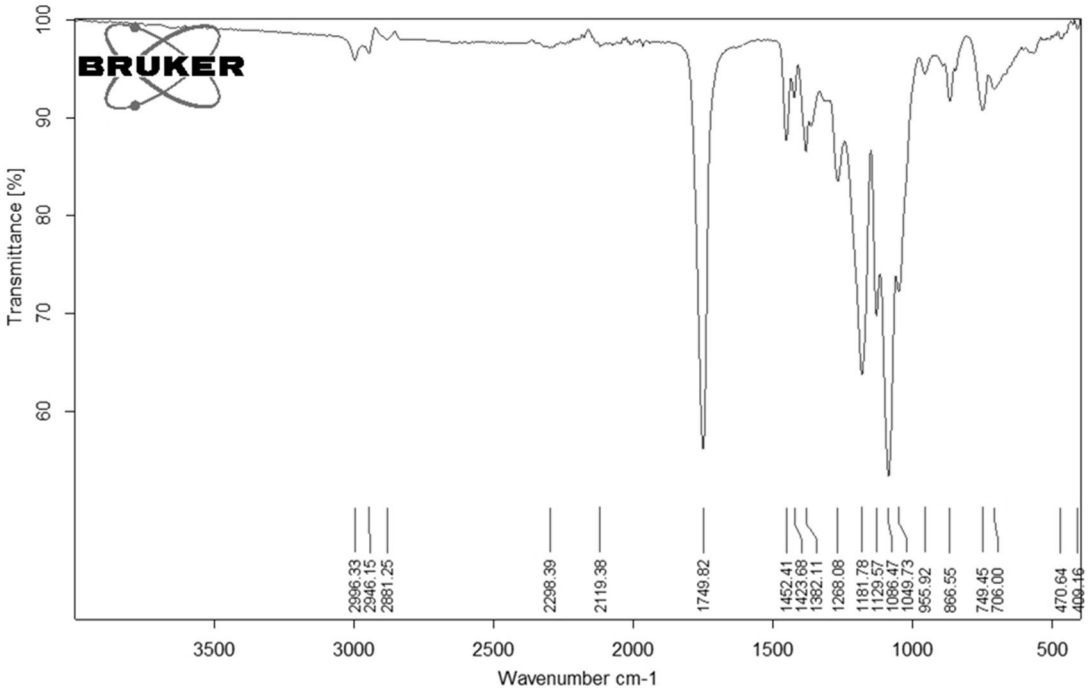
Şekil 4.9. N-4 Formülasyonuna ait DSC diyagramı.



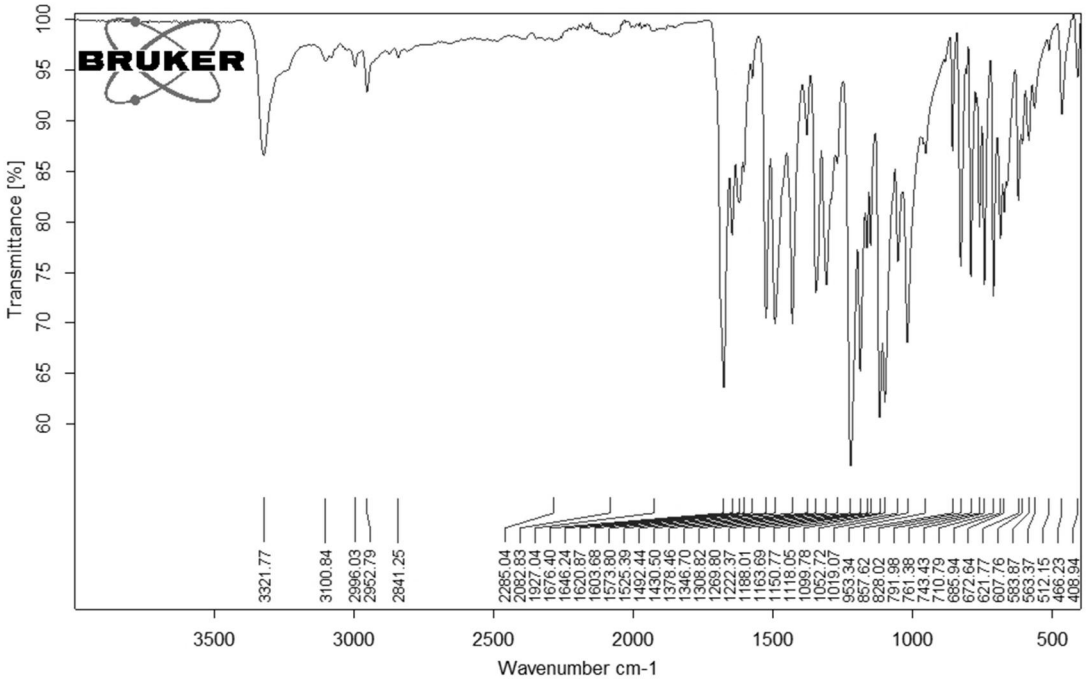
Şekil 4.10. NF, PLGA ve hazırlanan formülasyonların DSC diyagramları [1]: PLGA (75:25), [2]: NF, [3]: N-1 formülasyonu, [4]: N-3 formülasyonu, [5]: N-2 formülasyonu [6]: N-4 formülasyonu.

4.3.7. NF, PLGA, Boş Nanopartikül ve Etkin Madde Yüklü Formülasyonlara Ait FT-IR Diyagramları

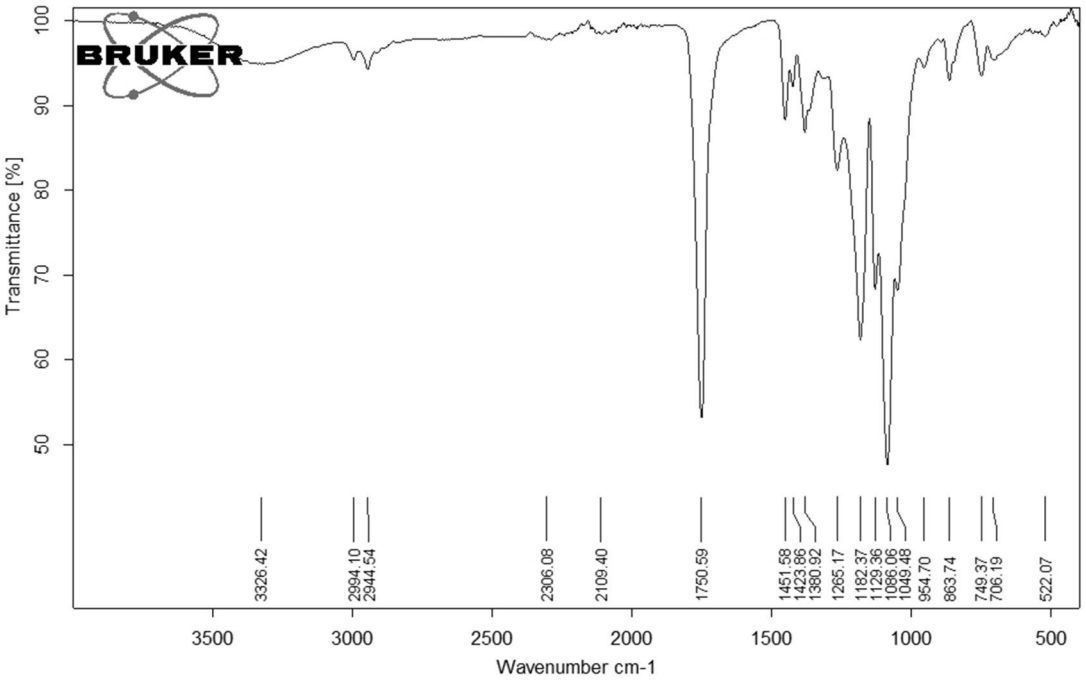
Polimer-etkin madde etkileşimlerinin belirlenebilmesi ve hazırlanan formülasyonlar içinde yer alan etkin madde varlığının tespit edilmesi amacıyla NF, PLGA, boş nanopartikül ve etkin madde yüklü formülasyonların FT-IR kullanılarak infrared spektrumları alınmıştır. Spektrumlar, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, ve Şekil 4.16'te gösterilmiştir.



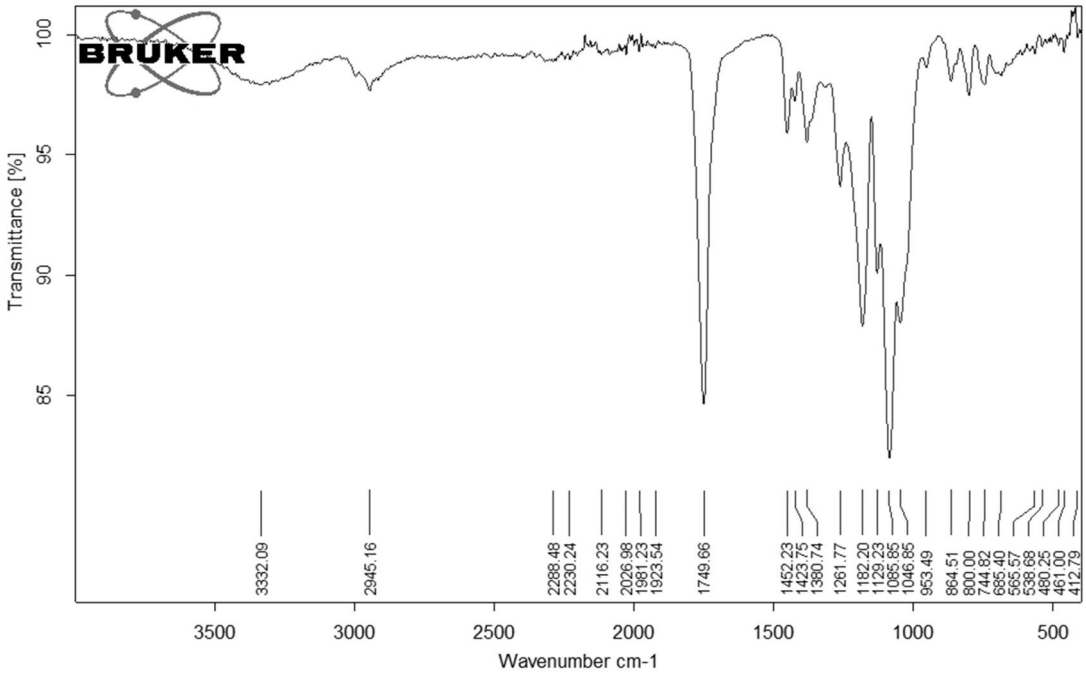
Şekil 4.11. PLGA'ya ait FT-IR spektrumu.



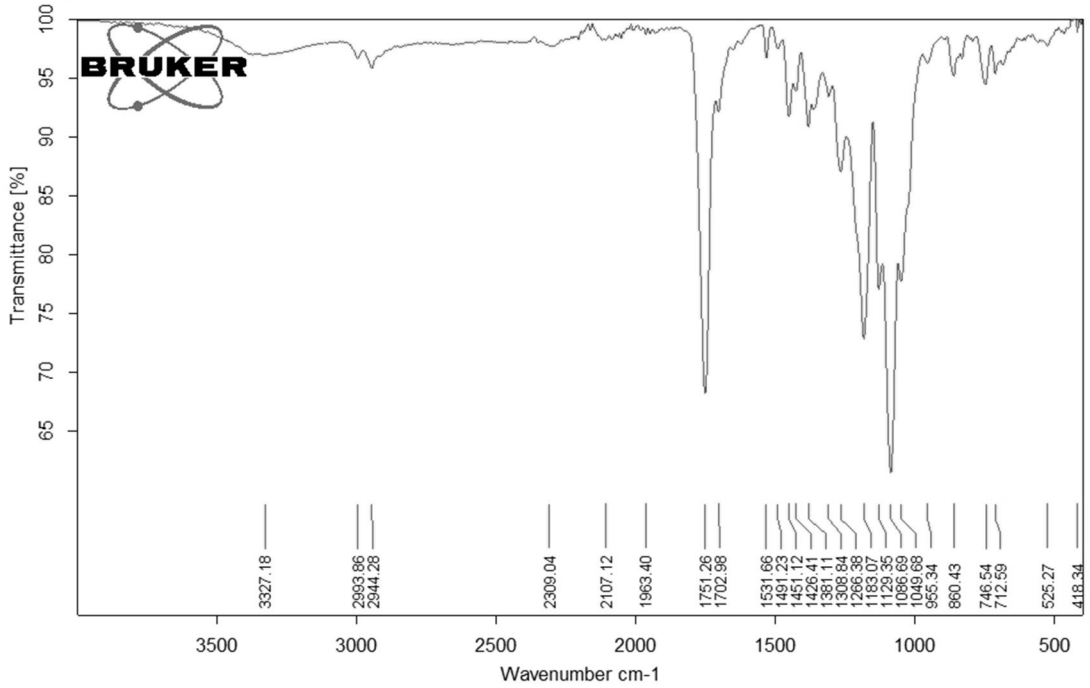
Şekil 4.12. NF'ye ait FT-IR spektrumu.



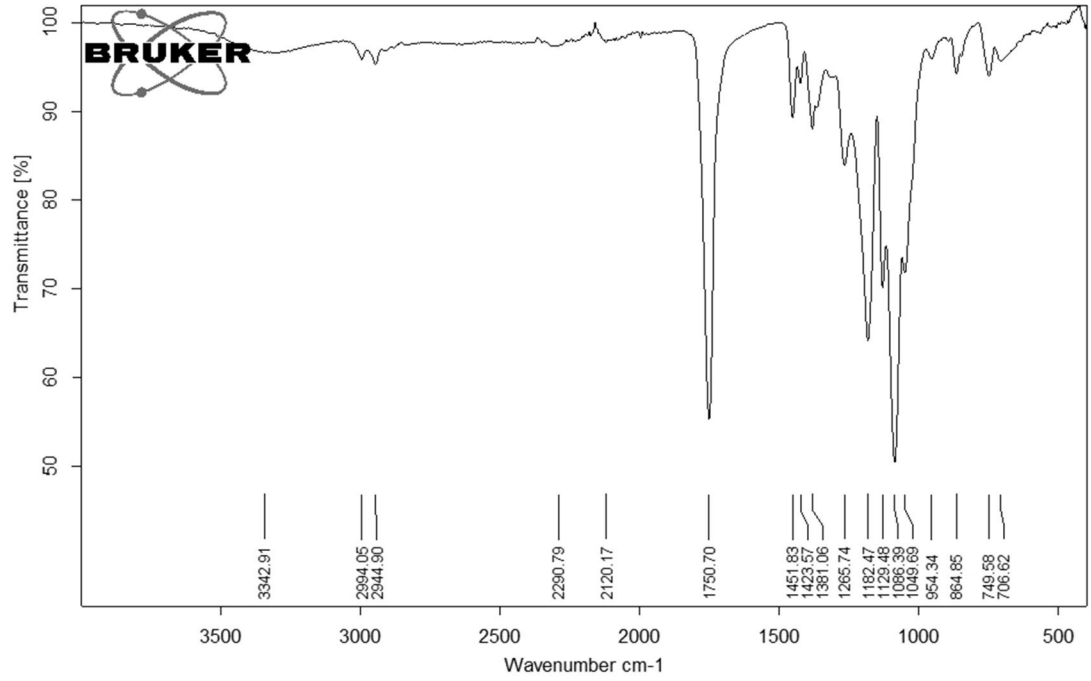
Şekil 4.13. N-1 Formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.



Şekil 4.14. N-3 Formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.



Şekil 4.15. N-2 Formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.



Şekil 4.16. N-4 Formülasyonuna ait FT-IR spektrumu.

5.TARTIŞMA

Gerek gelişmiş gerekse gelişmekte olan ülkelerde sosyoekonomik gruplara, yaşam tarzlarına, beslenme şekillerine bağlı olarak kardiyovasküler hastalıkların görülme sıklığı ve bu hastalıklara bağlı ölüm riski artmaktadır. Bundan dolayı, KVH, önlenmesi/tedavi edilmesi gereken bir hastalık grubu olarak önemini korumaktadır.[1] KVH'ın teşhis ve tedavisinde kullanılmak üzere PLGA nanopartikülleri geliştirilmiştir.[110, 135]

Konvansiyonel (alışılmış) dozaj şekillerinin kullanıldığı geleneksel tıbbi tedavide etkin madde plazma düzeyini terapötik pencere aralığında tutmak için gün içinde birkaç kez etkin madde dozunu tekrarlamak gerekmekte ve bu durum plazma konsantrasyon-zaman grafiğinde dalgalanmalara neden olmaktadır. Değiştirilmiş salım sistemleri, hemen salan dozaj şekillerinin bu sakıncalarını ortadan kaldırmak/azaltmak amacıyla geliştirilmiştir. Değiştirilmiş salım sistemleri, terapötik etkinliğin artırılması, etkin madde salım hızı/yerinin kontrol edilmesine imkân sağlaması, yan/istenmeyen etkilerin azaltılması, hasta uyuncunun artırılması ve dozlama sıklığının düşürülmesi gibi pek çok üstünlüğe sahiptir.[68, 101]

NF'nin uzun süreli salım yapan formülasyonları, refleks sempatik sinir sistemi aktivasyonunun önlenmesi ve terapötik etkinliğin uzatılması amacıyla yoğun bir şekilde tercih edilmektedir.[47]NF'nin yan etkilerini azaltmak ve hasta uyuncunu artırmak amacıyla değiştirilmiş salım sistemleri (mikropartikül, nanopartikül vb.) hazırlanmıştır.[73, 90] Biyoparçalanabilir nanopartiküller yüksek biyoyararlanım, daha iyi enkapsülasyon etkinliği, etkin madde salımının kontrolüne imkân sağlaması, etkin madde yan etkilerinin/toksik etkilerinin azaltılması gibi üstünlüklerinden dolayı ilaç taşıyıcı sistemler olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar. Etkin maddelerin nanotaşıyıcılara

hapsedilmesi, etkin maddenin etkinliğini, özgünlüğünü, tolere edilebilirliğini, istenen dokular içine absorpsiyonunu ve hücre içine penetrasyonunu iyileştirebilmektedir.[136]

PLGA, nanosistemlerin hazırlanmasında çok başarılı bir şekilde kullanılan sentetik bir polimerdir. PLGA'nın FDA onaylı (insanda kullanım için) biyoparçalanabilir ve biyouyumlu bir polimer olması, düşük toksisite/düşük immünojenite göstermesi, uygun mekanik özelliklere ve öngürülebilir biyoparçalanma kinetiğine sahip olması önemli üstünlükleridir.[136-138] PLGA nanopartikülleri özellikle peptid/protein yapıdaki ilaçların, aşıların, genlerin, büyüme faktörlerinin, antikanser ve antihipertansif etkili etkin maddelerin taşınması amacıyla, ayrıca farklı uygulama yollarına (pulmoner, nazal, oral, oftalmik vb.) yönelik olarak yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Etkin maddeler, nanopartiküllere hapsedilmiş ve/veya yüzeyine adsorbe olmuş halde bulunur.[136, 139, 140] PLGA nanopartikülleri çoğunlukla, emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi, emülsiyon-difüzyon yöntemi ve nanopresipitasyon yöntemleri kullanılarak hazırlanmaktadır.[136]

Yapılan literatür araştırmasında, PLGA polimeri kullanılarak NF-yüklü polimerik partiküler sistemlerle ilgili yapılmış az sayıda çalışma olduğu tespit edilmiştir. Genellikle, bu çalışmalar NF'nin salım hızının değiştirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.[48, 76, 77] Bu çalışmaların birinde, NF içeren PLGA mikroküreleri hazırlamak üzere çözücü buharlaştırma yöntemini kullanmışlar ve NF'nin salımını değiştirmek üzere farklı plastifiyan maddelerden [dietilftalat, triasetin, izopropil miristat ve asetillenmiş monogliserit (Myvacet®)] faydalanmışlardır. Dietilftalat ve Myvacet® kullanıldığında NF salımının daha hızlı gerçekleştiği, ortalama partikül boyutları 18 ve 80 μm olan mikroküreler hazırlandığı ve mikrokürelere yüklenen NF yüzdesinin sırasıyla % 6 ve % 14 olduğu ve partikül boyutu artıkça hapsedilen NF yüzdesinin arttığı raporlanmıştır. PLGA mikrokürelerinden NF salımının başlıca difüzyonla

gerçekleştiği belirtilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise organik çözücü olarak etil asetat seçilerek mikroküreler emülsiyon-difüzyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Etil asetatın hızlı bir şekilde su fazına difüzyonu sonucu gözenekli yapıda mikrokürelerin elde edildiği, hazırlanan tüm mikroküre formülasyonları için yüksek enkapsülasyon etkinliği (>% 81) elde edildiği ve NF'nin mikrokürelerden salımının iki fazlı bir salım eğrisine uyduğu bildirilmiştir.[77] PCL, PLGA ve Eudragit RL/RS polimerleri kullanılarak NF-yüklü nanopartiküllerin hazırlandığı diğer bir çalışmada ise hazırlanan nanopartiküllerin antihipertansif etkileri hipertansif sıçanlarda incelenmiştir. Sadece NF etkin maddesinin oral uygulanmasını takiben sistolik arteriyel kan basıncının hızla düştüğü ancak uygulamanın yaklaşık birinci saatini takiben yükselmeye başladığı ve 10. saate kadar eski haline döndüğü ifade edilmiştir. NF-yüklü nanopartiküller içinse daha dengeli bir kan basıncı düşüşü sağlanmış ve uygulamanın 10. saatine kadar anlamlı bir şekilde düşüş sürdürülmüştür. NF ile karşılaştırıldığında bağıl biyoyararlanımda en anlamlı artış negatif yüklü olan mukus nedeniyle NF-yüklü Eudragit nanopartikülleri kullanıldığında elde edilmiştir.[48]

Bu çalışmanın amacı, NF'nin uzun süreli salımını gerçekleştirmek, istenmeyen yan etkilerini azaltmak ve NF'nin farklı endikasyonlarında da kullanımını sağlamak üzere nanopartiküler sistemler hazırlamak ve bu nanopartiküllerin *in vitro* özelliklerini incelemektir. Bu çalışmada, nanopartiküllerin hazırlanması için PLGA polimeri ve stabilizan olarak da PVA seçilmiştir. PVA moleküllerinin damlacık yüzeyine adsorbe olarak damlacıkların birbirine yapışmasını engellediği, hatta tekrarlayan yıkamalar sonrası bile ara yüzeyde kaldığı ve yüzeyde polimer ile bağlantılı bir ağ yapısı oluşturduğu bu nedenle partikül stabilitesini artırdığı raporlanmış ve bundan dolayı çalışmamızda stabilizan olarak seçilmiştir.[124, 141]

PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması amacıyla nanopresipitasyon ve emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemleri seçilmiştir. Nanopresipitasyon yönteminde, yüzey aktif madde varlığında veya yokluğunda organik çözücünün sulu faza difüzyonu ve bunun sonucunda polimerin çökmesi söz konusudur. Bu yöntem sulu faz ile çözücünün karışabilirliğinden dolayı temelde lipofilik etkin maddeler için kullanışlıdır. Ancak, çeşitli değişiklikler yapılarak suda çözünür etkin maddeler için de kullanılabilir duruma getirilmiştir. Emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yönteminde ise polimer çözeltisi uçucu çözücüde hazırlanır, sonra emülsiyon oluşturulur ve organik çözücünün uzaklaştırılmasıyla nanopartiküller şekillenir.[142] Her iki yöntemde de organik faz ve sulu faz hazırlanmıştır. Organik faz hazırlanmasında nanopresipitasyon yöntemi için renksiz, uçucu, kaynama noktası 56.2°C ve yoğunluğu 0.791 g/mL (25°C'de) olan su ile karışabilen aseton (dimetilformaldehid; dimetil keton; b-ketopropan) çözücü olarak seçilirken emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi içinse su ile karışmayan, kaynama noktası 39.8-40°C ve yoğunluğu 1.325 g/mL (25°C'de) DCM (metilen klorür) seçilmiştir.[143, 144]

Daha sonra hazırlanan nanopartiküler sistemlerin in vitro karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, hazırlanan NF-yüklü nanopartiküllerin (N-2 ve N-4) SEM görüntüleri alınmış ve bu görüntülerden yaklaşık küresel görünüme sahip partiküllerin elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.2). Nanopresipitasyon yöntemi ile elde edilen N-1 ve N-2 formülasyonlarının partikül büyüklüğü değerleri sırasıyla 352.11±7.75 nm ve 424.92±4.96 nm ($p<0.05$) ve emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile elde edilen N-3 ve N-4 formülasyonları içinse 294.27±7.93 nm ve 304.88±6.03 nm olarak ölçülmüştür ($p=0.037$). Bu sonuçlara göre, her iki yöntem için de yüklenen etkin maddenin partikül büyüklüğü üzerinde etkisi olduğu saptanmıştır. Bunun yanı sıra, NF-yüklü nanopartiküler sistemlerin partikül

büyüklükleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$) ve emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemiyle daha küçük partiküllerin elde edildiği belirlenmiştir.

Partikül büyüklüğü, taşıyıcı sistemin dolaşımda kalış süresini, hücresel alımını, biyodağılımını, bunların yanı sıra etkin madde salım kinetiğini ve dolayısıyla taşıyıcı sistemin performansını etkileyen çok önemli bir faktördür. Nano-boyutlu sistemlerin (özellikle 100 nm civarında) hücre tarafından alınması açısından önemli bir üstünlüğe sahip olduğu ve mikron boyutundaki sistemlere göre hücreler tarafından alımının 15-250 kat daha fazla olduğu ifade edilmiştir.[145]

Nanopresipitasyon yöntemi kullanılarak PLGA nanopartiküllerinin hazırlandığı bir çalışmada PLGA:stabilizan oranı, organik faz:sulu faz oranı, organik çözücü tipinin değiştirilmesiyle partikül boyutunun kontrol edilebileceği ifade edilmiştir. Polimer konsantrasyonununda artışın (% 1), polimer çözeltisinin viskozitesini artırdığı ve bu nedenle organik fazın sulu faz içerisinde zayıf bir dağılım özelliği gösterdiği ve partikül büyüklüğünde de artışa neden olduğu raporlanmıştır. Ayrıca, sulu faz hacmi artırıldığında (organik faz:sulu faz, 1:3→1:5) daha küçük boyutlarda partikül elde edildiği, stabilizan miktarında artışın (Pluronik) yüzeyler arası gerilimi düşürerek partikül boyutunda küçülmeye neden olduğu bildirilmiştir.[146]

Xie ve ark.[145] tarafından yapılan bir çalışmada, nanopresipitasyon yönteminde bazı değişiklikler (akış-temelli bir sistem-özel bir akış düzeneği vardır) yapılarak PLGA nanopartikülleri hazırlanmıştır. Hazırlama sırasında dispersiyon ortamının akış hızı artırıldığında (35 mL/dakika→80 mL/dakika) partikül boyutunda önemli bir düşüş (393 nm→193 nm) sağlanmıştır. Ayrıca, polimer konsantrasyonu azaltıldığında (40 mg/mL→10 mg/mL) partikül boyutunda küçülme (393 nm→231 nm) olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada, nanopresipitasyon yöntemi ile ramipril içeren PLGA nanopartikülleri hazırlanmış ve bu nanopartiküllerin boyutlarının hazırlama koşullarına bağlı olarak 20-340 nm aralığında değişim gösterdiği saptanmıştır. PLGA konsantrasyon artışı ile partikül boyutunun önemli derecede yükseldiği ancak, stabilizan (Pluronic F-68) miktar artışı sonrası ise düştüğü raporlanmıştır.[147]

Kalimouttou ve ark.[148] tarafından yapılan çalışmada ise PLGA miktarı 75 mg'dan 450 mg'a çıkarıldığında partikül boyutunun önemli derecede değiştiği (200 nm civarından 490 nm'ye çıktığı) tespit edilmiş ve presipitasyon sırasında yüksek miktarda polimer varlığından dolayı daha büyük polimer agregatlarının şekillenmesi bu durumun nedeni olarak öne sürülmüştür. Bu yöntemde yığın halinde herhangi bir çökme olmaksızın nanopartikülleri elde etmek için sağlanması gereken çok önemli kritik koşullardan birisi düşük polimer konsantrasyonunun sağlanmasıdır.

Bizim çalışmamızda, nanoprecipitasyon yöntemiyle elde edilen partiküllerin boyutları (yaklaşık 352 ve 425 nm) üzerinde özellikle PLGA/organik fazdaki madde konsantrasyonuna bağlı olarak organik faz viskozitesinin yükselmesi ve sulu faz içerisindeki organik faz dağılımının zayıflaması etkili olmuştur.

Emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yönteminde ise partikül büyüklüğü stabilizanın tipi-konsantrasyonu, homojenizasyon hızı-süresi ve polimer konsantrasyonu tarafından önemli derecede etkilenmektedir. Daha küçük partiküller elde etmek için daha yüksek homojenizasyon hızı veya ultrasonifikasyon uygulanabilmektedir.[142] Bu yöntemin kullanılmasıyla PLGA nanopartiküllerinin hazırlandığı bir çalışmada elde edilen partiküllerin 399 nm boyutuna sahip olduğu görülmüştür.[149]

Emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak karvedilol yüklü-PLGA nanopartiküllerinin hazırlandığı bir çalışmada polimer miktarı, sonifikasyon süresi, stabilizan miktarı (PVA), organik çözücünün (DCM) uzaklaştırılma

hızı ve sulu faz/organik faz hacim oranı gibi değişkenlerin partikül boyutu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sonifikasyon süreleri 1, 5, 10 ve 15 dakika olarak gerçekleştirildiğinde partikül boyutları sırasıyla 370, 321, 292, 257 nm ölçülmüştür. PLGA miktarı, 25 mg'dan 50 mg'a yükseltildiğinde partikül boyutu 253 nm'den 340 nm'ye çıkmıştır. Polimer çözeltisinin viskozitesinin artması ve sulu fazda zayıf dağılım göstermesi sonucu kaba emülsiyon damlacıklarının oluştuğu ve bu durumunda çözücü uzaklaştırılması sonrası daha büyük partikül oluşumuna neden olduğu yazarlar tarafından ifade edilmiştir. Stabilizan miktarı artışı (% 0.25→% 0.75) sonucu küçük partiküller (320→260 nm) elde edilmiştir. Yetersiz stabilizan miktarında koruyucu etki düşeceğinden oluşan partiküllerin agregat oluşturacağı ve dolayısıyla partikül büyüklüğünün artacağı bildirilmiştir. Daha yüksek organik faz varlığında oluşan emülsiyon damlacıklarının olası koalesensinin önlenmesi sonucu organik faz/sulu faz hacim oranında yükselme sonucu partikül boyutunda hafif bir azalma saptanmıştır (organik faz hacmi 2.5 ve 5 mL, partikül boyutları sırasıyla 277 ve 242 nm). Organik çözücü rotavapor kullanılarak 30 dakikada veya manyetik karıştırıcıda beş saat karıştırılarak uzaklaştırılmış ve kısa sürede hızlı uzaklaştırmayla (310 nm) daha küçük partiküllerin elde edildiği tespit edilmiştir. Beş saat karıştırma sonucunda elde edilen partikül boyutu ise 440 nm olarak ölçülmüştür.[150] Bizim çalışmamızda da tüm bu faktörlerin etkisi sonucu emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan nanopartiküller için benzer aralıklarda partikül boyutu değerleri (294.27±7.93 nm ve 304.88±6.03 nm, Tablo 4.2) saptanmıştır.

Hazırlanan tüm nanopartiküler sistemlerin hazırlama verimi değerleri % 65'in üzerinde bulunmuş ve her iki yöntemle hazırlanan tüm formülasyonlar arasında hazırlama verimleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p \geq 0.05$). Her iki yöntem için de elde edilen yüksek verim sonuçları literatürle uyum

göstermektedir.[151-153] Emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak suda çok az çözünen siklosporin için PLGA nanopartikülleri hazırlanmış ve % 52.29-85.30 hazırlama verimi değerleri elde edilmiştir.[153] Nanopresipitasyon yöntemi kullanılarak PLA nanopartiküllerinin hazırlandığı bir çalışmada ise organik çözücü tipinin (tetrahidrofuran ve aseton), polimer molekül ağırlığının ve konsantrasyonunun nanopartikül hazırlama verimi üzerine etkileri incelenmiş ve aseton kullanıldığında daha yüksek hazırlama verimiyle nanopartiküllerin elde edildiği raporlanmıştır. Molekül ağırlığı 54400 ve 124800 olan PLA polimerlerinin 5-20 mg/mL konsantrasyonlarda asetonda çözündürülmesiyle nanopartiküler sistemler hazırlanmıştır. PLA konsantrasyonunun 5 mg/mL olduğunda her iki molekül ağırlığı için de % 70'in üzerinde hazırlama verimi elde edilmiştir. Ancak, 10 mg/mL için düşük molekül ağırlığına sahip polimer varlığında % 70 civarında verim elde edilirken, yüksek molekül ağırlığına sahip polimer kullanıldığında ise yaklaşık % 40 verimle partiküller hazırlanmıştır. 20 mg/mL durumunda ise her iki molekül ağırlığı için de verim önemli ölçüde azalmış ve hazırlama verimi değerleri düşük molekül ağırlığı için % 30 civarında kalırken, yüksek molekül ağırlıklı polimer kullanıldığında ise % 10'lara kadar düşmüştür. Genellikle, daha yüksek polariteli organik çözücülerin kullanılması ve polimer konsantrasyonunun düşük tutulması (<% 2) sonucu nanopresipitasyon yöntemi ile nanopartiküller yüksek hazırlama verimiyle elde edilebilmektedir.[151]

Zeta potansiyel, yüklü partiküller arasındaki elektrostatik itmeden dolayı nanopartikül süspansiyonlarının stabilitesi açısından son derece önemli bir kavramdır. Nanopartiküller için zeta potansiyel değeri yüksek olduğunda (genellikle, ±30 mV) kolloidal dağılımlarının stabilitesi sağlanmış olmaktadır. Zeta potansiyel değeri düştüğünde yüklü nanopartikül süspansiyonu stabil durumunu koruyamaz, bu durumda sıvı süspansiyon yerine liyofilize şekilde bu formülasyonların saklanması ve

kullanılmadan hemen önce sulandırılması stabilite açısından önemli üstünlükler sağlar.[154-156]

Bizim çalışmamızda, hazırlanan tüm formülasyonların zeta potansiyel değerleri sıfıra yakın olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2). Buna göre, boş ve NF-yüklü nanopartiküllerin zeta potansiyeli üzerinde hazırlama yönteminin etkili olmadığı saptanmıştır ($p \geq 0.05$). Zeta potansiyel nanosistemlerin farmakokinetik özelliklerini veya bu sistemlerin fagositoza uğramasını etkileyebilir.[157] Sıfıra yakın zeta potansiyel değerlerine sahip nanopartiküller yüklü nanopartiküllerle (özellikle pozitif zeta potansiyel değerine sahip) karşılaştırıldığında azalmış fagositik alıma uğrarlar. Nanopartiküller pH'sı 9 olan PVA çözeltisi ile hazırlandığında, karboksil grupları (PLGA'dan) ve hidroksil grupları (PVA'dan) nanopartikül yüzeyine yakın yerleşir ve yüksek zeta potansiyel değeri (-24.97 mV) ölçülür. Ancak, PVA çözeltisinin pH değeri düştükçe (pH 7 civarında) zeta potansiyel değeri de düşerek sıfıra yaklaşır.[154] Buna göre, bizim çalışmamızda elde edilen zeta potansiyel değerleri literatürle uyumlu sonuçlar göstermiştir.[155, 158]

Nanopartiküler sistemlere yüklenen etkin madde miktarının saptanması amacıyla UV-spektrofotometre kullanılarak miktar tayini yöntemi geliştirilmiş ve analitik yöntem validasyonu gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık çalışmalarında, PB pH 7.4 ortamı için 1-6 μg/mL aralıklarında çalışılmıştır (n=6). Her seri için elde edilen kalibrasyon doğrusuna ait eğimler karşılaştırılmıştır; karşılaştırma sonucunda genel kurala uygun olarak VK değeri <% 1 olarak saptanmıştır.[127] Elde edilen R^2 değeri 0.9998 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.1).

Analitik yöntemin gün içi kesinlik ve doğruluğunu tespit etmek üzere kalibrasyon doğrusu aralığında yer alan 3 farklı konsantrasyonda (PB pH 7.4 için 2.5, 4.5 ve 5.5 μg/mL), her bir konsantrasyondan 6'şar adet olacak şekilde standart çözeltiler

hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Günler arası kesinlik ve doğruluğun tespiti içinde aynı konsantrasyonlar seçilerek her bir konsantrasyon için 6'şar adet olacak şekilde hazırlanmış standart çözeltilerin absorbansları birbirini takip eden 3 gün içinde ölçülmüştür. Gün içi ve günler arası doğruluk için % bağıl hata değerleri hesaplanmış ve sırasıyla, -1.586-1.292 ve 0.228-1.080 aralığında oldukları saptanmıştır (Tablo 4.1). Gün içi ve günler arası kesinlik değerleri sırasıyla, 1.431-0.969 ve 1.046-1.720 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1). Hesaplanan değerler % 2'nin altında olduğu için sistemin kesinliği ve doğruluğu kanıtlanmıştır. Analitik yöntem için LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış ve ayrıca analitik yöntemin özgünlüğü de değerlendirilerek NF'nin maksimum absorbans verdiği dalga boyunda ortam bileşenleri ve formülasyona giren yardımcı maddelerin absorbans vermediği belirlenmiştir. Sonuç olarak, NF miktar tayini için uygun analitk yöntem geliştirilerek validasyonu gerçekleştirilmiştir.

N-2 ve N-4 nanopartikül formülasyonları için elde edilen yükleme etkinliği değerleri sırasıyla, % 13.03±1.82 ve % 18.96±1.95 ($p=0.05$) ve yükleme kapasitesi değerleri ise % 2.20±0.30 ve % 2.63±0.36 ($p>0.05$) olarak saptanmıştır. Dolayısıyla, hazırlama yönteminin, yükleme etkinliği ve kapasitesi üzerinde bizim çalışma koşullarımız altında etkili olmadığı belirlenmiştir. Genellikle, partiküler sistemlere ilaç yüklenmesi üzerinde polimer tipi, polimer molekül ağırlığı, organik fazın viskozitesi gibi çeşitli faktörler etkilidir.[159-162]

NF-yüklü PLGA mikroküreleriniin hazırlandığı bir çalışmada hapsedilen NF yüzdeleri % 6 ve % 14 olarak tespit edilmiş ve yüklenen NF yüzdesi üzerinde partikül boyutunun etkili olduğu raporlanmıştır.[76]

Partiküler sistemden etkin madde salımı üzerine kullanılan polimer/polimerlerin molekül ağırlığı, PLGA kullanılan durumlarda laktid/glikolid oranı, polimer-etkin

madde matriksinin fiziksel özellikleri, şekli ve büyüklüğü, etkin madde tipi ve konsantrasyonu, ortam pH'sı vb. pek çok faktör etki etmektedir. PLGA'daki laktid/glikolid oranı hazırlanan taşıyıcı sistemin hidrofilik özelliğini, degradasyonunu ve salım hızını etkilemektedir.[109] Buna göre, yapıda PGA oranı artıkça yapı daha hidrofilik bir özellik kazanır, daha fazla su absorpsiyonu gerçekleşir ve sonuç olarak degradasyon olayı daha hızlı gerçekleşir (kopolimerleri degradasyon hızlarına göre sıralarsak: PLGA 50:50>PLGA 65:35>PLGA 75:25>PLGA 85:15).[109] PLGA'nın ortalama molekül ağırlığı da salım üzerinde etkilidir. Molekül ağırlığının artmasıyla, polimer zincir uzunluğu artmakta ve zincir uzunluğundan dolayı degradasyon için daha fazla zamana gereksinim duyulmakta ve genellikle degradasyon daha yavaş gerçekleşmektedir. Taşıyıcı sistemin şekli ve büyüklüğü açısından bakıldığında ise daha yüksek yüzey alanı sonucu daha hızlı bir degradasyon görülür. Salım ortamındaki daha küçük partikül boyutuna sahip polimerik sistem içerisine daha yüksek hızda su girişi olacağından daha hızlı bir etkin madde difüzyonu sonucu daha hızlı bir salım gerçekleşmektedir. Dolayısıyla, yüzey alanı/hacim oranı yüksek olan PLGA-taşıyıcı sistemlerinden etkin madde salım hızı daha yüksektir.[109, 163] Ortam pH'sı da PLGA polimerinin degradasyon hızını etkiler. Alkali ve güçlü asidik ortamlarda degradasyon hızı artarken hafif asidik veya nötral ortamlarda ise daha yavaş bir degradasyon gerçekleşir.[109]

Bizim çalışmamızda, NF'nin uzun süreli salımını sağlamak üzere molekül ağırlığı 76,000-115,000 olan PLGA (75:25) kopolimeri kullanılarak nanopartiküler sistemler hazırlanmış ve in vitro salım çalışması, PB pH 7.4 ortamında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, hazırlanan N-2 ve N-4 formülasyonlarına ait salım grafikleri Şekil 4.3'te verilmiştir. N-2 formülasyonundan NF'nin % 25'i 1 günde, yaklaşık % 80'i ise 22 günde, N-4 formülasyonu içinse 6 saat içerisinde yaklaşık % 25 ve 22 günde ise ~% 100 NF salımı gerçekleşmiştir (Şekil 4.3). Her iki formülasyon

salım sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Her iki formülasyon için elde edilen tüm bu sonuçlar yukarıda verilen bilgiler ve çalışmalarla uyumlu bir şekilde daha uzun süreli bir in vitro etkin madde salımının gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.[109, 164, 165] Daha küçük partikül boyutlu olan N-4 formülasyonundan daha hızlı bir NF salımı gerçekleşmiştir ($p<0.05$).

PLGA taşıyıcı sistemlerinden etkin madde salımı iki fazlı bir salım profili oluşturmaktadır. İlk olarak nanopartikül yüzeyinde tutulan ve ortamla temas eden etkin maddenin ani bir salımı görülmektedir. İkinci fazda ise, taşıyıcı sistem içerisine hapsedilmiş etkin maddenin devamlı bir salımı görülür.[109] Çalışmamızda hazırlanan N-2 ve N-4 formülasyonlarından ilk 6 saat içerisinde sırasıyla ~% 15 ve ~% 25 civarında etkin madde salımı gerçekleşmiş ve devamında ise sürekli artan bir etkin madde salımı gözlenmiştir (Şekil 4.3).

İnfrared spektroskopisi, yapıdaki kimyasal bileşimi ve bağ düzenlemelerini aydınlatmak için gerekli olan önemli bir karakterizasyon tekniğidir. Bu teknik, yapıda var olan çeşitli bağların titreşim frekanslarını ölçer ve yapıdaki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi sağlar. PLGA kopolimerlerine ait IR spektrumlarında LA ve GA yapılarında yer alan karbonil gruplarına ait gerilme titreşimleri ile ilgili olarak 1770-1750 cm^{-1} aralığında belirgin bantlar görülmektedir. Bunun yanı sıra, 1300-1150 cm^{-1} aralığında ise asimetrik ve simetrik C-C(=O)-O gerilmeleri ile ilgili orta şiddette bantlar söz konusudur. Bu aralıktaki bantlar ester yapılarının karakterizasyonu açısından önemlidir. 3500-3450 cm^{-1} aralığında ise OH grubuna ait gerilme titreşimleri oluşmaktadır. C-H ve C-O gerilme titreşimleri sırasıyla, 2885-3010 cm^{-1} ve 1186-1089 cm^{-1} aralığında, C-H eğilme titreşimleri ise 1450-850 cm^{-1} aralığında gözlenmektedir.[166-168] Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz PLGA kopolimerine ait IR spektrumunda da (Şekil 4.11) literatürlerle benzer şekilde karbonil –C=O gerilme

titreşimi 1749.82 cm^{-1}'de, asimetrik ve simetrik C-C(=O)-O gerilme titreşimleri 1268.08-1181.78 cm^{-1} aralığında, C-H gerilme titreşimleri 2881.25-2996.33 cm^{-1} aralığında, C-O 1181.78-1086.47 cm^{-1} aralığında, C-H eğilme titreşimleri ise 1452.41-866.55 cm^{-1} aralığında saptanmıştır. Saf NF'nin FT-IR spektrumunda, 3321.77 cm^{-1}'de N-H gerilme titreşimi, 3100.84 cm^{-1}'de aromatik C-H gerilme titreşimi, 2952.79 cm^{-1}'de C-H gerilme titreşimi ($-CH_3$ grubu), 1676.40 cm^{-1}'de C=O gerilme titreşimi, 1525.39 cm^{-1}, 1308.82-1378.46 cm^{-1} aralığında NO_2 gerilme titreşimi, 1269.80 cm^{-1}'de aromatik C-N gerilme titreşimi, 1222.37 cm^{-1} ve 1118.05 cm^{-1}'de C-O gerilme titreşimlerinden kaynaklanan karakteristik bantlar görülmektedir.[169]

Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te verilen sırasıyla N-1 ve N-3 boş nanopartikül formülasyonlarına ait FT-IR spektrumları PLGA spektrumuna benzer olarak elde edilmiştir. N-2 formülasyonuna ait FT-IR spektrumuna (Şekil 4.15) bakıldığında ise saf PLGA ve N-1 boş nanopartiküllerine ait spektrumlardan farklı olarak NF'ye ait spektrumda görülen NO_2 gerilme titreşimi ile ilgili olan 1531.66 cm^{-1} ve 1308.84 cm^{-1} pikleri görülmektedir. Diğer görülen pikler ise PLGA kopolimerine ait piklerdir. N-4 formülasyonuna ait spektrumda (Şekil 4.16) ise saf PLGA ve N-3 formülasyonundan farklı olarak 3342 cm^{-1}'de (N-H gerilme titreşimleriyle ilgili olarak), 2994.05 cm^{-1}'de (C-H gerilme titreşimiyle ($-CH_3$ grubu) ilgili olarak artış) pikler olduğu saptanmış ve nanopartiküler sistemlere (N-2 ve N-4) NF'nin yüklendiği sonucuna varılmıştır.

DSC polimer analizlerinde ve taşıyıcı sistemlerin hazırlanması sırasında etkin madde-polimer etkileşimlerini incelemek üzere yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.[170-172]

Etkin madde-polimer etkileşimlerini incelemek üzere saf NF, saf PLGA, boş ve NF-yüklü nanopartikül formülasyonlarının (N-1-N-4) DSC analizleri yapılarak DSC diyagramları elde edilmiştir (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, ve Şekil

4.9). PLGA'nın DSC diyagramında ~50°C (T_{pik}:58.46°C) ve ~370°C (T_{pik}:371.37°C) de iki pik görülmektedir (Şekil 4.4). İlk pik polimerin camsı geçiş sıcaklığını (Tg) gösterirken ikinci pik polimerin bozunma sıcaklığı ile ilgilidir. Polimerin amorf doğasından dolayı belirgin bir erime derecesi gözlenmemiştir. PLGA 75:25 için Tg 49-55°C aralığında değişmektedir.[167, 173, 174] Yapılan bir çalışmada, PLGA'nın 371°C'de termal bozunmasının gerçekleştiği rapor edilmiştir.[167] NF'ye ait DSC diyagramı (Şekil 4.5) incelendiğinde, yaklaşık 170°C'de (T_{pik}:173.25°C) karakteristik bir endotermik pik görülmektedir. NF'nin erime derecesi 172°C-174°C aralığındadır.[44, 169, 175, 176] NF'nin termal bozunması ise 210-390°C aralığında gerçekleşmektedir.[176] N-1 ve N-3 formülasyonlarına ait DSC diyagramlarında (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7) ise PLGA'nın camsı geçiş sıcaklığını gösteren ~50°C (sırasıyla, T_{pik}:57.83 ve 59.03°C) deki pik ve 280°C civarında ise (sırasıyla, T_{pik}:275.71 ve 281.61°C) endotermik pikler elde edilmiştir. Saf PLGA bozunma sıcaklığına göre boş nanopartikül formülasyonlarının bozunma sıcaklığında düşüş olduğu saptanmıştır.[167] N-2 ve N-4 formülasyonlarına ait DSC diyagramlarında ise N-1 ve N-3 formülasyonlarından farklı olarak NF'nin erime derecesine yakın olarak yaklaşık 180°C ve termal bozunma sıcaklığına yakın olarak da 210°C civarında daha belirgin piklerin varlığı tespit edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- ✓ Söz konusu çalışmada; nifedipin-yüklü polimerik taşıyıcı sistemler, PLGA polimeri kullanılarak başarıyla hazırlanmış ve *in vitro* olarak karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.
- ✓ PLGA varlığında, nano boyutta, yaklaşık küresel şekilli, uygun salım özelliklerine sahip polimerik taşıyıcı sistemler elde edilmiştir.
- ✓ Nifedipin miktar tayini için UV-spektrofotometrik yöntem geliştirilmiş ve analitik yöntem validasyonu gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Nifedipin yükleme etkinliğinin hazırlanan formülasyonlarda (N-2 ve N-4) sırasıyla % 13.03±1.82 ve % 18.96±1.95 olduğu bulunmuştur.
- ✓ FT-IR, DSC analizleri kullanılarak etkin maddenin polimerik taşıyıcı sisteme yüklendiği saptanmıştır.
- ✓ Bundan sonra gerçekleştirilmesi planlanan devam çalışmalarında, yükleme etkinliğinin artırılması ve bu sistemlerin *in vivo* etkinliğinin incelenmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization (WHO). Cardiovascular Disease.

http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/. 12 Ekim 2014.

2. Paulis L, Unger T. Novel therapeutic targets for hypertension. *Nature Reviews Cardiology*, 2010, 7: 431-441.

3. Waeber B. Treatment strategy to control blood pressure optimally in hypertensive patients. *Blood Press*, 2001, 10: 62-73.

4. Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation*, 2000, 101: 329-335.

5. Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi. *Avrupa Klinik Uygulamada Kardiyovasküler Hastalıklardan Korunma Kılavuzu*, 2012; 40(3): 1-76.

6. Şendur MAN, Güven GS. Güncel kılavuzlar eşliğinde hipertansiyon tedavisi. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2011, 42: 53-64.

7. U.S. Department of Health and Human Services. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7). http://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/guidelines/phycard.pdf. 14 Ekim 2014.

8. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F. 2013 ESH/ESC guidelines for themanagement of arterial hypertension the task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of Hypertension*, 2013, 31: 1281-1357.

9. Barçın C. Yeni Avrupa Kardiyoloji Derneği/Avrupa Hipertansiyon Derneği hipertansiyon kılavuzu ile neler değişti? *Türk Kardiyol Derneği Arşivi*, 2014, 42: 1-6.

10. World Health Organization (WHO). Clinical guidelines for the management of hypertension. *WHO EMRO Publications*, 2005; 29: 1-97.

11. Savvatis K, Westermann D, Schultheiss HP, Tschope C. First-line treatment of hypertension: critical appraisal of potential role of aliskiren and hydrochlorothiazide in a fixed combination. *Integr Blood Press Control*, 2010, 3: 163-170.

12. Joffres M, Falaschetti E, Gillespie C, Robitaille C, Loustalot F, Poulter N, McAlister FA, Johansen H, Baclic O, Campbell N. Hypertension prevalence, awareness, treatment and control in national surveys from England, the USA and Canada, and correlation with stroke and ischaemic heart disease mortality: a cross-sectional study. *British Medical Journal Open*, 2013, 3: 1-9.

13. Türk Kardiyoloji Derneği. 2010 Dünya Hipertansiyon Günü, 17 Mayıs 2010/Hipertansiyon Görülme Sıklığı. http://tkd.org.tr/dernek/bultenler/basinbultenleri/hipertansiyonaltsayfalar/hipertansiyongorulmesikligi. 14 Ekim 2014.

14. Celalettin G. Antihipertansiflerle Arteriyel Kan Basınçları Kontrol Altına Alınamayan Hastaların Psikososyal Açıdan Değerlendirilmesi ve SSRI'ların (Sertralin) Hipertansiyon Kontrolüne Etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aile Hekimliği Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Ankara: Başkent Üniversitesi, 2008.

15. Messerli FH, Williams B, Ritz E. Essential hypertension. *Lancet*, 2007, 370: 591-603.

16. Demirci NF. Kayseri İli Sarız İlçesi 40 Yaş ve Üzeri Populasyonda Hipertansiyon ile Diabetes Mellitus Görülme Sıklığı ve Etkileyen Faktörler. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Halk Sağlığı Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Kayseri: Erciyes Üniversitesi, 2011.

17. Öksüz E. Hipertansiyonda klinik değerlendirme ve ilaç dışı tedavi. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 2004, 13(3): 99-104.

18. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Roccella EJ, Prog NHBPE. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure - The JNC 7 Report. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 2003, 289: 2560-2572.

19. Kaplan N, Mendis S, Poulter N, Whitworth J. 2003 World health organization (WHO) international society of hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *Journal of Hypertension*, 2003, 21: 1983-1992.

20. Türk Kardiyoloji Derneği. Kan Basıncının Ölçümü ve Klinik Değerlendirme. http://old.tkd.org.tr/kilavuz/k03/3_3575c.htm?wbnum=1105. 15 Ekim 2014.

21. Krakoff LR. Diuretics for hypertension. *Circulation*, 2005, 112: 127-129.

22. Türk Kardiyoloji Derneği. Hipertansiyonda Korunma ve Tedavi. http://old.tkd.org.tr/kilavuz/k03/4_2c93c.htm?wbnum=1107. 15 Ekim 2014.

23. Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *Journal of Physiology*, 1988, 395: 233-253.

24. Jentsch TJ, Hubner CA, Fuhrmann JC. Ion channels: function unravelled by dysfunction. *Nature CellBiology*, 2004, 6: 1039-1047.

25. Genç O. Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları. *Genel Tıp Dergisi*, 1997, 7(1): 43-46.

26. Jaeger JM, Dennis DM. Class IV Antiarrhymic Drugs: Calcium Channel Blockers. İçinde:Atlee JL (editör). *Complications in Anesthesia*, 2. Baskı. Oxford, Elsevier Health Sciences, 2007: 50.

27. Eraç Y, Selli Ç, Tosun M. Kalsiyumun çok yönlü işlevselliğinde TRPC iyon kanallarının rolü. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 2009, 28(2): 161-183.

28. Budriesi R, Bisi A, Ioan P, Rampa A, Gobbi S, Belluti F, Piazzi L, Valenti P, Chiarini A. 1,4-Dihydropyridine derivatives as calcium channel modulators: the role of 3-methoxy-flavone moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005, 13: 3423-3430.

29. Nayler WG. Calcium antagonists: past, present and future - a personal view. *Journal of Clinical and Basic Cardiology*, 1999, 2: 155-161.

30. Sweetman S. *Martindale: The Complete Drug Reference*. 1 Baskı. London, Pharmaceutical Press, 2007: 1-3709.

31. The Merck Index. Nifedipine. http://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/mono1500006613/nifedipine?q=unauthorize. 28 Ağustos 2014.

32. Hayashi K, Homma K, Wakino S, Tokuyama H, Sugano N, Saruta T, Itoh H. T-type Ca channel blockade as a determinant of kidney protection. *Keio Journal of Medicine*, 2010, 59: 84-95.

33. Friedrich H, Nada A, Bodmeier R. Solid state and dissolution rate characterization of co-ground mixtures of nifedipine and hydrophilic carriers. *DrugDevelopment and Industrial Pharmacy*, 2005, 31: 719-728.

34. Sun J, Triggle DJ. Calcium channel antagonists: cardiovascular selectivity of action. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1995, 274: 419-426.

35. Goldmann S, Stoltefuss J. 1,4-Dihydropyridines - effects of chirality and conformation on the calcium-antagonist and calcium agonist activities. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 1991, 30: 1559-1578.

36. Shaldam MA, Elhamamsy MH, Esmat EA, El-Moselhy TF. 1,4-Dihydropyridine calcium channel blockers: homology modeling of the receptor and assessment of structure activity relationship. *ISRN Medicinal Chemistry*, 2014: 1-14.

37. Schnell B, Krenn W, Faber K, Kappe CO. Synthesis and reactions of Biginelli-compounds. Part 23. Chemoenzymatic syntheses of enantiomerically pure 4-aryl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*, 2000: 4382-4389.

38. Niopas I, Daftsios AC. Determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography: validation and application to pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003, 32: 1213-1218.

39. Dinarvand R, Kouchakzadeh Z, Moghadam SH, Atyabi F. Effect of microencapsulation on photo-stability of nifedipine. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2006, 4: 239-244.

40. Farzaana F. The Photodecomposition of Different Polymorphic Forms of 1,4-Dihydropyridine Calcium Channel Blockers. Faculty of Science. Master Thesis, Port Elizabeth: Nelson Mandela Metropolitan University, 2011.

41. Li H, Yan GP, Wu SN, Wang ZJ, Lam KY. Numerical simulation of controlled nifedipine release from chitosan microgels. *Journal of Applied Polymer Science*, 2004, 93: 1928-1937.

42. Emara LH, Badr RM, Abd Elbary A. Improving the dissolution and bioavailability of nifedipine using solid dispersions and solubilizers. *DrugDevelopment and Industrial Pharmacy*, 2002, 28: 795-807.

43. Jagdale SC, Jadhav VN, Chabukswar AR, Kuchekar BS. Solubility enhancement, physicochemical characterization and formulation of fast-dissolving tablet of

nifedipine-betacyclodextrin complexes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 48: 131-145.

44. Lalitha Y, Lakshmi PK. Enhancement of dissolution of nifedipine by surface solid dispersion technique. *International Journal Pharmacy Pharmaceutical Science*, 2011, 3: 41-46.

45. Annapureddy T, Preetha JP, Kumar NA, Reddy MS. Enhancement of solubility of nifedipine by liquisolid compacts technique. *Indo American journal of Pharmaceutical Research*, 2013, 3(4): 3433-3465.

46. Hecq J, Deleers M, Fanara D, Vranckx H, Amighi K. Preparation and characterization of nanocrystals for solubility and dissolution rate enhancement of nifedipine. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 299: 167-177.

47. Snider ME, Nuzum DS, Veverka A. Long-acting nifedipine in the management of the hypertensive patient. *VascularHealth and Risk Management* 2008, 4: 1249-1257.

48. Kim YI, Fluckiger L, Hoffman M, Lartaud-Idjouadiene I, Atkinson J, Maincent P. The antihypertensive effect of orally administered nifedipine-loaded nanoparticles in spontaneously hypertensive rats. *British Journal ofPharmacology*, 1997, 120: 399-404.

49. Aydın A. Preterm Eylemin Durdurulmasında Ritodrin ve Nifedipinin Tedavi Etkinliklerinin Maternal ve Fetal Etkilerinin Karşılaştırılması. Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği. Uzmanlık Tezi, İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Zeynep Kâmil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2005.

50. Grundy JS, Eliot LA, Kulmatycki KM, Foster RT. Grapefruit juice and orange juice effects on the bioavailability of nifedipine in the rat. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 1998, 19: 175-183.

51. U.S. National Library of Medicine. Nifedipine. http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugınfo.cfm?setid=4617417a-08df-4417-a944-

dfc30de183db&cfid=871840&cftoken=1cb8b1d12050b1e5-01802f95-b47e-e996-d69a38ae78d4dbe4. 29 Ağustos 2014.

52. Patel N, Polak S, Jamei M, Rostami-Hodjegan A, Turner DB. Quantitative prediction of formulation-specific food effects and their population variability from in vitro data with the physiologically-based ADAM model: a case study using the BCS/BDDCS class II drug nifedipine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 57: 240-249.

53. Shen JB, Jiang B, Pappano AJ. Comparison of L-type calcium channel blockade by nifedipine and/or cadmium in guinea pig ventricular myocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2000, 294: 562-570.

54. Verhoeven FA, Moerings EP, Lamers JM, Hennemann G, Visser TJ, Everts ME. Inhibitory effects of calcium channel blockers on thyroid hormone uptake in neonatal rat cardiomyocytes. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 2001, 281: 1985-1991.

55. Lipscombe D, Helton TD, Xu W. L-type calcium channels: the low down. *Journalof Neurophysiology*, 2004, 92: 2633-2641.

56. Lucas RM, Howell LP, Wall BA. Nifedipine-induced gingival hyperplasia. A histochemical and ultrastructural study. *Journalof Periodontol*, 1985, 56: 211-215.

57. World Health Organization (WHO). WHO Model Lists of Essential Medicines. http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.html. 28 Ağustos 2014.

58. Conde-Agudelo A, Romero R, Kusanovic JP. Nifedipine in the management of preterm labor: a systematic review and metaanalysis. *American Journalof Obstetrics and Gynecology*, 2011, 204: 1-20.

59. Ishizawa K, Yamaguchi K, Horinouchi Y, Fukuhara Y, Tajima S, Hamano S, Tomita S, Tsuchiya K, Tamaki T. Drug discovery for overcoming chronic kidney disease (CKD): development of drugs on endothelial cell protection for overcoming CKD. *Journalof Pharmacological Sciences*, 2009, 109: 14-19.

60. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Nifedipine. http://www.fda.gov/safety/medwatch/safetyinformation/ucm275491.htm. 20 Ekim 2014.

61. U.S. National Library of Medicine. Nifedipine Tablet. http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=fcabfaee-df20-4e7c-b951-8a454f0d355e#i4i_interactions_id_bcd15ded-e1e1-43a3-a87a-6b5bea9d06bf. 20 Ekim 2014.

62. Koçak Farma. Nidicard 10 mg Yumuşak Kapsül. http://www.kocakfarma.com/tr/prospektus.aspx?id=128. 20 Ekim 2014.

63. Bailey DG, Malcolm J, Arnold O, Spence JD. Grapefruit juice-drug interactions. *British Journalof Clinical Pharmacology*, 1998, 46: 101-110.

64. Forte JS. Interactions of grapefruit juice with drugs. *Chronic Illness*, 2011, 5: 7-11.

65. Fami MJ, Ho NT, Mason CM. Another report of adverse reactions to immediate release nifedipine. *Pharmacotherapy*, 1998, 18: 1133-1135.

66. Mansoor AF, Keefer LAvH. The dangers of immediate-release nifedipine for hypertensive crisis. *Pharmacy and Therapeutics*, 2002, 27: 362-365.

67. Fu E, Nieh S, Hsiao CT, Hsieh YD, Wikesjo UM, Shen EC. Nifedipine-induced gingival overgrowth in rats: brief review and experimental study. *Journal of Periodontology*, 1998, 69: 765-771.

68. Lin XL, Tang DY, Du HF. Self-assembly and controlled release behaviour of the water-insoluble drug nifedipine from electrospun PCL-based polyurethane nanofibres. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2013, 65: 673-681.

69. Li DX, Kim JO, Oh DH, Lee WS, Hong MJ, Kang JY, Choi JS, Woo JS, Yong CS, Choi HG. Development of nifedipine-loaded coated gelatin microcapsule as a long acting oral delivery. *Archives of Pharmacal Research*, 2009, 32: 127-132.

70. Mallick S, Gupta BK, Ghosal SK. Assessment of bioavailability of experimental controlled release microcapsules of nifedipine. *ActaPoloniae Pharmaceutica*, 2000, 57: 175-180.

71. Varde NK, Pack DW. Microspheres for controlled release drug delivery. *Expert Opinionon Biological Therapy*, 2004, 4: 35-51.

72. Chuo WH, Tsai TR, Hsu SH, Cham TM. Preparation and in-vitro evaluation of nifedipine loaded albumin microspheres cross-linked by different glutaraldehyde concentrations. *International Journal of Pharmaceutics*, 1996, 144: 241-245.

73. Dhawan S, Singla AK. Nifedipine loaded chitosan microspheres prepared by emulsification phase-separation. *Biotechnic and Histochemistry*, 2003, 78: 243-254.

74. Kumbar SG, Aminabhavi TM. Synthesis and characterization of modified chitosan microspheres: effect of the grafting ratio on the controlled release of nifedipine through microspheres. *Journal of Applied Polymer Science*, 2003, 89: 2940-2949.

75. Kumar S, Shelke NB, Prasannakumar S, Sherigara BS, Aminabhavi TM. Microspheres of copolymeric N-vinylpyrrolidone and 2-ethoxyethyl methacrylate for the controlled release of nifedipine. *Journal of Polymer Research*, 2011, 18: 359-366.

76. Sansdrap P, Moes AJ. Influence of additives on the release profile of nifedipine from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 1998, 15: 545-553.

77. Soppimath KS, Aminabhavi TM. Ethyl acetate as a dispersing solvent in the production of poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres: effect of process parameters and polymer type. *Journal of Microencapsulation*, 2002, 19: 281-292.

78. Soppimath KS, Kulkarni AR, Aminabhavi TM. Encapsulation of antihypertensive drugs in cellulose-based matrix microspheres: characterization and release kinetics of microspheres and tableted microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 2001, 18: 397-409.

79. Perez MH, Zinutti C, Lamprecht A, Ubrich N, Astier A, Hoffman M, Bodmeier R, Maincent P. The preparation and evaluation of poly(epsilon-caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *Journal of Controlled Release*, 2000, 65: 429-438.

80. Giovannelli L, Bellomi S, Pattarino F, Albertini B. Characterization of nifedipine microparticles prepared by Hot Air Coating technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 293: 225-234.

81. Pattarino F, Giovannelli L, Bellomi S. Effect of poloxamers on nifedipine microparticles prepared by Hot Air Coating technique. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007, 65: 198-203.

82. Shelke NB, Aminabhavi TM. Synthesis and characterization of novel poly(sebacic anhydride-co-Pluronic F68/F127) biopolymeric microspheres for the controlled release of nifedipine. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 345: 51-58.

83. Huang J, Wigent RJ, Bentzley CM, Schwartz JB. Nifedipine solid dispersion in microparticles of ammonio methacrylate copolymer and ethylcellulose binary blend for controlled drug delivery. Effect of drug loading on release kinetics. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 319: 44-54.

84. Saigal A, Ng WK, Tan RB, Chan SY. Development of controlled release inhalable polymeric microspheres for treatment of pulmonary hypertension. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 450: 114-22.

85. Cilurzo F, Selmin F, Minghetti P, Gennari CGM, Dernartin F, Montanari L. Characterization and physical stability of fast-dissolving microparticles containing nifedipine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, 68: 579-588.

86. Guyot M, Fawaz F. Nifedipine loaded-polymeric microspheres: preparation and physical characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, 1998, 175: 61-74.

87. Devrim B, Canefe K. Midede kalış süresini uzatan ilaç şekilleri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2006, 35(1): 69-94.

88. Zhao L, Wei YM, Yu Y, Zheng WW. Polymer blends used to prepare nifedipine loaded hollow microspheres for a floating-type 443 oral drug delivery system: in vitro evaluation. *Archives of Pharmacal Research*, 2010, 33: 443-450.

89. Granada A, Tagliari MP, Soldi V, Silva MA, Zanetti-Ramos BG, Fernandes D, Stulzer HK. Nifedipine-loaded polymeric nanocapsules: validation of a stability-indicating HPLC method to evaluate the drug entrapment efficiency and in vitro release profiles. *Journal of AOAC International*, 2013, 96: 276-281.

90. Li P, Dai Y-N, Zhang J-P, Wang A-Q, Wei Q. Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. *International Journal of Biomedical Science*, 2008, 4(3): 221-228.

91. Barman RK, Iwao Y, Funakoshi Y, Ranneh AH, Noguchi S, Wahed MI, Itai S. Development of highly stable nifedipine solid-lipid nanoparticles. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2014, 62: 399-406.

92. Barman RK, Iwao Y, Islam MR, Funakoshi Y, Noguchi S, Wahed MII, Itai S. In vivo pharmacokinetic and hemocompatible evaluation of lyophilization induced nifedipine solid-lipid nanoparticle. *Pharmacology & Pharmacy*, 2014, 5: 455-461.

93. Kamiya S, Yamada M, Kurita T, Miyagishima A, Arakawa M, Sonobe T. Preparation and stabilization of nifedipine lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 354: 242-247.

94. Sherina V, Santhi K, Sajeeth CI. Formulation and evaluation of sodium alginate microbeads as a carrier for the controlled release of nifedipine. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 2012, 1: 699-710.

95. Santhi K, Dhanaraj SA, Ali AN, Sherina M. Formulation and evaluation of nifedipine microbeads using guar gum as a release modifier. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2013, 21: 270-275.

96. Tiwari G, Tiwari R, Sriwastawa B, Bhati L, Pandey S, Pandey P, Bannerjee SK. Drug delivery systems: An updated review. *International Journalof Pharmaceutical Investigation*, 2012, 2: 2-11.

97. Martinho N, Damgé C, Reis CP. Recent advances in drug delivery systems. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2011, 2: 510-526.

98. Kaş HS. İlaç taşıyıcı partiküler sistemler. İçinde:Gürsoy AZ (editör). *Kontrollü Salım Sistemleri*, 1. Baskı. İstanbul, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği, 2002: 65-102.

99. Chien YW. Concepts and system design for rate-controlled drug delivery. İçinde:Chien YW (editör). *Novel Drug Delivery Systems*, 2. Baskı. New York, Marcel Dekker, 1992: 1-42.

100. U. S. Pharmacopeia, The standart of Quality, USP30/NF 25, 2007.

101. Gürsoy AZ. Giriş. İçinde:Gürsoy AZ (editör). *Kontrollü Salım Sistemleri*, 1. Baskı. İstanbul, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği, 2002: 3-6.

102. Çetin EM. Periodontal Hastalıkların Tedavisinde Kullanılan Lokal Kontrollü Salım Sistemlerinin İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Bilim Dalı. Doktora Tezi, İzmir: Ege Üniversitesi, 2008.

103. Kumar MNVR. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2000, 3: 234-258.

104. Çapan Y. Kontrollü salım sistemlerinin salım mekanizmaları ve kullanılış yolları. İçinde:Gürsoy AZ (editör). *Kontrollü Salım Sistemleri*, 1. Baskı. İstanbul, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, 2002: 41-64.

105. Champion JA, Katare YK, Mitragotri S. Particle shape: a new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *Journal of Controlled Release*, 2007, 121: 3-9.

106. Brannon-Peppas L, Peppas N. Polimerlerin yapısı fiziksel ve biyolojik özellikleri. İçinde:Gürsoy AZ (editör). *Kontrollü Salım Sistemleri*, 1. Baskı. İstanbul, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, 2002: 21-40.

107. Tunçay M, Çalış S. İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan biyoparçalanabilir sentetik ve doğal polimerler. *FABAD Journal Pharmaceutical Sciences*, 1999, 24: 109-123.

108. Pillai O, Panchagnula R. Polymers in drug delivery. *Current Opinionin Chemical Biology*, 2001, 5: 447-451.

109. Makadia HK, Siegel SJ. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 2011, 3: 1377-1397.

110. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Preat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 2012, 161: 505-522.

111. Tunç I. Synthesis, Characterizatıon, and Thermal Degradation of Poly(l-lactide)s. The department of chemistry and the institute of engineering and sciences. Master Thesis, Ankara: Bilkent University, 2004.

112. Vroman I, Tighzert L. Biodegradable polymers. *Materials*, 2009, 2: 307-344.

113. Deluca PP, Mehta RC, Hausberger AG, Thanoo BC. Biodegradable polyesters for drug and polypeptide delivery. *Polymeric Delivery Systems*, 1993, 520: 53-79.

114. Jena KK. Biodegradable Polymers (PLA and PLGA) Based Nanoparticles in Protein and Plasmid DNA Delivery. Department of Life Science. Master Thesis, Rourkela: National Institute of Technology, 2011.

115. Murty BS, Shankar P, Raj B, Rath BB, Murday J. The Big World of Nanomaterials. İçinde:Raj B (editör). *Textbook of Nanoscience and Nanotechnology*, 1. Baskı. Chennai, Springer Science & Business Media, 2013: 26.

116. Ochekpe NA, Olorunfemi PO, Ngwuluka NC. Nanotechnology and drug delivery part 1: background and applications. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2009, 8: 265-274.

117. Couvreur P, Kante B, Grislain L, Roland M, Speiser P. Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: doxorubicin-loaded nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1982, 71: 790-792.

118. Couvreuer P, Couarraze G, Devissaguet J, Puisieux F. Nanoparticles: Preparation and Characterization. İçinde:Benita S (editör). *Microencapsulation, Methods and Industrial Applications*, 2. Baskı. New York-Basel-Hong Kong, Marcel Dekker, 1996: 183-211.

119. Gutierro I, Hernandez RM, Igartua M, Gascon AR, Pedraz JL. Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA loaded nanospheres. *Vaccine*, 2002, 21: 67-77.

120. Çırpanlı Y. Kamptotesin İçeren Polimerik ve Oligosakkarit Bazlı Nanopartiküler Formülasyonların Geliştirilmesi ve İn Vitro-İn Vivo Değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2009.

121. Athar M, Das AJ. Therapeutic nanoparticles: State of the art of nanomedicine. *Advanced Materials Reviews*, 2014, 1: 25-37.

122. Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, 2006, 2: 8-21.

123. Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *The Pharmaceutical Research*, 2009, 26: 1025-1058.

124. Gündoğdu N. Polimerik Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi ve İn Vitro Karakterizasyonu. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2012.

125. Schubert S, Delaney JT, Schubert US. Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid). *Soft Matter*, 2011, 7: 1581-1588.

126. Sigma-Aldrich. Nifedipine. http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/n7634pis.pdf. 25 Kasım 2014.

127. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis - understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 2003, 987: 57-66.

128. Van Zoonen P, Hoogerbrugge R, Gort SM, Van de Wiel HJ, Van't Klooster HA. Some practical examples of method validation in the analytical laboratory. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 1999, 18: 584-593.

129. Tomiyama N, Tsuji H, Watanabe M, Takeda M, Harada T, Kobayashi H. High-performance liquid chromatographic method for determination of DDT and its degradation products in rat plasma, liver and brain: validation and application to a pharmacokinetic study. *Journal of ChromatographyB Biomedical Sciences and Applications*, 2000, 748: 361-368.

130. Lambropoulos J, Spanos GA, Lazaridis NV, Ingallinera TS, Rodriguez VK. Development and validation of an HPLC assay for fentanyl and related substances in fentanyl citrate injection, USP. *Journalof Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999, 20: 705-716.

131. Söğüt-Ertaş Ö, Kayalı A. Analitik yöntem geçerliliğine genel bir bakış. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2005, 34(1): 41-57.

132. Banjare L, Chandra JK, Patel P. Method development and validation for estimation of irbesartan in bulk drug and pharmaceutcal dosage. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 2013, 3: 87-90.

133. Shabir GA, Bradshaw TK. Determination of the spermicides nonoxynol-9 in a gel pharmaceutical formulation by RPLC. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 8: 43-52.

134. Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Development and lndustrial Pharmacy*, 1999, 25: 471-476.

135. Lu JM, Wang XW, Marin-Muller C, Wang H, Lin PH, Yao QZ, Chen CY. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2009, 9: 325-341.

136. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010, 75: 1-18.

137. Zhang XY, Sun MZ, Zheng AP, Cao DY, Bi YQ, Sun JX. Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 45: 632-638.

138. Muthu MS, Rawat MK, Mishra A, Singh S. PLGA nanoparticle formulations of risperidone: preparation and neuropharmacological evaluation. *Nanomedicine*, 2009, 5: 323-333.

139. Bala I, Hariharan S, Kumar MNVR. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2004, 21: 387-422.

140. Bejjani RA, BenEzra D, Cohen H, Rieger J, Andrieu C, Jeanny JC, Gollomb G, Behar-Cohen FF. Nanoparticles for gene delivery to retinal pigment epithelial cells. *The Molecular Vision*, 2005, 11: 124-132.

141. Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Kunou N, Kawashima Y. Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-Lactide Glycolide Copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *Journal of Controlled Release*, 1993, 25: 89-98.

142. Nagavarma BVN, Hemant KSY, Ayaz A, Vasudha LS, Shıvakumar HG. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2012, 5(3): 16-23.

143. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6. Baskı. Grayslake, Pharmaceutical Press, 2009.

144. Sigma-Aldrich. DCM - Material Safety Data Sheet. http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/PleaseWaitMSDSPage.do?language=&country=TR&brand=SIAL&productNumber=650463&PageToGoToURL=http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/650463?lang=en&region=TR. 25 Kasım 2014.

145. Xie H, Smith JW. Fabrication of PLGA nanoparticles with a fluidic nanoprecipitation system. *Journalof Nanobiotechnology*, 2010, 8: 1-7.

146. Kara A. Investigation of formulation parameters of plga nanoparticles prepared by nanoprecipitation technique. http://avestia.com/ICNFA2014_Proceedings/papers/94.pdf. 25 Kasım 2014.

147. Jawahar N, Eagappanath T, Venkatesh N, Jubie S, Samanta MK. Preparation and characterisation of plga-nanoparticles containing an anti-hypertensive agent. *International Journal of PharmTech Research*, 2009, 1: 390-393.

148. Kalimouttou S, Lahiani-Skiba M, Naouli N, Lin VSZ, Skiba M. Evaluation of the paromomycin loading characteristics in nanoprecipitated PLGA nanospheres. *NSTI Nanotech, Technical Proceedings*, 2008: 407-410.

149. Alshamsan A. Nanoprecipitation is more efficient than emulsion solvent evaporation method to encapsulate cucurbitacin I in PLGA nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2014, 22: 219-222.

150. Lal PS, Jana GPMU, Manna PK. Antihypertensive drug loaded plga nanoparticles: Impact of formulation variables on particle size distribution. *Der Pharmacia Sinica*, 2013, 4: 40-46.

151. Legrand P, Lesieur S, Bochot A, Gref R, Raatjes W, Barratt G, Vauthier C. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide

nanoparticles by nanoprecipitation. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 344: 33-43.

152. Patel KC, Pramanik S. Formulation and characterization of mefenamic acid loaded polymeric nanoparticles. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2014, 3: 1391-1405.

153. Wagh VD, Apar DU. Cyclosporine A loaded plga nanoparticles for dry eye disease: in vitro characterization studies. *Journal of Nanotechnology*, 2014, 1: 1-10.

154. Si-Shen F, Huang G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (taxol) from nanospheres of biodegradable polymer. İçinde:Si-Shen F, Chong S, Rompas J (editörler). *Chemotherapeutic Engineering*, Florida, CRC Press, 2014: 328.

155. Mukherjee B, Santra K, Pattnaik G, Ghosh S. Preparation, characterization and in-vitro evaluation of sustained release protein-loaded nanoparticles based on biodegradable polymers. *International Journalof Nanomedicine*, 2008, 3: 487-496.

156. Clogston JD, Patri AK. Zeta potential measurement. *The Methods in Molecular Biology*, 2011, 697: 63-70.

157. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - a review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2013, 12: 255-264.

158. Mura S, Hillaireau H, Nicolas J, Le Droumaguet B, Gueutin C, Zanna S, Tsapis N, Fattal E. Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells. *International Journalof Nanomedicine*, 2011, 6: 2591-2605.

159. Fattal E, Quaglia F, Gupta PK, Brazeau GA. Biodegradable microparticles for the development of less-painful and less-irritating parenterals. İçinde:Gupta PK, Brazeau GA (editörler). *Injectable Drug Development: Techniques to Reduce Pain and Irritation*, 1. Baskı. Colorado, CRC Press 1999: 355-378.

160. Valot P, Baba M, Nedelec JM, Sintes-Zydowicz N. Effects of process parameters on the properties of biocompatible ibuprofen-loaded microcapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 369: 53-63.

161. Tuncay M, Calis S, Kas HS, Ercan MT, Peksoy I, Hincal AA. Diclofenac sodium incorporated PLGA (50:50) microspheres: formulation considerations and in vitro/in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, 195: 179-88.

162. Song XR, Zhao Y, Wu WB, Bi YQ, Cai Z, Chen QH, Li YB, Hou SX. PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and verapamil hydrochloride: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 350: 320-329.

163. Dawes GJ, Fratila-Apachitei LE, Mulia K, Apachitei I, Witkamp GJ, Duszczyk J. Size effect of PLGA spheres on drug loading efficiency and release profiles. *The Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 2009, 20: 1089-1094.

164. Amjadi I, Rabiee M, Hosseini MS. Anticancer activity of nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: in-vitro evaluation. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2013, 12: 623-634.

165. Shiny J, Ramchander T, Goverdhan P, Habibuddin M, Aukunuru JV. Development and evaluation of a novel biodegradable sustained release microsphere formulation of paclitaxel intended to treat breast cancer. *International Journal of Pharmaceutical lnvestigation*, 2013, 3: 119-125.

166. Singh G, Kaur T, Kaur R, Kaur A. Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer-plga. *International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences*, 2014, 1: 30-42.

167. Fouad H, Elsarnagawy T, Almajhdi FN, Khalil KA. Preparation and in vitro thermo-mechanical characterization of electrospun PLGA nanofibers for soft and hard

tissue replacement. *International Journal of Electrochemical Science*, 2013, 8: 2293-2304.

168. Marques DR, dos Santos LA, Schopf LF, de Fraga JCS. Analysis of poly(Lactic-co-Glycolic Acid)/poly(Isoprene) polymeric blend for application as biomaterial. *Polimeros-Ciencia E Tecnologia*, 2013, 23: 579-584.

169. Gowda DV, N R, Moin A, Shivakumar HG, Siddaramaiah. Controlled release behaviour of nifedipine from the pellets of gelucire/microcrystalline cellulose blends. *International Journal of PharmTech Research*, 2010, 2: 1215-1226.

170. Calvo P, VilaJato JL, Alonso MJ. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *The Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1996, 85: 530-536.

171. Gamisans F, Lacoulonche F, Chauvet A, Espina M, Garcia ML, Egea MA. Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, 179: 37-48.

172. Mainardes RM, Gremião MPD, Evangelista RC. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded plga nanoparticles. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, 42(4): 523-530.

173. Sigma-Aldrich. Poly(D,L-lactide-co-glycolide). http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/719927?lang=en&region=TR. 25 Kasım 2014.

174. Ro AJ, Falotico R, Dave V. Morphological study of porous sirolimus-containing poly(lactide-co-glycolide) discs for biomedical applications. *Abstracts of Papers of American Chemical Society*, 2010, 51: 618-626.

175. Muthukumaran M, Dhachinamoorthi D, Sekhar KBC. Fabrication and evaluation of sustained release mucoadhesive bilayer tablets containing nifedipine *Der Pharmacia Sinica*, 2012, 3: 367-376.

176. Filho ROC, Franco PIBM, Conceicao EC, Leles MIG. Stability studies on nifedipine tablets using thermogravimetry and differential scanning calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2008, 93: 381-385.

EKLER

EK-1 ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Emrah ÖZAKAR
Doğum tarihi	: 01.01.1984
Doğum yeri	: Erzurum
Medeni hali	: Evli
Uyruğu	: T.C.
Adres	: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM
Tel	: 0542 472 45 50
Faks	:
E-mail	: emrahozakar@gmail.com
EĞİTİM	
Lise	: Özel Dadaşkent Aziziye Erkek Lisesi (2001)
Lisans	: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2001-2005)
Yüksek lisans	:
Doktora	:
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: Orta düzeyde
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
13. Bölge Erzurum Eczacı Odası	
İLGİ ALANLARI, HOBİLER	
Eczacılık	
Farmasötik Teknoloji	
Spor yapmak	
Kaktüs ve sukulent yetiştirmek	

EK-2 ETİK KURUL ONAY FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Etik Alt Kurulu

Sayı : 93722986.12/ 219
Konu: Etik Alt Kurul Kararı **13/02/2014**

Sayın: Doç. Dr. Meltem ÇETİN

İlgi: 12.02.2014 tarih ve 168 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Alt Etik Kurulunun 13.02.2014 tarihinde almış olduğu 1' nolu karar ile "Etkin madde yüklü PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması ve in vitro değerlendirilmesi" başlıklı, yüksek lisans öğrenciniz Emrah ÖZAKAR ile beraber yürüteceğiniz çalışmanızın etik kurulumuz tarafından kabulüne karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Zühal GÜVENALP
Etik Alt Kurul Başkanı

TOPLANTI TARİHİ: 13.02.2014
TOPLANTI SAYISI: 1

Karar -1-Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Meltem ÇETİN'in yürütücülüğünde Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Araştırma laboratuarlarında yürütülecek olan "Etkin madde yüklü PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması ve in vitro değerlendirilmesi" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili 12.02.2014 tarih ve 168 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğunun mevcut oybirliği ile kabulüne karar verildi.

Atatürk Üniversitesi kampusu 25040 Tlf: 0442-231 52 07 Fax: 0442 - 2360962 Elektronik Post: eczfak@atauni.edu.tr ERZURUM