GAMZE ÇAMLIK

← Adınızı soyadınızı giriniz

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

↓

DOKTORA TEZİ

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ; Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

İSTANBUL-2021

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

ALZHEIMER HASTALIĞINDA ETKİLİ NAZAL YOLDAN UYGULANABİLEN HEDEFLENDİRİLMİŞ İNSÜLİN KUANTUM NOKTASI KOMPLEKSİNİN GELİŞTİRİLMESİ

GAMZE ÇAMLIK

DANIŞMAN
PROF. DR. YILDIZ ÖZSOY ERGİNER

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Farmasötik Teknoloji Programında Doktora öğrencisi Gamze ÇAMLIK tarafından Prof. Dr. Yıldız ÖZSOY ERGİNER'in danışmanlığında hazırlanan " Alzheimer Hastalığında Etkili Nazal Yoldan Uygulanabilen Hedeflendirilmiş İnsülin Kuantum Noktası Kompleksinin Geliştirilmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 19 /08 /2021 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Timuçin UĞURLU
Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri
Prof. Dr. Neşe Buket AKSU
Altınbaş Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri
Doç. Dr. Meryem Sedef ERDAL
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri
Doç. Dr. Ayca YILDIZ PEKÖZ
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri
Doç. Dr. Emine Meltem OCAK
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri-(Danışman oy hakkı olmaksızın)
Prof. Dr. Yıldız ÖZSOY ERGİNER
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri-(2. Tez Danışman oy hakkı olmaksızın)
Prof. Dr. İsmail Tuncer DEĞİM
Biruni Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Gamze ÇAMLIK

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince her an desteğini hissettiğim, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp büyük bir ilgi ve sabırla, güler yüzünü, samimiyetini benden esirgemeyen, kendisinden öğrendiğim değerli bilgiler gelecekteki mesleki hayatımda bana yol gösterecek olan Saygıdeğer Danışman Hocam *Prof. Dr. Yıldız ÖZSOY ERGİNER*'e teşekkürü bir borç bilir ve şükranlarımı sunarım.

Çalışma hayatımın her aşamasında bana destek olan bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, araştırma isteğimin ve şevkimin kırılmasına izin vermeden beni yönlendiren, 2. Tez Danışmanım Saygıdeğer Hocam *Prof. Dr. İsmail Tuncer DEĞİM*'e sağladığı imkanlar için sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezim sırasında desteğini, güler yüzünü ve samimiyetini her zaman hissettiren, bilgi ve bilimsel çalışmalarını benden esirgemeyen Saygıdeğer Hocam *Prof. Dr. Zelihagül DEĞİM*'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Nazal mukoza kesit alma çalışmalarında Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarı'na, konfokal görüntüleme çalışmalarında İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'ne, elektron mikroskop çalışmalarında Ortadoğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'na, spektroflorimetre çalışmalarında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Mühendislik Fakültesi Analitik Kimya Bölümü Anabilim Dalı'na, sundukları tüm imkanlar için teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince destekleri, motive edici konuşmaları ile her zaman yanımda olduğunu hissettiğim arkadaşlarım *Dr. Öğr. Üyesi Ecem Fatma KARAMAN* ve *Dr. Ecz. Tuğçe BORAN*, in situ jel çalışmalarında vermiş olduğu destekten dolayı *Dr. Öğr. Üyesi Ebru ALTUNTAŞ* ve *Dr. Öğr. Üyesi Burak ÇELİK*'e, BAP başvuru sürecinde desteklerini esirgemeyen *Dr. Meltem Ezgi DURGUN KILIÇ*'a, Biruni Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirdiğim çalışmalar boyunca beni yalnız bırakmayan *Ecz. Zeynep KESKİN* ve *Pelin KILIÇARSLAN*'a,

Hayatım boyunca attığım her adımda ve aldığım her kararda beni sonsuz destekleyen, sevgi, sabır ve hoşgörülerini benden hiç eksik etmeyen canım annem ve canım babam *Gülten-Zeynettin ÇAMLIK*'a, her zaman sevgisini hissettiğim ailemden gördüğüm dostum *Ecz. Damla KIZILTOPRAK*'a ve aile dostum kıymetli hocam *Sevgi IŞIK*'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2021-37536

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Xİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XVİ
ÖZET ..... XİX
ABSTRACT XX
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Alzheimer Hastalığı ile İlgili Genel Bilgiler 3
2.1.1. Alzheimer Hastalığı 3
2.1.2. AH Patofizyolojisi 4
2.1.2.1. Amiloid β Hipotezi 4
2.1.2.2. Kolinerjik Hipotezi 5
2.1.2.3. Glutamat Hipotezi 6
2.1.2.4. Tau Hipotezi 7
2.1.3. AH ve İnsülin İlişkisi 8
2.2. NAZAL YOL 10
2.2.1. Nazal Yol Anatomisi ve Hücresel Yapısı 10
2.2.2. Nazal Yolun Avantajları ve Dezavatajları 12
2.2.3. MSS'ye Nazal Yol ile İlaçların Taşınması 13
2.2.4. İlaçların Intranazal Yol ile Verilmesini Etkileyen Faktörler 16
2.2.5. Nazal Yol ve Mukoadezyon 19
2.2.6. Mukoadezyon Teorileri 20
2.2.6.1. Elektron Transfer Teorisi 20
2.2.6.2. Adsorpsiyon Teorisi 21
2.2.6.3. Islanma Teorisi 21

2.2.6.4. Difüzyon Teorisi 21
2.2.6.5. Kopma Teorisi.....21
2.2.7. Mukoadezyonu Etkileyen Faktörler.....21
2.2.7.1. Polimerik Faktörler 22
2.2.7.2. Çevresel Faktörler 22
2.2.7.3. Mukus Fizyolojisi.....22
2.2.8. Nazal Mukoadezif İlaç Taşıyıcı Sistemler 23
2.2.9. AH Tedavisinde Intranazal Yol ile Kullanılan İlaç Taşıyıcı Sistemler 25
2.2.10. In situ Polimerik İlaç Taşıcıyı Sistemler.....28
2.2.10.1. Fizyolojik Uyarana Duyarlı In situ Jel Sistemler.....29
2.2.10.2. İyon Değişimine Duyarlı In situ Jel Sistemler 30
2.2.10.3. Kimyasal Değişime Duyarlı In situ Jel Sistemler 31
2.3. Isı Değişimine Duyarlı İlaç Taşıyıcı Sistemler.....31
2.3.1. Isı Değişimlerine Duyarlı Polimerler.....32
2.3.2. PEO/PPO/PEO Triblok Kopolimerleri-Poloksamerler.....32
2.3.3. Isı Değişimlerine Duyarlı Nazal İlaç Taşıyıcı Sistemler 34
2.3.4. Peptit ve Proteinlerin Intranazal Yol ile Taşınması 35
2.4. KARBON KUANTUM NOKTALARI (KKN).....37
2.4.1. KKN'ler ve Genel Özellikleri.....37
2.4.1.1. KKN'leri Yapısı ve Optik Özellikleri.....37
2.4.1.2. KKN'lerin Avantajları ve Dezavantajları 40
2.4.2. KKN'lerin Uygulama Alanları.....41
2.4.3. KKN'lerin Analizlerinde Kullanılan Teknikler.....42
2.4.4. KKN'lerin Kuantum Verimi (Φ) 42
2.4.5. KKN'lerin Hazırlama Yöntemleri 43
2.4.5.1. Yukarıdan Aşağıya Yöntemler.....43
2.4.5.2. Aşağıdan Yukarıya Yöntemler.....44
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....47
3.1. Araç ve Gereçler 47
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 47
3.1.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler.....48
3.1.3. Kullanılan Bilgisayar Programları 49
3.2. Yöntem.....50

3.2.1. KKN'lerin Hazırlanması 50
3.2.2. KKN'lerin Verimi (Φ) 54
3.2.3. KKN'lerle İnsülin Kompleksinin Hazırlanması ve Karakterizasyon Çalışmaları 55
3.2.3.1. KKN'lerle İnsülin Kompleksinin Hazırlanması.....55
3.2.3.2. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı 55
3.2.3.3. Zeta Potansiyel Tayini.....55
3.2.3.4. Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) Görüntüsü Tayini 56
3.2.4. In situ Jellerin Hazırlanması 56
3.2.4.1. Sol-Jel Sıcaklıklarının (Tsol-jel) Belirlenmesi.....56
3.2.4.2. P407 çözeltisinin Tsol-jel Üzerine Ins-KKN ve Yardımcı Maddelerin Etkisinin İncelenmesi 57
3.2.4.3. pH Tayini 58
3.2.4.4. Reolojik Çalışmalar.....58
3.2.4.5. Hazırlanan In situ Jellerin Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi 59
3.2.4.6. Nazal In situ Jel Formülasyonlarında *In vitro* Salım Çalışması.....62
3.2.4.7. Nazal In situ Jel Formülasyonlarında *Ex vivo* Geçiş Çalışması 66
3.2.4.8. Nazal Mukozanın Optik Mikroskop ve Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopta İncelenmesi 68
3.2.4.9. Kinetik Parametrelerin Hesaplanması.....71
3.2.4.10. Formülasyona Ait Fizikokimyasal Stabilitelerinin Değerlendirilmesi 72
3.2.4.11. İstatistiksel Değerlendirmeler 73
4. BULGULAR.....74
4.1. KKN'lerin Hazırlanması.....74
4.2. KKN'lerin Kuantum Veriminin Hesaplanması 77
4.3. KKN'lerle İnsülin Kompleksinin Oluşturulması ve Karakterizasyon Çalışmaları80
4.3.1. KKN'lerle İnsülin Kompleksinin Oluşturulması 80
4.3.2. Ins-KKN'lerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımları 81
4.3.3. Ins-KKN'lerin Zeta Potansiyelleri.....82
4.3.4. Ins-KKN'lerin Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) Görüntüleri 83
4.4. In situ Jellerin Hazırlanması 83
4.4.1. Sol-Jel Sıcaklıklarının (Tsol-jel) Belirlenmesi 85

4.4.2. P407'nin Tsol-jel Üzerinde Ins-KKN ve Yardımcı Maddelerin Etkisinin İncelenmesi 88
4.4.3. Reolojik Çalışmalar.....89
4.4.4. Hazırlanan In situ Jellerin Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi 94
4.4.5. Nazal Jel Formülasyonlarından *In vitro* Salım Çalışması.....95
4.4.5.1. Analitik metot validasyon parametrelerin değerlendirilmesi.....96
4.4.6. Nazal Jel Formülasyonlarında *Ex vivo* Geçiş Çalışması.....98
4.4.7. Nazal Mukozanın Optik Mikroskop ve Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopta İncelenmesi 98
4.4.8. Kinetik Parametrelerin Hesaplanması.....101
4.4.9. Fizikokimyasal Stabilite Testlerine Ait Bulgular.....101
5. TARTIŞMA 108
KAYNAKLAR 118
HAM VERİLER 133
FORMLAR 134
ETİK KURUL KARARI 135
PATENT HAKKI İZNİ 136
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....137
ÖZGEÇMİŞ 138

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1 KKN'lerin Üretim Yöntemleri 43
Tablo 3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler 47
Tablo 3.2 Cihaz ve Malzemeler 48
Tablo 3.3 Kullanılan bilgisayar programları 49
Tablo 3.4 KKN'lerin elde edilemesi için ön formülasyon çalışmaları 50
Tablo 3.5 KKN'lerin sentezi için kullanılan formülasyon çalışmaları 53
Tablo 3.6 BSA standart protein prosedür tablosu 65
Tablo 4.1 KKN'lerin elde edilmesi için ön formülasyon çalışmalarının UV (365 nm) altındaki floresan özellikleri 74
Tablo 4.2 Reaksiyon sonucu KKN'lerin pH değerleri 77
Tablo 4.3 Nazal mukoza pH'sına uygun hale getirilen formülasyon pH değerleri 77
Tablo 4.4 Ins-KKN formülasyonlarının pH değişimleri 81
Tablo 4.5 Ins-KKN formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve dağılım ölçüm sonuçları 82
Tablo 4.6 Ins-KKN'lerin zeta potansiyel ölçüm sonuçları 83
Tablo 4.7 P407 polimer çözeltilerinin hazırlanması 84
Tablo 4.8 SAMH kullanılarak hazırlananan in situ jel formülasyonları 84
Tablo 4.9 Na-sitrat kullanılarak hazırlanan in situ jel formülasyonları 85
Tablo 4.10 Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan P407 çözeltilerinin sıcaklıkla değişimler 85
Tablo 4.11 P407 ve formülasyonların Tsol-jel Sonuçları 87
Tablo 4.12 F20 ve sadece %20'lik P407 içeren çözeltilerin, farklı konsantrasyonlarda MS (4000 cp), PEG3350 içeren formülasyonları 89
Tablo 4.13 Ins-KKN içermeyen J1V, J2V, J5V ve J7V nolu formülasyonların MS miktarlarının değişim tablosu 90
Tablo 4.14 Ins-KKN içeren J3V, J4V, J6V ve J8V nolu formülasyonların MS miktarının değişim tablosu 91
Tablo 4.15 Ins-KKN içeren ve içermeyen J1V ve J3V nolu formülasyonlar 92
Tablo 4.16 Ins-KKN içeren J4V ve J9V nolu formülasyonlar 93
Tablo 4.17 Hazırlanan in situ jellere ait mekanik özelliklerin ölçüm sonuçları 95

Tablo 4.18 BSA standasrt eğri için ölçüm sonuçları 96
Tablo 4.19 İnsülin için doğruluk ve geri elde sonuçları 97
Tablo 4.20 Hazırlanan formülasyonlara ve insülin çözeltilerine ait *in vitro* salım ve *ex vivo* geçiş kinetik modeller 101
Tablo 4.21 Ins-KKN formülasyonlara ait pH stabilite sonuçları 102
Tablo 4.22 J4 nolu formülasyonlara ait pH stabilite sonuçları 102
Tablo 4.23 Ins-KKN formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları 103
Tablo 4.24 J4 nolu formülasyonlara ait partikül büyüklüğü sonuçları 104
Tablo 4.25 Ins-KKN formülasyonlarına ait PDI stabilite sonuçları 104
Tablo 4.26 J4 nolu formülasyonlara ait PDI sonuçları 105
Tablo 4.27 Ins-KKN formülasyonlarına ait zeta potansiyeli stabilite sonuçları 106
Tablo 4.28 J4 nolu formülasyonlara ait zeta potansiyeli stabilite sonuçları 106

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 AH'nin patolojik evrimi (Masters ve ark. 2015). 4
Şekil 2.2 AH gelişiminde amiloid β hipotezi (Wen ve ark. 2017; Dhas ve ark. 2019). ... 5
Şekil 2.3 AH gelişiminde kolinerjik hipotez (Wen ve ark. 2017; Dhas ve ark. 2019). 6
Şekil 2.4 AH gelişiminde glutamat hipotezi (Wen ve ark. 2017; Dhas ve ark. 2019)..... 7
Şekil 2.5 AH gelişiminde Tau hipotezi (Wen ve ark. 2017; Dhas ve ark. 2019). 8
Şekil 2.6 İnsan insülininin yapısı (Mikiewicz ve ark. 2017). 8
Şekil 2.7 Nazal boşluğun histolojisi (Krinke ve Weber 2012). 10
Şekil 2.8 Nazal boşluk anatomik yapısı (Grassin-Delyle ve ark. 2012). 11
Şekil 2.9 Olfaktör bölge yapısı (Moon ve ark. 2014). 12
Şekil 2.10 Nazal yol ile beyne ilaç iletim mekanizmalarının şematik gösterimi (Aderibigbe 2018). 14
Şekil 2.11 Intranazal uygulamadan sonra maddenin olfaktör epitelden MSS'ye iletimi (Keller ve ark. 2021). 15
Şekil 2.12 İlaçların i.n. yoldan verilmesini etkileyen faktörler 16
Şekil 2.13 Nazal mukus tabakası (Bitter ve ark. 2011). 19
Şekil 2.14 Mukoadezif ilaç taşıyıcı sistemlerin şematik gösterimi. 20
Şekil 2.15 Kuantum sınırlaması etkisinden dolayı KKN'nin enerji seviye ayrımı şeması (Berends ve Mello Donega 2017). 39
Şekil 2.16 KN'lerin elektronik yapısı ve ışık mekanizmasının absorbsiyonu ve emisyonu. (Murphy ve ark. 2005). 40
Şekil 3.1 Formülasyonların mikrodalga reaktör cihazında hazırlanmasının şematik gösterimi ve mikrodalga reaktör cihazı 53
Şekil 3.2 Çöktürme uygulanan formülasyon örnekleri 54
Şekil 3.3 Hazırlanan formülasyonların Tsol-jel belirlenmesi 57
Şekil 3.4 Ins-KKN ve farklı konsantrasyonlarda MS, PEG3350 içeren formülasyonların 34 ^{o}C'de su banyosundaki görüntüleri 58
Şekil 3.5 Koni plak viskozimetre (Brookfield HA DV3T) cihazı 58
Şekil 3.6 Brookfield CT3 doku analiz cihazı 59
Şekil 3.7 Jellerin sertliğini gösteren kuvvet-zaman eğrisi 60
Şekil 3.8 Jellerin sıkıştırılabilirliğini gösteren kuvvet-zaman eğrisi 60
Şekil 3.9 Jellerin adezifliğini gösteren kuvvet-zaman eğrisi 61

Şekil 3.10 Jellerin kohezifliğini gösteren kuvvet-zaman eğrisi 61
Şekil 3.11 Salım deneyinde selofan membran kullanılan Franz hücrelerinin kısımlarının şematik gösterimi 62
Şekil 3.12 *In vitro* salım çalışmasında belirli zaman aralıklarında alınan örnekler 63
Şekil 3.13 t=0 anında J4 ve stok vialdeki formülasyonların UV 365 nm altındaki görüntüsü 63
Şekil 3.14 t=6. sa'deki J4 ve insülin çözeltisinin UV 365 nm altındaki görünütüsü 64
Şekil 3.15 *Ex vivo* geçiş çalışmaları için nazal mukoza örneklerinin hazırlanması 66
Şekil 3.16 Salım deneyinde nazal membran kullanılan Franz hücrelerinin kısımlarının şematik gösterimi 67
Şekil 3.17 *Ex vivo* geçiş çalışmasında belirli zaman aralıklarında alınan örnekler 67
Şekil 3.18 t=6 sa anında J4V formülasyonun UV (365 nm) altında görüntüsü 68
Şekil 3.19 Leica TCS-SPE markalı lazer taramalı konfokal mikroskop görüntüsü 69
Şekil 3.20 Nikon Eclipse E100 marka Optik mikroskop görüntüsü 69
Şekil 3.21 Nazal mukozanın kesit almaya hazırlama görüntüleri 70
Şekil 3.22 Nazal mukoza bloklarının kesilmesi 70
Şekil 4.1 Formülasyonların UV lambası (365 nm) altında görüntüleri 76
Şekil 4.2 0,5 M Kinin sülfat-sülfirik asit çözeltisi (a) ve F4 nolu formülasyonun farklı konsantrasyonlardaki floresan görünütüsü (b) 78
Şekil 4.3 Kinin Sülfatın spektroflorimetrede verdiği floresans/dalga boyu grafiği 79
Şekil 4.4 Kinin Sülfatın spektroflorimetrede verdiği grafiğin alanları ile floresans/dalga boyu arasındaki ilişki 79
Şekil 4.5 Hazırlanan KKN'lerin spektroflorimetrede verdiği floresans/dalga boyu grafiği 79
Şekil 4.6 Hazırlanan KKN'lerin spektroflorimetrede verdiği grafiğin alanları ile floresans/dalga boyu arasındaki ilişki 80
Şekil 4.7 Anton Paar Litesizer 500 Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Ölçüm Cihazı 81
Şekil 4.8 En iyi formülün elektron mikroskobunda elde edilen görüntüleri 83
Şekil 4.9 Farklı konsantrasyonlardaki P407 çözeltilerinin Tsol jel Belirlenmesi 86
Şekil 4.10 Hazırlanan formülasyonların sol-jel sıcaklıklarının belirlenmesi 87
Şekil 4.11 J1V, J2V, J5V ve J7V nolu formülasyonlarında MS miktarının 20 ^{o}C ve 34 ^{o}C'de viskozite grafikleri 91

Şekil 4.12 J3V, J4V, J6V ve J8V nolu formülasyonlarında MS miktarının 20 ºC ve 34 ºC'de viskozite grafikleri 92
Şekil 4.13 J1V ve J3V nolu formülasyonlarında Ins-KKN'lerin 20 ºC ve 34 ºC'de viskozite grafikleri 93
Şekil 4.14 J4V ve J9V nolu formülasyonlarında PEG 3350 miktarlarının 20 ºC ve 34 ºC viskozite grafikleri 94
Şekil 4.15 Selofan membrandan insülinin salım profilleri 96
Şekil 4.16 BSA protein standart grafiği 97
Şekil 4.17 Nazal mukozdan penetre olan % insülin miktarı 98
Şekil 4.18 Nazal mukoza kesitinin optik mikroskopta görüntüsü 99
Şekil 4.19 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopta 20 µm kalınlıktaki kesitte 10 büyütme 99
Şekil 4.20 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopta 10 µm kalınlıktaki kesitte 10 ve 40 büyütme 100
Şekil 4.21 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopta 10 µm kalınlıktaki kesitte 10 büyütme ve üç boyutlu görüntüsü 100
Şekil 4.22 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopta 5 µm kalınlıktaki kesitte 10 büyütme (görüntüleme öncesi (sol) ve sonrası (sağ)) 101
Şekil 4.23 Ins-KKN formülasyonlarına ait stabilite grafikleri 102
Şekil 4.24 Ins-KKN ve J4 nolu formülasyonlara ait zaman bağlı pH değişim grafiği . 103
Şekil 4.25 Ins-KKN formülasyonlarına ait zaman bağlı partikül büyüklüğü değişim grafiği 103
Şekil 4.26 J4 nolu formülasyonlara ait zaman bağlı partikül büyüklüğü değişim grafiği 104
Şekil 4.27 Ins-KKN formülasyonlarına ait zaman bağlı PDI değişim grafiği 105
Şekil 4.28 J4 formülasyonlarına ait zaman bağlı PDI değişim grafiği 105
Şekil 4.29 Ins-KKN formülasyonlarına ait zaman bağlı zeta potansiyel değişim grafiği 106
Şekil 4.30 J4 formülasyonlarına ait zaman bağlı zeta potansiyel değişim grafiği 107

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

µg : mikrogram

mg : miligram

µL: mikrolitre

ml : mililitre

^{o}C : Santigrat Derece

U : Unite

cm^{2}: santimetrekare

µm: mikrometre

g: gram

rpm: dakikadaki devir sayısı

N: Newton

m: metre

nm: nanometre

kPa: kilopaskal

cp : santipois

W: watt

dk: dakika

Tsol-gel : solden jele geçiş sıcaklığı

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

AH: Alzheimer Hastalığı

KBB: Kan beyin bariyeri

MSS: Merkezi sinir sistemi

KKN: Karbon kuantum noktaları

ROS: Reaktif oksijen türleri

APP: Amiloid prekürsör proteini

ACh: Asetilkolin

Ac CoA: Asetil koenzim A

ChAT: Kolin asetiltransferaz

AChE: Asetil kolinesteraz

NMDA: N-metil-D-aspartat

MAP: Mikrotübül ilişkili proteini

NFT: Nörofibriler yumaklar

IR: İnsülin reseptörleri

kDa: Kilodalton

IGF-I: İnsülin benzeri büyüme faktörü tip I

IGF- II: İnsülin benzeri büyüme faktörü tip II

GIS: Gastrointestinal sistem

BOS: Beyin omurilik sıvısı

OE: Olfaktör epitel

OB: Olfaktör bulba

ON: Olfaktör nöronlar

SUS: Sustentaküler hücreler

MSK: Mukosiliyer Klirens

CIPRO: Siprofloksazin HCl

NH: Naratriptan hidroklorür

GDO: Gliserol monooleat

SS: Sumatriptan süksinat

GH: Galantamin hidrobromür

TFB: Tarenflubrilin

NP: Nanopartiküller

SLN: Katı lipit nanopartiküller

TEM: Transmisyon Elektron Mikroskop

Lp: Lipozom

CPP: Hücreye nüfüz eden peptit

CPP-Lp: CPP modifiye lipozomlar

bFGF: Temel fibroblast büyüme faktörü

STL: Solanum tuberosum lektin

MS: Metil selüloz

HPMC: Hidroksipropil metil selüloz

PEO-PPO-PEO: poli(etilen oksit)-poli(propilen oksit)-poli(etilen oksit)

CST: Kritik çözelti sıcaklığı

LCST: Düşük kritik çözelti sıcaklığı

UCST: Üst kritik çözelti sıcaklığı

P407: Poloksamer 407

P188: Poloksamer 188

HPMS: Hidroksipropil metil selüloz

KN: Kuantum noktaları

N-KKN: Nitrojen katkılı karbon kuantum noktaları

Fe^{+2}: Demir iyonu

H_2O_2: Hidrojen peroksit

PDI: Polidispersite indeksi

Ins-KKN: İnsülin KKN kompleksi

HR-TEM: Yüksek çözünürlüklü transmisyon elektron mikroskobu

PNPAm: poli(N-n-propilakrilamid)

PPO: poli(propilen oksit)

i.n.: intranazal

i.v.: intravenöz

UV: ultraviyole

PL: fotolüminesans

PAS: p-aminosalisilik asit

ÖZET

Çamlık Gamze. Alzheimer Hastalığında Etkili Nazal Yoldan Uygulanabilen Hedeflendirilmiş İnsülin Kuantum Noktası Kompleksinin Geliştirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2021.

Anahtar Kelimeler: Karbon kuantum noktaları, İnsülin, Alzheimer hastalığı, in situ jel, Nazal Yol

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2021-37536

Alzheimer Hastalığı (AH), nedeni halen tam olarak bilinemeyen, geri dönüşü olmayan, bireysel mortalite ve morbiliteden sorumlu nörodejeneratif bir hastalıktır. Sağlık sistemi üzerinde önemli bir ekonomik yüke sahip olan AH'nda kullanılmakta olan ilaçlar sadece semptomatik tedavi sağlamaktadır.

İnsülin, merkezi sinir sisteminde (MSS) nöronal büyüme ve farklılaşma için gerekli olan nöromodülatör bir moleküldür ve beyine hedeflenebilen insülinin AH'yi iyileştirilebileceği anlaşılmıştır. Ancak büyük bir molekül olan insülinin MSS'ye girebilmesi için kan beyin bariyerini (KBB) aşabilmesi gerekmektedir. Bu amaçla nazal uygulama yolu tercih edilmekte ve insülin molekülünün biyodegredasyondan korunabilmesi için yeni bir ilaç taşıyıcı sistem olan 2-10 nm boyutlarında karbon kuantum noktaları (KKN) geliştirilmiştir. Aynı zamanda hazırlanan insülin KKN kompleksi, nazal mukozada kalış süresini arttırabilmek için in situ jel olarak hazırlanmışlardır.

Bu tez çalışması kapsamında KKN'ler ile kompleks haline getirilen insülin molekülü nazal bölgede kalış süresini arttırabilmek için ısıyla jelleşebilen mukoadezif in situ jel formülasyonu geliştirilmiştir. Hazırlanan formülasyonların karakterizasyon çalışmaları, floresan özellikleri, kuantum verimleri, reolojik ve mekanik özellikleri, fizikokimyasal stabiliteleri, *in vitro* salım ve *ex vivo* permeasyon çalışmaları yapılmştır. Sonuçta elde edilen formülasyonun mukozal membranlardan geçebildiği ve insülin molekülünü beyine hedeflendirilmiş olarak taşıyabileceği saptanmıştır.

ABSTRACT

Camlik Gamze. Development of Targeted Insulin Quantum Dot Complex for Effective Nasal Administration in Alzheimer's Disease. İstanbul University, Institute of Health Science, Deparment of Pharmaceutical Technology. PHD Thesis. Istanbul. 2021.

Key Words: Carbon quantum dots, Insulin, Alzheimer Disease, In situ gel, Nasal Drug Delivery

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: TDK-2021-37536

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disease that cause is still unknown, irreversible and responsible for individual mortality and morbidity. Therapeutics used in AD, which has a significant economic burden on the health system, provide only symptomatic treatment.

Insulin is a neuromodulatory molecule required for neuronal growth and differentiation in the central nervous system (CNS), and it has been understood that insulin that can be targeted to the brain can ameliorate AD. However, in order for insulin, which is a large molecule, to pass the CNS, it must be able to bypass the blood-brain barrier (BBB). For this purpose, the nasal route of administration is preferred and a new drug delivery system, carbon quantum dots (CQDs), has been developed with the size of 2-10 nm to protect the insulin molecule from biodegradation. At the same time, the prepared insulin CQDs complex was prepared as an in situ gel in order to increase the residence time in the nasal mucosa.

In this studies, a thermoreversible mucoadhesive in situ gel formulation was developed in order to increase the residence time of the insulin molecule complexed with CQDs in the nasal region. Characterization studies, fluorescent properties, quantum yields, rheological and mechanical properties, physicochemical stability, *in vitro* release and *ex vivo* permeation studies of the prepared formulations were carried out. As a results developed formulatin was found to be capable enough to deliver insülin molecule to the brain in a targeted manner.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 'küresel halk sağlığı önceliği' olarak bildirilen Alzheimer Hastalığı (AH), demansın en yaygın türü olarak bilinmektedir. AH; prevelansı bireyde her geçen yıl azalan öğrenme, hafıza, düşünme yeteneklerinin kademeli olarak bozulduğu, geri dönüşü olmayan nörodejeneratif bir hastalıktır. Nedeni tam olarak bilinmeyen, çok faktörlü bir hastalık olan AH, temel olarak hücre içinde amiloid β plakları ve hücre dışında da nörofibriler yumakların birikmesi ile karakterizedir. AH'li bireylerin beyinlerinde gerçekleştirilen incelemeler sonucunda bu kişilerin vücutlarındaki insülin ve reseptöründeki anormalliklerin ve insülin direnci prevelansındaki artışın hastalığın klinik semptomlarına ve patofizyolojisine etki edebileceğini göstermektedir. Aynı zamanda sağlıklı beyinlerle karşılaştırıldığında insülin reseptörlerinin yoğunluğunda azalma olduğu da bildirilmiştir. Bu nedenle beyinde AH nedeni ile farklılaşan endojen insülin ve reseptörlerinin eksojen insülin takviyesi ile düzeltilebileceği ile ilgili yeni çalışmaların varlığı dikkat çekmiştir. Gelinen bu noktada beyine hedeflenen insülinin bu rahatsızlıkları tedavi etmesi ve AH'nin iyileştirilmesi konusunda faydalı olacağı anlaşılmıştır. AH tedavisinde gerek insülinin gerekse kullanılan diğer ilaçların etkilerini göstererek tedavi sağlayabilmeleri için kan beyin bariyerini (KBB) geçerek merkezi sinir sistemine (MSS) ulaşmaları gerekmektedir. Bu amaçla beyinde ve MSS'de etki göstermesi gereken etkin maddeler için çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler ve farklı uygulama yolları ile ilgili bilimsel çalışmalar yapılmaktadır. Uygulama yolları dikkate alındığında bunlar temel olarak invaziv ve non-invaziv olarak ikiye ayrılmaktadır. İnvaziv yötemler doğrudan uygulandıklarında etkili olmakla berber çeşitli enfeksiyon riskleri, uygulama zorlukları ve yüksek maliyet gerektirmeleri gibi dezavantajları nedeniyle non-invaziv uygulamalar daha fazla tercih edilmektedir.

Non-invaziv uygulama yollarında biri olan intranazal yol ile nazal boşluğa uygulanan terapötik etkin maddeler uygulama yolunun yakın bölgede olması nedeni ile KBB'yi geçerek MSS'ye iletilebilmektedir. İnsülin yapısı büyük ve yapısında pek çok amino asit içeren, gastrointestinal enzimlerle bozulması ve yıkılması nedeni ile oral yoldan verilemeyen peptit yapılı bir moleküldür. Bu nedenle insulin molekülün MSS'ye iletilmesi ve beyine ulaştırılmasında zorluklar yaşanmaktadır. Yeni bir ilaç taşıyıcı

sistem olarak ortaya çıkan karbon kuantum noktaları (KKN) boyutları 2-10 nm arasında değişebilen optik, elektronik ve kimyasal özellikleri açısından pek çok avantajla sahip yarı iletken nanoyapılardır. KKN'ler sudaki iyi çözünürlükleri, kimyasal stabiliteleri ve yüzey fonksiyonlanabilme kolaylığı gibi özelliklere sahiptir. İnsülinin KKN'ler ile taşınabileceğini gösteren çeşitli çalışmalar da ortaya çıkmıştır.

Bu tez çalışmasında AH tedavisinde kullanılmak üzere insülin molekülü ile kompleks haline getirilen KKN'lerin nazal yol ile uygulanabilecek in situ jel formda hazırlanması, karakterizasyon çalışmalarının yapılması ve etkinliğinde rol alacak çeşitli parametrelerin incelenmesi ile bu yeni nesil formülasyonun mukozal mebranlardan geçişinin etkin araştırılması amaçlanmıştır.

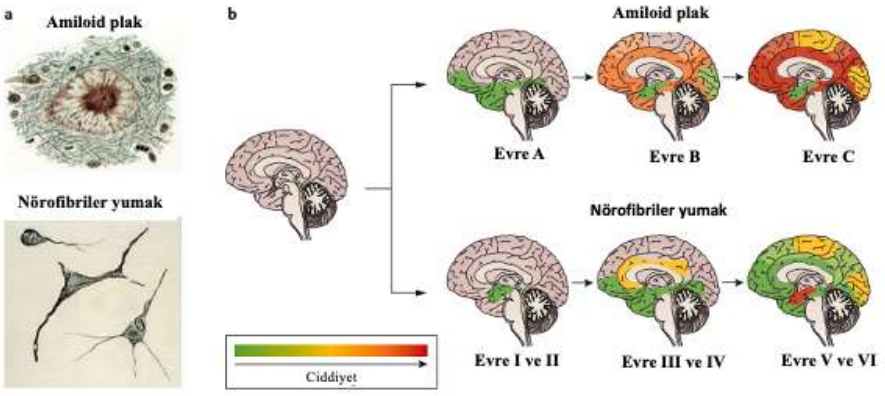
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı ile İlgili Genel Bilgiler

2.1.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH), hafıza kaybı, düşünme ve muhakeme geriliği, kişilik ve davranışlardaki değişiklikler ile karakterize olan, geri dönüşü olmayan, progresif bir nörolojik bozukluktur (Karthivashan ve ark. 2018; Liu ve ark. 2019). Dünya Sağlık Örgütünde (DSÖ) yer alan verilere göre AH, bugün dünya genelinde 50 milyon vakayla demansın %70'ini oluşturmakta ve 2050 yılında ise bu sayının 152 milyonu aşması beklenmektedir (Sood ve ark. 2014; Kartal ve Erigüç 2020). Bu sayılar Türkiye'de orta yaş popülasyonunda (65 yaş öncesi) ortalama 30.000-40.000 kişiyi bulurken, geç yaş popülasyonu (65 yaş üstü) ile 85 yaş üstü popülasyonunda sırasıyla toplumun %5 ile %30-50'sinde etkili olduğu bilinmektedir (Aydın 2020).

AH, Alman bir psikiyatrist ve nöropatolojist olan Alois Alzheimer (1864-1915)'ın progresif demansı olan hastasında gerçekleştiridiği postmortem beyin incelemesi sonucu ilk kez 1907 yılında tanımlanmıştır (Goedert ve Spillantini 2006; Vilatela ve ark. 2012). AH'de temel olarak beyinde serebral korteks ve hipokampusun nöronlarındaki nörofibriler yumaklar ve serebral kan damarlarında amiloid β formlarının birikimi ile karakterize edilmekte ve meydana gelen bu anormallikler genelde frontal ve temporal lobları içeren beyin dokusunda saptanmasının ardından değişen oranlarda neokorteksin diğer bölgelerine yavaş yavaş ilerleme gösterir **(Şekil 2.1)** (Selkoe 2000; Masters ve ark. 2015).



Şekil 2.1 AH'nin patolojik evrimi (Masters ve ark. 2015).

a) AH'nin ilerlemesiyle beyine yayılan amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar. b) Tipik AH vakalarında, amiloid-β (Aβ) birikimi ve nörofibriler yumaklar (aşama I-VI).

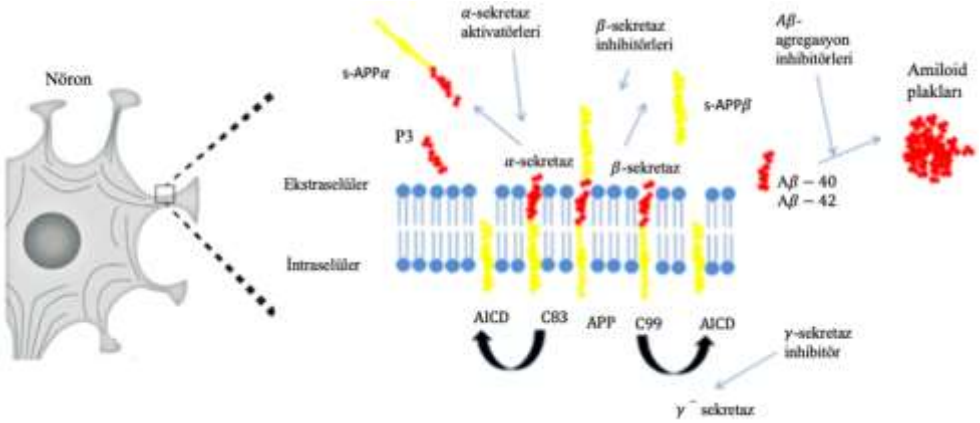
Yapılan araştırmalar AH'nı temelde ailesel form ve ailesel olmayan form olarak ikiye ayırmaktadır. Ailesel olarak bilinen form vakaların ortalama %2-3'ünde görülen bazı genlerde (presenilin-1 ve 2 gibi) meydana gelen mutasyonlar sonucu oluştuğunu gösterirken, ailesel olmayan diğer adıyla sporadik olarak bilinen form vakaların çoğunda gözlenen genetik yatkınlıkla beraber bireyin yaşam stili seçimleri ve çevresel risk faktörlerine bağlı olarak ortaya çıktığını göstermektedir (Hoyer 2002; Bellou ve ark. 2017). Ailesel form ve sporadik form etiyolojik olarak karşılaştırıldığında benzerlik olmamasına rağmen demans belirtileri birbirlerinden ayırt edilememekte, aynı klinik tabloları sergilemektedir (Hoyer 2002).

2.1.2. AH Patofizyolojisi

AH patogenez teorileri; amyloid, kolinerjik, glutamat ve tau hipotezleri olmak üzere dört farklı yaklaşım içermektedir. Bu temel hipotezlerin yanı sıra inflamatuvar aracılarının, bozulmuş enerji metabolizmalarının, nitrik oksidin ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) de AH'nin patogenezine katkıda bulunabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Wen ve ark. 2017; Dhas ve ark. 2019).

2.1.2.1. Amiloid β Hipotezi

Amiloid β hipotezi, Aβ plaklarının transmembran glikoprotein olan amiloid prekürsör proteininin (APP), α, β ve γ sekretaz enzimleri ile proteolize uğraması sonucu oluşan Aβ peptitlerinin birikmesine dayanmaktadır **(Şekil 2.2)**.

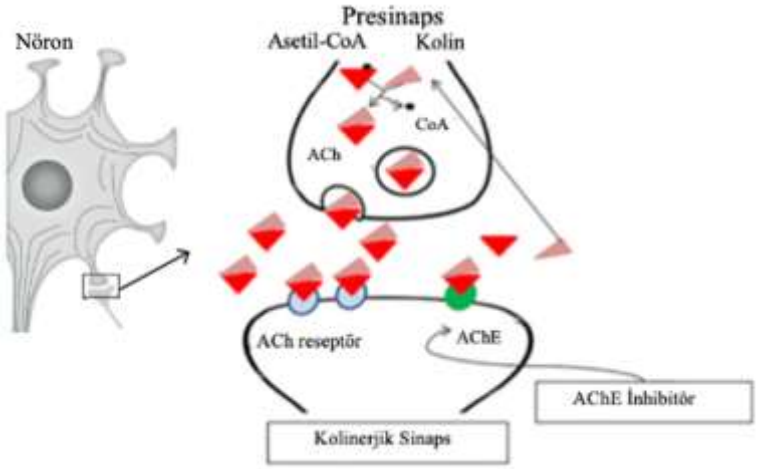


Şekil 2.2 AH gelişiminde amiloid β hipotezi (Wen ve ark. 2017; Dhas ve ark. 2019).

α sekretaz enzimi aracılığıyla kesilen APP'ler, sAPP-α'leri oluşmaktadır ve bu yapılar nöron hücrelerinin uyarılabilirliğini sağlamanın yanında hem beyin dokusunun maruz kadığı strese karşı savunmayı hem de hafıza ve öğrenme yeteneğinin korunmasına yardımcı olmaktadır. Ancak AH'den etkilenen beyinde β sekretaz enzimi APP'yi sAPPβ ve C99 olarak adlandırılan zara bağlı bir fraksiyona ayırmaktadır. C99 fraksiyonu ise daha sonra γ sekretaz enzimi ile harekete geçirilerek plak birikiminden sorumlu olan Aβ $_{(1\text{-}40)}$ veya Aβ $_{(1\text{-}42)}$'yi üretir. Böylece Aβ peptitleri, sAPP'nin etkilerine karşı çıkar ve nöronların uyarılabilirliğinin azalmasına neden olur, kalsiyum homeostazını bozar, metabolizma süreçlerini değiştirir, oksidatif stres yaratır (Shadab ve ark. 2018; Arya ve ark. 2019).

2.1.2.2. Kolinerjik Hipotezi

Kolinerjik hipotez, AH'den etkilenen kişilerde davranışsal ve bilişsel bozulmaya neden olan kolinerjik nöronların bozulmasına odaklanmaktadır. AH hastalarında yapılan çalışmalar sonucu asetilkolin (ACh) başta olmak üzere pek çok nörotransmiter sistemin etklendiği görülmektedir. ACh; korteks, bazal ganglionlar ve bazal ön beyin boyunca aktiviteye sahip, beyindeki önemli bir nörotransmiterdir. Aynı zamanda ACh, hafıza, öğrenme, dikkat, stres yanıtı, uyku ve uyanıklık gibi önemli fizyolojik süreçlerde yer alan kolinerjik nöronlar tarafından kullanılmaktadır. **Şekil 2.3'te**, nörotransmitter asetilkolinin sentezi, salınımı ve geri alımındaki temel adımları gösterilmektedir (Sood ve ark. 2014; Shadab ve ark. 2018).

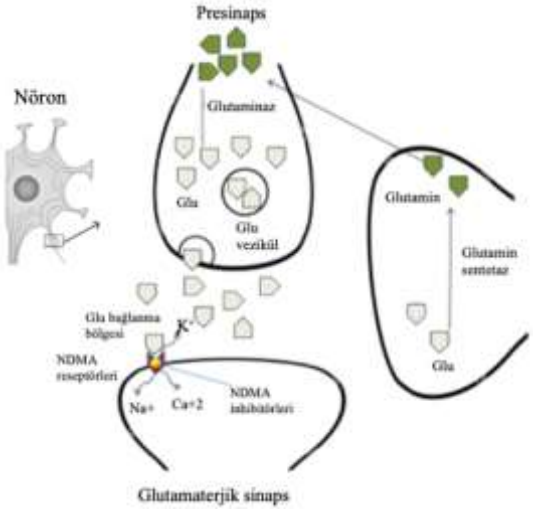


Şekil 2.3 AH gelişiminde kolinerjik hipotez (Wen ve ark. 2017; Dhas ve ark. 2019).

Şekil 2.3'te şematize edildiği gibi ACh, kolin substratı ile asetil koenzim A (Ac CoA)'nın kolin asetiltransferaz (ChAT) enzimi ile katalizlenmesi sonucu sentezlenmektedir. ACh sentezlendikten sonra presinaptik veziküller aracılığıyla sinaptik boşluğa salındığında, postsinaptik reseptörüne bağlanır, böylece bir nörondan diğerine bir sinyal iletir. Sinaptik boşluktaki postsinaptik reseptörlere bağlanamayan fazla ACh, asetil kolinesteraz (AChE) enzimi tarafından kolin ve asetata parçalanır ve bunlar, asetil koenzim A'ya geri dönüşüm için bir alım mekanizması tarafından presinaptik nörona geri döndürülür. Yapılan çalışmalar AH'de ChAT enzim seviyesinin azaldığını göstermektedir. Burada meydana gelen kolinerjik nöron hasarı, AH'deki bilişsel bozulma ile ilişkili kritik bir patolojik değişiklik olarak kabul edilmektedir (Briggs ve ark. 2016; Wen ve ark. 2017).

2.1.2.3. Glutamat Hipotezi

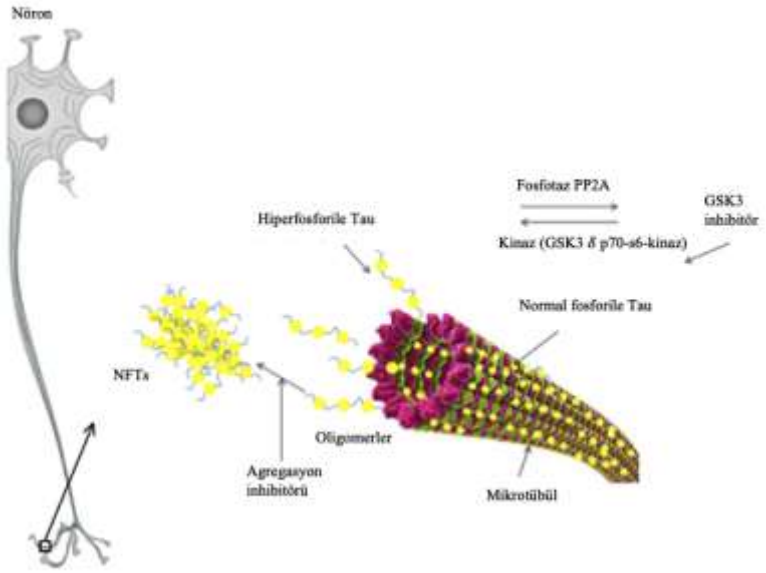
N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörü, Aβ ile düzenlenebilme kabiliyetine sahip bellek fonksiyonunu ve sinaptik plastisite ile ilişkili bir reseptördür **(Şekil 2.4).** NMDA reseptörüne glutamat ve glisinin bağlandığında Na^{+} ve Ca^{+2} iyonlarının akışına izin vererek aktive olur. Bu reseptörün aşırı uyarılması Ca^{+2} iyonlarının aşırı yüklenmesini indüklenmesi ve bunun sonucunda apoptoza yol açmaktadır (Shadab ve ark. 2018).



Şekil 2.4 AH gelişiminde glutamat hipotezi (Wen ve ark. 2017; Dhas ve ark. 2019).

2.1.2.4. Tau Hipotezi

Tau proteinleri hücre içi mikrotübüllerle ilişkili olan protein ailesinde yer almaktadır. Bu mikrotübüllerin oluşturulması ve stabilize edilmesinde yer alan MAP1A, MAP1B ve MAP2 olarak bilinen üç önemli tau proteini (MAP) bulunmaktadır. Tau proteinlerinin biyolojik aktivitesi, fosforilasyon derecesi ile kontrol edilmektedir. AH'ye sahip bireylerin beyinleri incelendiğinde tau proteinlerinin aşırı derecede fosforile olduğu görülmektedir. Bu bu durum proteinlerin mikrotübüllere bağlanmasının engelleyerek demansa neden olabilen nörofibriler yumakların (NFT'ler) birikmesiyle sonuçlanabilir **(Şekil 2.5)** (Mathew ve ark. 2011; Wen ve ark. 2017; Shadab ve ark. 2018).



Şekil 2.5 AH gelişiminde Tau hipotezi (Wen ve ark. 2017; Dhas ve ark. 2019).

2.1.3. AH ve İnsülin İlişkisi

İnsülin, pankreasta bulunan Langerhans adacıklarının beta hücreleri tarafından sentezlenen, polipeptit yapısında anabolik bir hormondur. 5,8 kDa molekül ağırlığına sahip olan bu hormon vücuttaki yağ, karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Yapı itibariyle bu molekül A (21 aminoasit) ve B (30 aminoasit) olmak üzere iki zincirden oluşmaktadır ve bu zincirler birbirlerine iki disülfit bağıyla bağlıdır **(Şekil 2.6)** (Uca ve Şahin 2006; Von Zuben ve ark. 2021).



Şekil 2.6 İnsan insülininin yapısı (Mikiewicz ve ark. 2017).

Başlangıçta insülinin sadece periferik dokulara etki ettiğine ve beyne bir etkisinin olmadığına inanılıyordu. Ancak araştırmacılar kemirgen ve insan beyninde insülin reseptörlerinin (IR'ler) varlığını göstererek aslında beynin düşünüldüğü gibi insülinden bağımsız olmadığını doğruladı. IR'ler beyinde özellikle olfaktör bulb, serebral korteks, hipotalamus ve hipokampüs bölgelerinde yoğun olarak yer almaktadır.

Bu reseptörler aynı zamanda hafıza ve öğrenmede önemli rol oynamaktadır (Gerozissis 2003; Nemoto ve ark. 2014). 1970'li yılların sonunda Havrankova ve ark. tarafından yapılan çalışmalar sıçan beyininde yüksek konsantrasyonlarda insülinin bulunduğu ve bunun periferik insülin seviyeleriden bağımsız olduklarını göstermişlerdir. Her ne kadar pankreasın beta hücrelerinden sentezlenen insülinin reseptör aracılı taşıyıcı mekanizmalarla kan-beyin bariyerini (KBB) aşarak beyne taşındığı bilinse de merkezi sinir sistemindeki (MSS) insülinin bir kısmı beyindeki nöronal hücreler tarafından lokal olarak üretildiğini kanıtlayan çalışmalar bulunmaktadır (Gerozissis 2003; Nemoto ve ark. 2014).

İnsülinin MSS'deki rolü, periferdeki işlevleri kadar çalışılmış olmamasına rağmen insülinin beyinde nörotrofik, metabolik, nöroendokrin ve nöromodülatör eylemler gösterdiğine dair kanıtlar mevcuttur. Nöronal büyüme ve farklılaşma için gerekli olan insulin, sinaptik plastisitede ve nörotransmiter salınımında rol oynayan bir nöromodülatördür (Gerozissis ve ark. 2003). Sağlıklı bir beyinde glukoz, hücrelerdeki enerji metabolizması düzenlemektedir. İnsülin sinyal iletimi tarafından kontrol edilen nöronal glukoz metabolizmasında meydana gelebilecek aksama glukoz ve dolayısıyla enerji metabolizmasında bozulmalara yol açacaktır. Buradan yola çıkarak beyinde glukoz kullanımının azalması ile insülin reseptörünün insülin duyarlılığını ortadan kalkacağı öne sürülmüştür (Hoyer, 2002; Sims-Robinson ve ark. 2010). Sporadik AH'de ortaya çıkan nörodejenerasyonun amilod beta birikmesi, nörofibriler yumaklar, oksidatif stres, bozulmuş enerji metabolizması, bazı sinyal yolak aktivasyonları gibi bir dizi biyokimyasal, histopatolojik ve moleküler anormalliklerle ilişkili olduğu bilinmektedir. AH'li beyinlerde gerçekleştirilen inceleme sonucunda insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü tip I ve II (IGF-I ve IGF-II) düzeylerinde ve bununla ilgili reseptörlerde belirgin bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada ise AH'li hastalar ve aynı yaştaki sağlıklı bireyler arasında yapılan karşılaştırmada insülin ve IR yoğunluklarının sağlıklı bireylere kıyasla azaldığı görülmüştür (de la Monte ve Wands 2005; Sood ve ark. 2014).

2.2. NAZAL YOL

2.2.1. Nazal Yol Anatomisi ve Hücresel Yapısı

Nazal yol ile terapötiklerin emilimini ve moleküllerin beyne ulaşmadan önce nüfuz etmesi (ilerlemesi, geçmesi) gereken yolları inceleyebilmek için, burun boşluğunun anatomik ve hücresel yapısı ile işlevini bilmek çok önemlidir. Burun, koku alma ve solunum gibi birçok fizyolojik işlevden sorumlu olan orta sagital düzlem boyunca uzanan septum ile bölünmüş iki simetrik boşluktan oluşur **(Şekil 2.7)** (Erdő ve ark. 2018).



Şekil 2.7 Nazal boşluğun histolojisi (Krinke ve Weber 2012).

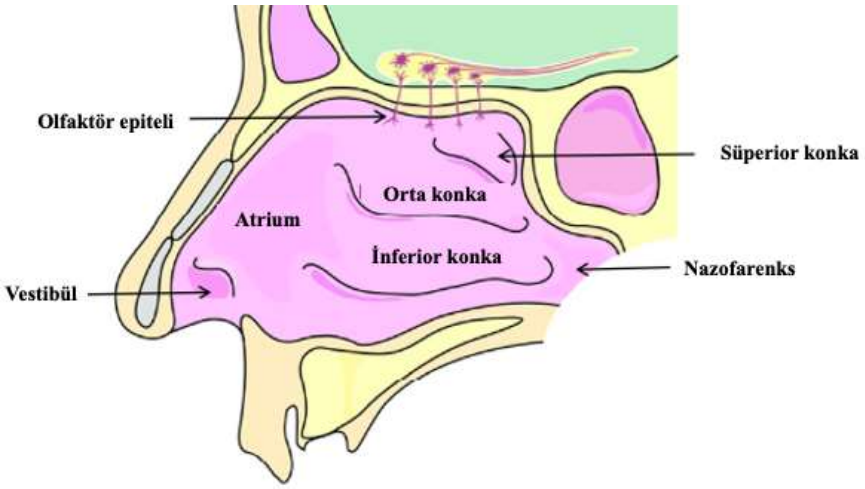
1) nazoturbinat; 2) maksillotürbinat; 3) nazolakrimal kanal; 4) kesici diş; 5) nazal septum; 6) vomeronazal organ

Bu boşluklar mukoza tabakası ile kaplıdır ve her iki burun boşluğunun toplam alanı ~150-160 cm^2'dir. Nazal boşluklar anatomik ve histolojik özelliklerine göre vestibüler bölge, solunum (respiratör) bölgesi ve olfaktör (koku alma) bölgesi olarak üçe ayrılmaktadır**.** Bunlardan sadece solunum ve olfaktör bölgelerinin ilaç dağıtımına katkıda bulunulduğu düşünülmektedir (Erdő ve ark. 2018; Veronesi ve ark. 2020).

Vestibuler bölge, burun deliklerinin hemen içinde, burun boşluğunun en ön kısmıdır ve yüzey alanı yaklaşık 0,6 cm^2 civarındadır. Burada, solunan havayı filtrelemeye yarayan vibrissae olarak da adlandırılan kısa kalın burun kılları bulunmaktadır. Bu bölgedeki birincil hücre tipi, çok az sayıda siliyer hücre içeren

skuamöz (yassı) epitel hücreleridir. Küçük yüzey alanı ve hücresel yapı nedeniyle bu bölgede ilaçların emilimi oldukça sınırlıdır (Pires ve ark. 2009; Erdő ve ark. 2018).

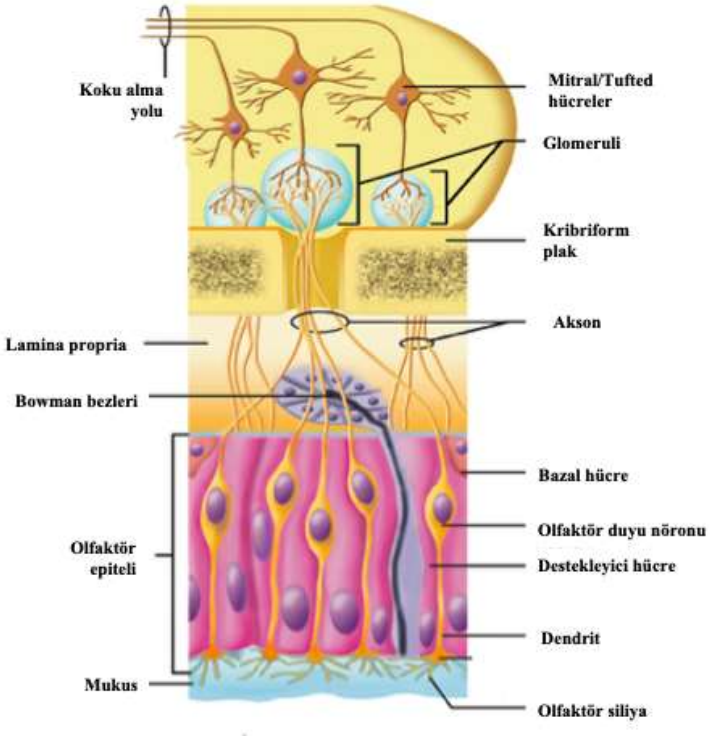
Solunum bölgesi (respiratör), üç bölgenin en büyüğüdür, nazal boşluğu içinde daha önde yer alır. Konka (türbin) olarak da adlandırılan bu bölge yan duvardan çıkıntı yapan üst, orta ve alt olarak üç kısma bölünmüştür **(Şekil 2.8)**.



Şekil 2.8 Nazal boşluk anatomik yapısı (Grassin-Delyle ve ark. 2012).

Bu üç kemikli yapı nedeniyle ~130 cm^2'lik geniş bir emici yüzey alanına sahiptir. Epitel bir bazal lamina üzerine yerleşmiş olan bu kısım, goblet hücreleri bakımından zengin yalancı çok katlı silyalı kolumnar epitel ile örtülüdür. Söröz bezler ve muköz bezler içeren bağ dokusu (lamina propria) ile desteklenmektedir. Epitelin nemli kalmasını sağlayan sıvı goblet hücreleri ve bu bezlerden salgılanmaktadır (Pires ve ark. 2009).

Olfaktör Bölge (Koku Alma Bölgesi), burun boşluğunun en arka yerleşimli bölgesidir, yalancı çok katlı kolumnar epitel ile örtülüdür. Olfaktör epiteli; olfaktör hücre, destek hücresi ve bazal hücre olarak üç tip hücre içermektedir. Olfaktör hücreler, destek hücreleri arasına düzenli bir şekilde dağılım göstermiş bipolar hücrelerdir. Destek hücreleri, mikrovilluslerle olfaktör hücrelerine bağlanan ince, uzun, silindirik hücrelerdir. Aynı zamanda sahip oldukları çok sayıda mikrovillusle de yüzey alanını arttırmaktadırlar. Bazal hücreler ise konik şekilli ve küçük hücrelerdir. Bu hücreler komşu olfaktör hücreler ile temas halindedirler **(Şekil 2.9)** (Chen ve ark. 2014)



Şekil 2.9 Olfaktör bölge yapısı (Moon ve ark. 2014).

Olfaktör bölge, burun boşluğunun toplam yüzey alanının sadece %3 ile 5'ini oluşturan küçük bir yüzey alanı (1-5 cm^2) vardır ve bu nedenle ilaçların sistemik emiliminde önemli ölçüde yer almaz. Ancak KBB'yi atlayarak MSS'ye doğrudan erişim sağlayabilir (Grassin-Delyle ve ark. 2012).

2.2.2. Nazal Yolun Avantajları ve Dezavatajları

Diğer uygulama yolları ile karşılaştırıldığında nazal yol pek çok avantaja sahiptir. Bu avantajlar aşağıdaki gibi sıralanabilir (Erdő ve ark. 2018; Shadab ve ark. 2018);

- Beyne kolayca erişilebilir ve non-invaziv uygulama sağlar,
- Non invaziv uygulama olması nedeniyle düşük enfeksiyon riskine sahiptir,
- KBB'yi atlayarak MSS'ye doğrudan ilaç iletimine izin verir,
- Hem MSS'ye hem de sistemik dolaşıma doğrudan taşınabilmeyi sağlar,
- Kendi kendine uygulama kolaylığı (yüksek hasta uyuncu) sağlar,
- Gastrointestinal sistemde (GIS) metabolize olan ilaçların bozulmasını önler,
- Hepatik ilk geçiş metabolizmasını engeller,
- Poröz ve ince membran yapıya sahip olması hızlı emilim ve hızlı etki başlangıcına yardımcı olur,

- Düşük dozla yüksek biyoyararlanım sağlar,
- Oldukça geniş absorbsiyon alanına (insanda yaklaşık 160 cm^2) ve geniş olfaktör epitelyum alanına sahiptir (insanda yaklaşık 12,5 cm^2).

Sahip olduğu avantajlara rağmen nazal yolun dezavantajları da bulunmaktadır ve bunlar (Erdő ve ark. 2018; Shadab ve ark. 2018);

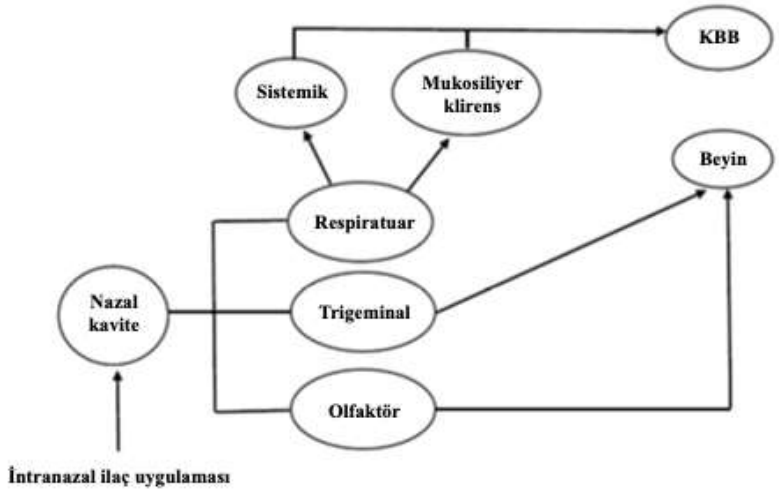
- Dozun tamamı 25–200 μL'lik bir hacimde verilmelidir (küçük hacimler),
- Her ilaç için uygun değildir,
- Mukosiliyer klirens sistemi ile ilacın nazal boşluğundan hızlı bir şekilde temizlenmesine neden olur,
- Nazal sitokrom P450 / peptidazlar / proteazlar tarafından enzimatik degradasyona yol açar,
- Gastrointestinal sistem ile karşılaştırıldığında daha küçük emilim yüzey alanına sahiptir,
- Burun tıkanıklığına bağlı burun tahrişi ve ilaç emilimine müdahale olasılığı yüksektir,
- Absorpsiyon artırıcı içermeyen hidrofilik ilaçlar için düşük geçirgenlik, büyük dozlar gerektirir,
- Bireyler arası değişkenlik gösterir,
- Nazal epitel pH'nın düşük olması olarak sıralanabilir.

2.2.3. MSS'ye Nazal Yol ile İlaçların Taşınması

Beyin, birçok hayati işleve sahip olan hassas bir organdır ve farklı mekanizmalar aracılığıyla dış çevreden izole edilerek korunmaktadır. Burada yer alan mekanizmalar ne yazık ki terapötik ajanların MSS'ne dağıtımını engelleyen mekanizmalarla aynıdır. Bu yüzden beyne ilacın (terapötiklerin) iletimini sağlayabilmek için geliştirilen stratejiler invaziv ve non-invaziv olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir. Bunlardan invaziv olan yöntemler arasında KBB'nin bozulması, intraserebral implantlar, intratekal uygulamalar sıralanabilir ancak bu uygulamaların kısa ömürlü olması, güvenli olmaması ve uygulama zorluğu gibi dezavantajlarından dolayı tercih edilmemektedir. Bu olumsuzluklar gözönüne alındığında son birkaç yıldır non-invaziv yöntemlerden biri olan intranazal (i.n.) yol, beyne ilaç verilmesi için umut verici bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır (Pires ve ark. 2009).

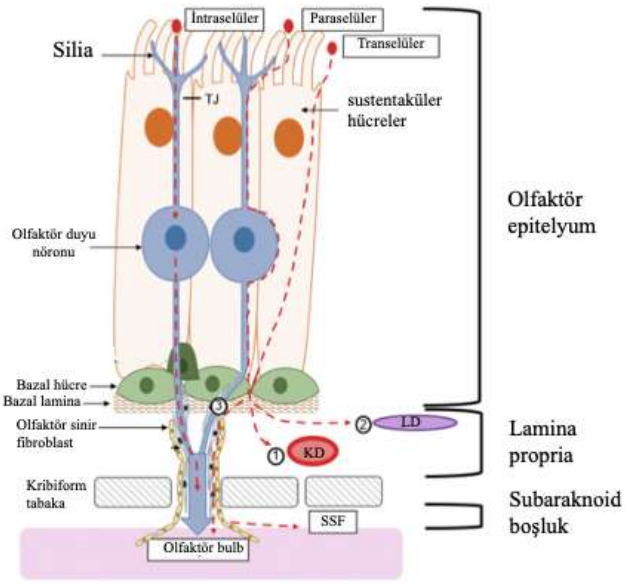
İlacın nazal boşluktan emilmesinin ilk adımı mukustan geçiştir. Yüksüz, lipofilik ve küçük partiküller bu tabakadan kolaylıkla geçebilmesine rağmen yüklü, hidrofilik ve büyük parçacıkların geçmesi daha zordur. Mukustaki çözünen maddelere bağlanma potansiyeline sahip ana protein olan müsin, ilaçların difüzyonunu engeller. Ek olarak, pH ve sıcaklık gibi çevresel değişikliklerin bir sonucu olarak mukoza tabakasında yapısal değişiklikler mümkündür (Bahadur ve Pathak 2012).

Nazal yol ile beyne ilaç ileti mekanizması halen tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen beyin omurilik sıvısı (BOS), damar sistemi ve lenfatik sistemin kombinasyonunu içeren yolaklar aracılığıyla terapötik maddelerin nazal boşluktan beyne taşınmada sorumlu olduğu bildirilmiştir **(Şekil 2.10)** (Aderibigbe 2018).



Şekil 2.10 Nazal yol ile beyne ilaç iletim mekanizmalarının şematik gösterimi (Aderibigbe 2018).

Solunum epitelinde biriken ilaç önce sistemik dolaşıma geçmekte ve daha sonra MSS'ye iletilmektedir. Olfaktör epitelinde biriken ilaç ise, olfaktör nöronlar veya olfaktör epitel hücreleri aracılığıyla intraselüler, paraselüler veya transselüler olarak MSS'ye iletilmektedir **(Şekil 2.10)** (Aderibigbe, 2018; Erdő ve ark., 2018; Keller ve ark. 2021)



Şekil 2.11 Intranazal uygulamadan sonra maddenin olfaktör epitelden MSS'ye iletimi (Keller ve ark. 2021).

İlacın nazal yoldan beyne taşınmasının bir başka yolu da trigeminal sinirlerdir. Olfaktör ve trigeminal sinirler beyin ile nazal boşluğunu birbirine bağlamakta ve KBB'yi atlayarak doğrudan nazal yoldan beyne ilaç iletimine izin vermektedir.

I.n. uygulama yolu ile bir maddenin olfaktör epitelinden (OE);

-Hücre içi aksonlar aracılığıyla ilacın olfaktör bulba (OB) taşınabildiği intraselüler yol,

-Etkin maddenin OE ve olfaktör nöronların (ON) canlı hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar yoluyla lamina propriaya taşınabildiği paraselüler yol,

-Etkin maddenin sustentaküler hücreler (SUS)'den reseptör aracılı endositoz veya pasif difüzyon ile lamina propriaya taşınabildiği transselüler yol olarak geçebileceği üç farklı yol bulunmaktadır (Keller ve ark. 2021; Aderibigbe, 2018)

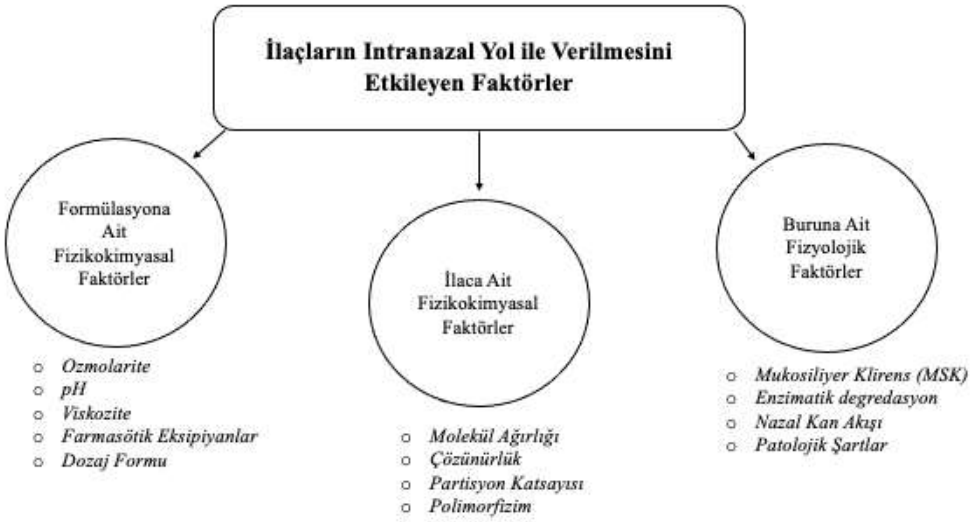
Bu yollardan iletilen maddeler dolaşıma ulaşan kan damarları (KD'ler) (1) ve lenfatik damarlar tarafından (LD) (2) absorplanabildiği gibi boynun derin servikal lenf düğümlerine de drene edilebilmektedir (3) **(Şekil 2.10)**. Ayrıca OB'ye ON ile bağlantılı olarak, koku alma hücreleri ile koku alma sinir fibroblastları arasındaki perinöral boşluklardan da etkin maddenin ulaşabilmesi sağlanabilmektedir (Keller ve ark. 2021). Kribriform plakayı geçilmesinin ardından etkin madde teorik olarak beyin omurilik sıvısına da ulaşabilir ve farklı beyin bölgelerine dağılabilir. (Keller ve ark. 2021).

Nazal yol; günümüzde migren, sigarayı bırakma, akut ağrı kesici, gece idrar kaçırma, osteoporoz ve B12 vitamini eksikliğinin tedavisinde kullanılmaktadır. Aynı

zamanda beyin kanserleri, nörodejeneratif hastalıklar, felç, nöbetler ve psikiyatrik hastalıkları da yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Son yirmi yılda, farmasötik teknolojideki ilerlemelerin sayısı, özellikle proteinler ve peptitler olmak üzere biyofarmasötiklerin büyük ölçekli üretim olasılıklarıyla sonuçlanmıştır (Bahadur ve Pathak 2012).

2.2.4. İlaçların Intranazal Yol ile Verilmesini Etkileyen Faktörler

Terapötiklerin veya biyoterapötiklerin i.n. yolla verilmesini etkileyen çeşitli faktörler aşağıda listelenmiştir **(Şekil 2.12)** (Dhas ve ark. 2019).



Şekil 2.12 İlaçların i.n. yoldan verilmesini etkileyen faktörler

pH: Nazal bölgedeki absorbsiyon derecesi; absorbsiyon bölgesindeki pH, ilacın pKa ve aynı zamanda formülasyonun pH'sından etkilenmektedir. Hazırlanacak olan formülasyonun pH değeri, nazal mukozayı tahriş etmeyecek, ilacın formülasyondaki etkinlik ve stabilitesini değiştirmeyecek şekilde hazırlanması gerekmektedir (Dhas ve ark. 2019). Bu sebeple nazal mukoza tahrişini engelleyebilmek için formülasyon pH'sı (5,0-6,5) arasında olması gerekmektedir. pH değerinin nazal mukoza üzerindeki etkisini değerlendirebilmek için Pujara ve ark. (1995) yapmış olduğu çalışmada, ilaçları pH 2-12 aralığında değişen farklı fosfat tamponun çözeltilerinde çözdükten sonra nazal pH'ı 7,39 olan sıçanlarda denemişlerdir. Sonuçlar, pH'ın 3-10 arasında değiştiğinde, hücresel hasar olmadığını ve hücrelerden minimum miktarda protein/enzimin salındığını göstermiştir. pH değerleri 10'un üzerinde veya 3'ün altında ise hücre içi ve membran seviyesinde hasar meydana geldiği gözlenmiştir (Güngör ve Özsoy 2009; Pires ve ark.

2009; Pujura 1995). Ayrıca pH, nazal mukoza tahrişi için önemli olduğu kadar nazal mukoza yüzeyinde mikroorganizmaların büyümesinin önlenmesinde de etkilidir. Formülasyon pH değeri hafif asidik hazırlanarak patojen bakterilerin üremeleri kontrol edilebilir. Nazal sekresyonlarda bulunan lizozim enzimi, belirli bakterileri ortadan kaldırabilir ve asidik pH'ı koruyabilir. Bu asidik değer alkaliye doğru değiştiğinde ise enzim inaktive olarak mikrobiyal enfeksiyona neden olabilir (Bahadur ve Pathak 2012). Bu nedenle pH değeri; nazal mukoza tahrişini engellemek, ilaç dağılımına izin vermek, nazal membranda patojenik mikroorganizmanın büyümesini kontrol etmek için önemlidir (Bahadur ve Pathak 2012).

Viskozite: Nazal yol ile ilaç uygulanmasında formülasyonun viskozitesi formülasyon içeriği ile doğrudan ilgilidir ve nazal mukoza tabakası ile formülasyon arasındaki temas süresini etkiler. Viskozitesi yüksek olan bir formülasyon hem etkin maddenin nazal kavitede kalış süresini hem de nazal mukozadan geçiş süresini arttırır (Dhas ve ark. 2019). Örneğin rizatriptan benzoat ile yapılan bir çalışmada, pektin/kitosan ile hazırlanan jel formülasyon viskozitesinin hidroksil propil metil selüloz eklenmesiyle arttığını ve bunun sonucunda nazal kavitede uzun süreli kalması sağlandığı gösterilmiştir (Dhas ve ark. 2019). Ancak bazı formülasyonlarda viskozitenin arttırılması ilacın absorpsiyonu arttırmamaktadır. Zaki ve arkadaşları, metoklopramid hidroklorit içeren farklı viskozite değerlerine sahip formülasyonların absorbsiyon üzerindeki etkilerini ve nazal kavitede tutulma sürelerini değerlendirmiş, nazal kavitede kalma sürelerinin viskoziteyle beraber artmasına rağmen ilaç absorpsiyonunun azaldığını görmüşlerdir. Bu sonuç formülasyondan ilaç difüzyonunda meydana gelen azalma olarak değerlendirilmiştir (Pires ve ark. 2009).

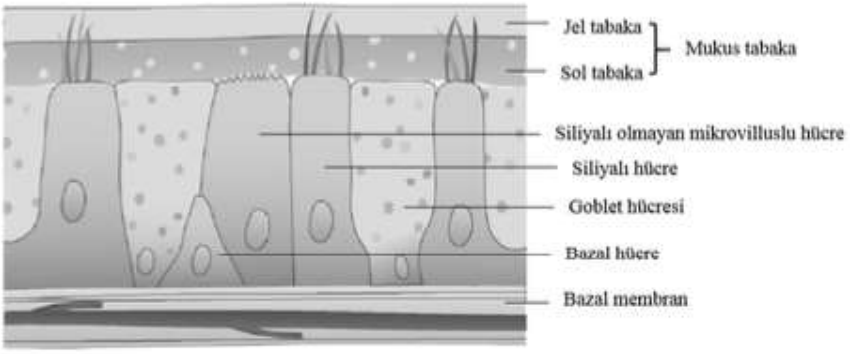
Sonuç olarak, etkin maddenin absorpsiyonunu ve biyoyararlanımını arttırmak için en fazla tercih edilen formülasyon, nazal kavitenin fizyolojik fonksiyonlarından etkilenmeyen, ilacı absorbsiyon bölgesinde tutabilen en uygun viskoziteye sahip dozaj formu olan jel veya mukoadezif sistemler seçilmelidir (Dhas ve ark. 2019; Lomate ve ark. 2019).

Farmasötik Eksipiyanlar: Nazal yolla uygulanacak formülasyonlarda koruyucular, antioksidanlar, viskozite ve jelasyon ajanları, nemlendiriciler, tampon bileşenleri gibi çeşitli farmasötik eksipiyanlar kullanılabilir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta seçilecek eksipiyanların kimyasal özellikleri ve konsantrasyonlarıdır.

Bunların nazal mukozayı tahriş etmemesi ve toksik olmaması gerekmektedir (Pires ve ark. 2009; Dhas ve ark. 2019).

Dozaj Formu: Nazal yol ile uygulanan dozaj şekilleri ilacın fizikokimyasal özelliklerine ve pazarlama tercihlerine göre değişebilmektedir. Bunlar; klasik dozaj şekilleri ve modern dozaj şekilleri olarak iki ana başlık altında toplanabilir. Klasik dozaj şekilleri günümüzde halen tercih edilmesine rağmen son yıllarda, etkin maddenin nazal mukozada kalış süresini ve biyoyararlanımını arttırabilmek, mukosiliyer klirensi, uygulanan doz sıklığını ve konsantrasyonunu azaltabilmek amacıyla hidrojeller, nazal filmler gibi yeni sistemler geliştirilmiştir. Bunların ortak noktaları biyoadezif özellikte olmalarıdır. Biyoadezyon ise en az bir tanesi biyolojik yüzey olan iki tabaka arasında yüzeylerarası kuvvetlerin etkisiyle belli süre temas etme durumudur. Eğer söz konusu yüzey mukus ise bu tanım mukoadezyon olarak adlandırmaktadır. Yani mukoadezyon, epitel dokunun mukozasının yüzeyine tutunma olarak da tanımlanabilir (Pires ve ark. 2009; Dhas ve ark. 2019).

Mukosiliyer Klirens (MSK): Solunan hava iki aşamada temizlenmektedir. İlk aşamada 3 µm'den büyük çapa sahip olan partiküller nazal vestibül bölgesindeki kıllar tarafından tutularak burun içine girmeleri engellenir. Sonraki aşamada ise 0,5-3 µm aralığında çapa sahip partiküller nazal mukoza tabakasına yapıarak burada kalırlar. 0,5 µm'den küçük çapa sahip olan partiküller ise alt hava yollarına geçerler (Özcan 2004). 5 µm kalınlığına sahip pH değeri yetişkinlerde 5,5-6,5; çocuklarda 5,0-6,7 arasında değişebilen nazal mukoza, jel ve sol olarak adlandırılan mukus tabakaları ile kaplıdır. Jel tabaka dış tabaka olup daha viskoz ve kalınken, sol tabaka epitel hücreler ile jel tabaka arasını dolduran, siliaların içinde bulunduğu ve hareket edebildiği seröz bir yapıya sahip olan tabakadır **(Şekil 2.13)** (Güngör ve Özsoy 2009; Bitter ve ark. 2011).

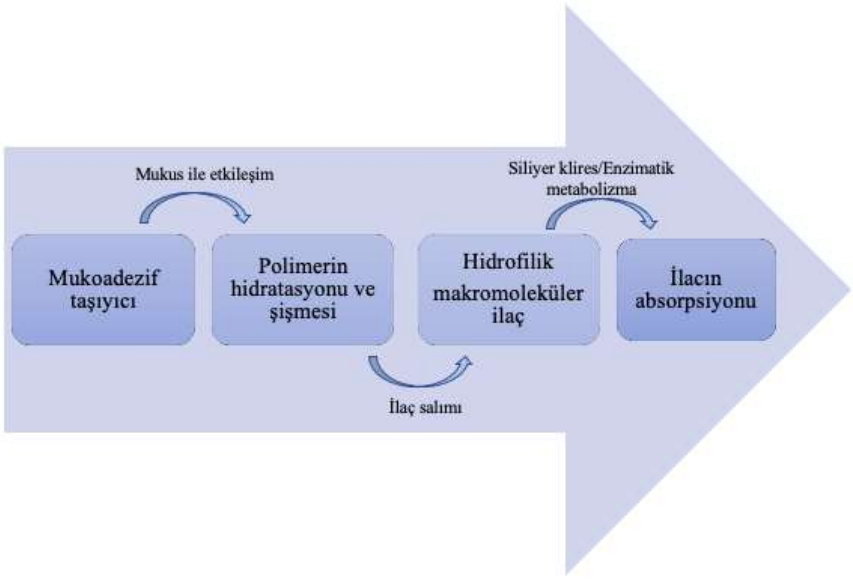


Şekil 2.13 Nazal mukus tabakası (Bitter ve ark. 2011).

Bu sol tabakası içerisinde yer alan siliaların uçları jel tabakası ile temas etmektedir ve silaların harekteleriyle jel tabakası ile içerisindeki partikülleri nazofarenkse doğru iterler ve bu ***mukosilier klirens*** olarak adlandırılır (Özsoy 2008). Nazal mukoza hem solunan havanın nemlenmesine hemde mukozanın çevresel faktörlerden (gaz, ısı değişiklikleri gibi) korunmasına yardımcı olur. Mukus salgısı %95 oranında su, %2 oranında glikoproteinlerden oluşur. Her gün üretilen mukus miktarı ortalama 1,5-2,0 litre arasında değişmekedir. Mukus içerisinde eozinofiller, nötrofiller, mast hücreleri, yanında temel olarak goblet hücreleri tarafından salgılanan immünolojik olarak aktif maddeler de bulunur (Rathbone 2002; Özer 2007; Özsoy 2008). MSK mekanizması nazal yolla uygulanan formülasyonun burun boşluğundan nazofarenkse doğru hızlı bir şekilde uzaklaştırılmasından sorumludur. Bu yüzden i.n. yol ile uygulanan terapötiklerin absorbsiyonunu olumsuz yönde etkileyen bir faktördür. MSK'nın üstesinden gelebilmek için formülasyonlara çeşitli biyoadezif eksipiyanlar kullanılmaktadır (Pires ve ark. 2009; Lomate ve ark. 2019).

2.2.5. Nazal Yol ve Mukoadezyon

Biyoadezyon; enaz biri biyolojik substrat olan iki yüzey arasında belrili bir süre için arayüzey kuvvetleriyle meydana gelen etkileşim sonucu sistemin yüzey enerjisindeki azalma olarak tanımlanmaktadır. Eğer substart mukus tabakası ise; uygulanan farmasötik dozaj şekli ile biyomembranlar arasındaki arayüzde meydana gelen etkileşim mukoadezyon olarak isimlendirilmektedir (Giuliano ve ark. 2018). Nazal yol ile uygulamayı takiben mukoadezyon süreci; mukoadezif bir polimer (metil selüloz, hidroksi propil metil selüloz, kitozan, poloksamer, polietilen gliklol, kitre zamkı vb.) ile submukozal bezlerden salgılanan mukus arasında ortaya çıkan etkileşim ile ilgilidir. Mukoadezyon sırasında; ıslanarak şişen polimer doku yarıklarına nüfuz eder ve mukusta bulunan protein zincileri ile polimer zincirleri ile iç içe geçerler. Bu geçiş sırasında fiziksel ve kimyasal bağlar meydana gelir ve bu bağların güçlendirilmesiyle adezyonluk iyileştirilebilir **(Şekil 2.14)** (Chaturvedi ve ark. 2011).



Şekil 2.14 Mukoadezif ilaç taşıyıcı sistemlerin şematik gösterimi.

Adezyonun oluşabilmesi için polimerlerin; hidrojen bağı oluşturan gruplar (-OH, -COOH), yüksek molekül ağırlığı, uygun yüzey gerilimi, anyonik yüzey yükü ve esnek zincirlerden en az birine sahip olması gerekmektedir (Boddupalli ve ark. 2010). Mukoadezyon için polimerin hidratasyon ve şişmesinin ardından meydana gelen polimer zincirlerinin serbest kalarak biyolojik doku ile etkileşime girdiği basamak önem taşımaktadır. Optimum mukoadezyonda kritik derecede hidratasyon gerekmektedir. Çünkü hidratasyonun düşük olması polimer zincirinin eksik serbest kalmasına yol açarken, hidratasyonun fazla olması polimer çözeltisini çok fazla seyrelteceğinden dolayı mukoadezif bağların zayıflamasına neden olmaktadır (Chaturvedi ve ark. 2011). Mukoadezif bir polimerin varlığı etkin maddenin mukozada bulunan enzimler ile temasını azaltırken aynı zamanda nazal kavitede kalış süresini arttırarak etkin maddenin biyoyararlanımını iyileştirmektedir (Chaturvedi ve ark. 2011; Giuliano ve ark. 2018).

2.2.6. Mukoadezyon Teorileri

Mukoadezyonun kimyasal ve fiziksel temeli bugüne kadar tam olarak anlaşılamamış olsa da genel olarak kabul edilen beş farklı teari bulunmaktadır.

2.2.6.1. Elektron Transfer Teorisi

Elektron transfer teorisi; mukus ile mukoadezif polimer farklı elektronik yapıya sahiptir. Bu iki yüzey birbiriyle temas ettiğinde meydana gelen elektron transferi, ara

yüzeyde elektriksel yüklü iki katmanlı tabaka ile sonuçlanır (Carvalho ve ark. 2010; Thakur ve ark. 2020).

2.2.6.2. Adsorpsiyon Teorisi

Adsorpsiyon teorisi; mukoadeziflerin hidrojen bağı ve Van der Waals bağı gibi ikincil kimyasal etkileşimlerle bağlanmasını açıklar. Bunlar mukoadezif etkileşimde en önemli kuvvetler olarak kabul edilmektedir. Çünkü tek başlarına zayıf bağlar olmasına rağmen yüksek miktarda etkileşimleri güçlü bir mukoadezyon ile sonuçlanabilmektedir (Mathiowitz ve ark. 1999).

2.2.6.3. Islanma Teorisi

Islanma teorisi; en eski teori olarak bilinmekle beraber sıvı sistemlere veya viskozitesi düşük biyoadezif yapılara uygulanmaktadır. Mukoadezyonda yüzey ve yüzeyler arası bölgenin sahip oldukları serbest enerjileri temel almaktadır (Mathiowitz ve ark. 1999).

2.2.6.4. Difüzyon Teorisi

Difüzyon teorisi; adezif polimer ve mukus zincirlerinin yarı-kalıcı adezif bağ oluşturmak için difüzyonunu açıklamaktadır. Adezif kuvvetin gücü, polimer zincirlerinin difüzyon derinliği ile doğru orantılı olarak değişmektedir (Mathiowitz ve ark. 1999).

2.2.6.5. Kopma Teorisi

Kopma teorisi; diğer teorilerden farklı olarak sistemler arasında oluşan adezif bağları, adezyon sağlandıktan sonra yüzeyleri birbirinden ayıtmak için gerekli olan kuvveti incelemektedir. Bu teori, birbirine yapışmış olan iki yüzeyi ayrıma zorluğu ile yapışma bağı arasında bağlantı kurmaktadır değişmektedir (Mathiowitz ve ark. 1999).

2.2.7. Mukoadezyonu Etkileyen Faktörler

Mukoadezif polimerin yapısı, nazal mukoza fizyolojisini etkileyen çevresel faktörler gibi mukoadezyonu etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır.

2.2.7.1. Polimerik Faktörler

Yüksek düzeyde mukoadezyon etki sağlayabilmek için gerekli moleküler kütle polimerin cinsine bağlıdır. Düşük molekül ağırlıklı polimerler daha kolay nüfuz edebilirken, polimerik ve mukuza zincirlerinin karışabilirliği için yüksek molekül ağırlığına sahip polimerler istenir. Katı dozaj formlarında polimer konsantrasyonu arttıkça mukoadezyon kuvveti artar. Nüfuz etme ve karışabilirlik için polimer zincirlerinin esnekliği de oldukça önemlidir. Polimer zincir esnekliğinin artması mukozaya difüzyonda artışa neden olmaktadır. Çapraz bağlı polimerler mukus tabakasına nüfuz eden zincir uzunluğu azalarak mukoadezyonu azaltır (Hombach ve Bernkop-Schnürch 2010).

2.2.7.2. Çevresel Faktörler

Hidrasyon durumu ve şişme

Bu faktörler hem polimer hem de çevreyle ilişkilidir. Yüksek oranda hidrasyon polimerin gereğinden çok şişmesine ve koheziflik gücün azalmasına neden olur (Ugwoke ve ark. 2001).

Çevresel pH

Çevresel pH mukus ve polimerin yükü üzerindeki etkisi nedeniyle mukoadezyonu etkilemektedir. Örneğin iyonize polimerlerin en yüksek adezyonu pH derecesi 3'te görülmüştür. pH'ın yükselmesiyle biyoadezif kuvvet düşmüş ve pH 6 ve 7'de tamamen yok olmuştur (Ugwoke ve ark. 2001).

Temas süresi ve uygulanan basınç

Temas süresinin ve basıncın artmasıyla mukoadezif özelliği ve polimerin interpenetrasyon derinliği arttığı raporlanmıştır (Smart ve ark. 1984).

2.2.7.3. Mukus Fizyolojisi

Doğal mukus döngüsü farklı canlılarda ve mukozal yüzeylerde değişken olmasının yanında mukoadeziflerin kalış süresini kısıtlamaktadır. Bu mukozal döngünün insanlarda 12-24 saat olduğu düşünülmektedir. Ek olarak mukus kalınlığı ve viskozitesi de göz önünde bulundurulmalıdır. Mukus tabakasının kalınlaşması daha fazla etkileşim alanı sağlarken viskozite meydana gelebilecek artış karışabilirliği zorlaştırır (Hombach ve Bernkop-Schnürch 2010).

2.2.8. Nazal Mukoadezif İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nazal yol ile hem lokal hem de sistemik etki için kullanılabilmesinin yanında mukoazaya yapışan sistemlerin kontrollü ilaç salımı sağlamasından dolayı adezif sistemler üzerinde çalışmalar hızlanmıştır. Nazal yolun poröz ve ince membran yapısı, ilk geçiş etkisinin olmaması gibi pek çok avantajlarının yanısıra non-invaziv bir yöntem olması ve etkin maddenin olfaktör bölgeden absorbe olmasının ardından KBB'yi atlayarak MSS'ne ulaşabilmesi dikkat çeken özellik olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca peptit, protein gibi moleküllerin nazal yol ile uygulandığında nazal epitelin sahip olduğu düşük enzimatik etkiden dolayı yüksek biyoyararlanım sağlayabilmektedir. Mukoadezif ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılması nazal mukozada kalış süresini arttırmakta, dozlama sıklığını ve mukosiliyer klirensi azaltmakta, biyoyaralanımını iyileştirmektedir (Erdő ve ark. 2018; Shadab ve ark. 2018).

Gürcan ve ark. (2010) nazal yol ile uygulabilecek siprofloksazin HCl (CIPRO) yüklü kitozan mikroküreler hazırlamışlardır. Hazırlanan bu formülasyon in vitro değerlendirmesinden yola çıkılarak sıçanlara nazal yoldan uygulanmışlardır. In vivo çalışmalar ile CIPRO'nun oral solüsyon, nazal solüsyon ve nazal mikroküre süspansiyonlarının mutlak biyoyararlanımları değerlendirilmiş olup nazal mikrokürelerin en yüksek bulunmuştur. Böylece hazırlanan CIPRO yüklü kitozan mikrokürelerinin sürekli salımı kanıtlanmış ve oral yol uygulamasına alternatif nazal yol olabileceği gösterilmiştir (Gürcan ve ark. 2010).

Shelke ve ark. (2015) migren için olaylanan ilaç molekülü olan naratriptan hidroklorürün (NH) düşük biyoyaralanım, sık dozlama, düşük yarı ömür gibi problemlerinden dolayı gerçekleştirdikleri çalışmada NH içeren ısıya duyarlı i.n. uygulanan in situ jel olarak hazırlamışlar ve olfaktör bölgeden beyne hedeflendirme çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. In situ jel formu için P407 ve mukoadezyon sağlamak için karbopol 934 polimerlerini kullanarak hazırlanan formülasyonlar, koyun mukozası kullanılarak jelleşme sıcaklığı, jel gücü, muko-yapışkanlık gücü, viskozite, *in vitro* ilaç salımı ve *ex-vivo* geçirgenlik çalışması için karakterize etmişler. Çalışma sonunda salım hızının arttığı ve i.n. NH jeli, ilacın biyoyararlanımını ve hasta uyumunu iyileştirmek için mevcut geleneksel dozaj formuna daha iyi bir alternatif olabileceğini göstermişlerdir (Shelke ve ark. 2015).

Mahajan ve Gattani (2010) anyonik bir polimer olan gellan zamkını kullanarak metoklopramid in situ jel hazırlamışlardır. Yapılan histolojik çalışmalarda formülasyonun nazal mukozaya zarar vermediğini saptamışlardır. Metoklopramid nazal in situ jel ile oral solüsyonları tavşanlara uyguladıktan sonra mutlak biyoyararlanımları ile Tmax değerlerini incelemişler. Hazırlanan in situ jel uygulamasıyla mutlak biyoyararlanımın iyileştiğini ve Tmax değerinin kısaldığı göstermişlerdir (Mahajan ve Gattani 2010)

Patil ve ark. (2019) beyne donepezil HCL iletimini arttırabilmek amacıyla kübozamal mukoadezif in situ nazal jel formülasyonları hazırlamışlar ve çözelti formuyla karşılaştırmışlar. Kübozomlar için gliserol monooleat (GDO), yüzey aktif madde olarak P407 polimerini kullanarak farklı formülasyonları denemişler ve optimizasyon için seçilen formülasyon üzerinden gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları, *in vivo* biyodağılım sonuçları çözelti formuyla karşılaştırıldığında transnazal geçirgenliğin yüksek olduğu ve beyne daha iyi dağılım olduğunu göstermişlerdir (Patil ve ark. 2019).

Yenil ve ark. (2013), verapamil HCl'nin biyoyararlanımını ve uzun süreli salımını geliştirebilmek için sodyum aljinat mukoadzif polimerlerini kullanarak nazal insert geliştirmişlerdir. *In vitro* çalışmalar sonucu Higuchi kinetik modeline uygun olduğu gösterilen formülasyon çalışmalarında penetrasyon arttırıcı olarak PEG 400 kullanılmıştır. Sığır mukozasında gerçekleştirilen *ex vivo* permeasyon çalışmalarında etkin madde salımının arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak nazal insertlerin oral uygulamaya alternatif olabileceğini göstermişlerdir (Yanil ve ark. 2013).

Galgatte ve ark. (2014), sumatriptan süksinatın (SS) biyoyararlanımını iyileştirmek için iyon aktivasyon mekanizmasıyla jelleşen nazal yoldan uygulanan formülasyonlar hazırlamışlardır. Jelleştirici ajan olarak deasetillenmiş jellan zamkını kullanarak hazırladıkları SS'nin Spraugue-Dawley sıçanlarında *in vivo* çalışmalarını gerçekleştirmişler. Optimize edilmiş seri, 5 saat içinde %98,57 ilaç salımı, koyun burun mukozası üzerinde yapılan *ex vivo* çalışmalar, 5 saat içinde %93,33 göstermiştir. Böylece in situ jelin, SS'nin nazal yoldan uygulanması için uygun olduğu kanıtlanmıştır (Galgatte ve ark. 2014).

2.2.9. AH Tedavisinde Intranazal Yol ile Kullanılan İlaç Taşıyıcı Sistemler

Tedavi de kullanılan mevcut onaylı ilaçlar donepezil, galantamin, rivastigmin ve memantin olarak bilinmektedir ve tedavilerinin çoğu oral ve paranteral uygulama gibi periferal yolu kullanmaktadır. Ancak bu tür uygulamalar ilaç tedavisinin etkinliğini ve gücünü azaltmaktadır. İlacın periferal uygulamasının en büyük dezavantajı, ilaç moleküllerinin veya aktif ajanların kandan beyne erişilebilirliğinin sınırlı olmasıdır. Bunun nedeni ise beyni herhangi bir zarardan koruyan KBB hemen hemen tüm ilaç moleküllerinin, proteinlerin, peptidlerin ve diğer büyük maddelerin girişini kısıtlamasıdır. Aynı zamanda, ilk geçiş metabolizması, enzimatik degradasyon (oral uygulama) ve sistemik klirens (oral ve parenteral yoldan) de ilaç biyoyararlanımını önemli ölçüde azaltmaktadır. Beyne ilaç iletiminin tüm bu karmaşıklıkları arasında, i.n. yol KBB'yi atlayan ve ilacı doğrudan burun boşluğundan beyne ileten, rahat ve kullanışlı non-invaziv bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. Çeşitli teoriler ve araştırmalar, i.n. yol ile, beyne ilacı iletiminin sağlanabildiğini, sistemik ilaç vermedeki sınırlamalarının üstesinden gelinebildiğini ve ilaç verme sürecini hızlandırdığını iddia etmektedir. William H. Frey II, 1989, terapötik olarak aktif bileşiklerin doğrudan MSS'ye verilmesi için burun içi yolun ilk konseptini keşfetmiştir. O zamandan beri burundan beyine ilaç verme sisteminde dikkate değer çalışmalar yapılmıştır. Başlangıçta araştırma, AH'nin tedavisi için beyne i.n. yol ile iletimi üzerine odaklanmıştır (Agrawal ve ark. 2018).

Yeni stratejiler (nano ilaç taşıyıcı sistemi, koloidal taşıyıcılar, muko yapışkan cihazlar, kontrollü uygulama sistemi, ön ilaç, vb.) yoluyla çeşitli verme sistemi, yukarıda belirtilen sınırlamaların üstesinden gelmek için adapte edilmektedir. Bu tür başarılı araştırmalara rağmen, anti-AH ilaçlarının burundan beyne ilaç dağıtımının çok azı, yeterli klinik kanıt olmaması nedeniyle pazar onayı kazanabilmiştir. Kısacası beyne i.n. ilaç dağıtımının başarılı olabilmesi için ilaç taşıma mekanizmasının, hastalığın patofizyolojisinin, beynin anatomisinin ve çeşitli formülasyonun yanı sıra deneysel parametrelerin doğru bir şekilde anlaşılması gerekmektedir (Agrawal ve ark. 2018).

Li ve ark. (2012), AH ve vasküler demansın semptomatik tedavisi için onaylanmış olan Galantamin hidrobromür (GH) yüklü esnek lipozomların i.n. yol ile uygulamasını gerçekleştirmişlerdir. Esnek lipozomlar, yüksek elastikiyete sahip olan karakteristik sıvı membranları ile geleneksel lipozomlardan farklılık gösterir, bu

nedenle bir dizi molekülün deri ve hücresel membranlara geçişini kolaylaştırır. Yapılan çalışmada GH yüklü esnek lipozomların i.n. uygulamasını takiben Male Sprague–Dawley rats beyninde GH'nin asetilkolinesteraz inhibisyon etkinliğini ve farmakokinetik davranışını araştırılmıştır. Ayrıca, GH'nin hücrelere sitotoksisitesinin esnek lipozomlara yüklenerek azaltılıp azaltılamayacağının da değerlendirilmesi yapılmıştır (Li ve ark. 2012).

Sıçan beyninde asetilkolinesteraz inhibisyonu ve farmakokinetik davranışla ilgili çalışmalar incelendiğinde GH'nin asetilkolinesteraz inhibisyonunun etkinliği, oral uygulama ile, özellikle esnek lipozomlarda yüklü GH ile karşılaştırıldığında burun içi uygulama da büyük ölçüde arttığı bulunmuştur. Ayrıca Cmax ve AUC değerlerinin oral yoldan uygulanan GH'a göre sırasıyla 3,52 ve 3,36 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur. Tmax değeri ise burun içi uygulama için 0,75 saate büyük ölçüde kısaldığı görülmüştür. Sitotoksisite testlerinde ise; PC-12 hücre canlılığı testleri, esnek lipozom taşıyıcısının kültürlenmiş hücreler için toksik olmadığı ve GH'nin hücrelere sitotoksisitesinin de esnek lipozomlara yüklenmesiyle açıkça azaldığı bulunmuştur. Bu çalışma, GH yüklü esnek lipozomların i.n. uygulamasının, AH'nin tedavisi için ümit verici bir teknoloji olarak gelecekte geliştirilmeye değer olabileceğini göstermiştir (Li ve ark. 2012).

Muntimadugu ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada zayıf beyin penetrasyonundan dolayı klinik çalışmada başarılı olamamış tarenflubrilin (TFB), beyne ilaç iletimini iyileştirmek amacıyla nanopartiküller (NP) ve katı lipit nanopartiküller (SLN) kullanılarak i.n. yoldan uygulanmak üzere hazırlanmıştır. Emülsifikasyon ve solvent difüzyon yöntemleri kullanılarak hazırlanmış olan TFB yüklü poli (laktit-ko-glikolid) nanopartiküller (TFB-NP'ler) ve katı lipid nanopartiküller (TFB-SLN'ler)'in TEM'de görüntüleri ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Farmakokinetik çalışmalar ise Sprague–Dawley rats kullanılarak değerlendirilmiş olup nanopartiküllerin i.n. uygulamalarının ardından TFB beyin konsantrasyonları incelenmiş ve i.n. formülasyonlarında önemli derecede yüksek bulunmuştur. Bu umut verici sonuçlar, TFB'nin terapötik konsantrasyonlarının, polimerik ve lipidik nanopartiküllerin i.n. uygulamasından sonra koku alma yolu yoluyla doğrudan beyne taşınabileceğini kanıtlamıştır (Muntimadugu ve ark. 2016).

Hafif-orta demanslı AH'nin semptomatik tedavisinde yaygın kullanılan Rivastigmin, reversibl ve rekabetçi olmayan kolinesteraz inhibitörüdür. Piyasa da tablet, kapsül gibi dozaj şekillerinde bulunmaktadır ancak hepatik ilk geçiş metabolizması, klirensi, ilacın sindirim enzimleri tarafından gastrointestinal yıkımı, sindirim sisteminin asidik pH koşulları, düşük biyoyararlanım ciddi yan etkiler gibi sınırlandırmaları mevcuttur. Zhen-Zhen Yang ve ark. (2013) beyindeki rivastigmin dağılımını iyileştirmek ve i.n. uygulama ile farmakodinamiği arttırmak ve yan etkileri en aza indirmek için rivastigmin lipozomlarını (Lp) ve hücreye nüfuz eden peptit (CPP) ile modifiye edilmiş lipozomları (CPP-Lp) formüle etmeyi amaçlayan çalışma gerçekleştirmişlerdir

Lipozomların ve CPP'lerin rivastigminin beyindeki dağılımını geliştirip geliştirmediğini anlayabilmek ve i.n. yol ile peroral yan etkileri en aza indirebilmek amacıyla rivastigmin lipozomlar (Lp) ve CPP modifiye lipozomlar (CPP-Lp) hazırlanmıştır. Bu–formülasyonların farmakodinamik etkileri için Sprague–Dawley sıçanlarda rivastigmin konsantrasyonu karşılaştırılmıştır ve son olarak, lipozomal formülasyonların toksisiteleri değerlendirilmiştir. Farmakokinetik ve biyodağılım sonuçları değerlendirildiğinde rivastigmin formülasyonlarının i.n. uygulaması, rivastigmin solüsyonunun intravenöz (i.v.) uygulaması ile karşılaştırıldığında plazma ve MSS bölgelerinde rivastigmin dağılımının önemli ölçüde artmış olduğu görülmüştür. CPP-Lp'li rivastigmin konsantrasyonu, hipokampüs, korteks ve koku alma bölgesinde i.n. uygulamasının ardından Lp'ninkinden belirli dakikalardan sonra önemli ölçüde daha yüksek olduğunu ve bu da CPP'nin rivastigminin burun boşluğu yoluyla beyne absorpsiyonu artırabildiğini göstermiştir. Rivastigmin solüsyonu ve rivastigmin lipozomlarının i.n. uygulaması, i.v. uygulamasına göre AH'den en çok etkilenen bölgeler olan özellikle hipokampüs ve kortekste MSS bölgelerinde rivastigmin dağılımını iyileştirdiğini göstermiştir. Veriler, rivastigmin lipozomlarının, özellikle CPP-Lp'nin, beyin iletimini iyileştirdiğini ve i.n. uygulamasından sonra KBB penetrasyonuna ve beyne nazal koku alma yoluna ilişkin farmakodinamikleri artırdığını ve aynı anda hepatik ilk geçiş metabolizmasını ve gastrointestinal yan etkileri azalttığını göstermekmiştir (Yang ve ark. 2013).

Zhang ve ark. (2014) temel fibroblast büyüme faktörünün (bFGF) MSS'ye girmesini kolaylaştırmak için Solanum tuberosum lektin (STL) konjuge PEG-PLGA nanopartiküllerini bir ilaç dağıtım sistemi olarak kullanmışlardır. Temel fibroblast

büyüme faktörü (bFGF), *in vitro* ve *in vivo* beyin nöronlarının hayatta kalmasını, nörit (neurite) büyümesini destekleyen ve ayrıca hipokampustaki sinaptik iletimi düzenleyen 155 amino asitten oluşan tek zincirli bir polipeptittir. Solanum tuberosum lektin (STL) ise iki özdeş 50 kDa alt biriminden oluşan bir glikoproteindir. STL seçici olarak, nazal epitel membranında bol bulunan N-asetilglukozamine bağlanmaktadır. bFGF'nin hipokampusa uygulanmasının, nöronal hasarı önleyebileceği ve AH sıçanlarının öğrenme eksikliklerini iyileştirebileceği düşünülmektedir. Bu nedenle bFGF, AH tedavisi için potansiyel bir ajan olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, AH'nin bFGF ile tedavi edilmesine ilişkin mevcut araştırmalar çoğunlukla serebroventriküler enjeksiyona odaklanmaktadır ve bu yol tamamen karmaşıktır aynı zamanda insanlarda pratik değildir. bFGF solüsyonunun i.n. uygulanması, AH modeli sıçanların hafıza bozukluklarının iyileştirilmesine yardımcı olabilir, ancak burun boşluğunda bFGF'nin zayıf stabilitesi ve küçük taşıma miktarı nedeniyle hala sınırlamalar mevcuttur. Bu nedenle STL konjuge PEG-PLGA nanopartikülleri emülsiyon / çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. *In vivo* sonuçlar değerlendirilmiş olup STL-bFGF-NP'nin i.n. uygulamasının, bFGF'nin i.v. enjeksiyonuna kıyasla daha yüksek beyin iletimi ile sonuçlandığını göstermiştir. Ek olarak bFGF solüsyonunun ve bFGF-NP'nin i.n. uygulamasından da daha yüksek beyin iletimi ile sonuçlandığını göstermiştir. Bu sonuçlar, STL'nin, peptit yüklü nanopartiküllerin nazal mukoza boyunca taşınmasını arttırmak ve MSSye erişimlerini iyileştirmek için burun boşluğunda bol miktarda gözlenen N-asetil-d-glukozamine spesifik olarak bağlanarak gelecek vaat eden bir ligand olduğunu ileri sürülmüş olup STL ile modifiye edilmiş nanopartiküllerin beyindeki bFGF alımını artırabileceğini ve AH'ye karşı terapötik etkilerini kolaylaştırabileceğini ikna edici bir şekilde göstermiştir (Zhang ve ark. 2014).

2.2.10. In situ Polimerik İlaç Taşıcıyı Sistemler

Son 30 yıldır, dozlama sıkılığı azaltması, uygulama kolaylığı sağlaması ve hasta uyuncunu arttırması nedeniyle in situ jel sistemlerin araştırılmasında ve geliştirilmesinde önem kazanmıştır. In situ kelimesi latincede 'yerinde' veya 'orijinal yerinde' anlamına gelmektedir. In situ jellerin uygulama yolları incelendiğinde oral, nazal, rektal, oküler, vajinal gibi pek çok uygulama yolu bulunmaktadır. In situ jel oluşturan sistemler; sabit plazma seviyelerini korumakta ve böylece uzatılmış ilaç salımını mümkün kılmaktadır. Aynı zamanda in situ jel sistemleri kolay uygulama, etki

bölgesinde kalış süresini arttırma, fizyolojik ortamla kolaylıkla oluşabilen, kolay üretim gibi avantajları bulunmaktadır. In situ jellerin temeli oda sıcaklığında sıvı halde olan formun sıcaklık, pH gibi fizyolojik uyaranlar, şişme, çözücü değişimi gibi osmotik olarak indüklenene veya fotopolimerizasyon, iyonik çapraz bağlanma gibi kimyasal uyaranlar ile jel formuna dönüşmesine dayanmaktadır (Bolla ve ark. 2018).

Uygun uyarana duyarlı, yeterli mukoadeziflik, viskoziteye ve ilaç salımına sahip polimerin seçilmesi, etkili bir in situ jelin oluşturulmasında önemli bir aşamadır. In situ jeller için literatürde bir çok polimer ve mukoadezif ajan bulunmasına rağmen sadece bir kısmı MSS ilaçları için uygundur. Bunlar hem doğal (kitozan, pektin gibi) hem de sentetik (poloksomer (P407 ve P188), karbopol gibi) uyaran duyarlı polimerleri içerir. Doğal ve sentetik polimerlerin her ikisi de sol-jel değişimi için uygundur ve isteğe göre benzer polimerler ile modifiye edilebilmektedir (Anand ve ark. 2012; Altuntaş ve Yener 2017). Ancak doğal polimerler; iki veya daha fazla uyaranla jelleşebilme özelliği gösterebilirken, çoğu sentetik polimer tek bir uyarana cevap verme özelliğine sahiptir. Burada dikkat edilmesi gereken; kullanılan sentetik polimerler iritasyona neden olmamalı, biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilmeli, toksisite oluşturmamalıdır (Anand ve ark. 2012; Altuntaş ve Yener 2017).

2.2.10.1. Fizyolojik Uyarana Duyarlı In situ Jel Sistemler

In situ jelin bulunduğu çevresel ortamda meydana gelebilecek değişikliklere bağlı olarak polimerde meydana gelen fizisel ve kimyasal değişimler sonucu hazırlananan sistemlerdir.

- ***Isı Değişimine Duyarlı In situ Jel Sistemler***

Isıya duyarlı polimerler kolay kontrol edilebilen ve *in vitro*/*in vivo* olarak kolay uygulanabilmelerinden dolayı oldukça sık tercih edilmektedirler. Isıya duyarlı sistemlerde oda sıcaklığında (20-25^{o}C) sıvı halde bulunan polimer çözeltisinin vücut sıvıları ile (35-37^{o}C) temas ettiğinde ısı yükselmesi nedeni ile jelleşerek ilaç salımını uzatmaktadır (Hoffman ve ark. 1986). Ancak bazen bu sıcaklık aralığı dışında erken veya geç jelleşme de meydana gelebilmektedir. Örneğin düşük sıcaklıkta sol formu ile sonuçlanabilir veya yüksek sıcaklıkta dış katmanın ani jelleşmesi ile sıvıyı içine hapsedebilir. Erken jelleşme ile meydana gelen sol formu uygulamada zorluğa, geç jelleşme ise hapsedilmiş ilacın sızmasına neden olabilir (Karavasili ve Fatouros 2016).

30-34ºC arasında sol-jel değişimi gösteren polimerler nazal uygulama yolu için ideal kabul edilmektedir (Sherafudeen ve Vasantha 2015). Poloksamer kopolimerleri en önemli ısıya duyarlı polimerlerden biridir ve sıklıkla in situ jellerin üretiminde kullanılmaktadır. P407 (PF127) ve P188 (PF68) nazal preparat hazırlanmasında en çok kullanılan formlardır. P407, P108'e daha çok tercih edilmesine rağmen bu iki poloksamerin kombinasyon halinde kullanılması da istenen jelleşme özelliğini sağlamaktadır. Bunların yanında kitozan, selüloz türevleri (HPMS, MS gibi) polimerlerde nazal formülasyonlarda kullanılmaktadır ancak bunlardan kitozanın sol-jel değişimi ve jel kuvveti nazal formülasyonlarda yeterli bulunmamıştır. Bu nedenle nöroterapötiklerin beyine ulaştırılmasında poloksamerler ile kombine olarak kullanılmaktadır (Agrawal ve ark. 2020).

- ***pH Değişimine Duyarlı In situ Jel Sistemler***

pH'da meydana gelen değikliklere bağlı olarak jelleşmeyi sağlayan diğer bir fiziksel uyaran olarak bilinmektedir. Bu kategoriye dahil edilen polimerler asit veya alkali bir grup bulundururlar ve bu gruplar farklı pH'a maruz kaldıklarında proton alır veya verirler (Devasani ve ark. 2016). Karbopol ve türevleri, poli vinil asetat dietilaminoasetat, polietilen glikol, poliakrilik asit gibi polimerler çevresel pH değişimi ile sol-jel değişimi geçiren pH duyarlı ajanlara örnek olarak verilebilir Nazal boşluk pH değeri 5,5-6,5 arasında değişmektedir. Karbopol bazlı formülasyonlar ise pH 4-5,5 arası değişen daha düşük pH'ta tutulurlar. Bu formülasyonlar nazal mukoza ile temasta bulunduklarında konformasyonel bir değişim geçirerek üç boyutlu bir ağ oluşturmaktadır (Agrawal ve ark. 2020).

2.2.10.2. İyon Değişimine Duyarlı In situ Jel Sistemler

In situ jel oluşturulmasına yönelik bir başka yaklaşım, iyon duyarlı ajanların varlığını içermektedir. Osmotik olarak indüklenen sistemler olarak da bilinmektedirler. Gellan zamkı, aljinatlar, hyaluronic asit gibi polimerler kullanılmaktadır. Nazal formülasyonlarda çok kullanılan anyonik bir polisakkarit olan Gellan zamkı fizyolojik sıvılarda bulunan Na^{+}, K^{+}, Ca^{++}, Mg^{++} gibi katyonlarla kesişme bölgesi oluşturarak üç boyutlu ağ yapısı meydana getirmektedir. Oluşan jel ile nazal bölgede kalış süresini arttırır, ilaç salımını kontrol eder ve ilaç absorbsiyonunu arttırır (Karavasili ve Fatouros 2016).

2.2.10.3. Kimyasal Değişime Duyarlı In situ Jel Sistemler

Bu grupta yer alan sistemler kimyasal reaksiyonlar; iyonik veya enzimatik çapraz bağlanma ve fotopolimerizasyon olarak sınıflandırabilir.

- *İyonik çapraz bağlanma*

Pektin, sodyum aljinat, gellan zamkı gibi polimerlerin iyonik ortamda jelleşmesine dayanmaktadır. Örneğin pektin oral in situ jel oluşturulmasında kullanlılan suda çözünür doğal polimerdir. Oral uygulama olarak hazırlanan pektin parasetamol formülasyonu uygulanmasının ardından mide de bulunan iki değerlikli katyonlar ile jel formuna dönüşerek parasetamolün biyoyararlanımının iyileşmesi sağlanmıştır (Kubo ve ark. 2004).

- *Enzimatik çapraz bağlanma*

Enzimatik çapraz bağlanma grubunda, sol-jel geçişi monomerler, başlatıcılar, çapraz bağlanma ajanları gerekmeden katalize edilmektedir. Enzimatik çapraz jel oluşumu basittir ve hafif koşullar altında bile gerçekleşebilmektedir (Chen ve ark. 2003).

- *Fotopolimerizasyon*

In situ fotopolimerizasyon; monomer veya reaktif bir makromer ile başlatıcı bir çözelti içerisinde UV, elektromanyetik radyasyon gibi uygulamalarla oluşan sistemlerdir. Fizyolojik sıcaklıkta, foto reaksiyonları hızlı polimerizasyon oranları sağlamaktadır ve sistemler bir implant oluşumuna yol açan karmaşık şekilli birimler halinde kolayca yerleştirilebilmektedir (Haraguchi ve Takada 2010).

2.3. Isı Değişimine Duyarlı İlaç Taşıyıcı Sistemler

Herhangi bir uyarana duyarlı ilaç taşıyıcı sistemler, doğrudan fizyolojik çevreye yanıt verebilen, hedefe odaklı, ayarlanabilir özellikle olmaları nedeniyle son yıllarda yoğun ilgi görmektedirler. Burada kullanılan polimerler ısı, ışık, enzimler, pH, UV, elektrik alanı gibi farklı uyaranlara fizikokimyasal değişikliklerle yanıt oluşturmaktadırlar. Isı değişimine duyarlı ilaç taşıyıcı sistemler arasında hidrojeller, dendrimerler, lipozomlar, mikroküreler, polimerik filmler olarak örnekleri vereilebilir. Bunların arasında en çok kullanılan üç boyutlu, gözenekli bir yapıya hidrofilik homopolymer ya da kopolimerler ağlar içeren, su veya fizyolojik sıvılarda şişme

özelliği sergileyen hidrojellerdir. Bu yapılar geri dönüşümlü olmakla beraber kritik bir sıcaklıkta sol-jel arası faz geçişi göstermektedir (Bolla ve ark. 2018).

2.3.1. Isı Değişimlerine Duyarlı Polimerler

Isı değişimine duyarlı polimerler, oda sıcaklığında sol formundayken vücuda uygulandığında jel forma dönüşebilen sistemlerdir ve bunlar doğal ya da sentetik olarak iki gruba ayrılmaktadır**.** Metil selüloz (MS), hidroksipropil metil selüloz (HPMS), kitozan, jelatin gibi örnekler doğal polimerler sınıfında yer alırken, poli(N-n-propilakrilamid) (PNPAm), poli(propilen oksit) (PPO), poli(etilen oksit)-poli(propilen oksit)-poli(etilen oksit) (poloksamer) (PEO–PPO–PEO), poli(laktik asit-ko-glikolik asit)-polietilen glikol-poli(laktik asit-ko-glikolik asit)-glikol-poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA–PEG–PLGA) maddeleri sentetik polimerler sınıfında yer almaktadır (Fitzpatrick ve ark. 2012). Polimerlerin yapısında yer alan hidrofilik ve hidrofobik gruplar arasındaki etkileşim polimerlerin su yada fizyolojik sıvılarla karşılaştığında yeniden ayarlanmasına neden olmaktadır. Kritik çözelti sıcaklığı (CST); polimer çözeltilerinin faz ayrımına uğradığı sıcaklık olarak tanımlanmakta olup daha düşük kritik çözelti sıcaklığına (LCST) sahip olan polimerler LCST'nin üzerinde ısıtıldıklarında tipik bir sol jel geçişi ortaya çıkmaktayken, ısıtıldıklarında çözünür hale gelen polimerin üst kritik çözelti sıcaklığına (UCST) sahip olduğu söylenmekte ve bu iki sistemde ilaçların taşınmasında kullanılabilmektedir (Bolla ve ark. 2018; Khimani ve ark. 2020).

2.3.2. PEO/PPO/PEO Triblok Kopolimerleri-Poloksamerler

Poloksamer olarak adlandırılan poli(etilen oksit)-poli(propilen oksit)-poli(etilen oksit) (PEO-PPO-PEO) triblok kopolimerleri yüksek suda çözünürlük, düşük tahriş/toksisite, iyi ilaç salım özellikleri, yardımcı kimyasallarla uyumlu ve çok iyi ısıya duyarlı jelleşme özelliklerine sahip olması nedeniyle sık tercih edilmektedir. Ancak zayıf mekanik dayanım ve biyoadezif özellik göstermelerinden dolayı poliakrilatlar, selüloz türevleri, kitozan, aljinat gibi biyoadezif polimerlerle beraber kullanılmaktadır (Anand ve ark. 2012; Altuntaş ve Yener 2017). Poloksamerler veya ticari adıyla Pluronics®; oftalmik, vajinal, nazal, transdermal ve enjekte edilebilir olarak farklı yollarda uygulanabilme kolaylığı sağlamakta ve polimerik çözeltilerinin hazırlanabilmeleri için sıcakta ve soğukta olmak üzere iki yöntem kullanılmaktadır.

Sıcakta hazırlama yöntemi yerine daha kolay ve hızlı olmasından dolayı soğukta hazırlama yöntemi tercih edilmektedir. Poloksamer 407 (P407) polimerik çözeltileri sık tercih edilmekle beraber oda sıcaklığında çözelti formundayken uygulandığı bölgede örneğin nazal mukoza sıcaklığında jel yani sol formuna geçmektedir. Soğukta hazırlama yöntemine göre 4-5^{o}C'deki distile suyla karıştırılan poloksamer bir gece boyunca buzdolabında bekletilerek şeffaf, homojen bir çözelti elde edilir. Poloksamerden hazırlanan ısıya duyarlı in situ jellerin sol-jel geçiş sıcaklıkları, mekanik özellikleri, reolojik özelliklerinin belirlenmesi ve formülasyonda yer alan ekspiyanların bu parametreler üzerindeki etkilerinin bilinmesi ilaç taşıyıcı sistemler olarak tasarlanabilmelerinde önem teşkil etmektedir. Örneğin MS kullanılması biyoadezifliği ve jel kuvvetinin artmasına neden olduğu için uygulama bölgesinde kalış süresini arttırarak etkin maddenin biyoyaralanımını olumlu olarak etkileyecektir (Wavikar ve Vavia 2015).

Hazırlanan poloksamerlerin Tsol-jel; su banyosunda cam test tüpler veya manyetik karıştırıcıda magnet yardımı olmak üzere kolay ve yaygın olarak kullanılan iki yöntem bulunmaktadır (Ban ve ark. 2017; Abouhussein ve ark. 2018). Su banyosu yönteminde hazırlanan formülasyonlar test tüplerine alınarak 15 ^{o}C'ye ayarlanmış su banyosuna yerleştirilir. Su banyo sıcaklığı belirli aralıklar ve belirli sürelerde arttırılarak sistemin dengeye gelmesi beklenir. Hazırlanan örneklerde jelleşmenin kontrolü için cam test tüpler 90^{o} döndürülerek hareket edip etmedikleri kontrol edilir. Hareket etmediği nokta Tsol-jel olarak kabul edilir (Ban ve ark. 2017). Manyetik karıştırıcının kullanıldığı yöntemde ise hazırlanan formülasyonları beherlere alınır. İçerisine magnet konularak manyetik karıştırıcıya yerleştirilir. Sabit bir karıştırma hızında ve sıcaklık belli aralık ve oranlarda arttırılarak magnetin dönmediği nokta tespit edilir (Abouhussein ve ark. 2018). Sol-jel geçiş sıcaklığı (Tsol-jel) P407 konsantrasyonlarıyla ters orantlı olarak değişmekte yani P407'nin konsantrasyonu arttıkça Tsol-jel değeri azalmaktadır (Russo ve Villa 2019).

Hazırlanan in situ jellerin viskoziteleri ve reolojik özelliklerinin belirlenmesi onların akış tipini belirlememizde in situ jellerin uygulandığı yerde kalabilmeleri ve terapötiklerden istenilen etkinin görülebilmesi için önemlidir. Bu özellikler, Brookfield reometreleri veya diğer çok noktalı viskozimetreler kullanılabilmektedir (Ranch ve ark. 2021).

2.3.3. Isı Değişimlerine Duyarlı Nazal İlaç Taşıyıcı Sistemler

Chen ve ark.'ları tarafından kürkimin yüklü ısıya duyarlı hidrojeller hazırlanmış ve beyin hedefleme verimliliği incelenmiştir. Hidrojeller, P407 ve P188 kullarak hazırlanan formülasyonlar sıçanlara nazal yoldan uygulandıklarında vücut sıcaklığında kısa sürede jelleştiği ve kürkuminin salım profilini geciktirdiği gösterilmiştir. Aynı zamanda nazal mukozal bütünlüğünün formülasyon uygulanmasından 14 gün sonra bile korunduğu bulguları elde edilmiştir. Formülasyonun i.n. uygulamasından sonra serebrum, hipokampus, beyincik ve olfaktör bulbdaki kurkumin için ilaç hedefleme etkinlikleri, ilacın ilaç hedefleme etkinlikleri i.v. uygulama ile karşılaştırıldığında i.n. uygulama yoluyla elde edilen sonuçların daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (Tao ve ark. 2006).

Pathan ve More (2017) tarafından nortriptilin hidroklorür yüklü ısıya duyarlı i.n. yolla uygulanan jel geliştirilmiştir. P188 ve HPMS konsantrasyonlarını arttırdıklarında viskozitenin ve mukoadezyon kuvvetinin arttığını, %3,6 P188 ve %0,04 HPMS içeren formülasyonun koyun nazal mukoza geçişinin %98 ilaç salımı sergilediği göstermişlerdir. Formülasyon üç aylık bir süre boyunca stabiliteleri değerlendirilmiş ve ve elde edilen sonuçların hazırlanan formülasyonun depresyon tedavisi için potansiyel bir terapötik olduğunu göstermişlerdir (Pathan ve More 2017).

Galgatte ve ark. (2014) tarafından asetillenmiş jellan zamkını kullanılarak sumatriptan in situ jel hazırlanmış ve KBB'den geçiş çalışmaları incelenmiştir. Jellan gam farklı konsantrasyonlardaki jel gücü ve jelden ilaç salım hızı değerlendirilmiş ve konsantrasyonunun artmasıyla jelin gücü artarken ilaç salım hızının azaldığı gösterilmiştir. *Ex vivo* geçiş çalışmaları koyun olfaktör bölgesinde gerçekleştirilmiş ve 300 dakikalık bir süre boyunca ilacın %93'ünün salındığını gösterilmiştir. *In vivo* çalışmalar, oral uygulamaya kıyasla nazal yol uygulamasında plazmada ve beyinde AUC'nin daha yüksek olduğunu gösterilmiştir. Sumatriptanın beyin dokularındaki AUC'sinin formülasyon i.n. olarak uygulandığında plazmadaki AUC'ye kıyaslandığında daha yüksek olduğu görülmüş olup ilaç moleküllerinin nazal mukozadan beyne geçişinin olfaktör yolla olduğunu ortaya koymuşlardır (Galgatte ve ark. 2014).

Abouhussein ve ark. (2018) tarafından P407 ve P188 olan iki farklı polimer tipi; kitozan, HPMS, karbopol 934 ve MS gibi mukoadezif ajanlarla hazırlanıldıktan sonra

elde edilen hidrojellerin reolojik davranışları, mukoadeziflikleri, mekanik güçleri ve salım profilleri değerlendirilmiştir. P407 ile karbopol 934 kombinasyon en iyi reolojik davranışları, mukoadeziflikleri ve mekanik güçleri sergilemişler bu yüzden *ex vivo* geçiş ve *in vivo* farmakokinetik çalışmalar bu seri üzerinden yapılmıştır. Bunun sonucunda *ex vivo* çalışmalarında rivastigminin nazal geçiş oranı daha fazla bulunmuş ve P407 ile karbopol 934 kombinasyonunun mukoadezyonluğa katkıda bulunduğunu, mukosiliyer klirensi azalttığını göstermişlerdir. Farmakokinetik çalışmalarında i.n. jel uygulamada rivastigminin serebral dağılımının ve biyoyaralanımının i.v.çözeltiye göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Bhandwalkar ve Avachat (2013) tarafından venlafaksin, P407 jelleştirici ajan ile PVP K30 mukoadezif ajan olarak hazırlanan ısıya duyarlı bir jel ile formüle edilmiş ve venlafaksinin nazal yoldan beyne iletimi için değerlendirilmiştir. Optimize edilen formülasyon, yaklaşık 32 ^{o}C fizyolojik değerlerde jelleşme sıcaklığı sergilediği, yeterli viskozite değerine sahip ve mukoadezif olduğu gösterilmiştir. Sıçanlar üzerinde farmakodinamik çalışmalar; oral solüsyona kıyasla ısıya duyarlı hidrojelin i.n. uygulamasından sonra lokomotif aktivite testlerinde antidepresan olarak daha iyi bir etkinlik gösterdiği bildirilmiştir.

2.3.4. Peptit ve Proteinlerin Intranazal Yol ile Taşınması

MSS hastalıklarını tedavi etmede karşılaşılan en önemli engel olan KBB, terapötik bileşenlerin çoğunun sistemik dolaşımdan beyine iletiminin kısıtlaması ve bu sebeple hedef bölgedeki ilaç düzeylerinin farmakolojik etki göstermede yetersiz kalmasıdır. KBB, seçici geçirgendir ve toksinler, bakteriler, kimyasallar gibi zararlı bileşenlerin geçişini engeller. Sadece küçük lipofilik moleküller kolayca geçebilmesine izin verirken, neredeyse tüm büyük moleküler ağırlıklı bileşenler (örneğin proteinler, peptitler gibi) ile %98'in üzerinde hidrofilik/küçük molekül ağırlıklı bileşenlerin geçişine izin vermemekte bu ise beyinde düşük biyoyararlanımla sonuçlanır (Arya ve ark. 2019; Hong ve ark. 2019). Bu yüzden uygulanan terapötiklerin KBB'yi geçerek etki gösterebilmeleri için, invaziv ve non-invaziv yöntemler geliştirilmiştir. İnvazif yöntemlerin uygulama zorluğu, güvenli olmaması, kısa ömürlü olması, düşük hasta uyuncu, fazla maliyet gibi dezavantajlarından dolayı non-invaziv yöntemlere odaklanılmıştır. Bu yöntemlerden i.n. uygulama, i.v. veya oral uyglamaya kıyasla pek çok avantajından dolayı araştırmacılar beyne giden alternatif yolları, özellikle i.n.

verilişi araştırdılar. Bu avantajların başında i.n. uygulama ile KBB'yi atlayarak doğrudan MSS'ne erişim sağlanması gelmektedir (Aderibigbe ve Naki 2018; Lomate ve ark. 2019). I.n. uygulama ile burundan beyne direk ulaşım yolağına dair kanıtlar birçok çalışma ile elde edilmiştir. Hidrofilik, yüksek molekül ağırlıklı peptit/proteinler, i.n. ve i.v. yol ile uygulamadan sonra karşılaştırıldıklarında i.n. uygulamadan kısa bir süre sonra beyinde ortaya çıktığını ve i.v.'ya kıyasla çok daha yüksek seviyelerde olduğu tespit edilmiştir (Frey ve ark. 1997).

Genel olarak, i.n. yol uygulamasında araştırılan protein insülindir, bunu oksitosin ve hipokretin-1 takip eder. Bu iyi karakterize edilmiş peptitler, MSS'deki reseptörlerinin geniş dağılımı nedeniyle burada önemli düzenleyici fonksiyonlara sahiplerdir ve pek çok sayıda klinik çalışma, bilişsel ve davranış bozuklukları, narkolepsi, nörolojik ve diğer çeşitli bozukluklara karşı tedavideki potansiyellerini göstermiştir (Samaridou ve Alonso 2018).

Sağlık alanında katılımcılarında yapılan bir çalışmada, 8 hafta boyunca i.n. insülin uygulaması ile akut olarak ve 1 hafta sonra hatırlanması gereken bir kelime listesine dayalı olarak, bildirimsel hafıza görevinde performansı iyileştirdiği görülmüştür (Freiherr ve ark. 2013). Başka bir araştırmada, nazal yoldan uygulanan peptit ve proteinlerin farmakolojik etkileri, i.n. yol ile insülin uygulamasından sonra AH hastalarında hafızanın iyileştiği gösterilmiştir. Yine bu çalışmada deneğin burnuna insülin püskürtülmesinin ardından insülin nazal mukozaya girer ve olfaktör reseptör hücrelerinin akson demetleri boyunca hücre dışı olarak taşınarak hipokampusa ve beynin diğer bölgelerine ulaştığı tespit edilmiştir (de la Monte 2013; Freiherr ve ark. 2013). Böylece i.n. uygulama yöntemiyle uygulanan insülinin, KBB'yi atlayarak doğrudan beyne girdiğini ve uygulamayı takiben 30-40 dakika sonra beyin omurilik sıvısı (BOS)'ta biyolojik olarak ilgili konsantrasyonlarda saptandığını göstermiştir. Bu uygulama yolu periferik yan etkiler olmadan MSS'de insülin seviyelerinin arttırılabildiğini göstermiştir (de la Monte 2013; Feng ve ark. 2018).

Wang ve ark. (2006), yaptıları bir çalışmada peptit yapılı maddelerin nazal yol ile dağıtımını sağlayabilmek için aminli jelatin mikroküreler hazırlamışlardır. Gerçekleştirdikleri in vitro çalışmalar; hazırlanan mikro kürelerin, doğal jelatin mikro kürelerle karşılaştırıldığında daha yavaş salım yaptığını göstermiştir. Hazırlanan mikroküreler, sıçanlara nazal yoldan toz ve süspansiyon şeklinde uygulandığında

süspansiyon halindeki mikrokürelerin önemli bir hipoglisemik etkiye yol açmadığı, toz halindeki mikrokürelerin ise plazma glikoz seviyelerinde önemli bir düşüşe neden olduğu görülmüştür. Aynı zamanda toz mikrokürelerin mutlak biyoyararlanımı süspansiyon mikrokürelere göre oldukça yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni; toz mikrokürelerin hidrojel yapıları nedeniyle nazal yoldan su çekerek epitelyal membranın geçici olarak dehidrate etmesi ve sıkı bağlantıların açılmasına yol açması olarak gösterilmiştir. Amine jelatin mikroküreler, mukoadeziv özellikleri nedeniyle makromoleküller için yeni bir taşıyıcı sistem olarak önerilmektedir (Wang ve ark. 2006).

2.4. KARBON KUANTUM NOKTALARI (KKN)

2.4.1. KKN'ler ve Genel Özellikleri

Kuantum noktaları (KN), ilk olarak yarı iletkenler ve koloidal çözeltiler üzerinde araştırma yapan Louis Brus tarafından New Jersey'de bir laboratuvarda keşfedilmiş ve "küçük yarı iletken kristalitler" terimi olarak ilk defa 1983-1984 yıllarında yayınlanan iki makalede kullanılmıştır (Brus 1983). KN'ler, grup II-VI veya III-V elementlerden oluşan birkaç atom büyüklüğüne sahip nanometre boyutunda (nm) yarı iletken kristaller olarak bilinen nanotaşıyıcılardır. Boyutları hazırlanılışlarında kullanılan materyallere bağlı olmakla beraber genellikle 2-10 nm arasında değişebilmektedir. Bu nanoyapılar dışarıdan bir lazer kaynağı ile uyarıldıklarında geniş UV absorpsiyon spektrumunda dar bir bant emisyonu vermekte, parlak floresans ve yüksek fotostabilite göstermektedir (Kuang ve ark. 2011; Jha ve ark. 2018).

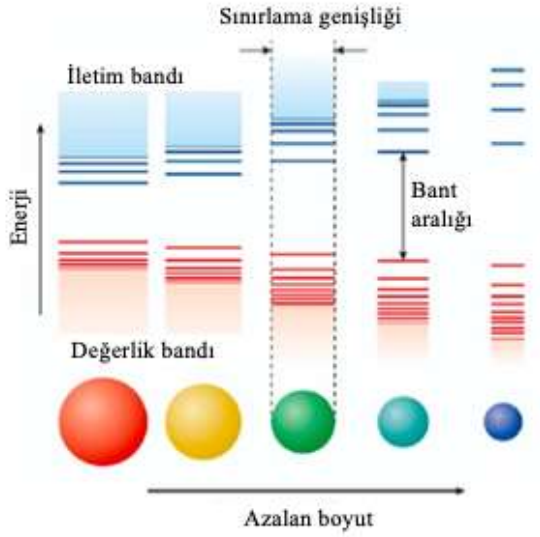
Geleneksel KN'lerin çoğu yapısında ağır metal grubunda yer alan ve toksik etkilere sahip kadminyum, selenyum gibi metaller içeren bileşiklerden (ZnSe, CdTe, CdSe, CdS) oluşturulmaktadır (Zhao ve ark. 2013). Bu metallerle hazırlanan KN'ler yüksek toksisite, çevre ve biyolojik sistemlere zararlı olmaları nedeniyle karbon temelli düşük toksisite, düşük maliyet ve çevre dostu olan karbon kuantum noktalarının (KKN) üretimine odaklanmışlardır (Rosenthal ve ark. 2011).

2.4.1.1. KKN'leri Yapısı ve Optik Özellikleri

Atomlar proton, nötron ve elektrondan oluşmaktadırlar. Proton ve nötron atomun çekirdeğini oluştururken elektronlar belirli yörüngelerde hareket ederler. Bu yörüngelerin atom çekirdeğine olan mesafesi *enerji seviyesi* olarak tanımlanır ve enerji seviyeleri normal kristallerde/malzemelerde birbirine oldukça yakındır.

Valans bandı (değerlik bandı); elektronların çekirdek etrafında bulundukları bölgedir ve bu bandın üstünde yer alan enerji seviyesi ve aralığına *bant boşluğu* denir. Bant boşluğunun hemen üzerinde yer alan bir enerji seviyesi bulunmakta ve *iletkenlik bandı* olarak tanımlanmaktadır. Dışarıdan elektronlara bir uyaran gelmediği takdirde belli bir hızda kendi yörüngelerinde hareket etmektedir yani sistem dengede olmaktadır. Dışardan bir uyaran ile uyarılmış bir elektron üst yörüngelere sıçradığı zaman kendi değerlilik bandındaki yeri boş kalır ve değerlilik bandına geri dönerken sahip olduğu enerjiyi boşaltmak için ışınım yapar. Elektronun uyarılması için gereken enerji ne kadar ise (yani bant boşluğu ne kadar büyükse) geri dönerken yaydığı enerji de o kadar fazla olur (Wang ve Tang 2020). Yani uyarılan elektron değerlilik bandına dönerken bazen ışık saçmaktadır ve bu ise uygun koşullar altında floresan renkleri görmemizi sağlanmaktadır. Her malzemenin uyarıldığı (absorpladığı) farklı bir enerji frekansı ve aynı şekilde yaydığı (emisyon) enerji frekansı aralığı bulunmaktadır. Böylece floresan maddeler uyarıldıklarında farklı renkler yaymış olurlar (Narayanan ve Peter 2012). KN'lerde de aslında değerlik, bant boşlukları ve iletkenlik bantlarnın prensipleri aynıdır. Ancak, kristal yapıda uyarılmış atomla, boşluk arasındaki mesafeye **'Bohr uyarım çapı',** elektron-boşluk çiftine ise **'uyarım (eksitasyon)'** denir (Wang ve Tang 2020; Cassidy ve Zamkov 2020).

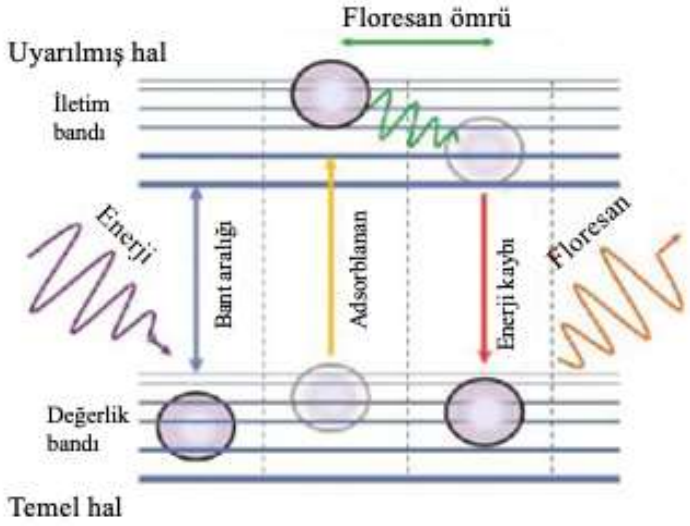
Kristal bir yapıya ait elektronların iç tarafa doğru hareket edebilecekleri mesafe var iken dış tarafa doğru kristal şeklinin sınırlandırılması bulunmaktadır ve kristal yapı ne kadar küçültülürse içe hareket edebileceği mesafe o kadar azalır. Eğer bu mesafe Bohr uyarım çapına eşit ya da daha küçük hale gelirse elektronların rahat dolaşabilecekleri yer kalmaz, küçük bir boşlukta hapsolur ve enerji seviyeleri arasında ayrılmaya neden olur **(Şekil 2.15).** Bu ayrık enerji seviyelerine ait duruma da **'kuantum sınırlaması (sıkışması)'** denilmektedir (Bawendi ve ark. 1990; Reimann ve Manninen 2002; Berends ve Mello Donega 2017).



Şekil 2.15 Kuantum sınırlaması etkisinden dolayı KKN'nin enerji seviye ayrımı şeması (Berends ve Mello Donega 2017).

Kuantum sınırlaması, KN'lerde üç boyutta da meydana gelmekte ve burada sıkışan elektron enerjisini üst seviyelere çıkarak harcayamadığı için dıştan gelen küçük bir uyaran, KN'lerin kinetik enerjisinın artmasına ve dalga boyunu kısalmasına neden olur. Böylece elektronun yaptığı ışımanın rengi değişir ve daha parlak ışıma görülür. Özetle, kristalin boyutu Bohr uyarım çapına ne kadar yaklaşırsa veya onun altına indirilebilirse, malzemenin renginin değişir, floresan özelliği ortaya çıkar (Frecker ve ark. 2016; Chinnathambi ve Shirahata 2019).

KKN'lerin bu optik özellikleri boyut dağılımı, yapısı, şekli ve malzeme bileşimi gibi pek çok faktörden etkilenmektedir. KKN'ler uyarılmış halden temel hale dönerken enerjisini foton şeklinde kaybeder. Bu fotonun dalga boyu, spektrumun görünür bölgesine tekabül eder **(Şekil 2.16)** (Murphy ve ark. 2005; Wang ve ark. 2006).



Şekil 2.16 KN'lerin elektronik yapısı ve ışık mekanizmasının absorbsiyonu ve emisyonu. (Murphy ve ark. 2005).

2.4.1.2. KKN'lerin Avantajları ve Dezavantajları

Avantajlar:

- Küçük partikül boyutu, yüksek parlaklık, yüksek fotostabilite özelliğine sahiptir. Böylece görüntüleme ve eş zamanlı izlemeye izin verir.
- Sahip oldukları küçük boyutlar nedeniyle hücre zarı, sıvı karışımlar, polimer matrisler dahil olak üzere birçok ortama enjekte edilebilirler.
- Çok yönlü yüzey modifikasyonlarına izin verir.
- Terapötiklerin hedeflenmesinde birden fazla bağlanma alanı sağlayan yüksek spesifik yüzey alanlarına sahiptir. Böylece terapötiklerin salımında avantajlı hale gelmektedir.
- Geleneksel boyalara göre floresan özelliği hem daha uzun sürmekte hem de daha düşük maliyette sahiptir.
- Nanokristal yapıya sahip olmaları, saçılımın artması nedeniyle elektron mikroskobunda görüntülemede iyi kontrast sağlar.
- IR'den UV'ye büyüklüklerine göre ayarlanabilir emisyonlara sahiptir (Jha ve ark. 2018; Badıllı ve ark. 2020).

Dezavantajlar:

- KKN'ler ile ilgili yapılan çalışmaların az sayıda olması nedeniyle biyosensör uygulamaları net açıklanamamaktadır.
- Floresan emisyonlarının kökeni geniş çapta tartışılmaktadır ancak halen net bir çalışma bulunmamaktadır.
- KKN'lerin sentezi sırasında kullanılan farklı sentez yöntemleri karbonlu agregasyonlara neden olabilmektedir.
- Çözünürlük ve spesifik uygulamalar için kritik olan yüzey özellikleri sentez yöntemlerine göre değişmesine neden olabilmektedir.
- KKN'lerin sentezinde kullanılan bazı yöntemler güçlü asitler veya organik çözücüler içermektedir ve bu karmaşık proseslere neden olabilmektedir (El-Shabasy ve ark. 2021).

2.4.2. KKN'lerin Uygulama Alanları

KN'ler veya KKN'ler olarak bilinen yarı iletken nanokristaller, biyosensörler, ışık yayan diyotlar, fotodedektörler ve doğa bilimleri gibi farklı uygulama alanlarında kullanılmaktadır. Bunların yanında biyolojik sistemlerde ise; hücrelerin izlenmesi, hayvanlarda tümörlein *in vivo* görüntülenmesi, hücre proteinlerinin farklı floresan özellikte işaretlenmesi, gen teknolojisi gibi pek çok alanda dikkat çekmeyi başarmışlardır.

Gao ve ark. (2008) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise farelere *in vivo* olarak KN'lerin uygulanmasının ardından yapılan 24 saatlik incelemede hayvanları sakrifiye etmeden beyin kısımlarının görüntülenmesi gerçekleştirebilmiştir. Ayrıca bu çalışmada KN'lerin AH ve beyin tümörü gibi hastalıkların tedavisinde biyolojik ortamdaki stabiliteleri, yüksek yükleme kapasiteleri, biyolojik bağlanma aktiviteleri ve yüzey değişikliklerine olan yatkınlıkları açısından önemli oldukları vurgulanmıştır (Guo ve ark. 2008). Yuan ve ark. (2010) tarafından KN'lerin ilaç salımında kullanılmasına yönelik gerçekleştirilen bir çalışmada antikanser ajanının folik asit ve kitozan ile çevrelenmiş ZnO yüklü KN'ler sayesinde yüksek ilaç yükleme kapasitesine ulaşıldığı ve başlangıçta hızlı sonrasında kontrollü salım elde edildiği rapor edilmiştir. Değim ve Kadıoğlu (2013) ise ketoprofen ve deksketoprofen yüklü ZnO-KN'lerin deriden

geçişlerini değerlendirilmiş ve KN'lerin kullanımı ile deriden penetre olan ilaç miktarında artış gözlemlenmiştir.

2.4.3. KKN'lerin Analizlerinde Kullanılan Teknikler

Hazırlanan KKN'lerin analizleri; geçirimli elektron mikroskobu (Transmission Electron Microscope, TEM), taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM), dinamik ışık saçılımı (Dynamic Light Scattering, DLS) veya atomik güç mikroskobu (Atomic Force Microscope, AFM) kullanılarak boyutları ve morfolojileri hakkında bilgi edinilebilmektedir. Yüzey kimyalarının anlaşılabilmesi için NMR, X-Ray fotoelektron spektroskopisi veya analitik ultrasantrifüj metodları kullanılabilmektir. UV-VIS veya fotolüminesans (PL) spektroskopi, konfokal mikroskop ile optik karakterizasyonları ve üç boyutlu yapıları tayin edilebilmekte ve Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) ile de KN'lerin yapısal olarak değerlendirilebilmektedir (Drbohlavova ve ark. 2009; Yang ve ark. 2011).

2.4.4. KKN'lerin Kuantum Verimi (Φ)

Kuantum verimi (Φ); yayılan foton sayısının, absorbe edilen foton sayısıa oranı olarak tanımlanmaktadır. Bu oran, cihaz ayarlarından bağımlı değildir ve bir floroforun uyarma ışığını floresansa ne kadar verimli bir şekilde dönüştürdüğünü açıklar. 0,5 M H_2SO_4-kinin sülfat çözeltisi için hem absorbans hem de floresan emisyonu 360 nm uyarma(eksitasyon) spektrumları ölçülür ve absorbansları kaydedilir. Ardından değişen konsantrasyonlardaki kinin sülfat-sülfürik asit çözeltileri ölçülerek floresan-intensite grafiği elde edilir. Aynı prosedür hazırlanan formülasyon için de uygulanır ve floresan intensity grafiği elde edilir. Elde edilen sonuçlar kuantum verimi formülündeki yerine yerleştirilerek kuantum verimi hesaplanır (Sadjadi 2021);

Kuantum verimi= {m(test)/m(kinin sülfat)}*A

A=(refraktif indeks-su/ refraktif index-0,1M sülfürik asit)=0,99939985

[refraktif indeks-su=1,3325; refraktif indeks-0,1M sülfürik asit=1,3333]

2.4.5. KKN'lerin Hazırlama Yöntemleri

Nano boyutta olan karbon temelli kuantum noktaları kimyasal reaksiyonlarla veya atom/moleküllerin belirli bir düzen içinde sıralanmasıyla elde edilir. Bu tür kuantum noktaların üretimi, başlangıç malzemesine göre iki gruba ayrılabilir:

-aşağıdan yukarıya (kimyasal) yöntemler
-yukarıdan aşağıya (fiziksel) yöntemler **(Tablo 2.1).**

Aşağıdan yukarıya yöntemler; temelde bir dizi küçük molekülün kimyasal reaksiyon yoluyla KKN'lerin eldesi sağlanır. Yukarıdan aşağıya yöntemlerde ise makromoleküller fiziksel yöntemlerle yok edilir veya küçük boyutlu KKN'lere dağıtılır (Wang ve ark. 2019).

Tablo 2.1 KKN'lerin Üretim Yöntemleri

Aşağıdan yukarıya (kimyasal) metotlar	Yukarıdan aşağıya (fiziksel) metotlar
Mikrodalga sentez	Lazer ablasyon
Hidrotermal yöntem	Ark deşarjı
Piroliz yöntem	Elektrokimyasal metot

2.4.5.1. Yukarıdan Aşağıya Yöntemler

Ark Deşarjı Yöntemi

Ark deşarj yöntemi, ham karbon nanotüp kaynağından, karbon noktaları geliştirmek için kullanılmaktadır. Ham materyale karboksil gruplarını dahil etmek için HNO ile oksitlenmesinin ardından NaOH/bazik pH 8,4 çözeltisi ile ekstre edilerek koyu renkli stabil bir süspansiyon elde edilir. Ekstre edilen maddeyi saflaştırabilmek amacıyla jel elektroforezi uygulanır. Bu yöntemle hazırlanan KKN'ler düşük verime sahiptir ve saflaştırılması zordur (Singh ve ark. 2018). Ark deşarjı yöntemi ile KKN'lerin hazırlanması 2004 yılında Xu ve ark. tarafından ortaya çıkmıştır. Xu ve ark. (2004) ark deşarj yöntemiyle tek duvarlı karbon nanotüpleri hazırlarken kazayla 365 nm'de mavi-yeşil, sarı ve turuncu floresan özelliklere sahip üç çeşit karbon nanoparçacık elde etmiştir. Bu farklı floresan özelliklerin KKN'lerin yüzeyini hidrofilik karboksil gruplarının eklendiğini göstermiştir. Bu yöntemle elde edilen KKN'ler suda

iyi çözünürlüğe sahiptir, fakat farklı boyutlarda karbon parçacıklarından oluştuğu için büyük bir parçacık boyutu dağılımına sahiptirler. Büyük partikül boyutu KKN'lerin spesifik yüzey alanını büyük ölçüde azalmasına neden olacaktır. Ulaşılabilir yöntemler arasında yer almasına rağmen düşük kuantum verimi ve zorlu koşullar içermektedir (Jha ve ark. 2018; Wang ve ark. 2019).

Lazer Ablasyon Yöntemi

Lazer ablasyon yöntemi; hedefin yüzeyini ışınlamak için yüksek enerjili bir lazer darbesi kullanımına dayanmaktadır. Sun ve diğerleri, başlangıçta bir karbon hedefi hazırlamak için bir çimento ve grafit tozu karışımını ısıtmış, ardından 900 °C ve 75 kPa'da su buharı taşıyan bir argon gazı akışında karbon hedefinin lazer ablasyonu yoluyla KKN'leri üretmiştir (Singh ve ark. 2018). Bu yöntem dar boyut dağılımına, iyi suda çözünürlüğe ve floresan özelliklerine sahip KKN'leri hazırlamak için etkili bir yöntemdir. Ancak karmaşık çalışması ve yüksek maliyeti, uygulamasını sınırlar (Wang ve ark. 2019).

Elektrokimyasal Yöntem

Hou ve ark. (2015), sodyum sitrat ve ürenin deiyonize su kullanılarak elektrokimyasal karbonizasyonu ile ortalama partikül boyutu 2,4 nm olan mavi floresan özellikli KKN'ler hazırlamışlardır. Hazırlanan bu KKN'ler atık suda Hg^{+2} için kullanılan hassas bir dedektör olarak kullanmışlardır (Hou ve ark. 2015). Bu yöntem normal sıcaklık ile basınç koşullarında gerçekleştirilebilen kullanışlı, fotolüminesans özelliği ayarlanabilir, basit bir hazırlama tekniğidir (Deng ve ark. 2014; Anwar ve diğerleri, 2019). Stabil, mevcut yoğunluk değiştirilerek karbon noktalarının kapsamı yönetilebilir, suda çözünür karbon noktası hazırlanabilmesine izin vermesine rağmen düşük kuantum verimine sahip, kompleks bir yöntemdir (Wang ve ark. 2019).

2.4.5.2. Aşağıdan Yukarıya Yöntemler

Mikrodalga Sentez Yöntemi

Mikrodalga sentez yöntemi, numuneye ısı enerjisinin doğrudan iletimiyle moleküllere derinlemesine nüfuz etmesini sağlamaktadır. Böylece bu yöntem ile enerji tasarrufu, yüksek verim, hızlı, iyi tekrarlanabilirlik, düşük safsızlık, gelişmiş güvenlik, kısa reaksiyon süresi, çevre dostu, kontrollü boyut ve sıcaklık, düşük maliyetli olması gibi pek çok avantaj sağlanmaktadır. Yapılan bir çalışmada PEG200 ve sakkaritlerin

şeffaf sulu çözeltisi hazırlanmış ve 2-10 dk 500 W'ta mikrodalga yöntemiyle ısıtılmıştır. Elde edilen KKN'ler 330-460 nm dalga boyları arasında incelendiğinde floresan özellik sergiledikleri görülmüştür (Wang ve ark. 2019).

Wang ve ark. (2019) nitrojen katkılı KKN'leri (N-KKN) elde etmek için 0,5 g p-aminosalisilik asit (PAS), 5 mL formamid içerisinde çözdükten sonra mikrodalga vialine aktararak 180°C'de 30 dk reaksiyona bırakmış. Reaksiyon sonunda N-KKN'lerin şeffaf renkli çözeltisi 365 nm UV altında bakıldığında parlak floresan özellik gösterdiği görülmüştür. Elde edilen N-KKN'ler hem hücre içi görüntülemede hem de insan-insülin fibrilasyonuna karşı yüksek verimli bir inhibitör olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir (Wang ve ark. 2020).

Hidrotermal Yöntem

Hidrotermal yöntemi ile doğal bir kaynağın sulu çözeltilerinin, doğrudan yüksek sıcaklıklarda ısıtılarak KKN'lerin eldesine dayanmaktadır. Bu yöntem, dehidrasyon, polimerizasyon, pasivasyon, karbonizasyon olarak dört önemli basamağı kapsayabilir. Ramar ve ark. Pomelo suyunu (*Citrus maxima* veya *Citrus grandis*) 7 saat boyunca 200 ^{o}C'de hidrotermal yönteme tabi tutarak, fotokatalitik ajan olarak etkili olan doğal-KKN'ler elde etmişlerdir (Nair ve ark. 2020).

Başka bir çalışmada gliserol ve süksinik asit herhangi bir baz veya asit ilavesi olmadan 6 saat boyunca 250^{o}C'de hidretermal yönteme tabi tutulmuştur. Hatta reaksiyon süreleri değiştiirlerek yapılan deneme sonuda kuantum verimi %11 ve %7 olan sırasıyla mavi ve yeşil floresan gösteren KKN'ler elde etmişlerdir. Mavi floresan gösteren KKN'ler, demir iyonu (Fe^{+2}) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) tespitinde sensör olarak kullanılmıştır. Ayrıca elde edilen KKN'lerin hücre görüntüleme testinde biyouyumluluğu yüksek olması nedeniyle hazırlanan bu KKN'ler kimyasal ve hücre içi problar olarakta umut vaad ettiklerini kanıtlamışlardır (Nair ve ark. 2020). Hidrotermal yönteminin; basit, kolaylıkla kontrol edilebilmesi, enerji açısından verimli olması, ekonomik ve toksik olmayan doğal-KKN'lerin eldesine yol açması sebebiyle kabul görmektedir. Ancak uzun işlem süreleri, yüksek sıcaklıkta fırın gerektirmesi, düşük kuantum verimi gibi bazı önemli dezavantajları da bulunmaktadır (Nair ve ark. 2020; Wang ve ark. 2020).

Piroliz Yöntemi

Piroliz yöntemi, yüksek sıcaklık altında perkürsörlerin karbonizasyonu sonucu KKN'lerin eldesine dayanmaktadır. Hazırlanacak KKN'ler; dehidrasyon, polimerizasyon, karbonizasyon işlemleri ardından gerçekleşir. Niu ve ark. (2014)'nın yaptıkları bir çalışmada L-glutamik asit perkürsör olarak kullanılmış olup ısıtma mantosu içerisinde 200°C'de 5 dk boyunca ısıtılmıştır. Bunu takiben L-glutamik asidin sıvılaştığını ve çözeltinin rengi berraktan kahverengiye değişerek KKN'lerin oluştuğu görülmüştür. Benzer şekilde başka bir çalışmada ise karpuz kabuğu kullanılmış olup taze karpuz kabukları, 220°C'de havada 2 saat ısıl işlem ile karbonize edilmiş ve elde edilen ürün su içinde dağıtılmıştır. Daha sonra 30 dk sonike edilerek süzme ve diyaliz işlemleri gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen KKN'ler suda çok iyi çözünürlük sergilemiş ve mavi floresan özellik sergilediği görülmüştür (Chan ve ark. 2018). Piroliz yöntemi basit, kısa sentez sürelerine sahip olamasına rağmen eşit olmayan ısıtma nedeniyle basit piroliz ölçeğinin büyütülmesi zordur (Chan ve ark. 2018).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler **Tablo 3.1**'de verilmiştir.

Tablo 3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Adı	Markası	Ülke
Sitrik asit monohidrat	Merck	Almanya
L-sistein	Daejung	Kore
İnsülin	Apidra Solostar	Fransa
Metil selüloz (4000 cp)	Sigma Aldrich	İsviçre
Polietilen glikol 3350	Sigma Aldrich	İsviçre
Poloksamer 407 (Pluronik F127)	BASF	Almanya
NaOH	Merck	Almanya
HCl	Merck	Almanya
Etanol	Tekkim	Türkiye
Lowry Protein Kiti	Bio-Basic	Kanada

3.1.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan cihaz ve malzemeler **Tablo 3.2**'de verilmiştir.

Tablo 3.2 Cihaz ve Malzemeler

Cihaz Adı	Marka	Ülke
Hasssas terazi	Shimadzu	Japonya
Manyetik Karıştırıcı	Daıhan Scientific	Güney Kore
Mikrodalga Sentez Reaktör	AntonPaar Monowave 300	Almanya
Partikül Analiz Cihazı (Zetasizer)	AntonPaar Litesizer 500	Almanya
Cary Eclipse Floresan Spektrofotometre	Agilent Teknolojileri	ABD
Reometre	Brookfield HA DV3T	ABD
Doku Analiz Cihazı	Brookfield CT3	ABD
TEM	Carl Zeis EM 900 ODTÜ	Almanya
Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop	Leica TCS-SPE DETAM	Almanya
Buzdolabı	Arçelik	Türkiye
Etüv	ElektroMag	Türkiye
pH metre	Mettler Toledo	ABD
UV el lambası	Camag	İsviçre
Vorteks	Wisemix	Portekiz

ELISA Reader (spektrofotometre)	Epoch-BioTek	ABD
Stabilite Test	Test kabinleri	Türkiye
PTFE 0.22 μm filtre	Merck Milipore	Almanya
Mikropipet (10-100 μl)	Eppendorf	Almanya
Mikropipet (20-200 μl)	Eppendorf	Almanya
Mikropipet (100-1000 μl)	Eppendorf	Almanya

3.1.3. Kullanılan Bilgisayar Programları

Tez çalışmasında kullanılan bilgisayar programları **Tablo 3.3'te** verilmiştitr.

Tablo 3.3 Kullanılan bilgisayar programları

Program Adı
Microsoft Office 2013
Rheocalc T
Texturepro CT

3.2. Yöntem

3.2.1. KKN'lerin Hazırlanması

KKN'lerin boyutları ve yüzey özellikleri üretim metotlarından etkilenmektedir. KKN'ler temel olarak; bir karbon kaynağının çeşitli yöntemlerle karbonizasyonuna dayanmaktadır (Mirtchev ve ark. 2012). Bu karbon kaynakları, sodyum sitrat, askorbik asit, sitrik asit, glukoz, grafit ve çeşitli maddeler kullanılabilmektedir (Tsai ve ark. 2016; Zhu ve ark. 2014; Dutta ve ark. 2012; Zhang ve ark. 2015; Kwon ve ark. 2014; Huang ve ark. 2014; Thambiraja ve Shankarana; 2016). KKN'lerin üretimi için aşağıdan yukarıya metodlardan birisi olan mikrodalga sentezi sahip olduğu yüksek verim, kısa süre, iyi tekrarlanabilirlik gibi avantajları nedeniyle seçilmiştir. Literatür taramaları sonucunda farklı karbon kaynakları kullanılarak en kolay modifiye edilen teknik ile ön çalışma olarak KKN hazırlamıştır ve 365 nm UV altında değerlendirilmiştir (Woosung ve ark. 2015). Bununla ilgili gerçekleştirilen ön çalışma örnekleri farklı sıcaklık (100 ^{o}C'den başlayarak 10 derece artışlarla 160 ^{o}C'ye) ve sürelerde (10 dk-30 dk arasında 5dk artışlarla) denenmiştir ve ön formülasyon içeriği aşağıdaki tabloda verilmiştir **(Tablo 3.4).**

Tablo 3.4 KKN'lerin elde edilemesi için ön formülasyon çalışmaları

	Formülasyon içeriği
1.	$C_6H_7NO_4$ (0,2 g) - H_3BO_3 (0,02 g) - $C_2H_8N_2$ (0,02 g) - d.su (1 ml)
2.	Maloik asit (0.1 g) - $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.005 g) - d. su (1 mL)
3.	$C_6H_8O_7H_20$ (0.2 g) - NH_4Cl (0.05 g) - d.su (1 mL)
4.	$C_6H_8O_7H_20$ (0.2 g) - $C_{27}H_{42}NO_2Cl$ (0.1 ml) - d.su (1 mL)
5.	$C_6H_8O_7H_20$ (0.2 g) - $ClHO_3S$ (0.1 ml)- d.su (1 mL)
6.	$C_6H_8O_7H_20$ (0.2 g) - LiCl (0.1 ml) - d.su (1 mL)
7.	$C_6H_8O_7H_20$ (0.2 g) - CH_4N_2O (0.1 g) - d.su (1 mL)
8.	Kolloidal gümüş (0.01 ml) - d.su (1 mL)
9.	$C_6H_8O_7H_20$ (0.2 g) - $C_6H_{15}NO_3$ (0.5 ml) - d.su (1 mL)
10.	$C_6H_8O_7H_20$ (0.2 g) - $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (0.05 g) - d.su (1 mL)

11. $C_6H_8O_7H_20$ (0.2 g) - $C_{12}H_{18}C_{l2}NOS$ (0.1 g) - d.su (1 mL)
12. $C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - $C_8H_{11}N$ (0.05 ml) - d.su (1 mL)
13. $C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - $C_3H_7NO_2S$ (0,05 g) - $CuSO_4$ (0,1g) - d.su (1 ml)
14. $C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) – Albümin (0.01 ml) – d.su (1 ml)
15. $C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) -PEG3350 (0.05 g) - d.su (1 mL)
16. $C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) – H_3BO_3 (0.02 g) - CH_4N_2O (0.01 g) – d.su (1 ml)
17. $C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - PVP (0.05 g) - d.su (1 mL)
18. $C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - PVP (0.025 g) - $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.025 g) - d.su (1 ml)
19. $C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.005 g) - d.su (1 mL)
20. $C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.005 g) – PEG3350 (0,02 g) - d.su (1 mL)
21. $C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.005 g) - PEG3350 (0,02 g) – MS (0,02 g) - d.su (1 mL)
22. $Na_3C_6H_5O_7$ (0,2 g) - $ZnCl_2$ (0,02 g) - $C_2H_8N_2$ (0,02 g) - d.su (1 mL)
23. $C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - $ZnCl_2$ (0,02 g) - $C_2H_8N_2$ (0,02 g) - d.su (1 ml)
24. $Na_3C_6H_5O_7$ (0,2 g) - $CuSO_4$ (0,02 g) - $C_2H_8N_2$ (0,02)- d.su (1 mL)
25. $C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - $MgCl_2$ (0,02 g) - $C_2H_8N_2$ (0,02 g)- d.su (1 mL)
26. $C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - $ZnCl_2$ (0,02 g) - $C_2H_8N_2$ (0,02 g) - d.su (1 mL)
27. $C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - $CuSO_4$ (0,02 g) - $C_2H_8N_2$ (0,02 g) - d.su (1 mL)
28. $Na_3C_6H_5O_7$ (0,2 g) - $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.005 g) - d.su (1 mL)
29. $Na_3C_6H_5O_7$ (0,2 g) - insulin (1 mL) - d.su (1 mL)
30. $Na_3C_6H_5O_7$ (0,2 g) - $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.005 g) - PEG3350 (0,02 g) - d.su (1 mL)
31. $Na_3C_6H_5O_7$ (0,2 g) - $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.005 g) - MS (0,02 g) - d.su (1 mL)
32. $Na_3C_6H_5O_7$ (0,2 g) - $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.005 g) - PEG3350 (0,02 g) - MS (0,02 g) - d.su (1 mL)
33. $Na_3C_6H_5O_7$ (0,2 g) - $ZnCl_2$(0,1 g)- $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.005 g) - d.su (1 mL)

34.	$C_6H_8N_2$ (1 ml) - CH_3NO (1 ml) - d.su (1 mL)

($C_6H_7NO_4$ = 4-aminofenol, H_3BO_3 = Borik asit, $C_2H_8N_2$ = Etilendiamin, $C_3H_4O_4$ = Malonik asit, $C_6H_8O_7H_2O$ = Sitrik asit monohidrat, $C_{27}H_{42}NO_2Cl$ = Benzalkonyum klorür, $ClHO_3S$ = Klorosülfonik asit, LiCl = Lityum klorür, CH_4N_2O = Üre, NH_4Cl = Amonyum klorür, $C_6H_{15}NO_3$ = Trietanolamin, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ = Amonyumheptamolibdat, $C_{12}H_{18}C_{l2}NOS$ = Tiaminhidroklorür , $C_8H_{11}N$ = Feniletilaminhidroklörür, $CuSO_4$ = Bakır II sülfat, $C_6H_8N_2$ = p-fenilendiamin, $C_3H_7NO_2S$ = l-sistein, $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ = kitozan, PEG3350 = polietilen glikol, PVP = polivinil pirolidon, MS = Metil selüloz, $Na_3C_6H_5O_7$ = Sodyum sitrat, $ZnCl_2$ = Çinko klorür, CH_3NO = Formamid, $C_6H_8N_2$ = p-fenilendiamin)

Yapılan ön formülasyon çalışmalarında ilk olarak lüminisans veren karışım ve oranlar belirlenmeye çalışılmıştır. Örneğin albumin ile gerçekleştirilen ön deneylerde iyi sonuçlar alınamamasına rağmen aslında albuminin içindeki l-sistein ve benzeri yapılardan floresan etkinin oluştuğu anlaşılmıştır. Bu sebeple sonraki çalışmalarda l-sistein kullanılarak çeşitli formülasyonlar gerçekleştirilmiştir.

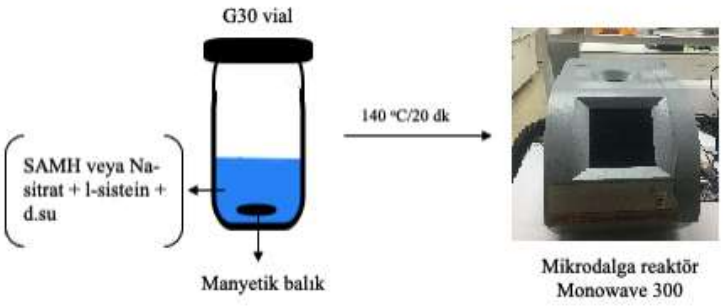
Wang J. ve ark. (2017) yapmış olduğu çalışmada karbon kaynağı olarak sitrik asit monohidrat ve yüzey modifikasyonu olarak dietilen glikol bis(3-aminopropil) eter kullanılarak kuvvetli manyetik karıştırma ve nitrojen koruması altında 400 ^oC'de ısıtılarak yüksek floresan özellikte KKN'leri elde etmişlerdir. Bu KKN'ler mükemmel stabilite sergilemelerinin yanında genetik bozulma olmaksızın hücre ve doku görüntülemede kullanılabilmişlerdir (Wang ve ark. 2017) Kumar P. ve ark. (2020)'ları mikrodalga sentez etkinliğini belirlemek amacıyla sitrik asit monohidrat, üre ve distile suyla hazırlanan çözeltiyi 500 rpm'de 700 W güç seviyesinde farklı sürelerde reaksiyona bırakmışlar. Reaksiyon sonrasında elde edilen KKN'lerin floresan özelliklerinin ısı sürelerindeki artışa göre değiştiklerini göstermişlerdir (Kumar ve ark. 2020). Bir başka çalışmada Copur F. ve ark. (2019)'ları selüloz nanoliflerinden yapılmış nanokağıtları, sentezlenen KKN'ler ile biraraya getirilerek fotolüminesans özellik kazandırmışlar. Burada kullanılan KKN'ler sitrik asit ve etilendiamin maddeleri ile belirli reaksiyon şartlarında hazırlandıktan sonra yardımcı maddelerin ilavesi ve son basamakta l-sistein maddesi ile işlevselleştirilmesi ile gerçekleştirilmiş (Copur ve ark. 2019).

Yapılan bu ve buna benzer literatür taramalarından ve yukarıda yapılan ön formülasyon çalışmalarından yola çıkılarak 0,1 g'dan 0,4 g' a kadar değişen miktarlarda SAMH veya Na-sitrat flakonlara aktarılmıştır. Her birine 1 ml distile su ilave edilerek çözünmesi sağlandıktan sonra 0,005 g l-sistein eklenerek iyice çözünene kadar manyetik karıştırıcıda bırakılmıştır **(Tablo 3.5)**.

Tablo 3.5 KKN'lerin sentezi için kullanılan formülasyon çalışmaları

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
SAMH	0,1 g	0,2 g	0,3 g	0,4 g	-	-	-	-
Na-sitrat	-	-	-	-	0,1 g	0,2 g	0,3 g	0,4 g
l-sis	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g
d.su	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Hazırlanan bu formülasyonlar sırayla G30 vialine aktarılarak mikrodalga reaktör cihazına yerleştirilmiştir **(Şekil 3.1).** Daha sonra cihaz 0-140°C: 5 dakika, karıştırma devir sayısı: 500 dev./dak., 140°C'de 15 dakika bekleme ve soğutma programına ayarlanmıştır.



Şekil 3.1 Formülasyonların mikrodalga reaktör cihazında hazırlanmasının şematik gösterimi ve mikrodalga reaktör cihazı

Reaksiyon sonrası G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 ve G8 nolu örnekler UV (365 nm) lambası altında değerlendirildikten sonra pH değerleri pH metre (Mettler Toledo) cihazı ile ölçülmüştür. Elde edilen pH değerlerine göre nazal mukoza pH'sına uygun hale getirebilmek için asidik pH'ya sahip olan SAMH içeren G1, G2, G3 ve G4 nolu formülasyonlara uygun miktarlarda katı NaOH kimyasal maddesi yavaşça manyetik karıştırıcıda eklenmiştir. Böylece SAMH yapısında bulunan -COOH gruplarındaki -OH'lara Na'lar bağlanarak ortamda sitrat tuzlarını oluşturmuştur. Suda çözünür olan sitrat tuzlarını uzaklaştırabilmek için ise soğuk etanol (C_2H_5OH) eklenerek çöktürülmesi sağlanmıştır. Bu çöktürme işlemi 3-4 defa tekrarlanmıştır **(Şekil 3.2).** Son olarak eklenen C_2H_5OH'ı ortamdan uzaklaştırabilmek için uçurma işlemi gerçekleştirimiş ve pH değerleri tekrar ölçülmüştür. Elde edilen yeni çöktürülmüş formülasyonları F1, F2, F3 ve F4 olarak isimlendirilmişlerdir.



Şekil 3.2 Çöktürme uygulanan formülasyon örnekleri

Alkali pH'ya sahip olan Na-sitrat içeren G5, G6, G7 ve G8 formülasyolarında ise zaten ortamda Na-sitrat tuzu halinde bulunmasından dolayı sadece soğuk C_2H_5OH ilavesi ile 3-4 defa çöktürülmüştür. Ardından C_2H_5OH'ı uzaklaştırabilmek için uçurma işlemi uygulanmıştır. Çöktürme işlemi sonucu nötr aralığa gelen formülasyonlar 0,1N HCl eklenerek nazal mukoza pH aralığına indirilmiştir. Elde edilen yeni çöktürülmüş ve pH ayarlanmış formülasyonlar F5, F6, F7 ve F8 olarak isimlendirilmişlerdir.

3.2.2. KKN'lerin Verimi (Φ)

Elde edilen KKN'lerin verimi Cary Eclipse Floresan Spektrofotometre cihazı yardımıyla 0,5 M H_2SO_4-kinin sülfat çözeltisi kullanılarak absorbans ve floresan emisyonu 360 nm uyarma spektrumları ölçülmüş ve absorbansları kaydedilmiştir. Aynı çözücünün floresan spektrumunu (Floresan intensite-dalga boyu grafiği) 10 mm floresan küvetine konularak ölçülmüştür. Daha sonra değişen konsantrasyonlardaki kinin sülfat-sülfirik asit çözeltileri ölçülerek floresan-yoğunluğu grafiği elde edilmiştir. Aynı prosedür hazırlanan formülasyon için de uygulanmış olup floresan yoğunluğu (intensite) grafiği elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kuantum verimi formülündeki yerine yerleştirilerek kuantum verimi aşağıdaki eşitlikte verilmiştir:

Kuantum verimi= {m(test)/m(kinin sülfat)}*A

A=(refraktif indeks-su/ refraktif index-0,1M sülfürik asit)=0,99939985

[refraktif indeks-su=1,3325; refraktif indeks-0,1M sülfürik asit=1,3333]

3.2.3. KKN'lerle İnsülin Kompleksinin Hazırlanması ve Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.3.1. KKN'lerle İnsülin Kompleksinin Hazırlanması

Hazırlanan KKN'lerle insülin kompleksinin hazırlanabilmesi için öncelikle nazal mukoza pH değerine uygun aralığa getirilmesi gerekmektedir. pH değerleri uygun aralığa getirildikten sonra Apidra insülin (Solostar)'dan 100 U/ml olacak şekilde hazırlanan tüm formülasyon serilerine 1:1 oranında ilave edilmiştir. Daha sonra bu formülasyonları manyetik karıştırıcıda ışıktan uzak oda sıcaklığında 6 saat karışıma bırakılmıştır.

3.2.3.2. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı

Partikül büyüklüğü dağılımı yani polidispersite indeksi (PDI); heterojenlik indeksi olarak da bilinmekle beraber nano boyuttaki yapıların partikül büyüklüğü dağılımını ifade etmektedir. PDI'nın sayısal değerinin 0,1-0.30 arasında olması dar bir boyut dağılımını yani homojen bir dağılımı ifade etmekte ve istenilen aralığı göstermektedir. PDI'nın sayısal değerinin 0,5'ten büyük olması geniş çaplı partiküllerin bulunmasına veya agregat oluşumuna bağlı geniş bir partikül boyutu dağılımı anlamına gelmektedir (Luan ve ark. 2015; Özkahraman ve ark. 2014).

Hazırlanan insülin KKN kompleksi (Ins-KKN) formülasyonlarının partikül boyutlarını ve dağılımlarını belirleyebilmek amacıyla Anton Paar Litesizer 500 cihazının küvetine konularak 25ºC'de ölçümler gerçekleştirilmiştir. Her bir formülasyondan 10'lu tekrardan oluşan toplam 3'er ölçüm yapılmıştır. Elde edilen boyut ölçüm verileri 3 ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Ölçümler hazırlanan tüm Insülin KKN kompleksi içeren formülasyonlar ve karar verilen son formülasyon için yapılmıştır.

3.2.3.3. Zeta Potansiyel Tayini

Hazırlanan tüm Ins-KKN'lerin ve karar verilen son formülasyonun zeta potansiyellerini tayin edebilmek amacıyla elektroforetik ışık saçılımı yöntemi kullanılmıştır. Ölçümler Anton Paar Litesizer 500 cihazında Ω şekilli kapiler küvetine konularak yüksek oranda hassasiyet ile gerçekleştirilmiştir. Her bir formülasyondan

10'lu tekrardan oluşan toplam 3'er ölçüm yapılmıştır. Elde edilen zeta potansiyel verileri 3 ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

3.2.3.4. Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) Görüntüsü Tayini

Elde edilen veriler sonucunda karar verilen uygun formülasyon belirlendikten sonra bu formülasyonun yüksek çözünürlüklü transmisyon elektron mikroskobu (HR-TEM) ile morfolojik yapıları ve partikül büyüklükleri hakkında bilgi edinilmesi sağlanmıştır. HR-TEM temelde çok ince bir örnek içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesi prensibine dayanmaktadır. Yüksek ayırma gücüne sahiptir ve aynı anda kırınım ve görüntü bilgilerinin alınabilmesine olanak tanımaktadır. HR-TEM analizlerinde; Ortadoğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarından hizmet alınarak modeli Carl Zeis EM 900 olan cihaz kullanılmıştır. Böylece daha önce gerçekleştirilen görüntüleme çalışmalarına ilave olarak yeni görüntüler elde edilmiştir.

3.2.4. In situ Jellerin Hazırlanması

Soğukta hazırlama metodu doğrultusunda %40 (a/h) P407 çözeltisi için uygun miktarda tartılan P407, +4^{o}C'de soğuk su eklendikten sonra 1 gece buzdolabında bekletilmiştir. Daha sonra bu çözeltiden %15, %18, %20 ve %25 (a/h) konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlanarak vilallere aktarılmıştır. Daha sonra SAMH ve Na-sitrat kullanılarak hazırlanan KKN'lerin insülin kompleksiyle elde edilen Ins-KKN'lerin pH değerleri uygun olarak ayarlanandıktan sonra yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda olacak şekilde P407 çözeltileri ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcıda belirli sürede karıştırılarak buzdolabına kaldırılmıştır.

3.2.4.1. Sol-Jel Sıcaklıklarının (Tsol-jel) Belirlenmesi

Hazırlanan formülasyonların ve P407 içeren çözeltilerin jelleşme sıcaklıklarını belirleyebilmek için 1'er ml alınan örnekler viallere aktarılmıştır. Hazırlanan vialler manyetik karıştırıcı üzerine bırakıldıktan sonra sıcaklık 20^{o}C'den başlayarak 5^{o}C/dk. olacak şekilde arttırılmış ve termometre ile takip edilmiştir **(Şekil 3.3).** Viallerin ters çevrildiğinde akmanın görülmediği sıcaklık jelleşme sıcaklığı olarak kaydedilmiştir (Abouhussein ve ark. 2018; Ban ve ark. 2017).



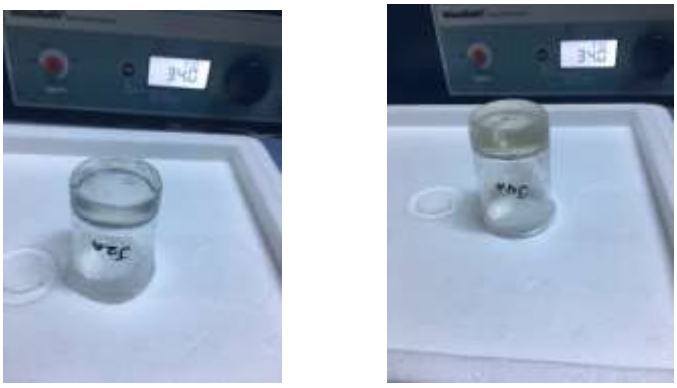


Şekil 3.3 Hazırlanan formülasyonların Tsol-jel belirlenmesi

3.2.4.2. P407 çözeltisinin Tsol-jel Üzerine Ins-KKN ve Yardımcı Maddelerin Etkisinin İncelenmesi

P407'den hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri (%15-25 a/h) ile Ins-KKN formülasyonlarının jelleşme sıcaklıklarının (Tsol-jel) belirlenmesinin ardından nazal uygulama için en uygun konsantrasyon ile formülasyon saptanmıştır. Bu formülasyona farklı konsantrasyonlarda MS (4000 cp) ve PEG3350 ilave edilmiş ve su banyosunda 34 ^{o}C'de bekletilerek jel oluşumları **Şekil 3.4'te** gösterilmiştir.





Şekil 3.4 Ins-KKN ve farklı konsantrasyonlarda MS, PEG3350 içeren formülasyonların 34 ºC'de su banyosundaki görüntüleri

3.2.4.3. pH Tayini

Hazırlanan formülasyonların belirli zaman aralıklarında, pH değerleri dijital pH metre kullanılarak tayin edilmiştir. Ölçüm öncesi cihaz pH 4 ve pH 7 tamponları kullanılarak kalibre edilmiştir (Viram ve ark. 2012).

3.2.4.4. Reolojik Çalışmalar

Hazırlanan formülasyonların oda sıcaklığındaki (20°C±1) (spindle no: CP-40) ve T sol-gel üzerinde belirlenen sabit sıcaklıktaki (34°C±1) (spindle no: CP-40) viskozite değerleri, koni-plak viskozimetre (Brookfield HA DV3T) cihazı kullanılarak belirlenmiştir **(Şekil 3.5).**



Şekil 3.5 Koni plak viskozimetre (Brookfield HA DV3T) cihazı

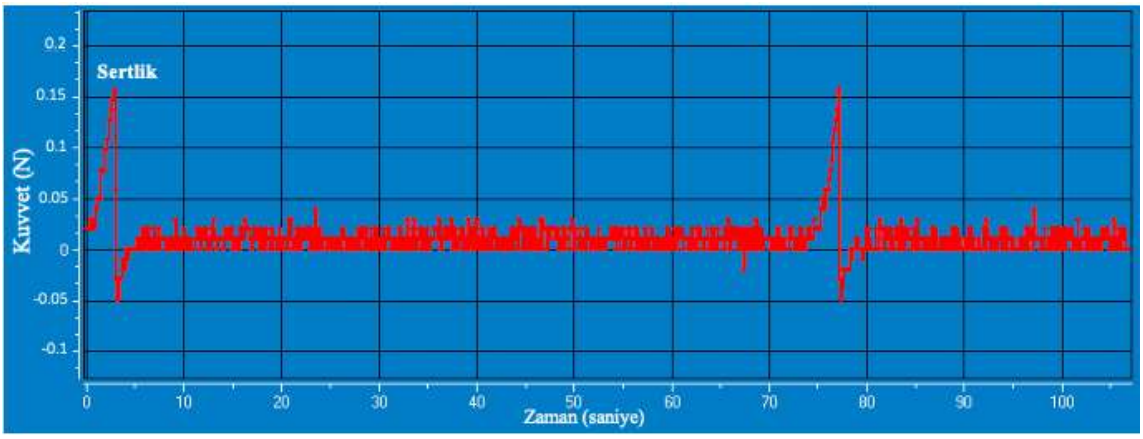
3.2.4.5. Hazırlanan In situ Jellerin Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi

Formülasyonların adezyon, kohezyon, sertlik ve sıkıştırılabililirlik gibi mekanik özellikleri Brookfield CT3 doku analiz cihazı kullanılarak tayin edilmiştir **(Şekil 3.6)**. 25 ml beher içerisinde bulunan 10 g örneğe 12,7 mm çapına sahip silindirik analitik prob (TA5), başlangıç kuvveti 0.01 N olacak şekilde, 2 mm/saniye olarak belirlenen bir hızda daldırılmıştır. Her bir örnekten 34±1°C'de 3 tekrarlı analiz yapıldı. Analiz sonucu güç-zaman eğri grafikleri elde edilmiş olup buradan yola çıkılarak jellerin sahip olduğu mekanik özellikler (sertlik, sıkıştırılabilirlik, adeziflik ve koheziflik) belirlenmiştir. Verilerin toplanması ve hesaplanmasında TexturePro CT V1.6 Build yazılımı kullanılmıştır (Meenakshi ve ark. 2010).



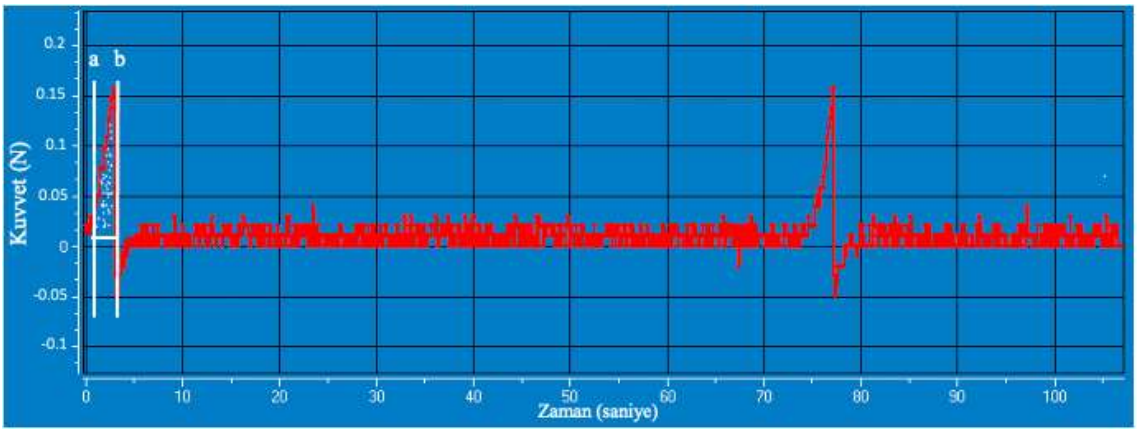
Şekil 3.6 Brookfield CT3 doku analiz cihazı

Jellerin sertliği: Jelin deformasyonunun sağlanabilmesi için gerekli olan kuvvet sertlik olarak tanımlanmaktadır (Yenil ve ark. 2013). Doku analiz cihazında gerçekleştirilen ölçüm sonucunda elde edilen güç zaman eğrisinden yola çıkarak jellerin sertlik değerleri hesaplanmıştır. **Şekil 3.7**'te görüldüğü gibi, probun ilk batma periyodunda saptanan en yüksek güç değeri hazırlanan jellerin deformasyonu için gereken sertlik değerini (Newton, N) vermektedir.



Şekil 3.7 Jellerin sertliğini gösteren kuvvet-zaman eğrisi

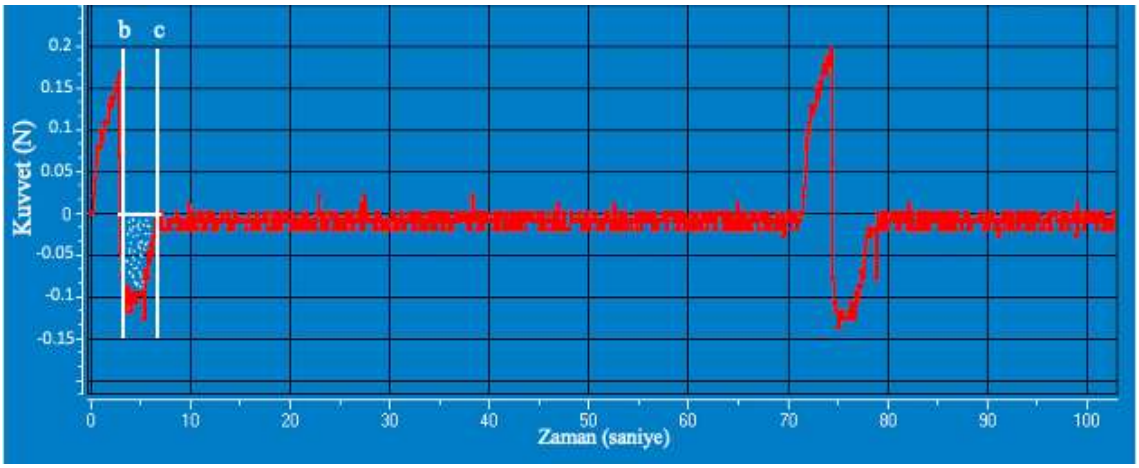
Jellerin sıkıştırılabilirliği: Probun ilk sıkıştırılması sırasında jeli deforme etmek için gereken iş ***sıkıştırılabilirlik*** olarak tanımlanmaktadır tanımlanmaktadır. Doku analiz cihazında gerçekleştirilen ölçüm sonucunda elde edilen güç zaman eğrisinden yola çıkarak probun jel formülasyonuna ilk batma periyodu boyunca elde ettiği eğrinin altında kalan alan (AUC a-b) ile hesaplanmakta olup birimi Newton x mm olarak bulunmaktadır **(Şekil 3.8).** Sıkıştırılabilirlik parametresi hazırlanan jel formülasyonlarının yayılabililiğinin basitliğini ifade etmektedir. Jelin yayılabilirliğini kolaylaştırabilmek amacıyla istenilen sıkıştırılabilirlik değeri düşük olmalıdır (Yenil ve ark. 2013).



Şekil 3.8 Jellerin sıkıştırılabilirliğini gösteren kuvvet-zaman eğrisi

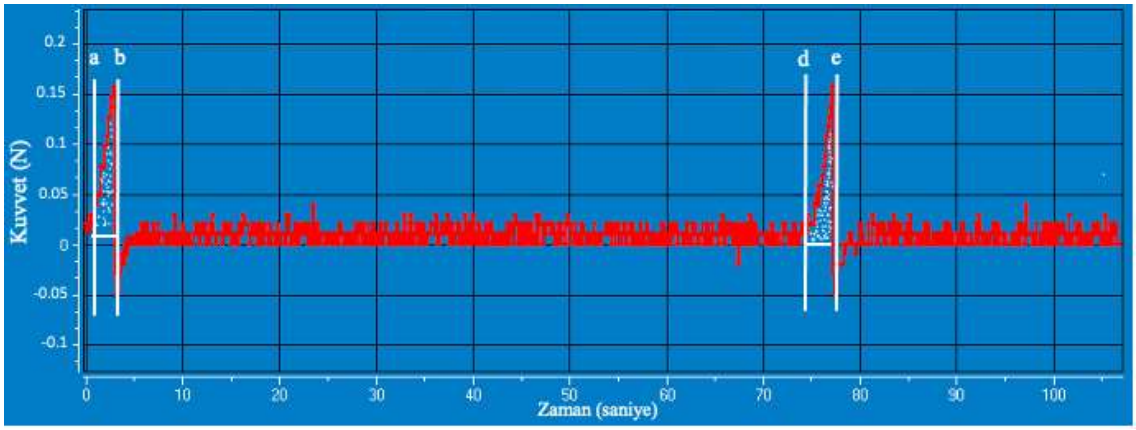
Jellerin adezifliği: Adeziflik, jelin yüzeyi ile probun yüzeyini ayırmak için gereken iş veya prob ile jel yüzeyleri arasındaki çekme kuvvetlerini yenmek için gerekli iş olarak tanımlamaktadır (Yenil ve ark. 2013). Doku analiz cihazında gerçekleştirilen ölçüm

sonucunda elde edilen güç zaman eğrisinden yola çıkarak jellerin adezifliği tespit edilmiştir. Buna göre probun ilk batma periyodundan sonra ilk geri gelme periyodu süresince elde edilen eğrinin altında kalan alan (AUC b-c) adezifliği vermektedir. Birimi Newton x mm olarak bulumaktadır. **(Şekil 3.9)**



Şekil 3.9 Jellerin adezifliğini gösteren kuvvet-zaman eğrisi

Jellerin kohezifliği: Doku analiz cihazında gerçekleştirilen ölçüm sonucunda elde edilen güç-zaman eğrisinden yola çıkarak jellerin kohezifliği hesaplanmıştır. Buna göre koheziflik; ikinci batma periyodunda elde edilen eğrinin altında kalan alanın (AUC d-e), ilk batma periyodunda elde edilen eğri altında kalan alana (AUC a-b) oranı ile elde edilmektedir (Jones ve ark. 1997) (**Şekil 3.10)**. Hesaplanan koheziflik değerinin birimi bulunmamaktadır (Yenil ve ark. 2013).



Şekil 3.10 Jellerin kohezifliğini gösteren kuvvet-zaman eğrisi

3.2.4.6. Nazal In situ Jel Formülasyonlarında *In vitro* Salım Çalışması

Ins-KKN noktalarının jelleşme sıcaklığı bulunması için farklı konsantrasyonlarda P407 çözeltisi ile karıştırılması sonucunda nazal mukoza için uygun sıcaklıkta jelleşen formülasyon F20, yani %20 P407 konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Daha sonra bu formülasyondan yola çıkılarak viskozite ve mekanik özelliklerin belirlenmesi için çalışmalara gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak *in vitro* ve *ex vivo* deneyleri için kullanılacak formülasyon J4 olarak karar verilmiş olup *in vitro* salım profilleri Franz Difüzyon Hücre metoduyla selofan membran kullanılarak gerçekleştirilmiştir **(Şekil 3.11).**



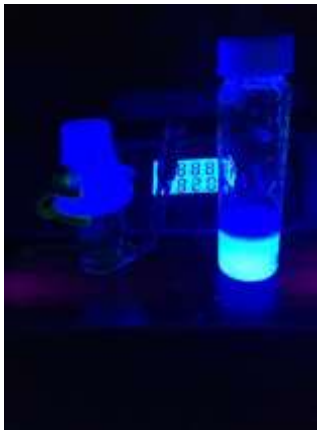
Şekil 3.11 Salım deneyinde selofan membran kullanılan Franz hücrelerinin kısımlarının şematik gösterimi

Bu amaçla 6 adet Franz hücresine selofan membranlar uygun boyutta yerleştirilmiştir. Manyetik ısıtıcılı su banyosunda nazal mukoza sıcaklığı olan 32 ^{o}C ve 300 rpm dönme hızına ayarlandıktan sonra hücrelerin reseptör kompartmanı pH 7.4 izotonik fosfat tampon çözeltisiyle doldurulmuştur. Hazırlanan hücreler sıcaklık istenilen dereceye geldiğinde, 1 ml hacimdeki formülasyon donör kompartımana konulmuştur. Donör kompartmanın üst kısmı, formülasyonda yer alan çözücünün uçmasını önlemek için parafilm ile kapatılmıştır. Reseptör çözelti örnekleri, reseptör kompartmanının örnekleme kolundan 1., 3., 6., 9., 12. saatlerde 1'er ml örnekler çekilerek ependorflara aktarılmış ve buzdolabına konulmuştur **(Şekil 3.12).**

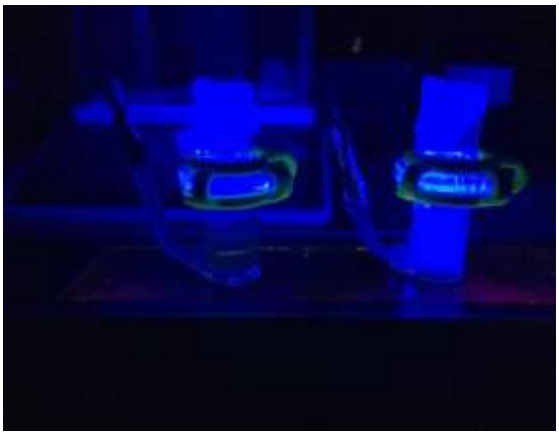


Şekil 3.12 *In vitro* salım çalışmasında belirli zaman aralıklarında alınan örnekler

t=0 anında UV altında J4 nolu formülasyona ait stok ve reseptçr hücresinin UV 365 nm altındaki görüntüsü **Şekil 3.13'te** verilmiştir. t=6. sa'te örnek almadan hemen önce sadece insülin çözeltisi içeren reseptör hücresi ile J4 nolu formülasyonu içeren reseptör hücresinin UV altındaki görüntüsü **Şekil 3.14'de** verilmiştir.



Şekil 3.13 t=0 anında J4 ve stok vialdeki formülasyonların UV 365 nm altındaki görüntüsü



Şekil 3.14 t=6. sa'deki J4 ve insülin çözeltisinin UV 365 nm altındaki görünütüsü

Çalışmada deney boyunca reseptör çözelti hacmini sabit tutmak için hücreler numune alındıktan sonra reseptör çözeltileri ile tekrar doldurulmuştur. Çalışma sonunda alınan örnekler Lowry metodu kullanılarak Elisa Reader cihazında analiz edilmiştir. Sonuçlar *ex vivo* çalışmasının anlatıldığı kısımda ortalama±SD (n=3) olarak verilmiştir. Sonuçlar zamana karşı % çıkan (salınan) ilaç grafikleri olarak gösterilmiştir Salım sonuçları kinetik olarak 0. Derece, 1. Derece ve Higuchi kinetiklerine göre uyumları değerlendirilmiştir.

Kullanılan yöntemin analitik metot validasyonu için incelenen parametreler aşağıda verilmiştir: (ICH Harmonised Tripartite Guideline 1995)

- Doğrusallık (linearity)
- Doğruluk ve geri elde (accuracy and recovery)
- Seçicilik (specifity)

- Doğrusallık (linearity):

Analitik yöntemin doğrusallığı, Çalışılan konsantrasyon aralığında elde edilen test sonuçlarının test içerisindeki ilgili madde/etkin madde konsantrasyonuyla doğru orantıya sahip olmasıdır (ICH Harmonised Tripartite Guideline 1995). BSA proetein standardından 100 µg/ml olacak şekilde stok hazırlanmıştır. Bu stok çözeltisinden yola çıkılarak **Tablo 3.6'deki** gibi kuyucuklara eklenmiştir. Final konsantrayonları 0-100 µg/ml arasında olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra A ve B solüsyon karışımlarından her kuyucuğa 100 µl eklenerek oda sıcaklığında bekletilmiştir. En son her kuyucuğa 10 µl folin-fenol reaktifi eklenip karıştırılmıştır. Ardından 30 dakika oda

sıcaklığında bekletilmiştir Elisa reader cihazında 750 nm'de okutularak elde edilen absorbans değerlerine karşı konsantrasyon değerleri arasındki ilişki regresyon analizi ile incelenmiş ve doğru denklemi çizilerek korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Lowry protein assay kiti kullanılarak n=3 defa tekrarlı çalışılmıştır.

Tablo 3.6 BSA standart protein prosedür tablosu

Kuyular / **Solüsyonlar**	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
H_2O (µl)	20	18	16	14	12	10	8	6	4	2	0
Diluted BSA (µl)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
BSA final konsantrayonu (µg/ml)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

Daha sonra aynı işlemler alına konsantrasyonları formülasyon örneklerine aşağıdaki gibi uygulanmıştır;

- Formülasyon örnekleri 1:5 oranında seyreltilmiştir.
- Seyreltilen formülasyonlardan her bir kuyucuğa 20 µl konulmuştur.
- Negatif kontrole ek olarak başka bir kuyucuğa 20 µl H_2O eklenmiştir.
- 6 µl Solüsyon A'yı 0.3 ml Solüsyon B ile karıştırdıktan sonra, her kuyuya 100 µl karışım aktarılmış, ardından oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir.
- Her kuyucuğa 10 µl Folin-fenol reaktifi eklenerek karıştırılmıştır ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir.
- Elisa Reader cihazında 750 nm absorbansta ölçümleri yapılmıştır.
- Elde edilen ölçüm sonuçları BSA standart denkleminde yerine konularak protein numunesinin orijinal konsantrasyonunu hesaplanmıştır.

- Doğruluk ve Geri Elde:

Elisa reader ile gerçekleştirilen ölçüm sonucu saptanan madde miktarı ile örnek içerisindeki gerçek etkin madde miktarının birbirine yakınlığıdır. Uygulanan yöntemin doğruluğunun kanıtlanabilmesi için konsantrasyonu bilinen örneklerin analizi yapılarak değerlendirilmiştir. Kullanılan metodun doğruluğu geri elde etme yüzdesine bağlıdır ve

elde edilen değer %95 olasılıkla daha önceden kabul edilen aralıkta olmalıdır (ICH Harmonised Tripartite Guideline 1995). Doğrusallık çalışmasından elde edilen doğru denklemi kullanılarak formülasyondaki insülin konsantrasyonu hesaplanmıştır. Yöntemin doğruluğu % geri elde değerleri hesaplanarak belirlenmiştir.

-Seçicilik:

Kullanılan Lowry protein kitinde sadece analiz edilmesi istenilen maddeyi saptayabilmesi yani insülinin saptanabilmesi seçicilik olarak ifade edilmektedir (ICH Harmonised Tripartite Guideline 1995). Bunun için etkin madde içermeyen çözelti (sadece reaktifler ve etkin madde yerine distile su) hazırlanarak aynı dalga boyunda aynı absorbans değeri verip vermediğinin kontrolü yapılmıştır.

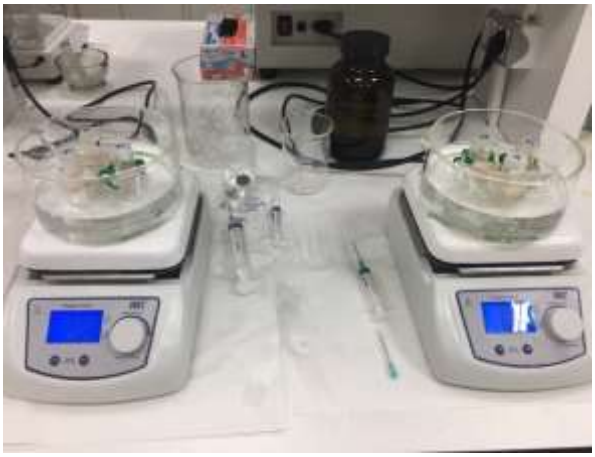
3.2.4.7. Nazal In situ Jel Formülasyonlarında *Ex vivo* Geçiş Çalışması

In vitro çalışmada kullanılan Franz Difüzyon Hücre Metodu *ex vivo* çalışma içinde kullanılmıştır. Kesimhaneden alınan koyun kafalarından nazal mukoza ayrıldıktan sonra temizlenerek buzdolabında bir gece bekletilmiştir. **(Şekil 3.15)**



Şekil 3.15 *Ex vivo* geçiş çalışmaları için nazal mukoza örneklerinin hazırlanması

Ertesi gün Franz difüzyon hücrelerine uygun şekilde kesilmesinin (2.84 cm^2) ardında 6 adet nazal mukoza, mukazal yüzeyi donör faza bakacak şekilde iki faz arasına yerleştirilmiştir**.** Manyetik ısıtıcılı su banyosunda nazal mukoza sıcaklığı olan 32 ^oC ve 300 rpm dönme hızına ayarlandıktan sonra hücrelerin reseptör kompartmanı pH 7.4 izotonik fosfat tampon çözeltisiyle doldurulmuştur. Hazırlanan hücreler sıcaklık istenilen dereceye geldiğinde, 1 ml hacimdeki formülasyon donör kompartımana konulmuştur. Donör kompartmanın üst kısmı, formülasyonda yer alan çözücünün uçmasını önlemek için parafilm ile kapatılmıştır **(Şekil 3.16).**



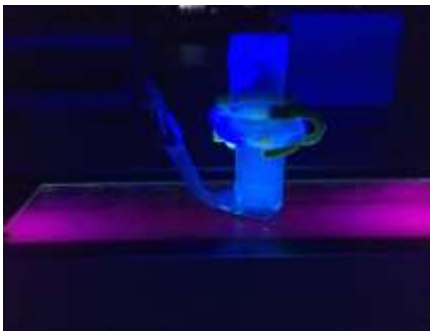
Şekil 3.16 Salım deneyinde nazal membran kullanılan Franz hücrelerinin kısımlarının şematik gösterimi

Reseptör çözelti örnekleri, reseptör kompartmanının örnekleme kolundan 1., 3., 6., 9., 12. saatlerde 1'er ml örnekler çekilerek ependorflara aktarılmıştır **(Şekil 3.17).**



Şekil 3.17 *Ex vivo* geçiş çalışmasında belirli zaman aralıklarında alınan örnekler

t=6. sa'te örnek almadan hemen önce sadece insülin çözeltisi içeren reseptör hücresi ile J4 nolu formülasyonu içeren reseptör hücresinin UV altındaki görüntüsü **Şekil 3.18'de** verilmiştir.



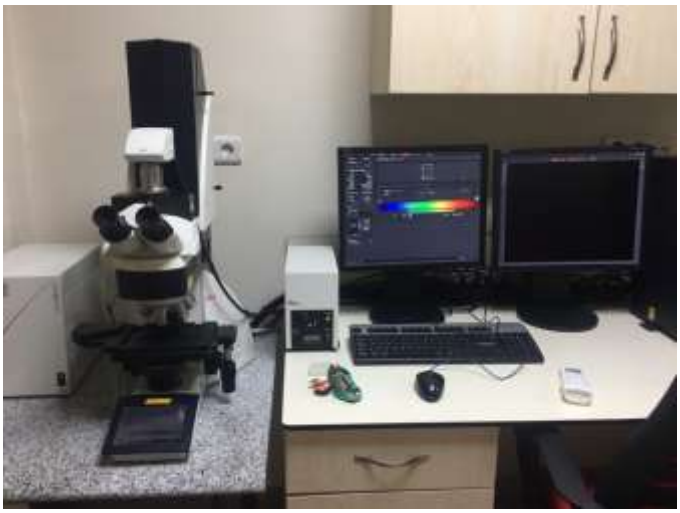
Şekil 3.18 t=6 sa anında J4V formülasyonun UV (365 nm) altında görüntüsü

Çalışma süresi boyunca reseptör çözelti hacmini sabit tutmak için hücreler numune alındıktan sonra reseptör çözeltileri ile tekrar doldurulmuştur. Çalışma sonunda hazırlanan örnekler Lowry metodu için süzülerek viallere aktarılmıştır. Lowry metodu uygulanırken kullanılarak Elisa Reader cihazında analiz edilmiştir. Sonuçlar zamana karşı %çıkan (salınan) ilaç grafikleri olarak gösterilmiştir. Sonuçlar ortalama±SD (n=3) olarak verilmiştir. Salım sonuçları kinetik olarak 0. Derece, 1. Derece ve Higuchi kinetiklerine göre uyumları değerlendirilmiştir.

3.2.4.8. Nazal Mukozanın Optik Mikroskop ve Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopta İncelenmesi

Optik mikroskop ise ışık kaynağından gönderilen görünür dalga boylarındaki ışık demetlerinin incelenecek örnekten geçerek mercekler tarafından büyütülmesi ile kontrast, yoğunluk farklarına göre algılanmasını sağlamaktadır **(Şekil 3.19).**

Lazer taramalı konfokal mikroskop, floresan veya yansıtıcı maddelerle işaretlenmiş hücrelerden veya beyin, kemik, mukoza gibi doku örneklerinden yüksek çözünürlüklü üç boyutlu görüntüleme sayesinde hücre içerisindeki yapıların görünür bir hale gelmesini sağlamaktadır **(Şekil 3.20).** Yani örneğin ya da kesitin farklı derinliklerinden alınan görüntülerin bilgisayar ortamında birleştirilmesiyle üç boyutlu görüntüler elde edilmektedir (Laurent ve ark. 1994).



Şekil 3.19 Leica TCS-SPE markalı lazer taramalı konfokal mikroskop görüntüsü



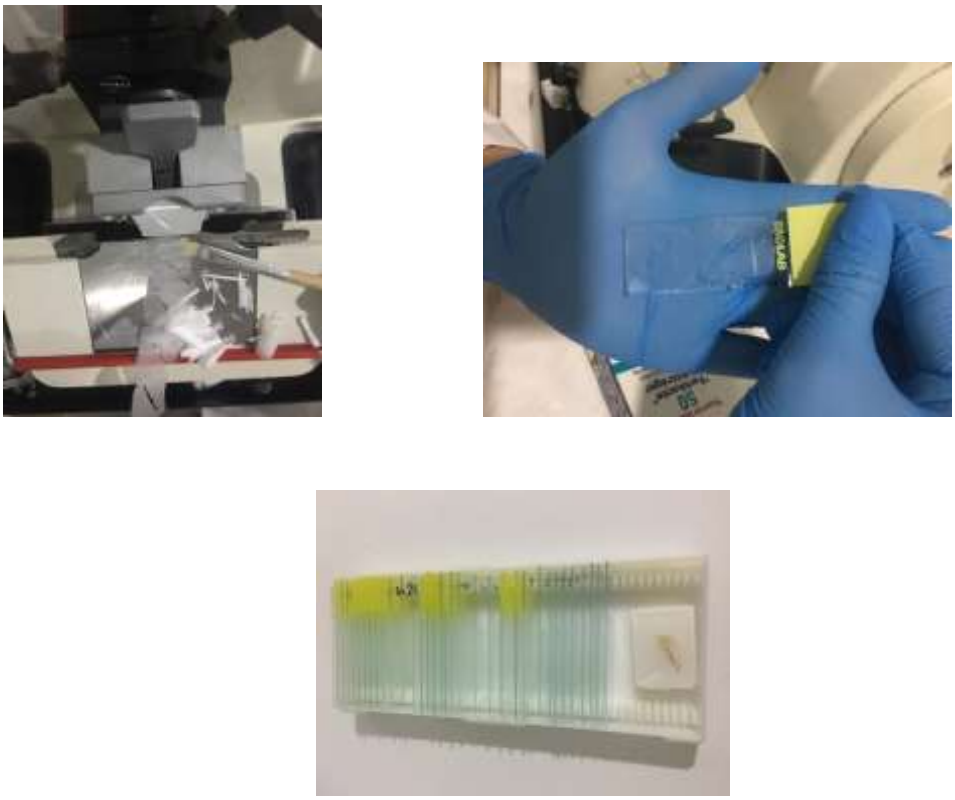
Şekil 3.20 Nikon Eclipse E100 marka Optik mikroskop görüntüsü

12 saatlik *ex vivo* geçiş çalışmaları sonunda nazal mukozalar Lazer Taramalı Konfokal mikroskopta görüntü elde edebilmek amacıyla belirli kalınlıklar halinde kesildikten sonra Biruni Üniversitesi Patoloji Laboratuvarında parafine batırılarak kesit almaya uygun hale getirilmişlerdir. **(Şekil 3.21)**.



Şekil 3.21 Nazal mukozanın kesit almaya hazırlama görüntüleri

Daha sonra 20 µm, 10 µm ve 5 µm kalınlıkta olacak şekilde kesilerek lam üzerine alınmışlardır **(Şekil 3.22).**



Şekil 3.22 Nazal mukoza bloklarının kesilmesi

Hazırlanan örnek kesitler hem İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde yer alan Leica TCS-SPE markalı lazer taramalı konfokal mikroskobu yardımıyla belirli dalga boylarında taramalar yapılarak hemde Biruni Üniversitesi Patoloji Laboratuvarında bulunan Nikon Eclipse E100 marka Optik mikroskop ile incelenerek görüntüler elde edilmiştir. Hazırlanan örneklerden 20 µm kalınlıkta olan kesit optik mikroskop altında 40 büyütme ile incelenmiştir.

3.2.4.9. Kinetik Parametrelerin Hesaplanması

Ins-KKN in situ jel sisteminden *in vitro* salım ve *ex vivo* geçiş çalışmaları sonunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinin ardından çizilen çözünme hızı grafiklerinden formülasyonların hangi salım kinetiğine uyduğu belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla reaksiyon kinetikleri; sıfırıncı derece kinetik, birinci derece kinetik ve Higuchi kinetik modellerine uygulanmıştır. Bunlara ait korelasyon katsayıları hesaplanarak hazırlanan formülasyondan insulin salımına uygun kinetik modeli tespit edilmiştir.

- *Sıfırıncı Derece Kinetik Modeli:*

Zamana (t) karşı çözünmüş etkin madde (Q) miktarı grafiğe geçirildiğinde bir doğru elde edilir ve bu modele göre her bir zaman aralığında formülasyondan çözeltiye geçen etkin madde miktarı sabit olmakta ve denklem aşağıda verilmektedir (Dash ve ark. 2010).

$$Q_t = Q_0 - k_0 t$$

Q_t : t zamanında çözünmüş olan etkin madde miktarı

Q_0 : başlangıç zamanındaki etkin madde miktarı

k_0 : sıfırıncı derece salım sabiti

t : zaman

- *Birinci Derece Kinetik Modeli:*

Zamana (t) karşı çözünmüş etkin madde (Q) miktarının 'ln' değeri grafiğe geçirildiğinde eğimi hız sabitine bağlı şekilde, çözünen madde miktarı üssel olarak azalmakta ve elde edilen denklem aşağıda verilmektedir (Dash ve ark. 2010).

$$\ln Q_t = \ln Q_0 - k_1 t$$

Q_t : t zamanında çözünmüş olan etkin madde miktarı

Q_0 : başlangıç zamanındaki etkin madde miktarı

k_1 : birinci derece salım sabiti

t : zaman

- *Higuchi Kinetik Modeli:*

Salınan etkin madde miktarının kareköküyle orantılı ve elde edilen denklem aşağıda verilmektedir (Gouda ve ark. 2017).

$$Q = k\, t^{1/2}$$

Q : birim yüzeyden salınan ilaç miktarı

k : Higuchi salım hızı sabiti

t : zaman

Salınan etkin madde miktarının kareköküyle orantılıdır (Gouda ve ark. 2017).

3.2.4.10. Formülasyona Ait Fizikokimyasal Stabilitelerinin Değerlendirilmesi

Stabilite; hazırlanan bir formülasyonun ya da ilacın etkin, güvenli ve kaliteli olduğunun göstergelerinden biridir. Stabilite testleri formülasyonun ve etkin maddenin raf ömrü sonuna kadar kimyasal ve fiziksel stabilitesini koruduğunu belirlemek, garanti altına almak ve kanıtlamak amacıyla gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla hazırlanan insülin KKN kompleksleri için 5°C'de buzdolabı ve 25°C±2°C/%60 bağıl nem'de oda sıcaklığında başlangıç, 3. ay, 6. ay olarak belirlenen zaman aralıklarında; son

formülasyon olarak belirlene in situ jel için 5°C'de buzdolabı ve 25°C±2°C/%60 bağıl nem'de oda sıcaklığında başlangıç, 1. ay, 2. ay olarak belirlenen zaman aralıklarında pH değişimleri, partikül büyüklüğü ve dağılımı ile zeta potansiyel değişimleri değerlendirildi (ICH Harmonised Tripartite Guideline 2006).

3.2.4.11. İstatistiksel Değerlendirmeler

Gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilen veriler ikiden fazla karşılaştırma öğesi varsa "one-way ANOVA testi", iki tane karşılaştırma öğesi olduğunda ise "t testi" uygulanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. KKN'lerin Hazırlanması

Yöntem 3.2.1'de yer alan **Tablo 3.4**'teki ön formülasyon çalışmaları sonucu UV altındaki (365 nm) floresan özellikleri **Tablo 4.1**'de verilmiştir.

Tablo 4.1 KKN'lerin elde edilmesi için ön formülasyon çalışmalarının UV (365 nm) altındaki floresan özellikleri

Formülasyon içeriği		Luminesanslık (UV 365 nm)
1.	$C_6H_7NO_4$ (0,2 g) - H_3BO_3 (0,02 g) - $C_2H_8N_2$ (0,02 g) - d.su (1 ml)	Luminesanslık yok
2.	Maloik asit (0.1 g) - $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.005 g) - d. su (1 mL)	Luminesanslık yok
3.	$C_6H_8O_7H_20$ (0.2 g) - NH_4Cl (0.05 g) - d.su (1 mL)	Luminesanslık yok
4.	$C_6H_8O_7H_20$ (0.2 g) - $C_{27}H_{42}NO_2Cl$ (0.1 ml) - d.su (1 mL)	Luminesanslık yok
5.	$C_6H_8O_7H_20$ (0.2 g) - $ClHO_3S$ (0.1 ml)- d.su (1 mL)	Luminesanslık yok
6.	$C_6H_8O_7H_20$ (0.2 g) - LiCl (0.1 ml) - d.su (1 mL)	Luminesanslık yok
7.	$C_6H_8O_7H_20$ (0.2 g) - CH_4N_2O (0.1 g) - d.su (1 mL)	Luminesanslık yok
8.	Kolloidal gümüş (0.01 ml) - d.su (1 mL)	Luminesanslık yok
9.	$C_6H_8O_7H_20$ (0.2 g) - $C_6H_{15}NO_3$ (0.5 ml) - d.su (1 mL)	Luminesanslık yok
10.	$C_6H_8O_7H_20$ (0.2 g) - $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (0.05 g) - d.su (1 mL)	Luminesanslık yok
11.	$C_6H_8O_7H_20$ (0.2 g) - $C_{12}H_{18}Cl_2NOS$ (0.1 g) - d.su (1 mL)	Luminesanslık yok
12.	$C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - $C_8H_{11}N$ (0.05 ml) - d.su (1 mL)	Luminesanslık yok

13.	$C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - $C_3H_7NO_2S$ (0,05 g) - $CuSO_4$ (0,1g) - d.su (1 ml)	Luminesanslık yok
14.	$C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) – Albümin (0.01 ml) – d.su (1 ml)	Mavimsi yeşil floresan
15.	$C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) -PEG3350 (0.05 g) - d.su (1 mL)	Luminesanslık yok
16.	$C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) – H_3BO_3 (0.02 g) - CH_4N_2O (0.01 g) – d.su (1 ml)	Mavi floresan
17.	$C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - PVP (0.05 g) - d.su (1 mL)	Mavi floresan
18.	$C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - PVP (0.025 g) - $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.025 g) - d.su (1 ml)	Mavi floresan
19.	$C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.005 g) - d.su (1 mL)	Mavi floresan
20.	$C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.005 g) – PEG3350 (0,02 g) - d.su (1 mL)	Mavi floresan
21.	$C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.005 g) - PEG3350 (0,02 g) – MS (0,02 g) - d.su (1 mL)	Mavi floresan
22.	$Na_3C_6H_5O_7$ (0,2 g) - $ZnCl_2$ (0,02 g) - $C_2H_8N_2$ (0,02 g) - d.su (1 mL)	Mavi floresan
23.	$C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - $ZnCl_2$ (0,02 g) - $C_2H_8N_2$ (0,02 g) - d.su (1 ml)	Mavi floresan
24.	$Na_3C_6H_5O_7$ (0,2 g) - $CuSO_4$ (0,02 g) - $C_2H_8N_2$ (0,02)- d.su (1 mL)	Mavi-yeşil renk
25.	$C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - $MgCl_2$ (0,02 g) - $C_2H_8N_2$ (0,02 g)- d.su (1 mL)	Yeşil renk
26.	$C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - $ZnCl_2$ (0,02 g) - $C_2H_8N_2$ (0,02 g) - d.su (1 mL)	Yeşil renk
27.	$C_6H_8O_7H_2O$ (0.2 g) - $CuSO_4$ (0,02 g) - $C_2H_8N_2$ (0,02 g) - d.su (1 mL)	Yeşil renk

28.	$Na_3C_6H_5O_7$ (0,2 g) - $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.005 g) - d.su (1 mL)	Yeşil floresan
29.	$Na_3C_6H_5O_7$ (0,2 g) - insulin (1 mL) - d.su (1 mL)	Yeşil floresan
30.	$Na_3C_6H_5O_7$ (0,2 g) - $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.005 g) - PEG3350 (0,02 g) - d.su (1 mL)	Yeşil floresan
31.	$Na_3C_6H_5O_7$ (0,2 g) - $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.005 g) - MS (0,02 g) - d.su (1 mL)	Yeşil floresan
32.	$Na_3C_6H_5O_7$ (0,2 g) - $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.005 g) - PEG3350 (0,02 g) - MS (0,02 g) - d.su (1 mL)	Yeşil floresan
33.	$Na_3C_6H_5O_7$ (0,2 g) - $ZnCl_2$(0,1 g)- $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ (0.005 g) - d.su (1 mL)	Sarı renk
34.	$C_6H_8N_2$ (1 ml) - CH_3NO (1 ml) - d.su (1 mL)	Kırmızı

($C_6H_7NO_4$ = 4-aminofenol, H_3BO_3 = Borik asit, $C_2H_8N_2$ = Etilendiamin, $C_3H_4O_4$ = Malonik asit, $C_6H_8O_7H_2O$ = Sitrik asit monohidrat, $C_{27}H_{42}NO_2Cl$ = Benzalkonyum klorür, $ClHO_3S$ = Klorosülfonik asit, LiCl = Lityum klorür, CH_4N_2O = Üre, NH_4Cl = Amonyum klorür, $C_6H_{15}NO_3$ = Trietanolamin, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ = Amonyumheptamolibdat, $C_{12}H_{18}C_{l2}NOS$ = Tiaminhidroklorür , $C_8H_{11}N$ = Feniletilaminhidroklörür, $CuSO_4$ = Bakır II sülfat, $C_6H_8N_2$ = p-fenilendiamin, $C_3H_7NO_2S$ = l-sistein, $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ = kitozan, PEG3350 = polietilen glikol, PVP = polivinil pirolidon, MS = Metil selüloz, $Na_3C_6H_5O_7$ = Sodyum sitrat, $ZnCl_2$ = Çinko klorür, CH_3NO = Formamid, $C_6H_8N_2$ = p-fenilendiamin)

Ön formülasyon çalışmalarından yola çıkarak hazırlanan G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 ve G8 nolu formülasyonlar mikrodalga reaktör cihazında reaksiyona bırakılmıştır. Reaksiyondan sonra UV (365 nm) lambası altında bakıldığında G1, G2, G3 ve G4 nolu formülasyonların mavi floresan, G5, G6, G7 ve G8 nolu formülasyonların ise yeşil floresan verdiği görülmüştür **(Şekil 4.1).**



Şekil 4.1 Formülasyonların UV lambası (365 nm) altında görüntüleri

Reaksiyon sonrası elde edilen KKN'lerin pH değerleri tablo halinde verilmiştir. **(Tablo 4.2)**.

Tablo 4.2 Reaksiyon sonucu KKN'lerin pH değerleri

Formülasyonlar	pH değerleri
G1	2,58
G2	2,53
G3	2,50
G4	2,31
G5	11,25
G6	11,30
G7	12,15
G8	12,35

pH değerleri ayarlanmış tüm formülasyonlar F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 ve F8 olarak isimlendirilmişlerdir. Tüm formülasyonların son pH değerleri **Tablo 4.3.**'te verilmiştir.

Tablo 4.3 Nazal mukoza pH'sına uygun hale getirilen formülasyon pH değerleri

Formülasyonlar	pH değerleri
F1	5,60
F2	5,64
F3	5,70
F4	5,75
F5	6,10
F6	6,25
F7	6,26
F8	6,36

4.2. KKN'lerin Kuantum Veriminin Hesaplanması

F5, F6, F7 ve F8 nolu formülasyonlarının UV lambası altında (365 nm) göstermiş olduğu yeşil floresan gücün zaman geçtikçe azalmasında dolayı verim hesabına katılmamıştır. Na-sitrattan hazırlanan bu formülasyonların yeşil floresan özelliğini

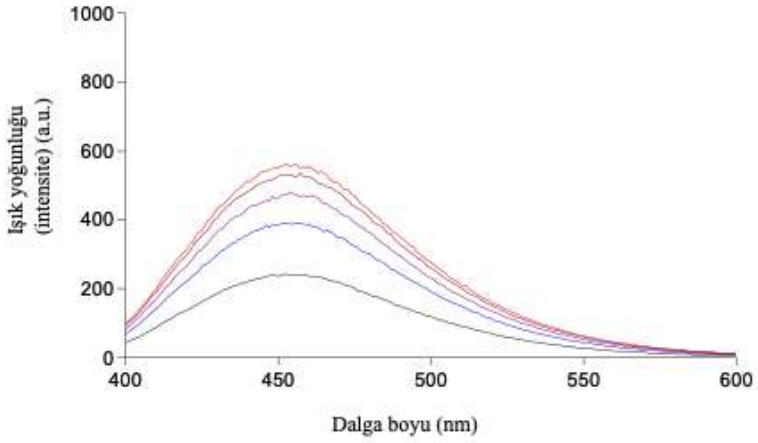
kaybetme nedenleri zamanla sahip oldukları disülfit bağlarının kırılması ya da pH değerinin sabit kalmaması olduğu düşünülmüştür. Bunu anlayabilmek için ise pH değerleri değiştirilerek denemeler yapılmış ve pH nın alkali tarafa doğru gittikçe floresan özelliğini kaybettiği görülmüştür. Bu yüzden kuantum verim hesabından kullanılacak formülasyonları SAMH ile hazırlananlardan seçilmiş ve yüksek floresan güç gösteren F4 nolu formülasyona karar verilmiştir. 0,5 M H_2SO_4-kinin sülfat çözeltisi ve F4 nolu formülasyonun %100, %80, %60, %40, %20 ve %0 konsantrasyonları hazırlanmıştır **(Şekil 4.2).**



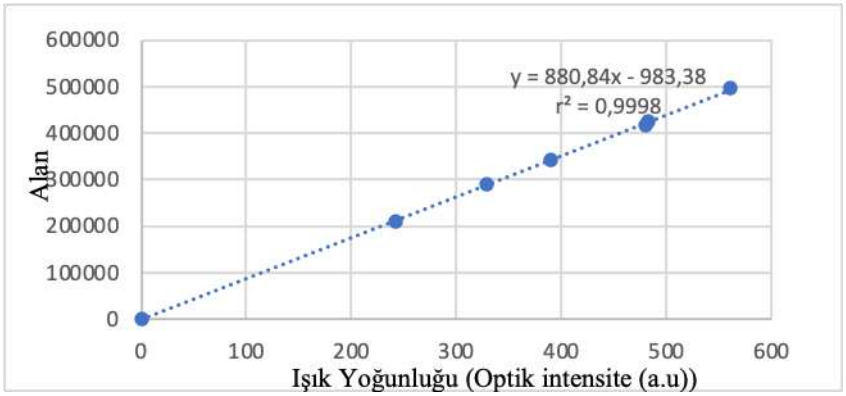
(a) **(b)**

Şekil 4.2 0,5 M Kinin sülfat-sülfirik asit çözeltisi (a) ve F4 nolu formülasyonun farklı konsantrasyonlardaki floresan görünütüsü (b)

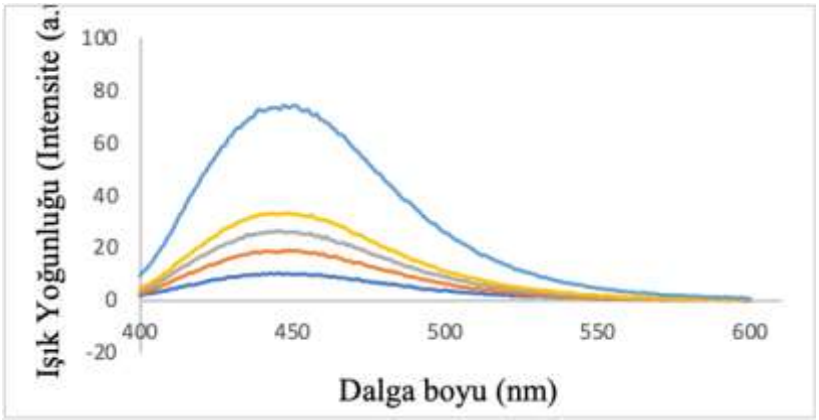
Hazırlanan örnekler için gerekli ölçümler İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Laboratuvarında bulunan Cary Eclipse Floresan Spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir. 3.2.2. nolu bölümde anlatılan şekilde yapılan ölçümler sonucunda kinin sülfat-sülfirik asit çözeltisi floresans - ışık yoğunluğu (intensite) grafiği ve KKN içeren çözeltinin floresan-ışık yoğunluğu (intensite) grafiğinden elde edilen sonuçlar kuantum verimi formülüne yerleştirilmiş ve kuantum verimi bulunmuştur **(Şekil 4.3 - 4.6).**



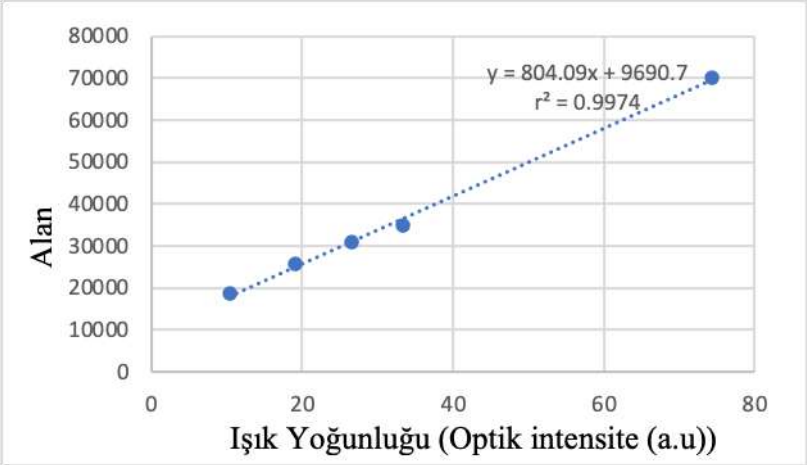
Şekil 4.3 Kinin Sülfatın spektroflorimetrede verdiği floresans/dalga boyu grafiği



Şekil 4.4 Kinin Sülfatın spektroflorimetrede verdiği grafiğin alanları ile floresans/dalga boyu arasındaki ilişki



Şekil 4.5 Hazırlanan KKN'lerin spektroflorimetrede verdiği floresans/dalga boyu grafiği



Şekil 4.6 Hazırlanan KKN'lerin spektroflorimetrede verdiği grafiğin alanları ile floresans/dalga boyu arasındaki ilişki

Elde edilen verilerden yola çıkılarak formülde değerler yerine konduğunda kuantum verimi aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır.

Kuantum verimi (Φ) = [$Eğim_{Test}$ / $Eğim_{Ref}$] * (n_{test}/ n_{ref})

= [804,09/880,84] * (1,3325/1,3333)

= 91,2 % olarak hesaplanmıştır.

4.3. KKN'lerle İnsülin Kompleksinin Oluşturulması ve Karakterizasyon Çalışmaları

4.3.1. KKN'lerle İnsülin Kompleksinin Oluşturulması

Burada kısa etkili insülin olan glulisin etkin madde olarak seçilmiştir. Bu amaçla Eczaneden alınanan Apidra Solostar (100 U/ml) enjeksiiyonluk kalemler kullanılmıştır. Nazal mukoza pH'sına uygun hale getirilen KKN'lere 1:1 oranda insülin (100 U/ml-3.49 mg/ml) ilave edilerek manyetik karıştırıcıda ortalama 6 saat boyunca ışıktan uzak oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Elde edilen Ins-KKN'in formülasyonları ve pH değişimleri **Tablo 4.4'te** verilmiştir.

Tablo 4.4 Ins-KKN formülasyonlarının pH değişimleri

	F1i	F2i	F3i	F4i	F5i	F6i	F7i	F8i
SAMH	0,1 g	0,2 g	0,3 g	0,4 g	-	-	-	-
Na-sitrat	-	-	-	-	0,1 g	0,2 g	0,3 g	0,4 g
l-sis	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g
d.su	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
insülin	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
pH	**5,65**	**5,70**	**5,74**	**5,80**	**6,40**	**6,30**	**6,35**	**6,30**

4.3.2. Ins-KKN'lerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımları

Hazırlanan formülasyonların partikül büyüklük ve dağılımları Anton Paar Litesizer 500 cihazında polistiren küvetler kullanılarak ölçülmüştür **(Şekil 4.7).**



Şekil 4.7 Anton Paar Litesizer 500 Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Ölçüm Cihazı

KKN'lerin kendilerinin sahip oldukları floresan özelliklerinden dolayı partikül büyüklüğü ve dağılım ölçümleri sırasında ekstra ışımalar yapmakta ve yoğunluk sorun olmaktadır; hem agregasyon nedeni ile hem de yansıma hatası nedeni ile başlangıçta elde edilen ölçüm sonuçlarında sıkıntılar yaşanmıştır. Bu nedenle kontrol ve standardizasyon amaçlı 1:10, 1:50, 1:100 oranlarında seyreltilerek, PTFE 0.22 µm membrandan süzüldükten sonra formülasyonların her birinden 10'lu tekrardan oluşan toplamda 3'er adet ölçüm yapılmıştır. Partikül boyut ve dağılımı için elde edilen ölçüm verileri bu 3 ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmış ve **Tablo 4.5**'te gösterilmiştir.

Tablo 4.5 Ins-KKN formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve dağılım ölçüm sonuçları

Formülasyonlar	Ort. Part. Büy. ± SD (nm)	PDI
F1i	8,82 ± 0,11	0,08 ± 0,01
F2i	8,85 ± 0,11	0,08 ± 0,01
F3i	8,78 ± 0,22	0,11 ± 0,04
F4i	8,35 ± 0,19	0,18 ± 0,05
F5i	9,59 ± 0,83	0,15 ± 0,03
F6i	9,27 ± 0,50	0,19 ± 0,06
F7i	9,32 ± 0,48	0,10 ± 0,41
F8i	9,82 ± 0,11	0,20 ± 0,06

4.3.3. Ins-KKN'lerin Zeta Potansiyelleri

Hazırlanan tüm formülasyonların zeta potansiyellerini tayin edebilmek amacıyla Anton Paar Litesizer 500 cihazında Ω şekilli kapiler küveti kullanarak ölçümler gerçekleştirilmiştir.

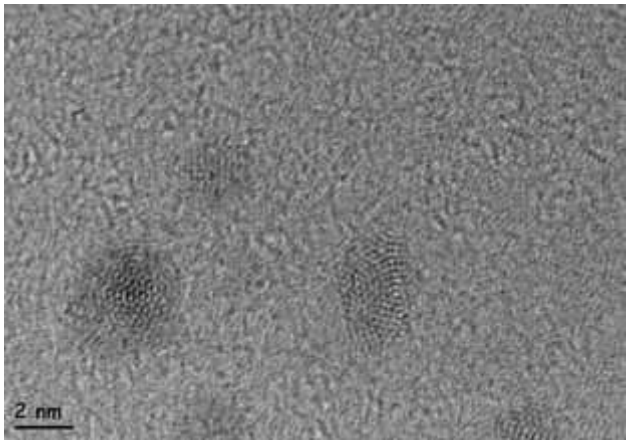
Partikül büyüklüğü ve dağılımı ölçümlerinde karşılaşılan aynı sorunlar nedeniyle zeta potansiyel ölçümlerini yaparken de kontrol ve standardizasyon amaçlı 1:10, 1:50, 1:100 oranlarında seyrelterek ve PTFE 0.22 µm membrandan süzüldükten sonra herbir formülasyondan 10'lu tekrardan oluşan toplam 3'er ölçüm yapılmıştır. Elde edilen zeta potansiyel verileri 3 ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır **(Tablo 4.6).**

Tablo 4.6 Ins-KKN'lerin zeta potansiyel ölçüm sonuçları

Formülasyonlar	Zeta potansiyel (mV) ± SS
F1i	-25,94 ± 2,49
F2i	-25,35 ± 2,99
F3i	-30,9 ± 2,99
F4i	-31,51 ± 1,59
F5i	-29,62 ± 1,56
F6i	-28,42 ± 1,73
F7i	-28,12 ± 0,82
F8i	-30,12 ± 2,52

4.3.4. Ins-KKN'lerin Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) Görüntüleri

Seçilen en iyi formüle ait morfolojik yapılar ve partikül büyüklükleri hakkında bilgi edinilmesi elektron mikroskobu ile sağlanmıştır **(Şekil 4.8)**.



Şekil 4.8 En iyi formülün elektron mikroskobunda elde edilen görüntüleri

4.4. In situ Jellerin Hazırlanması

%40 Stok P407 çözeltisinden %15, %18, %20 ve %25 (a/h) konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlanan örnekler vilallere aktarılmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlardaki P407 çözeltileri **Tablo 4.7'de** verilmiştir.

Tablo 4.7 P407 polimer çözeltilerinin hazırlanması

	%15 (V0)	**%18 (V1)**	**%20 (V2)**	**%25 (V3)**
Formülasyon yerine d.su	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Ins yerine d.su	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
%40-P407	1,2 ml	-	-	-
%40-P407	-	1,63 ml	-	-
%40- P407	-	-	2 ml	-
%40- P407	-	-	-	3,3 ml

Daha sonra pH değerleri uygun olarak ayarlanan Ins-KKN'lere yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda olacak şekilde P407 çözeltileri ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcıda belirli sürede karıştırılarak buzdolabına kaldırılmıştır. Elde edilen formülasyonlar **Tablo 4.8 ve Tablo 4.9'de** gösterilmiştir.

Tablo 4.8 SAMH kullanılarak hazırlananan in situ jel formülasyonları

	F9	**F10**	**F11**	**F12**	**F13**	**F14**	**F15**	**F16**	**F17**	**F18**	**F19**	**F20**
SAMH	0,1 g	0,2 g	0,3 g	0,4 g	0,1 g	0,2 g	0,3 g	0,4 g	0,1 g	0,2 g	0,3 g	0,4 g
l-sis	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g
d.su	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Ins	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
%15-P407	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	-	-	-	-	-	-	-	-
%18-P407	-	-	-	-	1,63 ml	1,63 ml	1,63 ml	1,63 ml	-	-	-	-
%20-P407	-	-	-	-	-	-	-	-	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml

Tablo 4.9 Na-sitrat kullanılarak hazırlanan in situ jel formülasyonları

	F21	F22	F23	F24	F25	F26	F27	F28	F29	F30	F31	F32
Na-sitrat	0,1 g	0,2 g	0,3 g	0,4 g	0,1 g	0,2 g	0,3 g	0,4 g	0,1 g	0,2 g	0,3 g	0,4 g
l-sis	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g	0,005 g
d.su	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
İns	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
%15-P407	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	-	-	-	-	-	-	-	-
%18-P407	-	-	-	-	1,63 ml	1,63 ml	1,63 ml	1,63 ml	-	-	-	-
%20-P407	-	-	-	-	-	-	-	-	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml

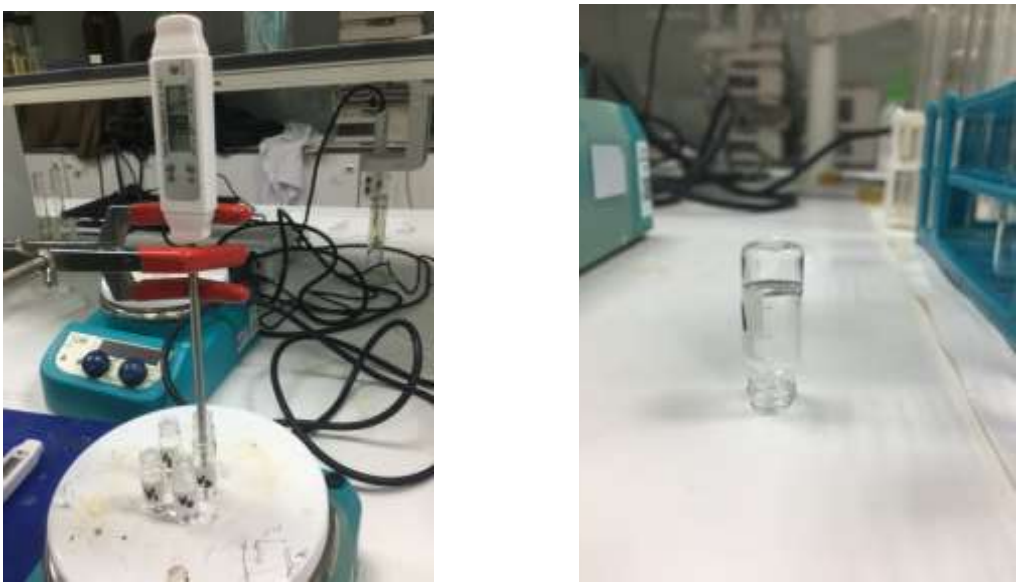
4.4.1. Sol-Jel Sıcaklıklarının (Tsol-jel) Belirlenmesi

Buzdolabında bekletilen farklı konsantrasyonlardaki V0, V1, V2 ve V3 nolu P407 çözeltileri manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilerek **(Şekil 4.9)** sıcaklık her 10 dk da 5 ^{o}C artacak şekilde ayarlanmıştır elde edilen sonuçlar **Tablo 4.10'da** verilmiştir.

Tablo 4.10 Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan P407 çözeltilerinin sıcaklıkla değişimler

T(^{o}C)	V0	V1	V2	V3
22	-	-	-	-
26	-	-	-	+
30	-	-	-	+
34	-	-	+	+
38	-	-	+	+
42	-	+	+	+

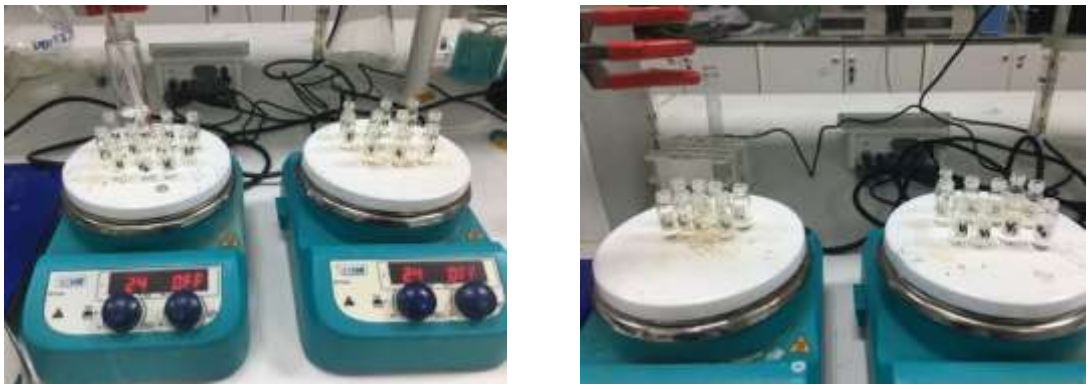
(+):tamamen jelleşme var, (+-): vial çeperinde hafif jelleşme var, (-): jelleşme yok

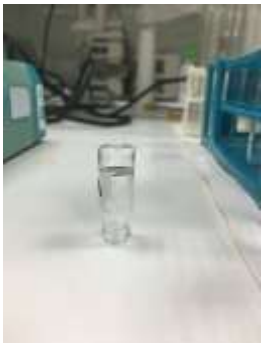


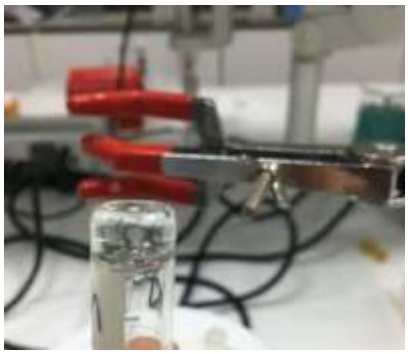
Şekil 4.9 Farklı konsantrasyonlardaki P407 çözeltilerinin Tsol jel Belirlenmesi

%15 (V0), %18 (V1), %20 (V2) ve %25 (V3) (a/h) konsantrasyonlarına sahip P407 çözeltisi manyetik karıştırıcı üzerinde sıcaklık kontrollü olarak takip edilmiştir. V0 nolu formülasyonun 42 ºC'de jel oluşumu gözlenmezken V1 nolu formülasyon 42 ºC'de jel oluşturuduğu bulunmuştur. V2 nolu formülasyonda 34 ºC'de jel oluşumu gözlenirken, V3 nolu formülasyonda 25-26 ºC'de jel olmuştur.

Daha sonra Tablo 4.11'deki gibi hazırlanan F9'dan F32'ye kadar tüm formülasyonlar manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilerek sıcaklık her 10 dk da 5 ºC artacak şekilde ayarlanmıştır. **(Şekil 4.10)**







Şekil 4.10 Hazırlanan formülasyonların sol-jel sıcaklıklarının belirlenmesi

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen değerler **Tablo 4.11'de** gösterilmiştir.

Tablo 4.11 P407 ve formülasyonların Tsol-jel Sonuçları

T(ºC)	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	+ -	-	-	-	+ -	+ -
34	-	-	-	-	-	-	+ -	-	-	-	+ -	+
38	-	-	+ -	-	-	-	+ -	+ -	-	-	+ -	+
42	-	-	+ -	-	-	-	+ -	+ -	-	-	+ -	+

T(ºC)	F21	F22	F23	F24	F25	F26	F27	F28	F29	F30	F31	F32
22	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
26	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
30	-	-	+	+	-	-	+	+	+ -	-	+	+ -
34	-	-	+	+	-	-	+	+	+ -	-	+	+
38	+ -	-	+	+	+ -	-	+	+	+ -	-	+	+
42	+ -	-	+	+	+ -	-	+	+	+ -	-	+	+

(+:jel var, -+:hafif jel oluşumu, -:jel yok)

SAMH'ten yola çıkılarak hazırlanan F9-F20 arasındaki Ins-KKN jel formülasyon denemelerinde F11 ve F16 nolu formülasyonlarda 38 ºC'de vial çeperlerinde hafif bir viskozite artışıyla beraber jel oluşumuna rastlanmıştır. F15 ve F19 nolu formülasyonlarda ise 30 ºC'de hafif jel oluşumuna rastlanmıştır. F20 nolu formülasyon 30 ºC'de vial çeperinde hafif jel oluşturmaya başlamış ve 34 ºC'ye geldiğinde tamamen jel olmuştur. F9, F10, F12, F13, F14, F17 ve F18 nolu

formülasyonlarda ise sıcaklığın 42 ^{o}C'lere çıkmasına rağmen jelleşme olamdığı görülmüştür.

Na-sitrat'tan yola çıkılarak hazırlanan F21-F32 arasındaki Ins-KKN jel formülasyon denemelerinde ise F21, F25 ve F29 nolu formülasyonlarda sırasıyla 38 ^{o}C ve 30 ^{o}C'de vial çeperlerinde hafif jel oluşumu başlamıştır ancak sıcaklığın giderek artması oluşan jel miktarını değiştirmemiştir F23, F27 ve F28 nolu formülasyonlar 30 ^{o}C'de tamamen jel oluşturmuş sıcaklığın daha da arrttırılması jellerin görüntülerinde ya da özelliklerinde bir değişime neden olmamıştır. F24 ve F31 nolu formülasyonlarda 22 ^{o}C'de hızla jel oluştuğu görülmüştür. F32 nolu formülasyonda ise 30 ^{o}C'de yüzeyde jel oluşumu görülmeye başlanmış olup tamamen jelleştiği nokta 34 ^{o}C olarak bulunmuştur.

4.4.2. P407'nin Tsol-jel Üzerinde Ins-KKN ve Yardımcı Maddelerin Etkisinin İncelenmesi

Yukarıda gerçekleştirilen floresan özelliği, partikül büyüklüğü ve dağılımı, pH değeri, zeta potansiyeli ve nazal mukoza sıcaklığına (30-34 ^{o}C) uygunluğu gibi çalışmalar sonucunda uygun olan formülasyon **F20** olarak belirlenmiştir. Buradan yola çıkarak sadece %20'lik P407 içeren (J1, J2, J5 ve J7) çözeltilere ve F20 formülasyonlarına (J3, J4, J6, J8 ve J9) farklı konsantrasyonlarda MS (4000 cp) ve PEG3350 ilave edilmiş ve su banyosunda 34 ^{o}C'de bekletilerek jel oluşumları **Tablo 4.12'de** gösterilmiştir.

Tablo 4.12 F20 ve sadece %20'lik P407 içeren çözeltilerin, farklı konsantrasyonlarda MS (4000 cp), PEG3350 içeren formülasyonları

Formülasyon	KKN yerine d.su (ml)	Ins yerine d.su (ml)	KKN (ml)	Ins (ml)	P407 (ml)	MS (4000 cp) (g)	PEG 3350 (g)	34 ºC
J1	2,5	2,5	-	-	5	0,1	0,2	-
J2	2,5	2,5	-	-	5	0,2	0,2	+
J3	-	-	2,5	2,5	5	0,1	0,2	-
J4	-	-	2,5	2,5	5	0,2	0,2	+
J5	2,5	2,5	-	-	5	-	0,2	-
J6	-	-	2,5	2,5	5	-	0,2	-
J7	2,5	2,5	-	-	5	0,15	0,2	+
J8	-	-	2,5	2,5	5	0,15	0,2	+-
J9	-	-	2,5	2,5	5	0,2	0,1	+

(+ : 34 ºC'de jel var, -+ : 34 ºC'de hafif jel oluşumu, - : 34 ºC'de jel yok)

Bu tabloya göre P407 konsantrasyonu %20 olarak sabit tutulmuş ve Ins-KKN içermeyen J1, J2, J5 ve J7 numaralı formülasyonlarda PEG3350 oranı sabit tutularak MS (4000 cp) miktarları değiştirilmiş ve Tsol-jel değerlendirilmesi yapılmıştır.

Ins-KKN içeren J3, J4 ve J8 numaralı formülasyonlarda PEG oranı sabit tutularak MS (4000 cp) miktarları değiştirilmiş ve Tsol-jel değerlendirilmesi gerçekleştirilmiş ve buna ek olarak J4 ve J9 numaralı formülasyonlarda MS sabit tutularak PEG3350 miktarının etkisi incelenmiştir.

4.4.3. Reolojik Çalışmalar

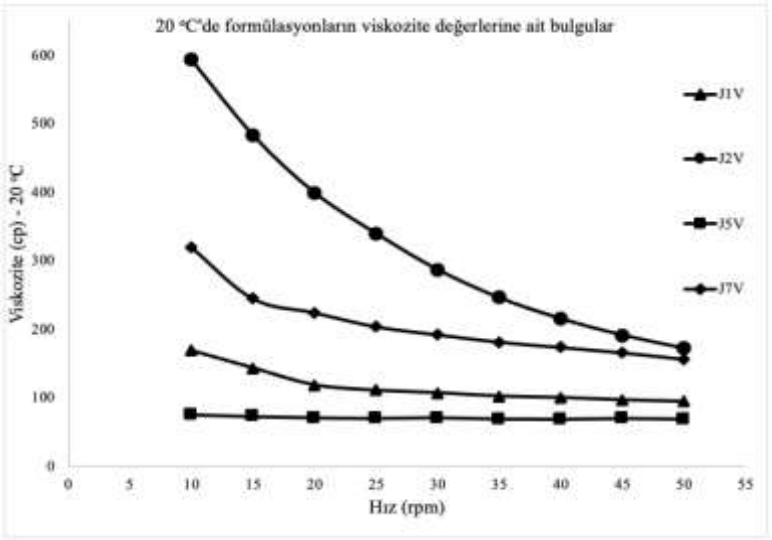
Tablo 4.12'deki gibi hazırlanan J1-J9 nolu örnekler reolojik çalışmalar için J1V-J9V olarak isimlendirilmiş olup her bir formülasyon için oda sıcaklığındaki (20°C±1) ve T sol-gel olarak belirlenen sabit sıcaklıktaki (34°C±1) viskozite değerleri, koni-plak viskozimetre (Brookfield HA DV3T) cihazı kullanılarak üçer tekrar ile ölçümleri yapılmıştır.

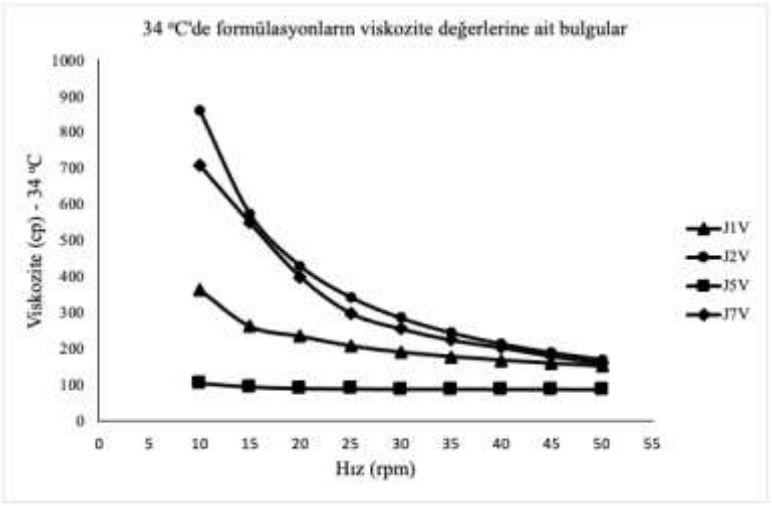
Daha sonra formülasyonlar Ins-KKN içermelerine, MS ve PEG 3350 konsantrasyonlarına göre incelenmiş elde edilen veriler tablo ve grafikler halinde aşağıda verilmiştir **(Tablo 4.13-4.16).**

Tablo 4.13 Ins-KKN içermeyen J1V, J2V, J5V ve J7V nolu formülasyonların MS miktarlarının değişim tablosu

Formülasyon	KKN yerine d.su (ml)	Ins yerine d.su (ml)	KKN (ml)	Ins (ml)	P407 (ml)	MS (4000 cp) (g)	PEG 3350 (g)
J1V	2,5	2,5	-	-	5	0,1	0,2
J2V	2,5	2,5	-	-	5	0,2	0,2
J5V	2,5	2,5	-	-	5	-	0,2
J7V	2,5	2,5	-	-	5	0,15	0,2

J1V, J2V, J5V ve J7V nolu formülasyonlarında MS miktarının 20 ºC ve 34 ºC'de viskoziteye olan etkileri incelenmiştir. Elde edilen grafikler aşağıda verilmiştir **(Şekil 4.11).**





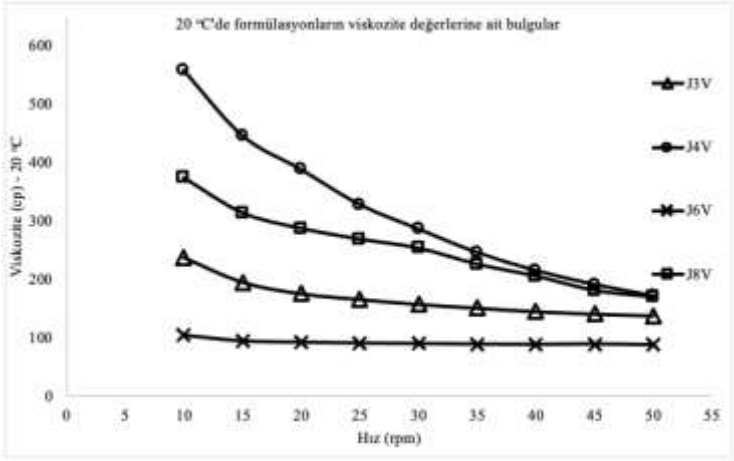
Şekil 4.11 J1V, J2V, J5V ve J7V nolu formülasyonlarında MS miktarının 20 ºC ve 34 ºC'de viskozite grafikleri

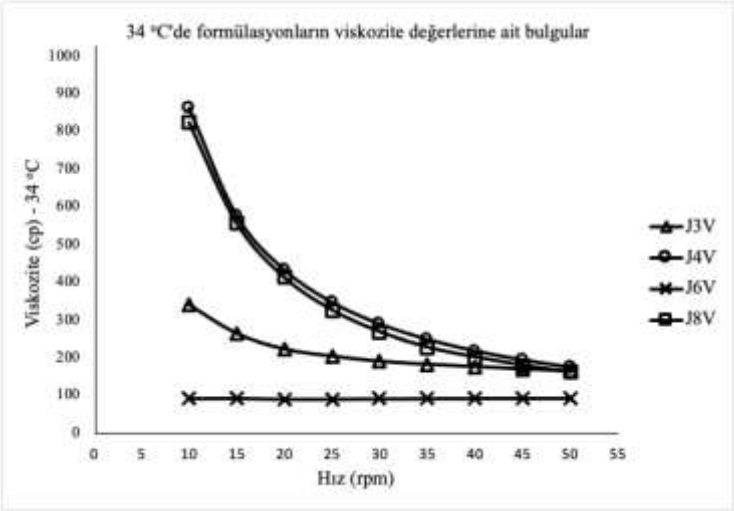
Tablo 4.14 Ins-KKN içeren J3V, J4V, J6V ve J8V nolu formülasyonların MS miktarının değişim tablosu

Formülasyon	KKN yerine d.su (ml)	Ins yerine d.su (ml)	KKN (ml)	Ins (ml)	P407 (ml)	MS (4000 cp) (g)	PEG 3350 (g)	34 ºC
J3V		-	2,5	2,5	5	0,1	0,2	-
J4V	-	-	2,5	2,5	5	0,2	0,2	+
J6V	-	-	2,5	2,5	5	-	0,2	-
J8V	-	-	2,5	2,5	5	0,15	0,2	+-

(+ : 34 ºC'de jel var, -+ : 34 ºC'de hafif jel oluşumu, - : 34 ºC'de jel yok)

J3V, J4V, J6V ve J8V nolu formülasyonlarında MS miktarının 20 ºC ve 34 ºC'de viskoziteye olan etkileri incelenmiştir. Elde edilen grafikler Şekil 4.12'de verilmiştir.





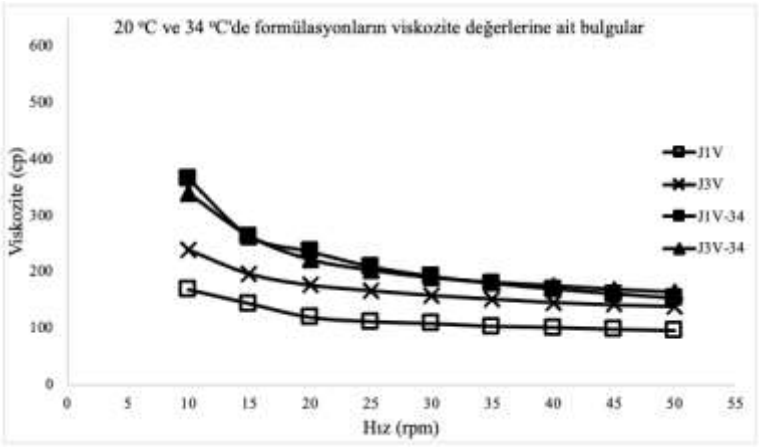
Şekil 4.12 J3V, J4V, J6V ve J8V nolu formülasyonlarında MS miktarının 20 ºC ve 34 ºC'de viskozite grafikleri

Tablo 4.15 Ins-KKN içeren ve içermeyen J1V ve J3V nolu formülasyonlar

Formülasyon	KKN yerine d.su (ml)	Ins yerine d.su (ml)	KKN (ml)	Ins (ml)	P407 (ml)	MS (4000 cp) (g)	PEG 3350 (g)	34 ºC
J1V	2,5	2,5	-	-	5	0,1	0,2	-
J3V	-	-	2,5	2,5	5	0,1	0,2	-

(+ : 34 ºC'de jel var, -+ : 34 ºC'de hafif jel oluşumu, - : 34 ºC'de jel yok)

J1V ve J3V nolu formülasyonlarında Ins-KKN'lerin 20 ºC ve 34 ºC'de viskoziteye olan etkileri incelenmiştir. Elde edilen grafikler **Şekil 4.13**'te verilmiştir.



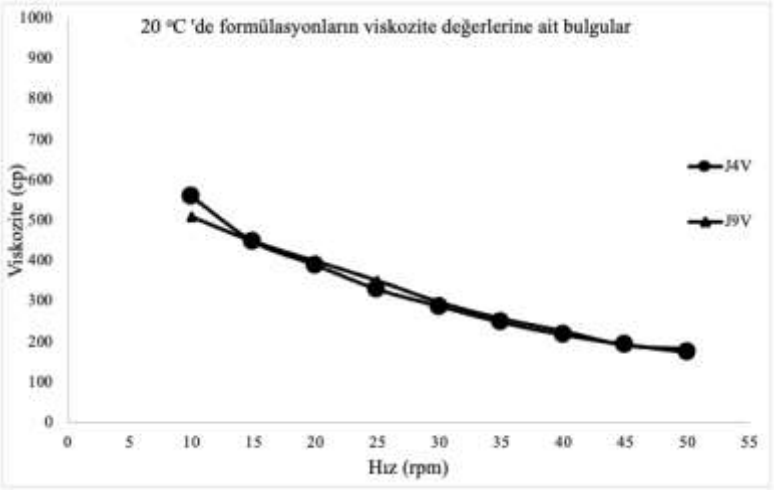
Şekil 4.13 J1V ve J3V nolu formülasyonlarında Ins-KKN'lerin 20 ºC ve 34 ºC'de viskozite grafikleri

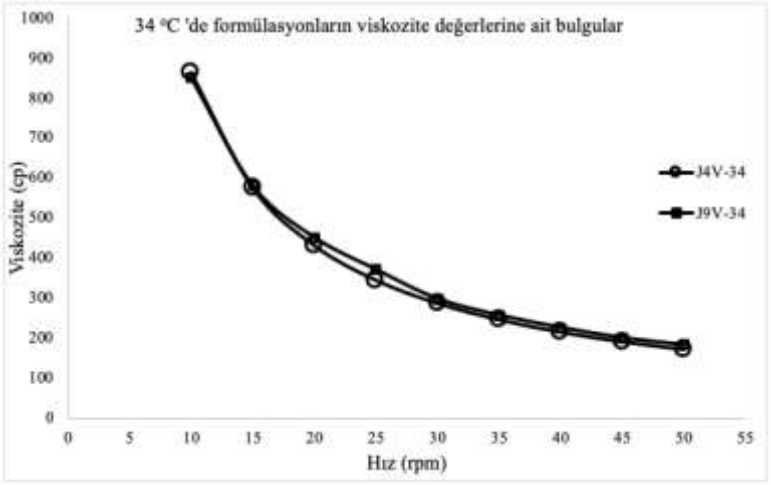
Tablo 4.16 Ins-KKN içeren J4V ve J9V nolu formülasyonlar

Formülasyon	KKN yerine d.su (ml)	Ins yerine d.su (ml)	KKN (ml)	Ins (ml)	P407 (ml)	MS (4000 cp) (g)	PEG 3350 (g)	34 ºC
J4V	-	-	2,5	2,5	5	0,2	0,2	+
J9V	-	-	2,5	2,5	5	0,2	0,1	+

(+ : 34 ºC'de jel var, -+ : 34 ºC'de hafif jel oluşumu, - : 34 ºC'de jel yok)

J4V ve J9V nolu formülasyonlarında PEG 3350 miktarlarının 20 ºC ve 34 ºC'de viskoziteye olan etkileri incelenmiştir. Elde edilen grafikler Şekil 4.14'te verilmiştir.





Şekil 4.14 J4V ve J9V nolu formülasyonlarında PEG 3350 miktarlarının 20 ºC ve 34 ºC viskozite grafikleri

Her iki formülasyonda MS miktarları aynı olduğu için ikisinde de 20 ºC'de Newtonial olmayan akış tipi görülmüştür. Viskoziteleri karşılaştırıldığında PEG3350 miktarlar daha az olan J9V nolu formülasyonda sıcaklığın 34ºC'ye getirilmesiyle viskozite artışı daha fazla olduğu fark edilmiştir.

4.4.4. Hazırlanan In situ Jellerin Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi

Reolojik özelliklerin belirlenmesinde hazırlanan formülasyonları mekanik özelliklerin belirlenmesi için tekrar hazırlanmış (J1A-J9A) ve buzdolabına kaldırılmıştır. Ölçümlere başlamadan önce formülasyonlar su banyosuna 34 ºC'de yarım saat bekletilmiştir. Hazır hale gelen formülasyonlar Brookfield CT3 doku analiz cihazı yardımıyla 3 tekrarlı ölçümleri tamamlanmıştır. Elde edilen sertlik, sıkıştırılabilirlik, adezyon ve kohezyon değerleri **Tablo 4.17**'de verilmiştir.

Tablo 4.17 Hazırlanan in situ jellere ait mekanik özelliklerin ölçüm sonuçları

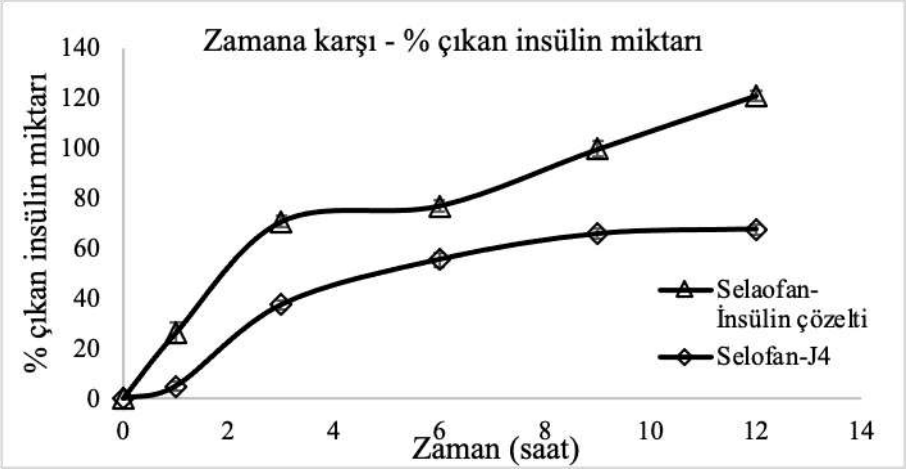
	Sertlik (N)	**Sıkıştırılabilirlik (mj)**	**Adezyon kuvveti (N)**	**Adeziflik (mj)**	**Koheziflik**
J1A	0,167 ± 0,816	0,433 ± 0,047	0,075 ±0,020	0,200 ± 0,216	1,116 ± 0,712
J2A	0,261 ± 0,025	4,300 ± 0,081	0,117 ± 0,042	0,600 ± 0,294	1,226 ± 0,316
J3A	0.096 ± 0,986	0,350 ± 0,789	0,121 ± 0,138	0,540 ± 0,123	-4,130 ± 0,163
J4A	0,140 ± 0,048	0,666 ± 0,169	0,130 ± 0,028	0,933 ± 0,309	0,913 ± 0,435
J5A	0,125 ± 0,034	0,135 ± 0,091	0,024 ± 0,018	0,323 ± 0,115	0,102 ± 0,434
J6A	0,189 ± 0,027	0,278 ± 0,171	0,094 ± 0,032	0,245 ± 0,147	0,160 ± 0,213
J7A	0,219 ± 0,004	0,800 ± 0,081	0,124 ± 0,008	0,633 ± 0,188	1,103 ± 0,233
J8A	0,121 ± 0,067	0,233 ± 0,047	0,046 ± 0,044	000,000	1,813 ± 1,161
J9A	0,113 ± 0,018	0,366 ± 0,149	0,100 ± 0,038	0,763 ± 0,357	0,615 ± 0,635

Gerçekleştirilen reolojik ve mekanik çalışmalardan elde edilen verilerden yola çıkılarak uygun olan formülasyon J4 olarak belirlenmiştir. Bundan sonra yapılan *in vitro* salım, *ex vivo* geçiş çalışmaları, optik mikroskop - lazer taramalı konfokal mikroskop incelemeleri ve kinetik parametrelerin değerlendirmeleri **J4 nolu** formülasyon üzerinden gerçekleştirilmiştir.

4.4.5. Nazal Jel Formülasyonlarından *In vitro* Salım Çalışması

Çalışma sonunda Lowry metodu kullanılarak Elisa Reader cihazında analiz edilmiş olup ortalama±SD (n=3) olarak verilmiştir. Sonuçlar zamana karşı %çıkan (salınan) ilaç grafikleri olarak gösterilmiştir Salım sonuç reaksiyon kinetikleri; sıfırıncı derece kinetik, birinci derece kinetik ve Higuchi kinetik modellerine uyumları değerlendirilmiştir.

BSA Standart Eğri grafiği çizilmiş olup elde edilen yola çıkılarak yapılan hesaplamalar sonrasında formülasyonların selofan membrandan % salım grafiği elde edilmiş olup aşağıda gösterilmiştir **(Şekil 4.15)**.



Şekil 4.15 Selofan membrandan insülinin salım profilleri

4.4.5.1. Analitik metot validasyon parametrelerin değerlendirilmesi

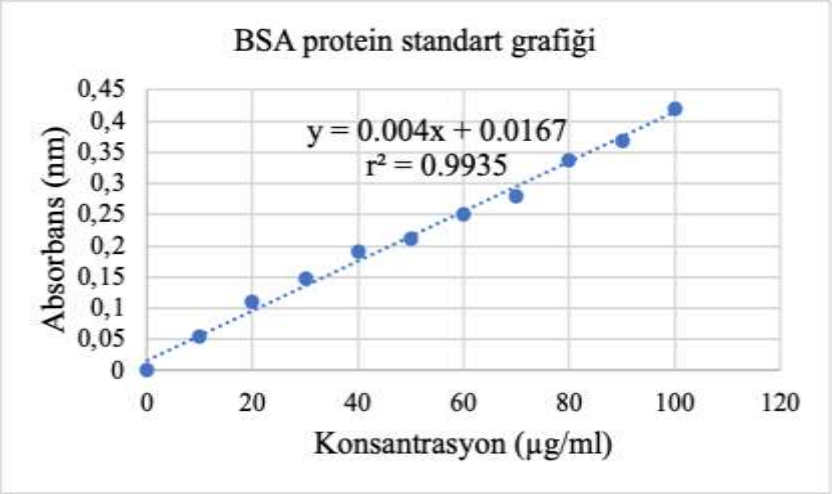
- ***Doğrusallık (linearity):***

Elde edilen sonuçlar **Tablo 4.18'de** verilmiştir.

Tablo 4.18 BSA standasrt eğri için ölçüm sonuçları

Konsantrasyon µg/ml	Absorbans (nm)
0	0
10	0,054
20	0,109
30	0,146
40	0,191
50	0,210
60	0,251
70	0,280
80	0,336
90	0,368
100	0,420

BSA Standart Eğri grafiği ve elde edilen denklem **Şekil 4.16'te** gösterilmiştir.



Şekil 4.16 BSA protein standart grafiği

- ***Doğruluk ve geri elde (accuracy and recovery)***
- Elde edile bulgular **Tablo 4.19'da** verilmiştir.

Tablo 4.19 İnsülin için doğruluk ve geri elde sonuçları

Hazırlananan konsantrasyon µg/ml	**Hesaplanan konsantrasyon µg/ml**	**Doğruluk ve %Geri elde**
95	94,075	99,026
90	89,825	99,805
85	84,075	98,911
Ort.	89,325	99,247
SS	5,018	0,280
Varyasyon katsayısı	5,618	0,490

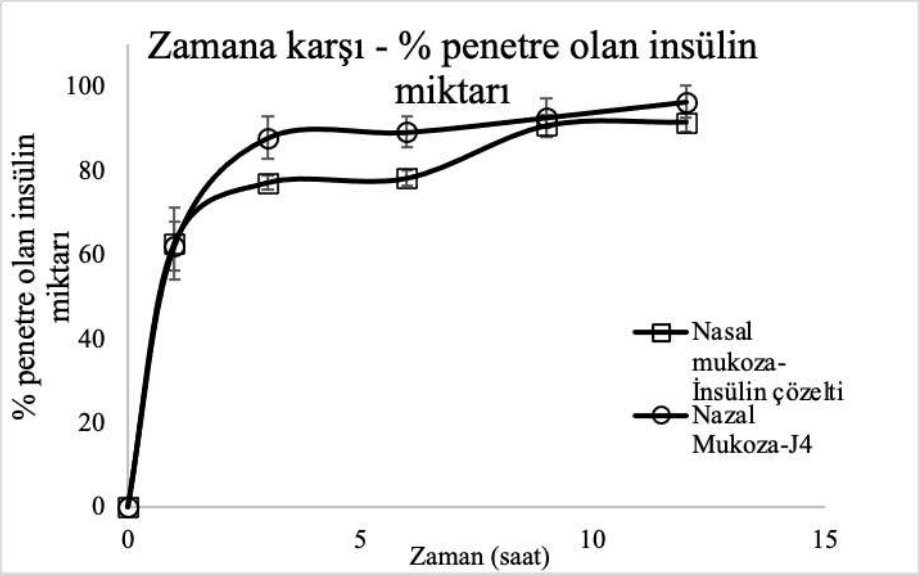
- ***Seçicilik (specifity)***

Kullanılan metotta etkin madde içermeyen çözelti (sadece reaktifler ve etkin madde yerine distile su) analiz edildiğinde çok az da olsa bir absorbans vermiştir. Ancak bu değer ölçümlerde kör (blank) olarak kullanılmış ve analiz örneklerinin absorbanslarından çıkarılarak hesaplar yapılmıştır.

4.4.6. Nazal Jel Formülasyonlarında *Ex vivo* Geçiş Çalışması

Çalışma sonunda Lowry metodu kullanılarak Elisa Reader cihazında analiz edilmiş olup ortalama±SD (n=3) olarak verilmiştir. Sonuçlar zamana karşı % çıkan (salınan) ilaç grafikleri olarak gösterilmiştir Salım sonuç reaksiyon kinetikleri; sıfırıncı derece kinetik, birinci derece kinetik ve Higuchi kinetik modellerine uyumları değerlendirilmiştir.

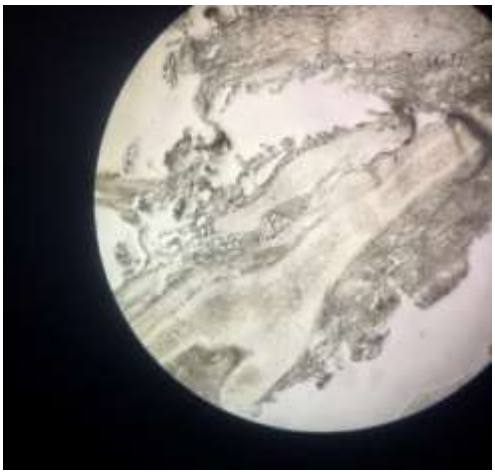
BSA Standart Eğri grafiğinden elde edilen denklemden yola çıkılarak yapılan hesaplamalar sonrasında formülasyonların nazal membrandan % geçiş grafiği elde edilmiş olup aşağıda gösterilmiştir **(Şekil 4.17)**.



Şekil 4.17 Nazal mukozdan penetre olan % insülin miktarı

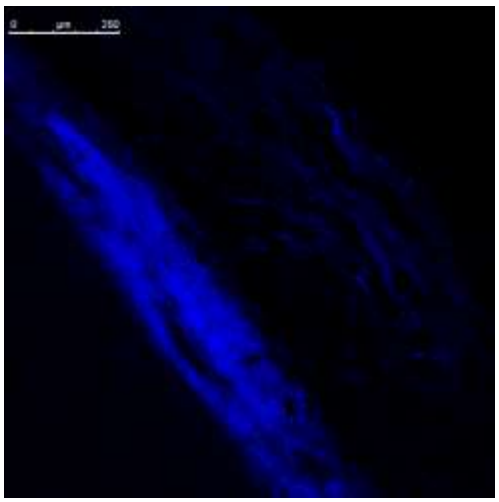
4.4.7. Nazal Mukozanın Optik Mikroskop ve Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopta İncelenmesi

12 saatlik *ex vivo* geçiş çalışmaları sonunda nazal mukozalar Lazer Taramalı Konfokal mikroskopta görüntü elde edebilmek amacıyla belirli kalınlıklar halinde kesilerek Biruni Üniversitesi Patoloji Laboratuvarında parafine batırılarak kesit almaya uygun hale getirilmişlerdir. **(Şekil 4.18).**

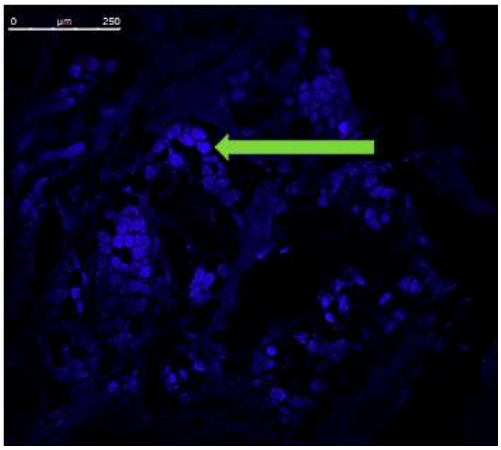


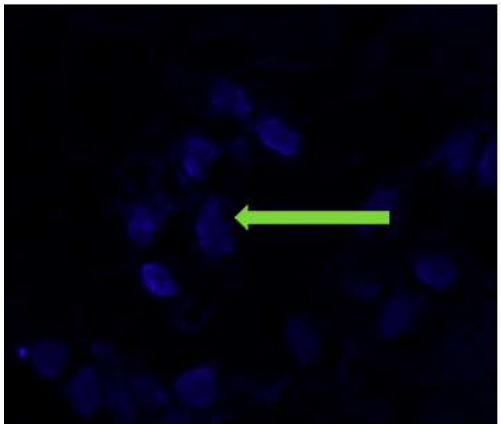
Şekil 4.18 Nazal mukoza kesitinin optik mikroskopta görüntüsü

Hazırlanan diğer kesitlerin Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop altındaki görüntüleri aşağıda verilmiştir **(Şekil 4.19-4.23).**

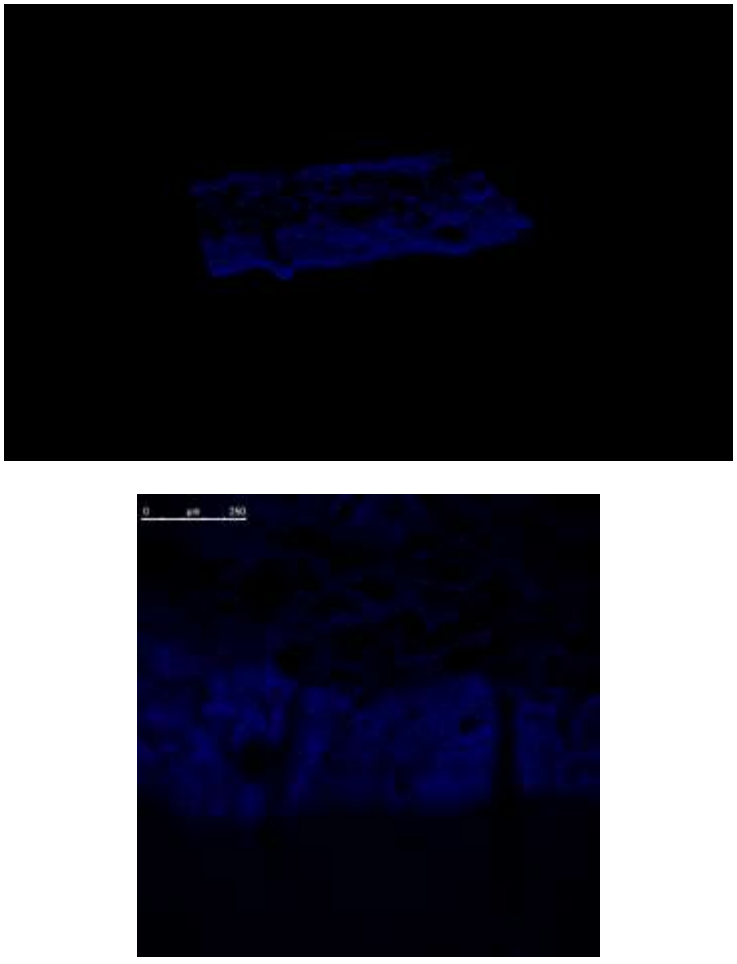


Şekil 4.19 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopta 20 µm kalınlıktaki kesitte 10 büyütme

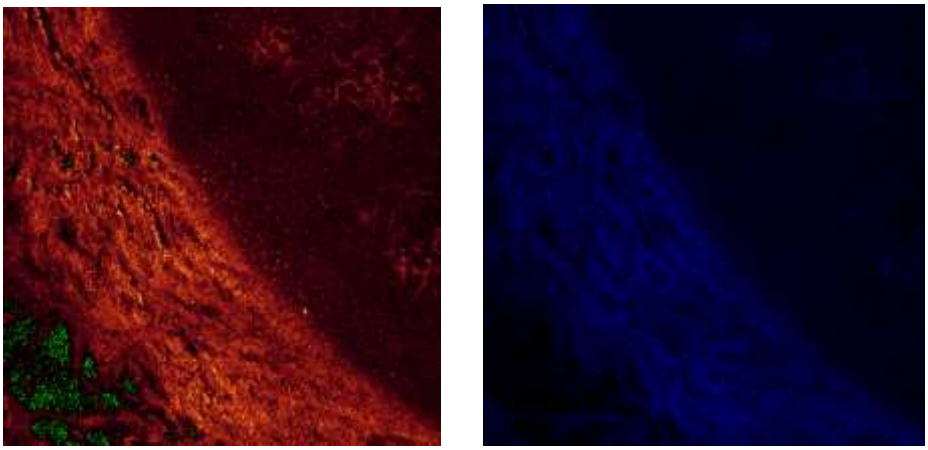




Şekil 4.20 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopta 10 µm kalınlıktaki kesitte 10 ve 40 büyütme



Şekil 4.21 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopta 10 µm kalınlıktaki kesitte 10 büyütme ve üç boyutlu görüntüsü



Şekil 4.22 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopta 5 µm kalınlıktaki kesitte 10 büyütme (görüntüleme öncesi (sol) ve sonrası (sağ))

4.4.8. Kinetik Parametrelerin Hesaplanması

Formülasyonların zamana karşı % salım ve % geçiş çalışmaları sonucu elde edilen r^2 değerleri **Tablo 4.20'de** yer almaktadır.

Tablo 4.20 Hazırlanan formülasyonlara ve insülin çözeltilerine ait *in vitro* salım ve *ex vivo* geçiş kinetik modeller

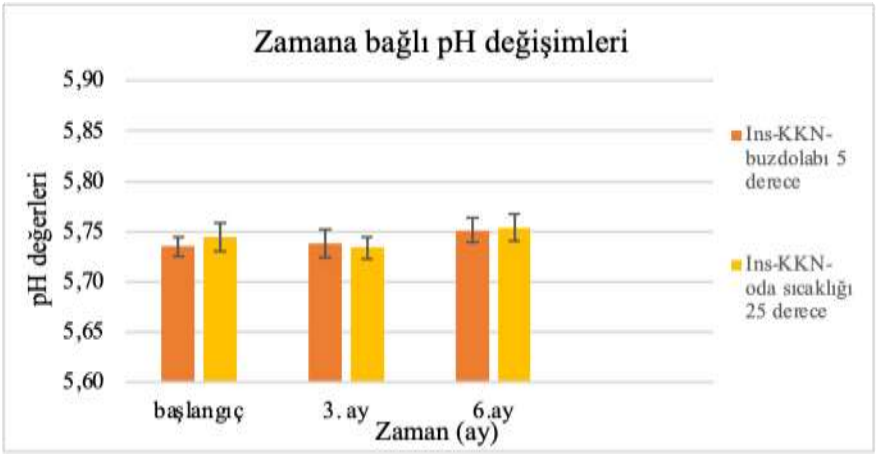
Formülasyon Adı	Sıfırıncı derece	Birinci derece	Higuchi
Selofan-Ins çöz	0,811	0,851	0,915
Selofan-J4	0,826	0,911	0,927
Nazal mukoza-Ins çöz	0,877	0,919	0,926
Nazal mukoza-J4	0,668	0,892	0,786

4.4.9. Fizikokimyasal Stabilite Testlerine Ait Bulgular

J4 (Ins-KKN+P407+MS+PEG3350) ve Ins-KKN'lerine ait stabilite testleri 5°C'de buzdolabı ve 25°C±2°C/%60 bağıl nem'de oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. J4 nolu formülasyonlar başlangıç, 1. ve 2. aylarda; Ins-KKN formülasyonlar ise başlangıç, 3. ve 6. aylarda pH değişimleri, partikül büyüklüğü ve dağılımı ile zeta potansiyel değişimleri **Tablo 4.21-4.25 ve Şekil 4.23-4.30**'de gösterilmiştir.

Tablo 4.21 Ins-KKN formülasyonlara ait pH stabilite sonuçları

Formülasyon	Buzdolabı +5ºC			Oda sıcaklığı 25°C±2°C/%60 bağıl nem		
	Başlangıç	3. ay	6. ay	Başlangıç	3 ay	6. ay
Ins-KKN	5,743 ± 0,012	5,740 ± 0,014	5,750 ± 0,012	5,752 ± 0,014	5,731 ± 0,011	5,751 ± 0,013

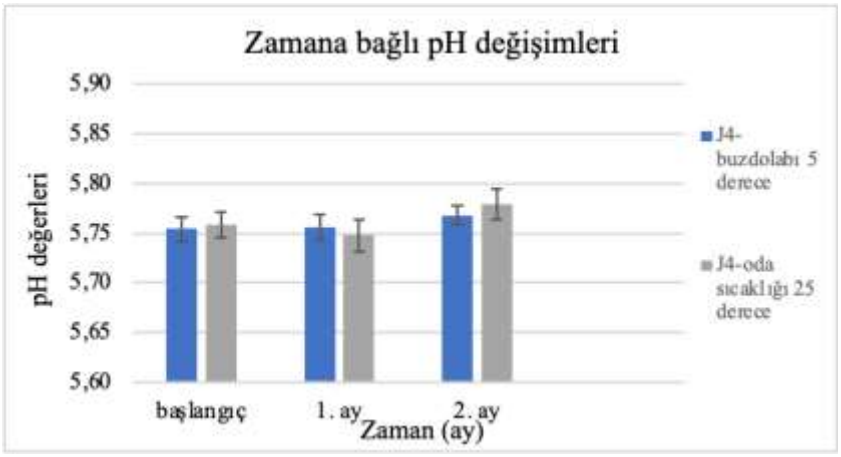


Şekil 4.23 Ins-KKN formülasyonlarına ait stabilite grafikleri

Tablo 4.22 J4 nolu formülasyonlara ait pH stabilite sonuçları

Formülasyon	Buzdolabı +5ºC			Oda sıcaklığı 25°C±2°C/%60 bağıl nem		
	Başlangıç	1. ay	2. ay	Başlangıç	1. ay	2. ay
J4*	5,750 ± 0,012	5,760 ± 0,013	5,770 ± 0,010	5,760 ± 0,013	5,750 ± 0,016	5,780 ± 0,015

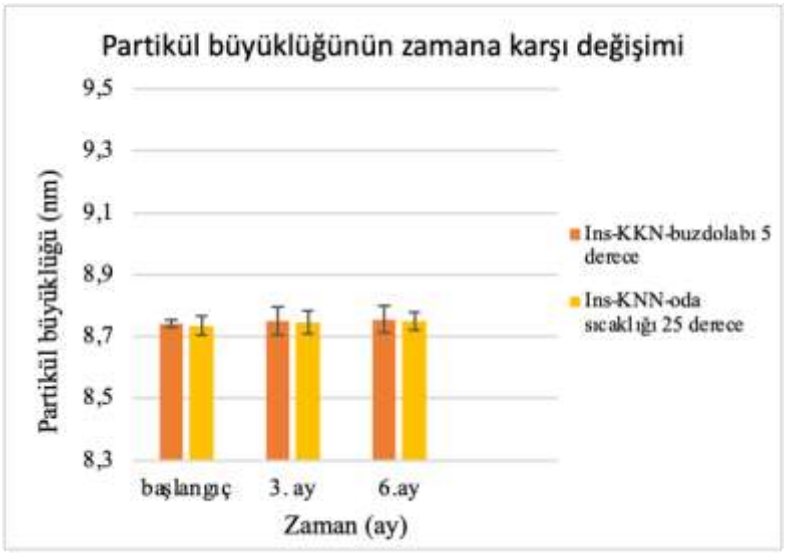
***J4: (Ins-KKN+P407+MS+PEG3350) içermektedir ve son formülasyondur.**



Şekil 4.24 Ins-KKN ve J4 nolu formülasyonlara ait zaman bağlı pH değişim grafiği

Tablo 4.23 Ins-KKN formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları

Formülasyon	**Buzdolabı +5ºC**			**Oda sıcaklığı 25°C±2°C/%60 bağıl nem**		
	Başlangıç	**3. ay**	**6. ay**	**Başlangıç**	**3. ay**	**6. ay**
Ins-KKN	8,741 ± 0,010	8,754 ± 0,027	8,752 ± 0,030	8,734 ± 0,032	8,743 ± 0,038	8,751 ± 0,028

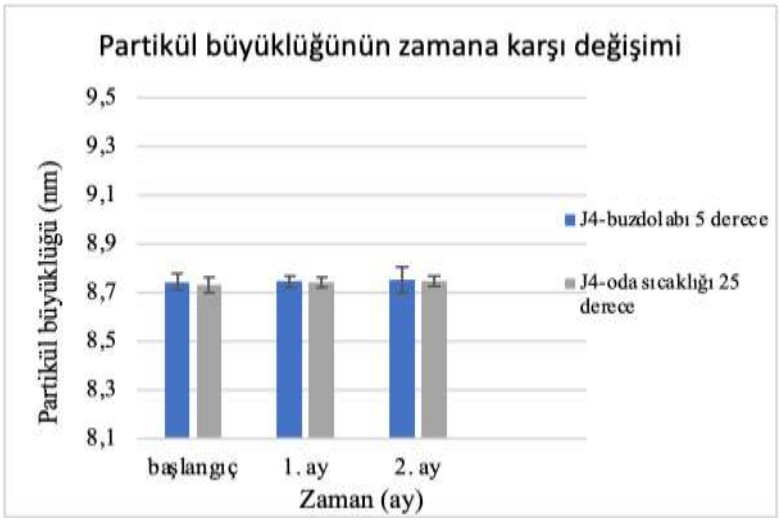


Şekil 4.25 Ins-KKN formülasyonlarına ait zaman bağlı partikül büyüklüğü değişim grafiği

Tablo 4.24 J4 nolu formülasyonlara ait partikül büyüklüğü sonuçları

Formülasyon	Buzdolabı +5ºC			Oda sıcaklığı 25°C±2°C/%60 bağıl nem		
	Başlangıç	1. ay	2. ay	Başlangıç	1. ay	2. ay
J4*	8,743 ± 0,035	8,741 ± 0,026	8,754 ± 0,050	8,732 ± 0,021	8,742 ± 0,019	8,744 ± 0,021

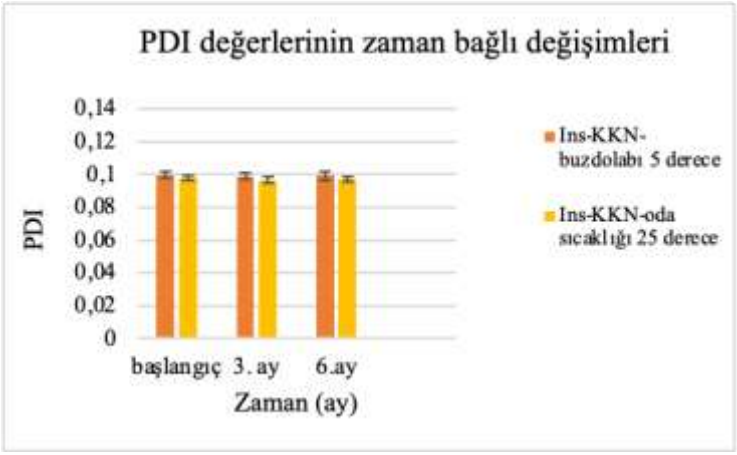
***J4: (Ins-KKN+P407+MS+PEG3350) içermektedir ve son formülasyondur.**



Şekil 4.26 J4 nolu formülasyonlara ait zaman bağlı partikül büyüklüğü değişim grafiği

Tablo 4.25 Ins-KKN formülasyonlarına ait PDI stabilite sonuçları

Formülasyon	Buzdolabı +5ºC			Oda sıcaklığı 25°C±2°C/%60 bağıl nem		
	Başlangıç	3. ay	6. ay	Başlangıç	3. ay	6. ay
Ins-KKN	0,099 ± 0,001	0,099 ± 0,002	0,099 ± 0,002	0,098 ± 0,001	0,096 ± 0,001	0,097 ± 0,001

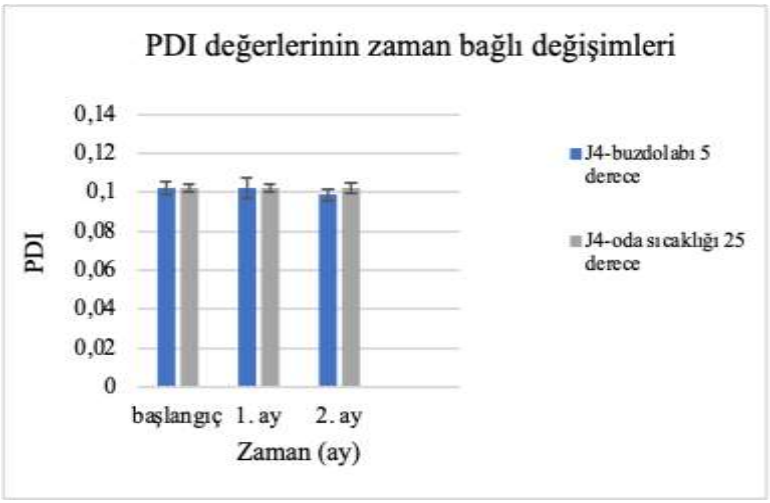


Şekil 4.27 Ins-KKN formülasyonlarına ait zaman bağlı PDI değişim grafiği

Tablo 4.26 J4 nolu formülasyonlara ait PDI sonuçları

Formülasyon	Buzdolabı +5ºC			Oda sıcaklığı 25°C±2°C/%60 bağıl nem		
	Başlangıç	1. ay	2. ay	Başlangıç	1. ay	2. ay
J4*	0,102 ± 0,003	0,102 ± 0,005	0,098 ± 0,002	0,102 ± 0,002	0,102 ± 0,001	0,102 ± 0,003

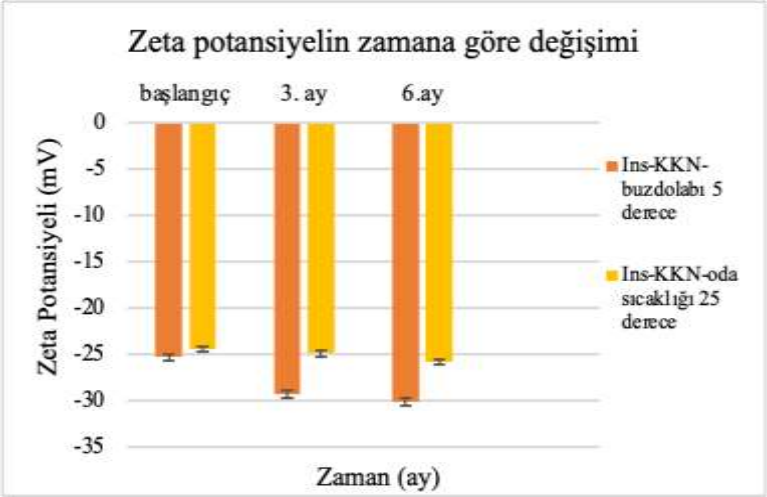
***J4: (Ins-KKN+P407+MS+PEG3350) içermektedir ve son formülasyondur.**



Şekil 4.28 J4 formülasyonlarına ait zaman bağlı PDI değişim grafiği

Tablo 4.27 Ins-KKN formülasyonlarına ait zeta potansiyeli stabilite sonuçları

Formülasyon	Buzdolabı +5ºC			Oda sıcaklığı 25°C±2°C/%60 bağıl nem		
	Başlangıç	3. ay	6. ay	Başlangıç	3. ay	6. ay
Ins-KKN	-25,311 ± 0,412	-29,272 ± 0,224	-29,253 ± 0,425	-24,433 ± 0,260	-24,882 ± 0,350	-28,641 ± 0,305

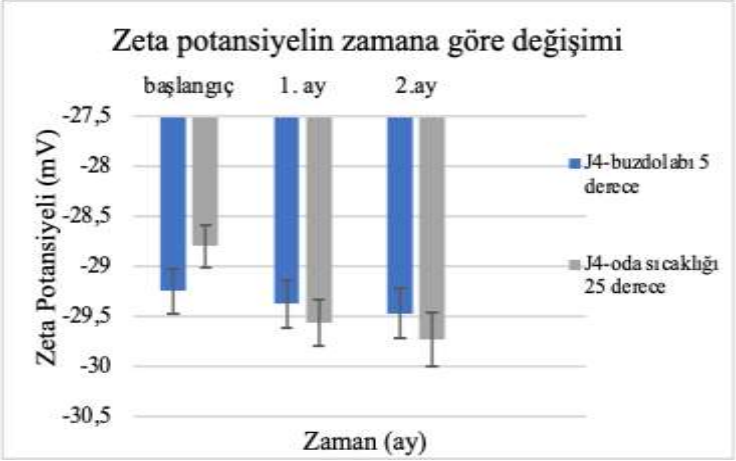


Şekil 4.29 Ins-KKN formülasyonlarına ait zaman bağlı zeta potansiyel değişim grafiği

Tablo 4.28 J4 nolu formülasyonlara ait zeta potansiyeli stabilite sonuçları

Formülasyon	Buzdolabı +5ºC			Oda sıcaklığı 25°C±2°C/%60 bağıl nem		
	Başlangıç	1. ay	2. ay	Başlangıç	1. ay	2. ay
J4*	-29,252 ± 0,224	-29,383 ± 0,238	-29,472 ± 0,247	-28,801 ± 0,216	-29,562 ± 0,233	-29,733 ± 0,268

***J4: (Ins-KKN+P407+MS+PEG3350) içermektedir ve son formülasyondur.**



Şekil 4.30 J4 formülasyonlarına ait zaman bağlı zeta potansiyel değişim grafiği

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında AH tedavisinde kullanılmak üzere insülin molekülü ile kompleks haline getirilen KKN'lerin nazal yol ile uygulanabilecek in situ jel formda hazırlanması gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar kapsamında öncelikle KKN'lerin hazırlanarak, KKN kuantum verimleri hesaplanması gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan KKN'lerin, insülin ile kompleks haline getirilmesinin ardından karakterizasyon çalışmaları (partikül boyutu ve dağılımları, zeta potansiyelleri, TEM görüntüleri) yapılmıştır. Daha sonra ısı değişime duyarlı olarak seçilen P407 polimerini farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanarak Tsol-jel sıcaklıkları tespit edilmiştir. Hazırlanan Ins-KKN'ler ile farklı konsantrasyonlardaki P407 polimer çözeltilerinin Tsol-jel sıcaklıkları incelenmiştir. Elde edilen verilere göre nazal mukoza için uygun Ins-KKN'ler içeren P407 konsantrasyonu belirlenmiştir. Buradan yola çıkılarak hazırlanan formülasyonlarda yer alan Ins-KKN'lerin ve kullanılan yardımcı maddelerin Tsol-jel üzerindeki etkileri incelenmesi gerçekleştirilmesinin ardından reolojik ve mekanik özellikleri belirlenmiştir. Tüm bu çalışmalardan yola çıkarak seçilen formülasyon ve insulin çözeltisi üzerinden insülinin selofan membranlardan *in vitro* salımı ve koyun nazal mukozalarından *ex vivo* permeasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş olup kinetik parametreleri hesaplanmıştır. Permeasyon çalışmalarının ardından alınan nazal mukozalar optik ve lazer taramalı konfokal mikroskop görüntülemeler için uygun hale getirilmiştir. Belirlenen formülasyon ve Ins-KKN'lerin fizikokimyasal stabiliteleri değerlendirilmiştir.

Belirli uygulamalar ve mekanik çalışma için tek tip özellikler elde edebilmek amacıyla KKN'lerin boyutunu hazırlama işlemi sırasında/sonrasında kontrol etmenin mümkün olduğu literatürde bildirilmektedir (Wang ve Hu, 2014). Aynı zamanda kullanılan öncüler, reaksiyon sıcaklık ve süreleri de KKN'lerin üretiminde önem teşkil etmektedir (Nair ve ark. 2020). Literatürede KKN'lerin filtrasyon, kolon kromatografisi, santrifüjleme ve jel elektroforez gibi işlemlerle saflaştırılabileceği söylenmekle beraber bunun oldukça zor olduğu da bildirilmektedir (Wang ve Hu, 2014). KKN'lerin boyutlarının sentezleme yoluyla ilişkili olduğu belirtilmekte ve genel olarak 1,5-2,5 nm büyüklüğünde oldukları bildirilmiştir. Elde edilen bu KKN'lerin düşük toksisite, iyi fotostabilite, mükemmel lüminesans gösterdikleri rapor edilmiştir (Zhu ve ark. 2009). Tez çalışması kapsamında KKN'lerin hazırlanabilmesi için aşağıdan yukarıya

yöntemlerden olan mikrodalga sentez yöntemi kullanılmıştır. Mikrodalga sentez yöntemi sahip olduğu yüksek verim, iyi tekrarlanabilirlik, kontrollü boyut ve sıcaklık, düşük maliyet, hız, çevre dostu, kısa reaksiyon süresi gibi birçok avantajlarından dolayı tercih edilmiştir (Wang ve ark. 2019). İlk başta KKN'leri üretebilmek için pek çok karbon kaynağı olabileceği düşünülen kimyasal maddelere farklı sıcaklık ve sürelerde denemeler yapılmıştır. Yapılan bu denemelerin sonunda 0,1 g'dan 0,4 g' a kadar değişen konsantrasyonlarda SAMH ve Na-sitratın karbon kaynağı olarak kullanıldığı l-sistein içeren çözeltiler mikrodalga sentez cihazında 140°C'de 20 dakika reaksiyon sonucunda elde edilmişlerdir. Elde edilen bu formülasyonları (G1-G8) 365 nm UV lambası altında incelendiğinde SAMH içeren KKN'lerin mavi floresan, Na- sitrat içeren KKN'lerin ise yeşil floresan özellik göstermişler ve bu KKN'lerin oluşumunu kanıtlayan ilk adımdır (Tablo 3.5). Aynı zamanda SAMH içeren KKN'lerde (G1-G4) konsantrasyon arttıkça UV altında floresan yoğunluğunun artmasına rağmen Na-sitrat içeren KKN'lerde (G5-G8) ise konsantrasyon artışlarında böyle bir netliğin olduğu görülmemiştir. Na-sitrattın karbon kaynağı olarak kullanıldığı formülasyonların fiziksel görünümlerinde zamanla yeşil floresanlığın azaldığı fark edilmiştir. Bu azalma ortam pH değerinin değişmesine bağlı olarak kuantum noktasının yüzeyinde ve yüzey pasivizasyon sağlayan fonksiyonel gruplarda oluşan değişikliklere bağlı olduğu düşünülmüştür.

Reaksiyon sonrası elde edilen KKN'lerin pH değerleri hem formülasyonda bulunan etkin maddenin stabilite ve etkinliğini değiştirmemesi hem de nazal mukozada tahrişe neden olmaması gerekmektir (Dhas ve ark. 2019). Bu amaçla hazırlanan KKN'lerin pH değerleri ölçülmüş olup SAMH içeren (G1-G4) KKN'ler aşırı asidik özellikteyken (pH:2-3), Na-sitrat içeren (G5-G8) KKN'ler yüksek alkali (pH:11-13) özellik göstermekte ve nazal mukoza pH (5,5-6,5)'sına uygun bulunmamıştır (Tablo 4.2) (Güngör ve Özsoy 2009). Bu amaçla pH'nin uygun aralığa çekilebilmesi için çöktürme işlemi uygulanmıştır ve pH değerleri uygun aralığa getirilmiştir (F1-F8) (Tablo 4.3).

Hazırlanan formüasyonlardan F5-F8 arasında olan ve yeşil floresan gösteren KKN'lerin belirli bir zaman sonra floresan yoğunluğunu kaybetmesinden dolayı mavi floresan özellik gösteren F1-F4'ten floresan yoğunluğu yüksek olan F4 tercih edilmiştir. Burada 0,5 M sülfat-sülfürik asit çözeltisi kendi kendine kuantum noktaları oluşturduğu

bilindiği için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan F4 formülasyonu ile spektroflorimetrede ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Kinin sülfat ile yapılan kuantum verimi %58 dir (Albrecht 2008). F4 nolu formülasyon sonucunda elde edilen verim ise % 91,2 olarak hesaplanmıştır. Kuantum veriminin yüksek olması düşük konsantrasyonlarda bile güçlü floresan gösterebileceğini yani *in vivo* bir uygulama için gereken miktarı azaltarak vücuttan daha iyi metabolize olabilmesi sağlamıştır (Fong ve ark. 2018).

Nazal mukoza pH'sına uygun hale getirilen F1-F8 nolu formülasyonlara 1:1 oranında insülin glulisin ilave edilmiş olup oda sıcaklığında, manyetik karıştırıcıda, karanlık ortamda 6 saat karışmaya bırakılmıştır (Tablo 4.4). Daha sonra elde edilen Ins-KKN'lerin (F1i-F8i) partikül boyutları 8-10 nm arasında, PDI değerleri ise 0,1 ile 0,5 arasında değişmektedir (Tablo 4.5). Elde edilen bu sonuçlar Ins-KKN'lerin partikül büyüklük dağılımlarının homojen olduğunu yani agregata bağlı veya geniş çaplı partiküller içermediğini göstermiştir. Zeta potansiyellerinin ise -25,35 ± 2,992 ile -31,51 ± 1,595 arasında değiştiği bulunmuştur (Tablo 4.6). Tüm formülasyonlar arasında F4i nolu formülasyonunun -31,51 ± 1,595 ölçüm sonuç ortalamasyla daha yüksek olduğu görülmüş ve daha stabil olduğu sonucuna varılmıştır. Partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları hazırlanan tüm formülasyonların 2-10 nm arasında olduğunu göstermesine rağmen TEM görüntüsü Ins-KKN'lerin morfolojik özellikleri hakkında daha net bilgi edinilmesini sağlamıştır. Seçilen en iyi formülasyon (F4i), partikül büyüklüğü ölçüm ortalama sonuçları 8.35 ± 0.193 olmasına rağmen TEM görüntüsü ile elde edilen görüntüler 2 nm boyutta olduğunu göstermiştir. Böylece aslında hazırlanan Ins-KKN'lerin çok daha noktacıklar hlinde olduğu görülmektedir. Elektron mikrokobunda daha küçük görüntülere inilmesi için kullanılan elektrik akımının daha da yükseltilmesi gerekmiştir, ancak bu durumda numune yandığından sonuç alınamamıştır.

In situ jeller soğukta hazırlama metoduna göre hazırlanmıştır (Ban ve ark. 2018). Jelleşme ajanı olarak suda çözünürlüğü yüksek, düşük iritasyon ve toksisite gösteren, ilaç salım özellikleri yüksek olan P407 polimeri seçilmiştir (Giuliano ve ark. 2018). P407'den %15 (V0), %18 (V1), %20 (V2) ve %25 (V3) (a/h) konsantrasyonlarda, etkin madde içermeyen polimer çözeltileri (Tablo 4.7) hazırlandıktan sonra F9'dan F32'ye kadar farklı konsantrasyon ve Ins-KKN içeren formülasyonlar hazırlanmıştır (Tablo 4.8, Tablo 4.9). Bu P407 çözeltilerinden V3 oda sıcaklığında hızlıca jel formuna

dönüşmesinden dolayı boş hali çalışılmıştır. Elde edilen tüm formülasyonlar berrak saydam bir görüntüye sahip olmuştur.

Farklı konsantrasyonlardaki P407 çözeltisinin manyetik karıştırıcıda ısı kontrollü jel oluşum noktalarından elde edilen sonuçlara göre P407 konsantrasyonu arttıkça jelleşme sıcaklığının azaldığı görülmüştür (Tablo 4.10). Bu sonuç Russo ve ark.'larının yapmış olduğu çalışmayla uyum göstermiştir. Aynı zamanda %20 (a/h) konsantrasyonuna sahip olan V2 nolu formülasyonun 34 ^{o}C'de jel oluşturması hazırlanacak formülasyonun nazal mukozaya uygulanabileceğini göstermiştir. Bu sonuç Lindemann ve ark.'larının yapmış olduğu nazal mukoza sıcaklık çalışması sonuçlarına uygun bulunmuştur (Lindemann ve ark. 2002).

Farklı konsantrasyonlarda KKN kaynağı ve P407 polimer çözeltilerinden hazırlanan formülasyonlar için Tsol-jel sıcaklıkları incelenmiş olup aynı konsantrasyonlarda P407 içeren formülasyonların faklı sıcaklık noktalarında jelleştiği görülmüştür (Tablo 4.11). Örneğin 30 ^{o}C'de, %20 (a/h) P407 içeren F19 ve F32 nolu formülasyonlar karşılaştırıldığında F19 nolu formülasyon hafif jel oluşumu görülmüşken F32 nolu formülasyon tamamen jel olmuştur. V2 nolu P407 çözeltisi 34 ^{o}C'de jel oluşturmasına rağmen Ins-KKN'lerin ilavesi jelleşme sıcaklıklarını değiştirebildikleri hatta kullanılan karbon kaynakları ve miktarları dahil olmak üzere jelleşme sıcaklığını etkilediğini görülmüştür. Böylece formülasyonda kullanılan maddelerin P407 çözeltisindeki çapraz bağlanmaları etkileyerek jelleşme sıcaklığını değiştirebildiği gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre F20, F23, F27, F28 ve F32 nolu formülasyonların jelleşme sıcaklıkları nazal mukoza için uygun olarak bulunmuştur. Bu formülasyonlardan Na-sitrat ile hazırlanan KKN'lerin zamanla floresan özelliklerini kaybetmeleri nedeniyle (F23, F27, F28 ve F32), SAMH'ten hazırlanan KKN'ler olan F20 nolu formülasyon üzerinden devam edilmiştir. Daha sonra belirlenen F20 nolu formülasyonun içerdiği %20 (a/h) P407 polimer çözeltilerinin Tsol-jel değerine Ins-KKN ve yardımcı maddelerin etkisi incelenmiştir (Tablo 4.12). J1 ve J5 nolu formülasyonlarda 34 ^{o}C'de jel oluşmazken J2 ve J7 nolu formülasyonlarda jel oluşumunun gözlenmesi MS miktarının belirli bir konsantrasyonda Tsol-jel değerini değiştirdiğini ortaya koymuştur. Aynı şekilde J3, J4 ve J8 nolu konsantrasyonlarda MS miktarının değişmesi Tsol-jel değerini etkilemiştir. J3, J4 ve J8 nolu formülasyonlarda MS miktarının belirli konsantrasyon üzeri olması Tsol-jel değerini etkilemiştir. J4 ve J9

nolu formülasyonlarda ise PEG3350 miktarının değişmesi Tsol-jel üzerinde etki yaratmamıştır. Aynı denemeler Ins-KKN içeren J3, J4 ve J8 nolu formülasyonları içinde gerçekleşirilmiş olup son olarak MS miktarı sabit tutularak PEG3350 miktarının Tsol-jel değeri incelenmiş olup bunların sonucunda Ins-KKN ve MS Tsol-jel değerlerini etkilerken, PEG3350 miktarları Tsol-jel değerini değiştirmediği saptanmıştır.

Reolojik özelliklerin incelenebilmesi amacıyla hazırlanan J1V-J9V nolu formülasyonlardan 20 ºC'de J1V, J2V, J5V ve J7V nolu formülasyonlarda MS miktarı arttıkça viskozite arttığı görülmüştür. Sıcaklık 34 ºC'ye geldiğinde ise MS içermeyen J5V viskozitesinde değişiklik görülmezken J1V, J2V ve J7V nolu formülasyonlardaki viskozite değerinde sıcaklığa bağlı olarak çok daha fazla artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.11). J3V, J4V, J6V ve J8V nolu formülasyonlarında 20 ºC 'de en yüksek viskozite değerinin MS miktarı en fazla olan J4V nolu formülasyona ait olduğu bulunmuştur (Şekil 4.12). Formülasyondaki MS miktarı azaldıkça viskozite değeri azalmıştır. Sıcaklık 34 ºC'ye getirildiğinde viskozite değerleri J6V nolu formülasyonda değişmezken J3V, J4V, J6V nolu formülasyonda artmıştır. J1V ve J3V nolu formülasyonlarında 20 ºC'de J3V nolu formülasyonun viskozite değeri aynı sıcaklıkta J1V nolu formülasyondan yüksek bulunmuştur (Şekil 4.13). 34 ºC' de viskozite değeri her iki formülasyon içinde artmıştır (Şekil 4.13). Son olarak J4V ve J9V nolu formülasyonlarının her ikisinde de aynı sıcaklıklarda viskozite değerleri arasında fark görülmemiştir. Sıcaklığın artmasıyla iki formülasyon da viskozite değeri artmıştır (Şekil 4.14). Elde edilen sonuçlara göre hazırlanan formülasyonlardaki MS miktarlarına bağlı olarak meydana gelen viskozite artışı Shin ve ark.'ları tarafından yapılan çalışma ile benzerlik göstermiştir (Shin ve ark. 2018). Sıcaklığın nazal mukoza sıcaklığına getirilmesiyle elde edilen viskozite artışı Nasatto ve ark.'larının araştırma sonuçlarıyla uyum sağlamıştır (Nasatto ve ark. 2015).

Hazırlanan in situ jellerin mekanik özellikleri Tablo 4.17'de değerlendirilmiş, MS mukoadezif ajan olmasından dolayı Ins-KKN içermeyen J1A, J2A, J5A ve J7A nolu formülasyonlarda MS miktarı arttıkça mekanik özelliklerde genel olarak artma görülmüştür. Ins-KKN içeren J3A, J4A, J6A ve J8A nolu formülasyonlar muko/biyoadezif ajan olan MS miktarlarına göre karşılaştırıldığında en fazla MS içeren J4A nolu formülasyonda, J6A nolu formülasyona göre adeziflik ve sıkıştırılabilirlik artarken, sertlik azalmıştır. MS miktarı iki kat fazla olan J4A nolu formülasyonda J3A'ye göre tüm mekanik özelliklerin arttığı görülmüştür. J3A ile J1A formülasyonları

karşılaştırıldığında adezifliğin J3A nolu formülasyonda daha yüksek adeziflik ve daha düşük koheziflik olması nazal mukozaya ilginin fazla olacağını göstermiştir. Ins-KKN içeren formülasyonlarda PEG3350'nin mekanik özelliklere etkisi incelendiğinde ise PEG3350 miktarının artması tüm mekanik özelliklerin artmasına neden olmuştur.

Adeziflik sıralaması yapıldığında Ins-KKN içermeyen formülasyonları için; sırasıyla J7A, J2A, J5A, J1A olarak azalmakta ve 0,15 g MS içeren formülasyonun (J7A), 0,2 g MS içerenden (J2A) adezifliği daha fazla olmasına rağmen sertlik ve sıkıştırabilirliği daha az olduğu görülmüştür.

Ins-KKN içeren formülasyonlarda ise adeziflik sırasıyla J4A, J3A, J6A, J8A olarak azalmakta MS miktarı ile orantılı olarak artmaktayken MS en yüksek olan J4A nolu formülasyon için sertlik ve sıkıştırılabilirlik değerleri MS içermeyen J6A nolu formülasyondan daha düşük bulunmuştur.

Buradan yola çıkılarak Ins-KKN içermeyen J7A nolu formülasyonda MS 0,15 g iken adeziflik en fazla, Ins-KKN içeren J8A nolu formülasyonda ise aynı MS miktarında adeziflik en az bulunmuştur. Ins-KKN'ler P407 arasındaki çapraz bağlantılara girerek sol fazda kalmasına neden olmakta Ins-KKN'ler Tsol-jel sıcaklığını değiştirmekte ve adezif ajan MS yeterli olmamaktadır.

Ins-KKN içeren J4A nolu formülasyonda, MS 0,2 g iken adeziflik en fazla, Ins-KKN içermeyen J2A nolu formülasydan aynı MS miktarında adeziflik, 0,15 g MS içeren J7A nolu formülasyondan düşük olması adeziflik için Ins-KKN varken 0,2 g MS'nin yeterli olduğunu göstermiştir. Ins-KKN'lerde insulin MS nin nazal mukoza etkileşimini azalttığını göstermiştir.

Koheziflik karşılaştırıldığında aynı miktarda MS içeren J2A (Ins-KKN yok), J4A (Ins-KKN) daha yüksek kohezyona sahip daha az aezifliğe sahip bu yine Ins-KKn'lerle P407 polimerleri ile arasındaki etkileşim ile ilglidir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak MS ve PEG3350 miktarının artması viskozite ve adeziflik özelliklerinde artışa neden olmuştur. Aynı zamanda kohezifliğin azalması nazal mukoza yüzeyine adezifliğin artmasına neden olmuştur. Adezifliğin artması ise uygulanan formülasyonun nazal mukoza yüzeyinde kalış süresini arttırmakta, mukosiliyer klirensi azaltmakta ve biyoyararlanımın iyileşmesine neden olmaktadır (Giuliano ve ark. 2018).

Jel üzerine gerçekleştirilen tüm Tsol-jel, reolojik ve mekanik özellik çalışmalarının sonunda nazal mukozaya uygun olan formülasyonun J4 nolu formülasyon olmasına karar verilmiştir. Bundan sonra gerçekleştiren *in vitro* salım, *ex*

vivo geçiş çalışmaları, konfokal ve optik incelemeler J4 nolu formülasyon üzerinden yapılmıştır.

Franz difüzyon ile gerçekleştirilen sadece insülin çözeltisi içeren formülasyonlar ile Ins-KKN içeren in situ jel (J4) formülasyonları n=3 olarak selofan membranla 12 sa boyunca yapılan salım çalışmaları değerlendirilmiştir. Yapılan karşılaştırmalarda 3. saatte sadece insülin çözeltisi içeren formülasyondan % çıkan insülin % 70,75 iken Ins-KKN içeren in situ formülasyonunnda bu değer % 37,51 olarak bulunmuştur. 9. saate gelindiğinde insülin çözeltisi içeren formülasyonun tamamına yakın kısmının salındığı görülürken Ins-KKN içeren in situ jel formülasyonundan aynı saatte salınan insülin miktarı çok daha az olarak bulunmuştur (Şekil 4.15). Bu iki formülasyon kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Ins-KKN içeren in situ jel formülasyonundan P407 ve MS varlığı nazal mukozada kalış süresini arttrmıştır. Özsoy ve Güngör (2011) yapmış olduğu çalışmayla uyum sağlamaktadır. Sonuç olarak KKN'lerin insülin salımını değiştirmesi, hem KKN ile insülin arasında bir etkileşmenin olduğunu, hem de mebrandan geçişte moleküler özellikler ve moleküler aktivitesinin değiştiğini göstermektedir.

Analitik metot validasyonu bir ürünün hazırlanmasında kullanılan yöntemlerden elde edilen verilerden yola çıkarak değerlendirilmesi olarak tanımlanabilir (McMillan, 2016). Analitik doğrulama, uygulanan çalışmanın/yöntemin kabul edilmiş metodolojiyi kullanarak tutarlı bir tekrarlanabilirlik sağlarken aynı zamanda kesin ve doğru sonuçlar verdiğine dair de deneysel kanıtlar oluşturmakta ve birçok adımdan oluşmaktadır. Bu amaçla tez çalışmasında kullanılan yöntemin r^2 değeri 0.994 olarak bulunmuş olup doğrusal olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmadan yola çıkılarak 95, 90 ve 85 µg / ml konsantrasyonlarda hazırlanan formülasyonlarda doğruluk ve % geri elde değerleri incelenmiş ve sonuçlar, doğruluğunun bulunduğunu ve kullanılabilir olduğu göstermiştir. Ayrıca Lowry protein kitinde anlatıldığı gibi gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda kullanılan yardımcı maddelerin 750 nm'deki absorbansları ölçüldüğünde metodun insüline seçici olduğu gösterilmiştir.

12 saat sonunda sadece insülin çözeltisi ile Ins-KKN içeren in situ jel (J4) formülasyonlarının başlangıçta benzer % geçiş insülin miktarları görülmesine rağmen 3. saat sonunda yapılan ölçümlerde Ins-KKN içeren in situ formülasyonlarda geçiş miktarının daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.17). Bu iki formülasyon 3. saatte

kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). İnsülin molekülünün nazal mukozadan penetrasyonları KKN'lerle beraber elektrosatik etkileşimlere, termodinamik aktivite değişimlerine ve KKN'lerle biraraya gelme konformasyonlarına bağlı oldukları düşünülmektedir. Termodinamik aktivite molekülün sahip olduğu brown hareketi olarak düşünüldüğünde insülinin molekül hareketliliğini arttırarak geçişi sağladığı düşünülmüştür (Yerlikaya ve ark. 2021).

Hazırlanan nazal mukoza kesitleri optik mikroskop altında incelenmiştir. Burada 12 sa sonunda nazal mukoza epitelinin yapısında bozulma olmadığı görülmüştür. Deney sonucunu etkilleyebilecek zamana bağlı dekompozistyon ve doku bozulmalarının olmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.18).

Lazer taramalı konfokal mikroskopta boyama olmadan sadece kesit alınarak yapılan incelemede yoğun bir mavi floresan görüntü elde edilmiştir (Şekil 4.19-4.23). Bu in situ formülasyonda bulunan Ins-KKN'lerin nazal epiteline geçebildiğini göstermiştir. Herhangi bir boyama yapılmadan mavi floresan görülmesi KKN'lerin başarılı bir şekilde hazırlandığını kanıtlamıştır. Aynı zamanda nazal uygulamadan 12 saat sonra dahi floresan özelliğini koruyabilmesi kararlı bir formülasyon olduğunu ve hücre içinde yıkıma uğramadığını göstermiştir.

Kuantum noktaları ile yapılan çalışma sonucunda elde edilen mukozal doku örnekleri konfokal lazer taramalı mikroskospta incelendiğinde, kuantum noktalarının ve buna bağlı floresans görüntünün daha çok hücre içinde yoğunlaştığı, hücreler arası boşlukta (interselüler aralıkta) daha az bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.20). Bunun kuantum noktalarının permeabilite bariyerini kolay aşabilme kabiliyetinin olmasına, kuantum noktalarının termodinamik aktivitelerinin daha yüksek olması nedeni ile membranlardan daha yüksek oranda geçmesine, membran lipitleri ile etkileşerek hidrofobik alanda daha fazla yer alma potansiyellerine bağlanmasının yanlış olmayacağı değerlendirilmiştir.

Gerçekleştirilen kinetik parametrelerin değerlendirilmesinde, KKN'den insülin salımına bakıldığında (Selofan membran) salım kinetiğinin Higuchi kinetiğine daha yüksek uyum gösterdiği bulunmuştur (Tablo 4.20). Bu kinetikte uyum zamanın karekökü ile orantılıdır ve daha çok bir matristen çıkışı ifade etmektedir. Kuantum noktaları kullanıldığında böyle bir matris olmadığı düşünülebilir. Ancak salımın böyle kontrollü olması kuantum noktalarının çok küçük olan boyutları nedeni ile sahip

oldukları büyük ve geniş yüzey alanı ile açıklanabilir. Burada kullanılan polimerden dolayı matris olabileceği düşünülse de aslında KKN'lerin sahip oldukları büyük yüzeye adsorbe olmuş insülin molekülleri, bir veya birkaç noktadan kuantum noktası ile ilişki halinde olup, bağıl olarak büyük bir kuvvetle yüzeyde alıkonduğundan zamana göre matristen çıkar gibi dereceli bir şekilde molekülleri serbest bırakmaktadır. KKN boyut olarak çok küçük olduğundan ve filtrasyon gibi tekniklerle ayırılamadığından kuantum noktalarının insülin molekülünün membrandan geçişinde başka bazı etkileşimleri de mümkün kılabileceği düşünülebilir. Bu durumda basit ve net bir salım ve membrandan geçiş değil daha kompleks, zamana göre değişen konsantrasyon gradienti nedeni ile değişen bağlanma kuvvetleri matristen salıma benzer bir salım kinetiği elde edilmesine neden olmuştur. Burada insülin molekülü kuantum noktası ve bunların tek tek veya birlikte membranı oluşturan polimer ile etkileşimleri de olayın kompleks olmasına destek verecektir.

Mukozadan geçişe gelince (Nazal mukozadan geçiş) burada benzer olayların olması aynen söz konusu olmakla birlikte ilave olarak mukozal membranın yapısı, yapısındaki protein ve yağlar ile mukoza yüzeyinde mevcut biyolojik mukus varlığı, mukozal membranın tek ve homojen bir yapıya sahip olmaması (epidermal, tabaka ve derine doğru diğer dokuların mevcudiyeti bu dokuyu kompozit bir doku haline getirmektedir) olayın daha da farklı olmasına neden olmaktadır. Bu durumda kuantum noktalarının protein ve yağ molekülleri ile etkileşmesi, kauntum noktası ve insülin kompleksinin termodinamik aktivite ve diffüzyon katsayılarının çıplak insülin molekülünden farklı olması olayı daha da karışık karmaşık hale getirmektedir. Ancak kuantum noktaslarının floresan özellikte olması onları mikroskop altında da izlenebilir kılmaktadır. Bu özellik onların karmaşık penetrasyon kabiliyetlerini bir nebze de olsa daha anlaşılabilir ve gözle izlenebilir kılmaktadır. Yapılan bu değerlendirme sonucu olay oldukça karmaşık olsa da kuantum noktası insülin kompleksinin nazal mukoza hücrelerinin içine kolayca girebildiğini göstermektedir. Mikroskop altında bunlar daha ziyade hücre içlerinde ve hidrofobik bölgelerde yoğun olarak izlenmektedir. Hücresel boşluklarda ise daha az yoğun olarak tespit edilmiştir. Aslında doku kesitleri deney sonrası alındığı için deney sonunda yani permeasyon olayı neredeyse tamamlandıktan sonra onların sonuç olarak nerede olduğu tespit edilebilmiştir.

Deneyin başlangıç zamanlarında yani hangi yolu izleyerek gittikleri inceleme imkanı mikrıoskop ile yapılamamış olmakla birlikte, deney esnasında reseptör faz sürekli UV lamba ile kontrol edilerek geçiş izlenmiş ve bu insülin geçişinin oldukça hızlı olduğu saptanmıştır ki bu zaten penetrasyon grafiği ile de doğrulanmaktadır. Yani diğer bir deyişle hem KKN, hem de insülin hızla reseptör faza geçmiştir. Bu da kompleksin geçişte bozulmadığının bir kanıtıdır. Kompleks yapılamamış olsa veya geçiş esnasında bir bozulma olsa reseptör faz da hem KKN hem de insülin aynı anda tespit edilemezdi. Bu çalışmada ayrıca floresan özellikte olan maddelerin geçiş çalışmasında nasıl kullanaılabileceği ile ilgili de uygulama yapılmıştır.

J4 (Ins-KKN+P407+MS+PEG3350) ve Ins-KKN'lerine ait stabilite testleri 5°C'de buzdolabı ve 25°C±2°C/%60 bağıl nem'de oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. J4 nolu formülasyonların başlangıç, 1. ve 2. aylarda buzdolabı ile oda sıcaklığı arasındaki partikül büyüklükleri, PDI değerleri ve zeta potasiyelleri ile Ins-KKN formülasyonlarının başlangıç, 3. ve 6. aylarda buzdolabı ile oda sıcaklığı arasında partikül büyüklükleri, PDI değerleri ve zeta potasiyelleri arasında değişiklik görülmemiştir.

Sonuç olarak yapılan bu tez çalışması sonunda elde edilen veriler ve sonuçlar değerlendirildiğinde hazırlanan in situ jel formülasyonunun tekrar edilebilir sonuçlar veren ve uygulanabilir bir fomülasyon olduğu bulunmuştur. Ancak mutlaka daha detaylı ve *in vivo* deneyleri de kapsayan çalışmaların yapılmasına hala ihtiyaç olduğu söylenebilir. Hazırlanan bu formülasyonun Alzheimer hastalığı tedavisinde nazal yoldan verilmeye uygun ve potansiyel alternatif bir tedavi yöntemi olduğu sonucuna da ulaşılmıştır. Bu formülasyonlarda kullanılan KKN'ler ile ilgili detaylı tecrübe edinilmiş ve endüstriye uygulanabilir, ölçek büyütmesi yapılabilir metotlarla yapıldığından ticarileştirilmesinde ve endüstriyel ölçekte üretilmesinde büyük sorunlar yaşanmayacağı değerlendirilmiştir. Kullanılan analitik metotlar valide edilmiştir ve kolaylıkla sanayiye tarnsfer edilebilir niteliktedir. Ön formülasyon çalışmaları ve stabilite testleri ürünün kalitesi üzerine olumsuz etkileyecek düzeyde olumsuz bir formülasyon bileşeni olmadığını göstermiştir, ancak yine de daha detaylı stabilite testlerinin yapılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

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

Aderibigbe, B. A. (2018). In situ-based gels for nose to brain delivery for the treatment of neurological diseases. Pharmaceutics, 10(2), 40.

Aderibigbe, B. A., & Naki, T. (2018). Design and efficacy of nanogels formulations for intranasal administration. Molecules, 23(6), 1241.

Agrawal, M., Saraf, S., Saraf, S., Antimisiaris, S. G., Chougule, M. B., Shoyele, S. A., & Alexander, A. (2018). Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. Journal of Controlled Release, 281, 139-177.

Agrawal, M., Saraf, S., Saraf, S., Dubey, S. K., Puri, A., Gupta, U., Kesharwani, P., Ravichandiran, V., Kumar, P., Naidu, V. G. M., Murty, U. S., & Alexander A. (2020). Stimuli-responsive In situ gelling system for nose-to-brain drug delivery. Journal of Controlled Release, 10(327), 235-265.

Albrecht, C. (2008). Joseph R. Lakowicz: Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Edition. Anal Bioanal Chem 390, 1223–1224.

Altuntaş, E., & Yener, G. (2017). Formulation and evaluation of thermoreversible in situ nasal gels containing mometasone furoate for allergic rhinitis. AAPS PharmSciTech, 18(7), 2673-2682.

Anand, U., Feridooni, T., & Agu, R. U. (2012). Novel mucoadhesive polymers for nasal drug delivery. Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems, 315-330.

Anwar, S., Ding, H., Xu, M., Hu, X., Li, Z., Wang, J., & Bi, H. (2019). Recent advances in synthesis, optical properties, and biomedical applications of carbon dots. ACS Applied Bio Materials, 2(6), 2317-2338.

Arya, M. A., Kumar, M. K. M., Sabitha, M., Menon, K. N., & Nair, S. C. (2019). Nanotechnology approaches for enhanced CNS delivery in treating Alzheimer's disease. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 51, 297-309.

Aydın A. C. (2020). Alzheimer Hastalığı ve Demans. Journal of Literature Pharmacy Sciences, 9(2):125-36.

Badıllı, U., Mollarasouli, F., Bakirhan, N. K., Ozkan, Y., & Ozkan, S. A. (2020). Role of quantum dots in pharmaceutical and biomedical analysis, and its application in drug delivery. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 116013.

Bahadur, S., & Pathak, K. (2012). Physicochemical and physiological considerations for efficient nose-to-brain targeting. Expert Opinion on Drug Delivery, 9(1), 19-31.

Ban, E., Park, M., Jeong, S., Kwon, T., Kim, E. H., Jung, K., & Kim, A. (2017). Poloxamer-based thermoreversible gel for topical delivery of emodin: influence of P407 and P188 on solubility of emodin and its application in cellular activity screening. Molecules, 22(2), 246.

Ban, M. M., Chakote, V. R., Dhembre, G. N., Rajguru, J. R., & Joshi, D. A. (2018). In-situ gel for nasal drug delivery. Int J Dev Res, 8(2), 18763-18769.

Bawendi, M. G., Steigerwald, M. L., & Brus, L. E. (1990). The quantum mechanics of larger semiconductor clusters ("quantum dots"). Annual Review of Physical Chemistry, 41(1), 477-496.

Bellou, V., Belbasis, L., Tzoulaki, I., Middleton, L. T., Ioannidis, J. P., & Evangelou, E. (2017). Systematic evaluation of the associations between environmental risk factors and dementia: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. Alzheimer's & Dementia, 13(4), 406-418.

Berends, A. C., & de Mello Donega, C. (2017). Ultrathin one-and two-dimensional colloidal semiconductor nanocrystals: Pushing quantum confinement to the limit. The Journal of Physical Chemistry Letters, 8(17), 4077-4090.

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

Bitter, C., Suter-Zimmermann, K., & Surber, C. (2011). Nasal drug delivery in humans. Topical Applications and the Mucosa, 40, 20-35.

Boddupalli, B. M., Mohammed, Z. N., Nath, R. A., & Banji, D. (2010). Mucoadhesive drug delivery system: An overview. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research, 1(4), 381.

Bolla, P. K., Rodriguez, V. A., Kalhapure, R. S., Kolli, C. S., Andrews, S., & Renukuntla, J. (2018). A review on pH and temperature responsive gels and other less explored drug delivery systems. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 46, 416-435.

Briggs, R., Kennelly, S. P., & O'Neill, D. (2016). Drug treatments in Alzheimer's disease. Clinical Medicine, 16(3), 247.

Brus, L. E. (1983). A simple model for the ionization potential, electron affinity, and aqueous redox potentials of small semiconductor crystallites. The Journal of chemical physics, 79(11), 5566-5571.

Carvalho, F. C., Bruschi, M. L., Evangelista, R. C., & Gremião, M. P. D. (2010). Mucoadhesive drug delivery systems. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 46(1), 1-17.

Cassidy, J., & Zamkov, M. (2020). Nanoshell quantum dots: Quantum confinement beyond the exciton Bohr radius. The Journal of chemical physics, 152(11), 110902.

Chan, K. K., Yap, S. H. K., & Yong, K. T. (2018). Biogreen synthesis of carbon dots for biotechnology and nanomedicine applications. Nano-micro Letters, 10(4), 1-46.

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

Chen, C. R., Kachramanoglou, C., Li, D., Andrews, P., & Choi, D. (2014). Anatomy and cellular constituents of the human olfactory mucosa: a review. Journal of Neurological Surgery Part B: Skull Base, 75(05), 293-300.

Chen, T., Embree, H. D., Brown, E. M., Taylor, M. M., & Payne, G. F. (2003). Enzyme-catalyzed gel formation of gelatin and chitosan: potential for in situ applications. Biomaterials, 24(17), 2831-2841.

Chinnathambi, S., & Shirahata, N. (2019). Recent advances on fluorescent biomarkers of near-infrared quantum dots for in vitro and in vivo imaging. Science and Technology of Advanced Materials, 20(1), 337-355.

Copur, F., Bekar, N., Zor, E., Alpaydin, S., & Bingol, H. (2019). Nanopaper-based photoluminescent enantioselective sensing of L-Lysine by L-Cysteine modified carbon quantum dots. Sensors and Actuators B: Chemical, 279, 305-312.

Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. Acta Pol Pharm, 67(3), 217-223.

de la Monte, S. M. (2013). Intranasal insulin therapy for cognitive impairment and neurodegeneration: current state of the art. Expert Opinion on Drug Delivery, 10(12), 1699-1709.

de la Monte, S. M., & Wands, J. R. (2005). Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's Disease, 7(1), 45-61.

Degim, I. T., & Kadioglu, D. (2013). Cheap, Suitable, Predictable and Manageable Nanoparticles for Drug Delivery: Quantum Dots. Current Drug Delivery, 10, 32- 38.

Deng, J., Lu, Q., Mi, N., Li, H., Liu, M., Xu, M., ... & Yao, S. (2014). Electrochemical synthesis of carbon nanodots directly from alcohols. Chemistry–A European Journal, 20(17), 4993-4999.

Devasani, S., Dev, A., Rathod, S., & Deshmukh, G. (2016). An overview of in situ gelling systems. Pharmaceutical and Biological Evaluations, 3, 60-69.

Dhas, N. L., Kudarha, R. R., & Mehta, T. A. (2019). Intranasal delivery of nanotherapeutics/nanobiotherapeutics for the treatment of Alzheimer's disease: A proficient approach. Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems, 36(5).

Drbohlavova, J., Adam, V., Kizek, R., & Hubalek, J. (2009). Quantum dots – characterization, preparation and usage in biological systems. International Journal of Molecular Sciences, 10, 656-673.

Dutta M, Sarkar S, Ghosh T, Basak D, ZnO/graphene quantum dot solid-state solar cell. J. Phys. Chem. C, 116, 20127–20131, 2012.

El-Shabasy, R., M, Elsadek, M., F., Ahmed, B., M., Farahat, M., F., Mosleh, K., N., Taher, M., M. (2021). Recent Developments in Carbon Quantum Dots: Properties, Fabrication Techniques, and Applications. Process, (9), 388.

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

Erkekoğlu, P., Giray, B., & Şahin, G. İnsülin Glarjin Kullanımının Toksikolojik Açıdan Değerlendirilmesi. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, (2), 187-204.

Feng, Y., He, H., Li, F., Lu, Y., Qi, J., & Wu, W. (2018). An update on the role of nanovehicles in nose-to-brain drug delivery. Drug Discovery Today, 23(5), 1079-1088.

Fitzpatrick, S. D., Fitzpatrick, L. E., Thakur, A., Mazumder, M. A. J., & Sheardown, H. (2012). Temperature-sensitive polymers for drug delivery. Expert Review of Medical Devices, 9(4), 339-351.

Fong, J. F., Ng, Y. H., & Ng, S. M. (2018). Carbon dots as a new class of light emitters for biomedical diagnostics and therapeutic applications. In Fullerens, Graphenes and Nanotubes (pp. 227-295). William Andrew Publishing.

Frecker, T., Bailey, D., Arzeta-Ferrer, X., McBride, J., & Rosenthal, S. J. (2015). Quantum dots and their application in lighting, displays, and biology. ECS Journal of Solid State Science and Technology, 5(1), R3019.

Freiherr, J., Hallschmid, M., Frey, W. H., Brünner, Y. F., Chapman, C. D., Hölscher, C., Craft, S., De Felice, F. G., & Benedict, C. (2013). Intranasal insulin as a treatment for Alzheimer's disease: a review of basic research and clinical evidence. CNS Drugs, 27(7), 505-514.

Frey, W. H., Liu, J., Chen, X., Thorne, R. G., Fawcett, J. R., Ala, T. A., & Rahman, Y. E. (1997). Delivery of 125I-NGF to the brain via the olfactory route. Drug Delivery, 4(2), 87-92.

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

Gerozissis, K. (2003). Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. Cellular and Molecular Neurobiology, 23(1), 1-25.

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

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

Goedert, M., & Spillantini, M. G. (2006). A century of Alzheimer's disease. Science, 314(5800), 777-781.

Gouda, R., Baishya, H., & Qing, Z. (2017). Application of mathematical models in drug release kinetics of carbidopa and levodopa ER tablets. J. Dev. Drugs, 6(02), 1-8.

Grassin-Delyle, S., Buenestado, A., Naline, E., Faisy, C., Blouquit-Laye, S., Couderc, L. J., Le Guen, M., Fischler, M., & Devillier, P. (2012). Intranasal drug delivery: an efficient and non-invasive route for systemic administration: focus on opioids. Pharmacology & Therapeutics, 134(3), 366-379.

Güngör, S., & Özsoy, Y. (2009). Sistemik etki için nazal yol. Mersin Üniv. Sağlık Bilimleri Dergisi, 2(3).

Guo, Y., Shi, D., Cho, H., Dong, Z., Kulkarni, A., Pauletti, G. M., & Ewing, R. C. (2008). In vivo imaging and drug storage by quantum- dot- conjugated carbon nanotubes. Advanced Functional Materials, 18(17), 2489-2497.

Gürcan, D., Okyar, A., Özbek, B., BAKTIR, G., Gerçeker, A., & ÖZSOY, Y. (2010). Nasal administration of ciprofloxacin HCl loaded chitosan microspheres: in vitro and in vivo evaluation. ACTA Pharmaceutica Sciencia, 52(1).

Haraguchi, K., & Takada, T. (2010). Synthesis and characteristics of nanocomposite gels prepared by in situ photopolymerization in an aqueous system. Macromolecules, 43(9), 4294-4299.

Hombach, J., & Bernkop-Schnürch, A. (2010). Mucoadhesive drug delivery systems. Drug Delivery, 251-266.

Hong, S. S., Oh, K. T., Choi, H. G., & Lim, S. J. (2019). Liposomal formulations for nose-to-brain delivery: recent advances and future perspectives. Pharmaceutics, 11(10), 540.

Hou, Y., Lu, Q., Deng, J., Li, H., & Zhang, Y. (2015). One-pot electrochemical synthesis of functionalized fluorescent carbon dots and their selective sensing for mercury ion. Analytica Chimica Acta, 866, 69-74.

Hoyer, S. (2002). The brain insulin signal transduction system and sporadic (type II) Alzheimer disease: an update. Journal of Neural Transmission, 109(3), 341-360.

Huang JJ, Zhong ZF, Rong MZ, Zhou X, Chen XD, Zhang MQ, An easy approach of preparing strongly luminescent carbon dots and their polymer based composites for enhancing solar cell efficiency. Carbon, 70, 190–198, 2014.

Huffman, A. S., Afrassiabi, A., & Dong, L. C. (1986). Thermally reversible hydrogels: II. Delivery and selective removal of substances from aqueous solutions. Journal of Controlled Release, 4(3), 213-222.

ICH Harmonised Tripartite Guideline, Stability Testing of new Drug Substances and Products (CPMP/ICH/2736/99), 2003.

ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: Methodology (CPMP/ICH/281/95), 1995.

Jha, S., Mathur, P., Ramteke, S., & Jain, N. K. (2018). Pharmaceutical potential of quantum dots. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 46(sup1), 57-65.

Jones, D. S., Woolfson, A. D., Brown, A. F., & O'Neill, M. J. (1997). Mucoadhesive, syringeable drug delivery systems for controlled application of metronidazole to the periodontal pocket: in vitro release kinetics, syringeability, mechanical and mucoadhesive properties. Journal of controlled release, 49(1), 71-79.

Karavasili, C., & Fatouros, D. G. (2016). Smart materials: in situ gel-forming systems for nasal delivery. Drug Discovery Today, 21(1), 157-166.

Kartal, N., & Erigüç, G. (2020). Yazılı Basında Demans Haberleri Üzerine İçerik Analizi Uygulaması. Süleyman Demirel Üniversitesi Vizyoner Dergisi, 11(Ek), 211-219.

Karthivashan, G., Ganesan, P., Park, S. Y., Kim, J. S., & Choi, D. K. (2018). Therapeutic strategies and nano-drug delivery applications in management of ageing Alzheimer's disease. Drug Delivery, 25(1), 307-320.

Keller, L. A., Merkel, O., & Popp, A. (2021). Intranasal drug delivery: opportunities and toxicologic challenges during drug development. Drug Delivery and Translational Research, 1-23.

Khimani, M., Patel, H., Patel, V., Parekh, P., & Vekariya, R. L. (2019). Self-assembly of stimuli-responsive block copolymers in aqueous solutions: An overview. Polymer Bulletin, 1-28.

Krinke, G. J., & Weber, K. (2012). Histolgy. In The Laboratory Mouse, Elsevier.

Kuang, H., Zhao, Y., Ma, W., Xu, L., Wang, L., & Xu C. (2011). Recent development in analytical applications of quantum dots. Trends in Analytical Chemistry, 30(10), 1620-1636.

Kubo, W., Konno, Y., Miyazaki, S., Attwood, D. (2004). In situ gelling pectin formulation for oral sustained delivery of paracetamol. Drug Development and Industrial Pharmacy, 30(6), 593-599.

Kumar, P., Bhatt, G., Kaur, R., Dua, S., & Kapoor, A. (2020). Synthesis and modulation of the optical properties of carbon quantum dots using microwave radiation. Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures, 28(9), 724-731.

Kwon W, Lee G, Do S, Joo T, Rhee SW, Size-controlled soft-template synthesis of carbon nanodots toward versatile photoactive materials. Small, 10, 506–513, 2014.

Laurent, M., Johannin, G., Gilbert, N., Lucas, L., Cassio, D., Petit, P. X., & Fleury, A. (1994). Power and limits of laser scanning confocal microscopy. Biology of the Cell, 80(2-3), 229-240.

Li, W., Zhou, Y., Zhao, N., Hao, B., Wang, X., & Kong, P. (2012). Pharmacokinetic behavior and efficiency of acetylcholinesterase inhibition in rat brain after intranasal administration of galanthamine hydrobromide loaded flexible liposomes. Environmental Toxicology and Pharmacology, 34(2), 272-279.

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

Liu, P. P., Xie, Y., Meng, X. Y., & Kang, J. S. (2019). History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. Signal Transduction and Targeted Therapy, 4(1), 1-22.

Lomate, D., Mahajan, A., & Tapkir, M. (2019). Nasal drug delivery: a promising approach for brain targeting. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutıcal Sciences, 8(10), 477-491.

Luan, J., Zheng, F., Yang, X., Yu, A., & Zhai, G. (2015). Nanostructured lipid carriers for oral delivery of baicalin: in vitro and in vivo evaluation. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 466, 154-159.

Mahajan, H. S., & Gattani, S. (2010). In situ gels of metoclopramide hydrochloride for intranasal delivery: in vitro evaluation and in vivo pharmacokinetic study in rabbits. Drug delivery, 17(1), 19-27.

Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. Nature Reviews Disease Primers, 1, 15056.

Mathew, A., Yoshida, Y., Maekawa, T., & Kumar, D. S. (2011). Alzheimer's disease: cholesterol a menace?. Brain Research Bulletin, 86(1-2), 1-12.

Mathiowitz, E., Chickering III, D. E., & Lehr, C. M. (Eds.). (1999). Bioadhesive drug delivery systems: fundamentals, novel approaches, and development. Drugs and the Pharmaceutical Sciences. New York: Marcel Dekker.

McMillan, J. (2016). Principles of Analytical Validation. Proteomic Profiling and Analytical Chemistry, 13, 239-251.

Meenakshi, P., Hetal, T. H. A. K. K. A. R., & Kasture, P. V. (2010). Preparation and evaluation of thermoreversible formulations of flunarizine hydrochloride for nasal

delivery. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2, 115-120.

Mikiewicz, D., Bierczyńska-Krzysik, A., Sobolewska, A., Stadnik, D., Bogiel, M., Pawłowska, M., & Płucienniczak, A. (2017). Soluble insulin analogs combining rapid-and long-acting hypoglycemic properties–From an efficient E. coli expression system to a pharmaceutical formulation. PLoS One, 12(3), e0172600.

Mirtchev P, Henderson EJ, Soheilnia N, Yip CM, Ozin GA, Solution phase synthesis of carbon quantum dots as sensitizers for nanocrystalline TiO2 solar cells. J. Mater. Chem, 22, 1265–1269, 2012.

Moon, C. I., Yoo, S. J., Han, H. S. (2014). Smell in Encyclopedia of the Neurological Sciences, Volume 4. Ed. Aminoff, M. J., Daroff, R. B. Academic Press, United States.

Muntimadugu, E., Dhommati, R., Jain, A., Challa, V. G. S., Shaheen, M., & Khan, W. (2016). Intranasal delivery of nanoparticle encapsulated tarenflurbil: A potential brain targeting strategy for Alzheimer's disease. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 92, 224-234.

Murphy, C. J., Sau, T. K., Gole, A. M., Orendorff, C. J., Gao, J., Gou, L., & Li, T. (2005). Anisotropic metal nanoparticles: synthesis, assembly, and optical applications. The Journal of Physical Chemistry B, 109(29), 13857-13870.

Nair, A., Haponiuk, J. T., Thomas, S., & Gopi, S. (2020). Natural carbon-based quantum dots and their applications in drug delivery: A review. Biomedicine & Pharmacotherapy, 132, 110834.

Narayanan, M., & Peter, A. J. (2012). Pressure and temperature induced non-linear optical properties in a narrow band gap quantum dot. Quantum Matter, 1(1), 53-58.

Nasatto, P. L., Pignon, F., Silveira, J. L., Duarte, M. E. R., Noseda, M. D., & Rinaudo, M. (2015). Methylcellulose, a cellulose derivative with original physical properties and extended applications. Polymers, 7(5), 777-803.

Nemoto, T., Toyoshima-Aoyama, F., Yanagita, T., Maruta, T., Fujita, H., Koshida, T., Yonaha, T., Wada, A., Sawaguchi, A., & Murakami, M. (2014). New insights concerning insulin synthesis and its secretion in rat hippocampus and cerebral cortex: Amyloid-β1–42-induced reduction of proinsulin level via glycogen synthase kinase-3β. Cellular Signalling, 26(2), 253-259.

Niu, J., & Gao, H. (2014). Synthesis and drug detection performance of nitrogen-doped carbon dots. Journal of luminescence, 149, 159-162.

Özcan, M. (2004). Burun anatomisi ve fizyolojisi In: Koç C. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi. Ankara: Güneş Kitapevi, 455-461.

Özkahraman, B., İşıl, A. C. A. R., Gök, M. K., & Güçlü, G. Poli (N-Vinilkaprolaktam) Mikrojellerinin Sentez Şartlarının Optimizasyonu. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 14(1), 13-21.

Ozsoy, Y. (2008). Particulate carriers for nasal administration. Handbook of Particulate Drug Delivery: Applications, 143-64.

Ozsoy, Y., & Güngör, S. (2011). Nasal route: an alternative approach for antiemetic drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, *8*(11), 1439-1453.

Pathan, I. B., & More, B. (2017). Formulation and characterization of intra nasal delivery of nortriptyline hydrochloride thermoreversible gelling system in treatment of depression. ACTA Pharmaceutica Sciencia, 55(2).

Patil, R. P., Pawara, D. D., Gudewar, C. S., & Tekade, A. R. (2019). Nanostructured cubosomes in an in situ nasal gel system: an alternative approach for the controlled delivery of donepezil HCl to brain. Journal of Liposome Research, 29(3), 264-273.

Pires, A., Fortuna, A., Alves, G., & Falcão, A. (2009). Intranasal drug delivery: how, why and what for?. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 12(3), 288-311.

Prathumsuwan, T., Jamnongsong, S., Sampattavanich, S., & Paoprasert, P. (2018). Preparation of carbon dots from succinic acid and glycerol as ferrous ion and hydrogen peroxide dual-mode sensors and for cell imaging. Optical Materials, 86, 517-529.

Pujara, C. P., Shao, Z., Duncan, M. R., & Mitra, A. K. (1995). Effects of formulation variables on nasal epithelial cell integrity: Biochemical evaluations. International journal of pharmaceutics, 114(2), 197-203.

Ranch, K. M., Maulvi, F. A., Koli, A. R., Desai, D. T., Parikh, R. K., & Shah, D. O. (2021). Tailored Doxycycline Hyclate Loaded In Situ Gel for the Treatment of Periodontitis: Optimization, In Vitro Characterization, and Antimicrobial Studies. AAPS PharmSciTech, 22(3), 1-11.

Rathbone, M. J., Hadgraft, J., & Roberts, M. S. (Eds.). (2002). Modified-release drug delivery technology. CRC Press.

Reimann, S. M., & Manninen, M. (2002). Electronic structure of quantum dots. Reviews of Modern Physics, 74(4), 1283.

Rosenthal, S. J., Chang, J. C., Kovtun, O., McBride, J. R., & Tomlinson, I. D. (2011). Biocompatible quantum dots for biological applications. Chemistry & Biology, 18(1), 10-24.

Russo, E., & Villa, C. (2019). Poloxamer hydrogels for biomedical applications. Pharmaceutics, 11(12), 671.

Sadjadi, S. (2021). The utility of carbon dots for photocatalysis. In Emerging Carbon Materials for Catalysis (pp. 123-160). Elsevier.

Samaridou, E., & Alonso, M. J. (2018). Nose-to-brain peptide delivery–The potential of nanotechnology. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 26(10), 2888-2905.

Selkoe, D. J. (2000). The origins of Alzheimer disease: a is for amyloid. Jama, 283 (12), 1615-1617.

Shadab, Md, S., Bhattmisra, S. K., Zeeshan, F., Shahzad, N., Mujtaba, M. A., Meka, V. S., Radhakrishnan, A., Kesharwani, P., Baboota, S., & Ali, J. (2018). Nano-carrier enabled drug delivery systems for nose to brain targeting for the treatment of neurodegenerative disorders. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 43, 295-310.

Shelke, S., Shahi, S., Jalalpure, S., Dhamecha, D., & Shengule, S. (2015). Formulation and evaluation of thermoreversible mucoadhesive in-situ gel for intranasal delivery of naratriptan hydrochloride. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 29, 238-244.

Sherafudeen, S. P., & Vasantha, P. V. (2015). Development and evaluation of in situ nasal gel formulations of loratadine. Research in Pharmaceutical Sciences, 10(6), 466.

Shin, Y., Kokate, R., Desai, V., Bhushan, A., & Kaushal, G. (2018). D-cycloserine nasal formulation development for anxiety disorders by using polymeric gels. Drug discoveries & therapeutics, 12(3), 142-153.

Sims-Robinson, C., Kim, B., Rosko, A., & Feldman, E. L. (2010). How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology?. Nature Reviews Neurology, 6(10), 551-559.

Singh, I., Arora, R., Dhiman, H., & Pahwa, R. (2018). Carbon quantum dots: synthesis, characterization and biomedical applications. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 15(2), 219.

Smart, J. D., Kellaway, I. W., & Worthington, H. E. (1984). An in-vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 36, 295-299.

Sood, S., Jain, K., & Gowthamarajan, K. (2014). Intranasal therapeutic strategies for management of Alzheimer's disease. Journal of Drug Targeting, 22(4), 279-294.

Tao, T., Zhao, Y., Yue, P., Dong, W. X., & Chen, Q. H. (2006). Preparation of huperzine A nasal in situ gel and evaluation of its brain targeting following intranasal administration. Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica, 41(11), 1104-1110.

Thakur, A. K., Kaundle, B., & Singh, I. (2020). Mucoadhesive drug delivery systems in respiratory diseases. In Targeting Chronic Inflammatory Lung Diseases Using Advanced Drug Delivery Systems (pp. 475-491). Academic Press.

Thambiraja S, Shankarana DR, Green synthesis of highly fluorescent carbon quantum dots from sugarcane bagasse pulp, Applied Surface Science, 390, 435–443, 2016.

Tsai ML, Tu WC, Tang L, Wei TC, Wei WR, Lau SP, Chen LJ, He JH, Efficiency Enhancement of Silicon Heterojunction Solar Cells via Photon Management Using Graphene Quantum Dot as Downconverters. Nano Lett.,, 16, 309–313, 2016.

Uca, İ., & Şahin, N. Ö. (2006). İntranazal insülin preparatlarının hazırlanması, farmasötik bakım-klinik eczacılık açısından in vitro/in vivo incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 3-26.

Ugwoke, M. I., Verbeke, N., & Kinget, R. (2001). The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 53(1), 3-22.

Veronesi, M. C., Alhamami, M., Miedema, S. B., Yun, Y., Ruiz-Cardozo, M., & Vannier, M. W. (2020). Imaging of intranasal drug delivery to the brain. American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 10(1), 1.

Vilatela, M. E. A., López-López, M., & Yescas-Gómez, P. (2012). Genetics of Alzheimer's disease. Archives of Medical Research, 43(8), 622-631.

Viram, P., & Lumbhani, A. N. (2012). Development and evaluation of ion-dependent in situ nasal gelling systems of metoclopramide hydrochloride as an antimigraine model drug. IJLRST, 1, 80-89.

Von Zuben, E. D. S., Eloy, J. O., Araujo, V. H. S., Gremião, M. P. D., & Chorilli, M. (2021). Insulin-loaded liposomes functionalized with cell-penetrating peptides: influence on drug release and permeation through porcine nasal mucosa. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 622, 126624.

Wang, B. B., Wang, Y. Y., Zhang, X. Y., Xu, Z. Q., Jiang, P., Jiang, F. L., & Liu, Y. (2020). Bifunctional carbon dots for cell imaging and inhibition of human insulin fibrillation in the whole aggregation process. International Journal of Biological Macromolecules, 147, 453-462.

Wang, F., Tan, W. B., Zhang, Y., Fan, X., & Wang, M. (2005). Luminescent nanomaterials for biological labelling. Nanotechnology, 17(1), R1.

Wang, J., Li, Q., Zhou, J., Wang, Y., Yu, L., Peng, H., & Zhu, J. (2017). Synthesis, characterization and cells and tissues imaging of carbon quantum dots. Optical Materials, 72, 15-19.

Wang, J., Tabata, Y., & Morimoto, K. (2006). Aminated gelatin microspheres as a nasal delivery system for peptide drugs: evaluation of in vitro release and in vivo insulin absorption in rats. Journal of controlled release, 113(1), 31-37.

Wang, X., Feng, Y., Dong, P., & Huang, J. (2019). A mini review on carbon quantum dots: preparation, properties, and electrocatalytic application. Frontiers in Chemistry, 7, 671.

Wang, Y., Hu, A. (2014). Carbon quantum dots: Synthesis, properties and applications. Journal of Materials Chemistry C., 2 (32). 6921-39

Wang, Z., & Tang, M. (2020). The cytotoxicity of core-shell or non-shell structure quantum dots and reflection on environmental friendly: a review. Environmental Research, 110593.

Wavikar, P. R., & Vavia, P. R. (2015). Rivastigmine-loaded in situ gelling nanostructured lipid carriers for nose to brain delivery. Journal of Liposome Research, 25(2), 141-149.

Wen, M. M., El-Salamouni, N. S., El-Refaie, W. M., Hazzah, H. A., Ali, M. M., Tosi, G., Farid, R. M., Blanco-Prieto, M. J., Billa, N., & Hanafy, A. S. (2017).

Nanotechnology-based drug delivery systems for Alzheimer's disease management: Technical, industrial, and clinical challenges. Journal of Controlled Release, 245, 95-107.

Woosung K,, Sungan D, Ji-Hee K, Mun SJ, Shi-Woo R, Control of Photoluminescence of Carbon Nanodots via Surface Functionalization using Para-substituted Anilines, Scientific Reports 5, Article number: 12604, 2015. (doi:10.1038/srep12604).

Xu, X., Ray, R., Gu, Y., Ploehn, H. J., Gearheart, L., Raker, K., & Scrivens, W. A. (2004). Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. Journal of the American Chemical Society, 126(40), 12736-12737.

Yang, C., Gu, B., Xu, C., & Xu, X. (2011). Self-assembled ZnO quantum dot bioconjugates for direct electrochemical determination of allergen. Journal of Electroanalytical Chemistry, 660, 97-100.

Yang, Z. Z., Zhang, Y. Q., Wang, Z. Z., Wu, K., Lou, J. N., & Qi, X. R. (2013). Enhanced brain distribution and pharmacodynamics of rivastigmine by liposomes following intranasal administration. International Journal of Pharmaceutics, 452(1-2), 344-354.

Yenil, Ö., Kahraman, E., Algın Yapar, E., Cevher, E., Özkırımlı, S., & Özsoy, Y. (2013). Preparation and evaluation of bioadhesive inserts containing verapamil hydrochloride for nasal delivery. Lat Am J Pharm, 32(8), 1170-1177.

Yerlikaya, F., Camlik, G., Akkol, K., E., Degim, Z., Degim, İ., T. (2021). Formation of Quantum Water in Nanoparticulate Systems. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 63, 102456.

Yuan, Q., Hein, S., & Misra, R. D. K. (2010). New generation of chitosan-encapsulated ZnO quantum dots loaded with drug: synthesis, characterization and in vitro drug delivery response. Acta Biomaterialia, 6(7), 2732-2739.

Zhang, C., Chen, J., Feng, C., Shao, X., Liu, Q., Zhang, Q., & Jiang, X. (2014). Intranasal nanoparticles of basic fibroblast growth factor for brain delivery to treat Alzheimer's disease. International Journal of Pharmaceutics, 461(1-2), 192-202.

Zhang, H., Zhang, Q., Li, M., Kan, B., Ni, W., Wang, Y., Yang, X., Du, C., Bc, XW., Chen, Y. (2015). Investigation of the enhanced performance and lifetime of organic

solar cells using solution-processed carbon dots as the electron transport layers. J. Mater. Chem. C, 3, 12403–12409.

Zhao, D., Song, H., Hao, L., Liu, X., Zhang, L., & Lv, Y. (2013). Luminescent ZnO quantum dots for sensitive and selective detection of dopamine. Talanta, 107, 133-139.

Zhu, Hui., Wang, X., Li, Y., Wang, Z., Yang, F., Yang, X. (2009). Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties. Chemical Communications, 34 (20), 5118.

Zhu, Z., Ma, J., Wang, Z., Mu, C., Fan, Z., Du, L., Bai, Y., Fan, L., Yan, H., Phillips, DL. (2014). Efficiency enhancement of perovskite solar cells through fast electron extraction: The role of graphene quantum dots. J. Am. Chem. Soc., 136, 3760–3763.

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ALZHEİMER HASTALIĞINDA ETKİLİ NAZAL YOLDAN UYGULANABİLEN HEDEFLENDİRİLMİŞ İNSÜLİN KUANTUM NOKTASI KOMPLEKSİNİN GELİŞTİRİLMES

ORİJİNALLİK RAPORU

%7	%6	%2	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Haliç Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
4	www.romerlabs.com İnternet Kaynağı	<%1
5	wako-chem.co.jp İnternet Kaynağı	<%1
6	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	<%1
8	www.crlb.qc.ca İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gamze	**Soyadı**	ÇAMLIK
Doğ.Yeri	Mersin	**Doğ.Tar.**	15.07.1988
Email	gamzecamlik@gmail.com	**Uyruğu**	Türkiye Cumhuriyeti

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2016
Lise	Özel Uğur Koleji	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Araştırma Görevlisi	Biruni Üniversitesi	2016-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi	81,25	

*****Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft office	Çok iyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

YERLİKAYA FIRAT, ÇAMLIK GAMZE, Küpeli Akkol Esra, DEĞİM ZELİHAGÜL, DEĞİM İSMAİL TUNCER, Sobarzo-Sánchezde Eduardo (2021). Formation of Quantum Water in Nanoparticulate Systems. Journal of Drug Delivery Science and Technology, Doi:

10.1016/j.jddst.2021.102456 (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Derleme Makale) (Yayın No: 6979729)

DEMİRBOLAT GÜLEN MELİKE,ALTINTAŞ LEVENT,YILMAZ ŞÜKRAN,ARSOY TAİBE,ÇAMLIK GAMZE,DEĞİM İSMAİL TUNCER (2020). Cellular Activities of Erlotinib Containing Nanotailored ZnO Quantum Dots. BIO TURKİYE-ULUSLARARASI BİYOTEKNOLOJİ KONGRESİ (/Poster)(Yayın No:6371692)

TUNA SEMA,DEMİRBOLAT GÜLEN MELİKE,ÇOBAN ÖZLEM,ALTINTAŞ LEVENT,YILMAZ ŞÜKRAN,ARSOY TAİBE,ÇAMLIK GAMZE,DEĞİM ZELİHAGÜL,DEĞİM İSMAİL TUNCER (2020). Introducing Boron Nitride Nanotubes to Drug Delivery Platform for The Treatment of Cancer. BIO TURKİYE-ULUSLARARASI BİYOTEKNOLOJİ KONGRESİ (/Poster)(Yayın No:6371814)

DEĞİM ZELİHAGÜL,DEĞİM İSMAİL TUNCER,ÇAMLIK GAMZE,Uslu Abdullah (2018). New Usages for Known Drug Molecules. International Journal of Basic and Clinical Studies, 7(1), 7-23. (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Derleme Makale) (Yayın No: 5226957)

6th Workshop on Pulmonary DrugDelivery, 6th Workshop on Pulmonary Drug Delivery, İstanbul Üniversitesi, Sertifika, 11.09.2019 -12.09.2019 (Uluslararası)

XVII. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ DENEYSEL UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ, Sertifika, 16.07.2018 -25.07.2018 (Ulusal)

Sabancı SUNUM Hücre Kültüründen Saflaştırmaya Biyoteknolojik İlaç Üretim Kursu, Sabancı SUNUM

Hücre Kültüründen Saflaştırmaya Biyoteknolojik İlaç Üretim Kursu, Sabancı SUNUM, Kurs, 12.12.2019 - 13.12.2019 (Ulusal)

Özel İlgi Alanları (Hobileri):