



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**YUMUŞAK JELATİN KAPSÜL İLE
KANABİDİOL İÇEREN KENEVİR TOHUMU
YAĞI UYGULAMASI İÇİN
POLİKAPROLAKTON MODİFİYE SALIM
SİSTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

Emre Fatih EDİZ

DOKTORA TEZİ

Nanobilim Ve Nanomühendislik Anabilim Dalı

**Temmuz-2023
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Emre Fatih EDİZ tarafından hazırlanan “Yumuşak Jelatin Kapsül İle Kanabidiol İçeren Kenevir Tohumu Yağı Uygulaması İçin Polikaprolakton Modifiye Salım Sistemi Geliştirilmesi” adlı tez çalışması 21/07/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Nanobilim Ve Nanomühendislik Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Unvanı Adı SOYADI

Prof. Dr. Mustafa ERSÖZ

Danışman

Unvanı Adı SOYADI

Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS

Üye

Unvanı Adı SOYADI

Prof. Dr. Erdal KOCABAŞ

Üye

Unvanı Adı SOYADI

Prof. Dr. Gökalp Özmen GÜLER

Üye

Unvanı Adı SOYADI

Doç. Dr. Serpil EDEBALI

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Şerife YURDAGÜL KUMCU
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığı tarafından 211451004 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 119C100 nolu 2244 Sanayi Doktora Programı projesi ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Emre Fatih EDİZ

Tarih: 21/07/2023

ÖZET

DOKTORA TEZİ

YUMUŞAK JELATİN KAPSÜL İLE KANABİDİOL İÇEREN KENEVİR TOHUMU YAĞI UYGULAMASI İÇİN POLİKAPROLAKTON MODİFİYE SALIM SİSTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

Emre Fatih EDİZ

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanobilim Ve Nanomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Kemal ÇETİN

2023, 108 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS
Prof. Dr. Mustafa ERSÖZ
Prof. Dr. Erdal KOCABAŞ
Prof. Dr. Gökalp ÖZMEN GÜLER
Doç. Dr. Serpil EDEBALI

Kanabidiol (CBD); multiple skleroz, parkinson, anoreksiya, göz tansiyonu, kanser, ağrı, bulantı ve kusma, depresyon, insomnia, stres ve kaygı bozuklukları gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde umut vadetmektedir. Fakat CBD'nin yüksek lipofilik özellikleri, kullanım ve dozlamayı zorlaştırmakta, dolayısıyla farmasötik olarak yararlanımını kısıtlamaktadır. Bu tez çalışmasının amacı, CBD'nin gıda takviyelerinde kullanılması için elverişli bir dozaj formu geliştirilmesi ve başarılı bir şekilde kapsüllenmesinin sağlanmasıdır. Nanopartiküller (NP), farklı molekül ağırlıklarına sahip polikaprolakton (PCL) polimerleri kullanılarak, ultrasonik homojenleştirici ve ultra-turrax ile emülsifikasyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile sentezlenmiştir. Optimizasyon çalışmalarında, farklı molekül ağırlıklarının ve farklı üretim yöntemlerinin partikül boyutuna ve zeta potansiyeline etkileri değerlendirilmiştir. En uygun polimerin 14000 g/mol molekül ağırlığına sahip PCL olduğu bulunmuş ve 5 mg, 10 mg, 15 mg ve 30 mg CBD enkapsüle edilmiş PCL NP'ler ultrasonikasyon tekniği kullanılarak hazırlanmıştır. CBD enkapsüle NP'ler morfolojik ve yüzey özellikleri açısından karakterize edilmiştir. Plasebo NP'ler ve 5mg, 10 mg, 15 mg ve 30 mg CBD enkapsüle PCL NP için sırasıyla -23,37, -10,21, -9,62, -9,93 ve -9,40 mV'lik potansiyel değerleri tayin edilmiştir. Plasebo NP'ler ve 5 mg, 10 mg, 15 mg ve 30 mg CBD enkapsüle PCL NP'lerin sırasıyla ortalama 207,5 nm 227,2 nm, 225,5 nm, 227,7 nm ve 216,9 nm boyuta sahip oldukları belirlenmiştir. İki farklı pH değerinde (1,2 ve 7,4) CBD-PCL-NP'lerin *in vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. NP'lerin DSC analizi ile etken madde-polimer uyumluluğu ortaya çıkartılmıştır. Ayrıca FT-IR analizi sonuçlarıyla, CBD'nin NP'ler içine kapsüllendiği gösterilmiştir. CBD'nin çeşitli reseptörlerle etkileşiminin incelenmesi için moleküler yerleştirme yöntemi kullanılarak *in silico* analizleri yapılmıştır. Bu molekülün reseptörler üzerinde yapısal davranışları, afinitesi ve toksisitesi değerlendirilmiştir. PCL-NP'nin hücre içerisine alındığı ise Nil kırmızısı enkapsüle edilmiş NP'lerin hücrelerin içerisinde birikimi gösterilerek ortaya koyulmuştur. Saf CBD'nin hücrelerin çoğalmaları üzerindeki etkisi ise L929 normal fibroblast hücreleri ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 24, 48, 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılık analizi yapılarak ve IC₅₀ değerleri hesaplanarak belirlenmiştir. Sonuçlar, CBD-PCL-NP'lerinin kenevir tohumu yağıyla birlikte, yumuşak jelatin kapsül formunda bir gıda takviyesi olarak geliştirilebileceğini göstermiştir. Gıda takviyesi uygulaması için kullanılmak üzere elde edilen kenevir tohumu yağının yumuşak jelatin kapsül formunda prototip üretimi gerçekleştirilerek ambalajlanmıştır. Kapsülün, uzun süreli CBD salımı yaparak serbest CBD tüketimine göre farmasötik avantajlara sahip olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Kanabidiol, Kenevir Tohumu Yağı, Modifiye Salım Sistemi, Polikaprolakton, Yumuşak Jelatin Kapsül.

ABSTRACT

Ph.D THESIS

DEVELOPMENT OF A POLYCAPROLACTONE MODIFIED RELEASE SYSTEM FOR APPLICATION OF HEMP SEED OIL CONTAINING CANNABIDIOL WITH SOFT GELATIN CAPSULE

Emre Fatih EDİZ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN NANOSCIENCE AND NANOENGINEERING

Advisor: Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS

Co-advisor: Assist. Prof. Dr. Kemal ÇETİN

2023, 108 Pages

Jury

Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS

Prof. Dr. Mustafa ERSÖZ

Prof. Dr. Erdal KOCABAŞ

Prof. Dr. Gökalp ÖZMEN GÜLER

Doç. Dr. Serpil EDEBALI

Cannabidiol (CBD) shows promise in the treatment of various diseases such as multiple sclerosis, Parkinson's disease, anorexia, glaucoma, cancer, pain, nausea and vomiting, depression, insomnia, and stress and anxiety disorders. However, CBD's high lipophilic properties make its administration and dosing challenging, thus limiting its pharmaceutical utility. The aim of this thesis study is to develop a suitable dosage form for the use of CBD in food supplements and to ensure its successful encapsulation. Nanoparticles (NPs) were synthesized using polycaprolactone (PCL) polymers with different molecular weights through ultrasonic homogenization and emulsification solvent evaporation method using an ultraturrax. In optimization studies, the effects of different molecular weights and production methods on particle size and zeta potential were evaluated. The most suitable polymer was found to be PCL with a molecular weight of 14,000 g/mol, and PCL NPs encapsulated 5 mg, 10 mg, 15 mg, and 30 mg CBD were prepared using ultrasonication. The CBD-encapsulated NPs were characterized in terms of morphological and surface properties. Potential values of -23.37, -10.21, -9.62, -9.93, and -9.40 mV were determined for placebo NPs and 5 mg, 10 mg, 15 mg, and 30 mg CBD-encapsulated PCL NPs, respectively. The average sizes of placebo NPs and 5 mg, 10 mg, 15 mg, and 30 mg CBD-encapsulated PCL NPs were determined to be 207.5 nm, 227.2 nm, 225.5 nm, 227.7 nm, and 216.9 nm, respectively. *In vitro* release studies of CBD-PCL-NPs were conducted at two different pH values (1.2 and 7.4). The drug-polymer compatibility of NPs was revealed by DSC analysis. Additionally, FT-IR analysis results demonstrated the encapsulation of CBD into NPs. *In silico* analyses were performed using molecular docking method to investigate the interaction of CBD with various receptors. The structural behavior, affinity, and toxicity of this molecule on receptors were evaluated. The uptake of PCL-NPs into cells was demonstrated by the accumulation of Nile red-encapsulated NPs within the cells. The effect of pure CBD on cells was determined by cell viability analysis and calculation of IC₅₀ values after 24, 48, and 72 hours of incubation with L929 normal fibroblast cells and MCF-7 breast cancer cells. The results indicate that CBD-PCL-NPs, in combination with hemp seed oil, may be developed as a food supplement in the form of soft gelatin capsules. A prototype production of

soft gelatin capsules containing hemp seed oil was carried out and packaged for use as a food supplement. The capsules are capable of long-term CBD release and offer pharmaceutical advantages compared to free CBD consumption.

Keywords: Cannabidiol, Hemp Seed Oil, Modified Release System, Polycaprolactone, Soft Gelatin Capsule.

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca, göstermiş olduğu ilgi, yardım ve desteğini esirgemeyen, yanında çalışmaktan büyük keyif aldığım ve onur duyduğum, bilgisinden ve tecrübelerinden yararlanırken büyük bir hoş görü ve sabır gösteren tez danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS'a,

Tez çalışmalarına başladığım günden beri çalışmalarım sırasında yapmış olduğu katkılarından dolayı ikinci tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Kemal ÇETİN'e, değerli katkılarından dolayı doktora tez izleme komitesi üyeleri hocalarım Sayın Prof. Dr. Erdal KOCABAŞ'a ve Sayın Prof. Dr. Gökalg Özmen GÜLER'e, tez çalışmalarım sırasında desteklerinden dolayı Sayın Prof. Dr. Ahmet Özgür SAF'a ve tez savunma sınavı jüri üyeleri hocalarım Sayın Prof. Dr. Mustafa ERSÖZ'e ve Sayın Doç. Dr. Serpil EDEBALI'ya,

Çalışmalarında her daim desteklerini ve bilgilerini esirgemeyen Necmettin Erbakan Üniversitesi değerli öğretim üyelerine ve Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi akademik ve idari personeline,

HELVACIZADE ve Zade Vital İlaç Kimya Gıda Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi'ne,

Hayatımın her anında desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen biricik annem ve babama en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

TÜBİTAK 2244 Sanayi Doktora Programı 119C100 nolu proje kapsamındaki desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a ve 211451004 nolu proje kapsamındaki desteklerinden dolayı Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Emre Fatih EDİZ
KONYA-2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
ÖNSÖZ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Kenevir.....	4
1.1.1. Kanabidiol.....	6
1.1.2. Kenevir tohumu yağı	8
1.2. Partiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Kullanılan Polimerler	9
1.2.1. Polikaprolakton	9
1.3. İlaç Salım Kinetikleri.....	11
1.3.1. Sıfırıncı Derece Kinetik Modeli	11
1.3.2. Birinci Derece Kinetik Modeli	12
1.3.3. Higuchi Kinetik Modeli	12
1.3.4. Hixson-Crowell Kinetik Modeli	13
1.3.5. Korsmeyer-Peppas Kinetik Modeli	13
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	15
2.1. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	15
2.1.1. Emülsifikasyon çözücü buharlaştırma tekniği.....	15
2.2. Nanoemülsiyon	15
2.2.1. Ultrasonikasyon	17
2.2.2. Rotor stator yüksek hızlı homojenizasyon.....	18
2.3. Literatür Çalışmaları	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. Kullanılan kimyasallar	24
3.1.2. Kullanılan cihazlar	24
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. PCL nanopartiküllerinin ön formülasyon çalışmaları.....	25
3.2.2. CBD enkapsüle edilmiş PCL nanopartiküllerin hazırlanması	25
3.2.3. Nanopartiküllerin morfolojisi ve karakterizasyonu	26
3.2.4. <i>In vitro</i> salım çalışmaları	28
3.2.5. <i>In vitro</i> hücre proliferasyon çalışmaları	29

3.2.6. PCL-NP'lerin hücre içerisine alınımının test edilmesi	30
3.2.7. Kenevir tohumu yağında yapılan analizler	30
3.2.8. Yumuşak jelatin kapsül ile üretim	32
3.2.9. Nihai ürün prototipinin farmasötik etkinlik ve kalite kontrol testleri	33
3.2.10. Moleküler yerleştirme çalışmaları	34
3.2.11. İstatistik analiz	36
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	37
4.1. PCL Nanopartiküllerinin Ön Formülasyon Çalışmaları Sonuçları.....	37
4.2. CBD Enkapsüle Edilmiş Nanopartiküllerin Morfolojisi ve Karakterizasyonu ..	44
4.2.1. Nanopartiküllerin partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli sonuçları	44
4.2.2. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu sonuçları	49
4.2.3. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi sonuçları.....	51
4.2.4. İlaç yükleme ve kapsülleme verimliliği.....	56
4.2.5. Reaksiyon Verimi	57
4.2.6. İlaç-polimer çözünürlüğü ve uyumluluğu.....	57
4.3. <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları Sonuçları.....	58
4.3.1. <i>In vitro</i> salım kinetikleri	62
4.4. <i>In Vitro</i> Hücre Proliferasyon Testi.....	64
4.5. PCL-NP'lerin Hücre İçerisine Alımı Testi	68
4.6. Kenevir Tohumu Yağı Analiz Sonuçları	69
4.6.1. Serbest yağ asitliği analiz sonuçları.....	69
4.6.2. Peroksit sayısı analiz sonuçları	69
4.6.3. Yağ asitleri kompozisyonu analizi.....	69
4.7. Nihai Ürünün Farmasötik Etkinlik ve Kalite Kontrol Test Sonuçları	72
4.7.1. Ağırlık sapması	72
4.7.2. Dağılma testi	73
4.8. Moleküler Yerleştirme Çalışmaları	73
4.9. Moleküler Yerleştirme Çalışmaları	74
4.9.1. Moleküler yerleştirme sonuçları	74
4.8.2. Farmakokinetik/ADMET profili.....	82
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	84
5.1 Sonuçlar	84
5.2 Öneriler	86
6. KAYNAKLAR	88
7. EKLER	102

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Nanopartikül hazırlamada yaygın olarak kullanılan bazı polimerler (Mohanraj ve Chen, 2006; Tunçay ve Çalış, 1999).....	9
Çizelge 1.2. Korsmeyer–Peppas denkleminde bulunan n değerine göre salım mekanizmaları (Dash, 2010).....	14
Çizelge 2.1. Düşük enerjili ve yüksek enerjili nanoemülsifikasyon üretim yöntemleri.	17
Çizelge 3.1. Farklı molekül ağırlığına sahip PCL plasebo nanopartikül elde parametreleri	25
Çizelge 3.2. Gaz Kromatografi sisteminin çalışma koşulları	32
Çizelge 3.3. Shimadzu GC-2010 Plus Enstrümental sistemin sıcaklıkları.....	32
Çizelge 3.4. Izgara Kutucuğu (Grid box) değerleri ve merkez koordinat değerleri	36
Çizelge 4.1. Farklı molekül ağırlıklarına sahip PCL plasebo nanopartiküllere ait boyut ve PDI ve zeta potansiyeli sonuçları (n=3).....	37
Çizelge 4.2. Farklı CBD miktarı içeren PCL nanopartiküllere ait boyut ve PDI ve zeta potansiyeli sonuçları (n=3)	49
Çizelge 4.3. Farklı CBD miktarı içeren enkapsüle PCL nanopartiküllere ait kapsülleme verimleri (n=3).....	56
Çizelge 4.4. Plasebo ve farklı CBD miktarı içeren PCL nanopartiküllere ait reaksiyon verimleri.....	57
Çizelge 4.5. Saf CBD, saf PCL ve PCL-CBD fiziksel karışımlarına ait DSC analiz sonuçları.....	58
Çizelge 4.6. pH 1,2 mide ortamında CBD enkapsüle PCL nanopartiküllere ait <i>in vitro</i> % salım sonuçları (n=3)	60
Çizelge 4.7. pH 7,4 bağırsak ortamında CBD enkapsüle PCL nanopartiküllere ait <i>in vitro</i> % salım sonuçları (n=3)	61
Çizelge 4.8. pH 1,2 mide ortamı için kinetik modellere ait kolerasyon katsayıları	62
Çizelge 4.9. pH 7,4 bağırsak ortamı için kinetik modellere ait kolerasyon katsayıları..	62
Çizelge 4.10. CBD etken maddesinin hücre çoğalması üzerine etkisi	65
Çizelge 4.11. 37 bileşenli FAMEMIX karışımı standardında bulunan yağ asitlerinin alıkonma zamanları, %Alan ve %Yükseklik sonuçları (GC)	71
Çizelge 4.12. Soğuk sıkım kenevir tohumu yağına ait yağ asitleri, alıkonma zamanları ve %konsantrasyonları	72
Çizelge 4.13. Yumuşak jelatin kapsül ağırlık sapması sonuçları	73
Çizelge 4.14. CBD'nin CB1, CB2, δ -OP, GPR55, TRPV1 ve 5-HT1A reseptörlerine moleküler yerleştirme işlemi sonuçları.....	74
Çizelge 4.15. CBD'ye ait ADMET parametreleri ve Rat oral toksisite çevrimiçi SwissADME ve GUSAR tahmini.....	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kanabidiolün moleküler yapısı (Mechoulam ve Hanuš, 2002).....	7
Şekil 1.2. Poli(ϵ -kaprolakton)'un kimyasal yapısı (McKeen, 2021)	10
Şekil 2.1. Amfifilik emülsifyerlerle stabilize edilmiş nanoemülsiyon damlacıklarının gösterimi A) yağ içinde su fazı (w/o) ve B) su içinde yağ fazı (o/w) (Kupikowska-Stobba ve Kasprzak, 2021)	16
Şekil 2.2. Ultrasonikasyon yöntemiyle nanoemülsiyonun hazırlanması (Singh ve ark., 2017).....	18
Şekil 2.3. Ultra-Turrax homojenleştiricinin rotor/stator düzeninin karıştırma mekanizması (Sand Chee ve Jawaid, 2019).....	19
Şekil 3.1. Yumuşak Jel Kapsülleme makinesinin parça ve bileşenleri	33
Şekil 3.2. Yumuşak jelatin kapsül dolum işlemi	33
Şekil 4.1. Ultra-Turrax ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_A :14 000).....	37
Şekil 4.2. Ultra-Turrax ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_A :14000, İletkenlik 0,0563 mS/cm).....	38
Şekil 4.3. Ultra-Turrax ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_A :45000).....	38
Şekil 4.4. Ultra-Turrax ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_A :45000, İletkenlik 0,0503mS/cm).....	39
Şekil 4.5. Ultra-Turrax ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_A :80000).....	39
Şekil 4.6. Ultra-Turrax ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_A :80000, İletkenlik 0,0555 mS/cm).....	39
Şekil 4.7. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_A :14000).....	40
Şekil 4.8. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_A :14000, İletkenlik 0,1652 mS/cm).....	40
Şekil 4.9. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen ve 0.22 μ m filtreden geçirilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_A :14000).....	41
Şekil 4.10. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen ve 0,22 μ m filte ile süzülen plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_A :14000, İletkenlik 0,1327 mS/cm).....	41
Şekil 4.11. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_A :45000).....	42
Şekil 4.12. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_A :45000, İletkenlik 0,1388 mS/cm).....	42
Şekil 4.13. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_A :80000).....	43
Şekil 4.14. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_A :80000, İletkenlik 0,1388 mS/cm).....	43
Şekil 4.15. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 5 mg CBD yüklü PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_A :14000)	45
Şekil 4.16. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 5 mg CBD yüklü PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_A :14000, İletkenlik 0,1735 mS/cm).....	45
Şekil 4.17. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 10 mg CBD yüklü PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_A :14000)	46
Şekil 4.18. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 10 mg CBD yüklü PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_A :14000, İletkenlik 0,0060 mS/cm). 46	

Şekil 4.19. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 15 mg CBD yüklü PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_A :14000)	47
Şekil 4.20. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 15 mg CBD yüklü PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_A :14000, İletkenlik 0,1256 mS/cm). 47	
Şekil 4.21. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 30 mg CBD yüklü PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_A :14000)	48
Şekil 4.22. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 30 mg CBD yüklü PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_A :14000, İletkenlik 0,1263 mS/cm). 48	
Şekil 4.23. Liyofilizasyonla kurutulan PCL nanopartiküllerin FE-SEM görüntülemesi A) 200 000X B) 20 000X	50
Şekil 4.24. 1:20 oranında seyreltilmiş PCL nanopartiküllerin FE-SEM görüntülemesi A) 200 000X B) 20 000X	50
Şekil 4.25. PCL nanopartiküllerin STEM görüntülemesi A) Plasebo PCL-NP B) 30 mg CBD enkapsüle PCL-NP	51
Şekil 4.26. Saf PCL'ye ait FT-IR spektrumu (14 000 M_A).....	52
Şekil 4.27. Plasebo PCL nanopartiküle ait FT-IR spektrumu	52
Şekil 4.28. Saf CBD'ye ait FT-IR spektrumu	53
Şekil 4.29. 5 mg CBD içeren PCL nanopartiküle ait FT-IR spektrumu.....	53
Şekil 4.30. 10 mg CBD içeren PCL nanopartiküle ait FT-IR spektrumu.....	54
Şekil 4.31. 15 mg CBD içeren PCL nanopartiküle ait FT-IR spektrumu.....	54
Şekil 4.32. 30 mg CBD içeren PCL nanopartiküle ait FT-IR spektrumu.....	54
Şekil 4.33. Saf PCL ve Saf CBD'ye ait FT-IR spektrumu	55
Şekil 4.34. Saf PCL, Saf CBD, Plasebo PCL nanopartikül, CBD içeren (5 mg, 10 mg, 15 mg, 30 mg) PCL nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu	55
Şekil 4.35. Saf CBD, saf PCL ve PCL-CBD fiziksel karışımlarına ait DSC termogramları.....	58
Şekil 4.36. CBD'ye ait 6 noktalı UV spektrofotometrede elde edilen kalibrasyon eğrisi	59
Şekil 4.37. CBD'ye ait 8 noktalı HPLC'de elde edilen kalibrasyon eğrisi	59
Şekil 4.38. pH 1,2 mide ortamında CBD enkapsüle PCL nanopartiküllere ait <i>in vitro</i> salım profili.....	60
Şekil 4.39. pH 7,4 bağırsak ortamında CBD enkapsüle PCL nanopartiküllere ait <i>in vitro</i> salım profili.....	60
Şekil 4.40. pH 1,2 mide ortamı için sıfırıncı derece kinetik modeli grafikleri A) 5/150 CBD/PCL B) 10/150 CBD/PCL C) 15/150 CBD/PCL D) 30/150 CBD/PCL	63
Şekil 4.41. pH 7,4 bağırsak ortamı için Higuchi kinetik modeli grafikleri A) 5/150 CBD/PCL B) 10/150 CBD/PCL C) 15/150 CBD/PCL D) 30/150 CBD/PCL	64
Şekil 4.42. CBD'nin farklı konsantrasyonlarının L929 hücrelerine zamana bağlı etkisinin ters mikroskop altında gösterilmesi (10 X).....	66
Şekil 4.43. CBD'nin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerine zamana bağlı etkisinin ters mikroskop altında gösterilmesi (10 X).....	67
Şekil 4.44. Ters (invert) floresan mikroskobu altında L929 hücrelerinin filtre aktif edilmeden önceki görünümü A) 40X, B) 60X.....	68
Şekil 4.45. Ters (invert) floresan mikroskobu altında L929 hücrelerinin floresan filtre aktif durumdayken görünümü A) 40X, B) 60X.....	68
Şekil 4.46. 37 bileşenli FAMEMIX karışımı standardına ait kromatogram (GC)	70
Şekil 4.47. Soğuk sıkım kenevir tohumu yağına ait kromatogram (GC)	70
Şekil 4.48. Nihai ürün prototipi (Modifiye Salım Nano CBD)	74
Şekil 4.49. En yüksek enerjiye sahip kanabidiol analogunun CB1 reseptörüne karşı etkileşimi.....	75

Şekil 4.50. CBD'nin CB1 reseptörüne bağlanma etkileşimlerinin iki boyutlu çizimi....	75
Şekil 4.51. En yüksek enerjiye sahip kanabidiol analogunun CB2 reseptörüne karşı etkileşimi.....	76
Şekil 4.52. CBD'nin CB2 reseptörüne bağlanma etkileşimlerinin iki boyutlu çizimi....	76
Şekil 4.53. En yüksek enerjiye sahip kanabidiol analogunun İnsan Delta-Opioid reseptörüne karşı etkileşimi	77
Şekil 4.54. CBD'nin Human Delta-Opioid reseptörüne bağlanma etkileşimlerinin iki boyutlu çizimi	77
Şekil 4.55. En yüksek enerjiye sahip kanabidiol analogunun N-OFQ Opioid reseptörüne karşı etkileşimi	78
Şekil 4.56. CBD'nin N-OFQ Opioid reseptörüne bağlanma etkileşimlerinin iki boyutlu çizimi	78
Şekil 4.57. En yüksek enerjiye sahip kanabidiol analogunun Serotonin 1A (5-HT1A) reseptörüne karşı etkileşimi	79
Şekil 4.58. CBD'nin Serotonin 1A (5-HT1A) reseptörüne bağlanma etkileşimlerinin iki boyutlu çizimi	79
Şekil 4.59. En yüksek enerjiye sahip kanabidiol analogunun TRPV1 reseptörüne karşı etkileşimi.....	80
Şekil 4.60. CBD'nin TRPV1 reseptörüne bağlanma etkileşimlerinin iki boyutlu çizimi	80

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

C	Santigrat
g	Gram
kJ	Kilojul
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mol	Mol
nm	Nanometre
ppm	Milyonda bir birim
R ²	Belirlilik katsayısı
rpm	Dakikadaki devir sayısı
W	Watt

Kısaltmalar

CBD	Kanabidiol
DCM	Diklorometan
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
FBC	Fetal bovine serum
FE-SEM	Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu
FT-IR	Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi
GC	Gaz kromatografisi
HCl	Hidroklorik asit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
NaCl	Sodyum klorür
NP	Nanopartikül
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCL	Polikaprolakton
PDI	Polidispersite indeksi
PVA	Polivinil alkol
STEM	Taramalı-geçirimli elektron mikroskobu

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yayınlanan rapora göre, bitkisel kaynaklı ürünlerden küresel nüfusun yaklaşık %70'lik kısmı tarafından çeşitli hastalıkların tedavisinde ve hastalıktan korunmada “geleneksel tıp” bağlamında faydalanılmaktadır. Tıbbi amaçlı bitki türlerinin yaklaşık 70 000 adet olduğu tahmin edilmekle beraber; WHO tarafından 21000 bitki türünün ilaç içeriğinde kullanım için uygun olduğu belirtilmektedir (Atalay ve Erge, 2018). Türk Gıda Kodeksi'nin Ağustos 2013'de yayınlanan Takviye Edici Gıdalar Tebliği'ne göre gıda takviyeleri “normal beslenmeyi takviye etmek amacıyla; vitamin, mineral, protein, karbonhidrat, lif, yağ asidi, amino asit gibi besin öğelerinin veya bunların dışında besleyici veya fizyolojik etkileri bulunan bitki, bitkisel ve hayvansal kaynaklı maddeler, biyoaktif maddeler ve benzeri maddelerin konsantre veya ekstraktlarının tek başına veya karışımlarının kapsül, tablet, pastil, tek kullanımlık toz paket, sıvı ampül, damlalık şişe ve diğer benzeri sıvı veya toz formlarda hazırlanarak günlük alım dozu belirlenmiş ürünler” olarak tanımlanmaktadır (Anonim, 2013). Amerika Birleşik Devletleri Diyet Takviyeleri Sağlık ve Eğitim Kanunu (DSHEA), gıda takviyelerinin ilaç kategorisinden ziyade genel olarak gıdalar kategorisinde sınıflandırılmasını öngörmektedir. Bu takviyelerin performans artırma, kozmetik amaçlar için kullanımı, dengeli beslenmeyi sağlama, bağışıklık sistemini güçlendirme ve bazı hastalıkların tedavisi gibi amaçlarla kullanılabilmesi belirtilmektedir (Atalay ve Erge, 2018). Gıda takviyeleri genellikle düşük biyoyararlanım oranına sahiptir, bu da vücut tarafından emilmeden önce büyük ölçüde parçalanmalarına neden olur. Bu nedenle, gıda takviyelerinin uzun süreli salımını sağlamak için çeşitli yöntemler geliştirilmektedir.

Kenevir (*Cannabis sativa* L.), Cannabaceae familyasına ait tek yıllık, çok yönlü kullanım potansiyeli olan ve eski çağlardan beri tıbbi amaçlarla kullanılan bir bitki türüdür. Bitkinin aktif bileşenleri arasında THC (tetrahidrokanabinol) ve CBD (kanabidiol) gibi kanabinoidler bulunur. THC, psikoaktif özelliklere sahip olup, kişinin zihinsel durumunda değişikliklere neden olurken, CBD ise terapötik özelliklere sahiptir (ElSohly ve ark., 2017). Kanabidiol (CBD), *Cannabis sativa*'daki başlıca fitokanabinoidlerden biridir ve son zamanlarda gıda ve sağlık endüstrisinde yoğun ilgi görmektedir. CBD, kenevir bitkilerinin tohumlarında bulunmaz, ancak kenevir tohumu yağı, işleme sırasında çapraz kontaminasyon nedeniyle CBD içerebilir. Anksiyete, depresyon, uyku bozuklukları, epilepsi, cilt rahatsızlıkları, ağrı ve inflamasyon gibi birçok sağlık sorununu azaltma ve tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Ancak, CBD'nin

düşük su çözünürlüğü, yüksek lipofilitesi ve düşük oral biyoyararlanımı gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır (Williams ve Nutbrown, 2021).

Kenevir tohumu, insanlar tarafından ham, pişmiş veya kavrulmuş bir gıda kaynağı olarak kullanılmıştır ve kenevir tohumu yağı en az 3000 yıldır Çin'de gıda ve ilaç olarak tüketilmektedir. Kenevir tohumu, zengin bir mineral içeriğine sahip A, C ve E vitaminleri, β -karoten, %20-25 protein, %20-30 karbonhidrat, %25-35 yağ, %10-15 çözünmeyen lif ve özellikle fosfor, potasyum, magnezyum, sülfür ve kalsiyum gibi mineraller içermektedir. Kenevir tohumu yağı besin değerinin yanı sıra lipid metabolizması, kardiyovasküler sağlık, immunomodülatör etkiler ve dermatolojik hastalıklar gibi çeşitli sağlık faydaları sunar (Montserrat-de la Paz ve ark., 2014). Kenevir tohumu yağı, çoklu doymamış yağ asitlerinin doğal bir kaynağıdır. Kenevir tohumu yağında bulunan başlıca yağ asitleri C18:2 linolenik asit (ω -6) ve C18:3 α -linolenik asit (ω -3)'tir. Bu iki yağ asidi, kenevir tohumu yağında sırasıyla yaklaşık %60 ve %20 oranında bulunur. Optimal değer olarak önerilen bu iki yağ asidinin oranı insan beslenmesi için 3:1 oranındadır. Esansiyel yağ asitleri olarak bilinen bu bileşikler, insanlar veya diğer hayvanlar için sağlıklı bir yaşam için zorunlu olan yağ asitleri sınıfına girerler. Bu sınıftaki yağ asitlerinin vücut tarafından sentezlenmesi mümkün değildir. Kenevir tohumu yağı ayrıca, antioksidan aktivite gösteren önemli bir fonksiyonel bileşikler sınıfı olan fitokimyasallar içerir. Antioksidan aktiviteye sahip kenevir tohumu fitokimyasalları, lignanlar, flavonoidler ve fenolik asitler gibi fenolik bileşikler sınıfına dahildir. Bu özellikleri nedeniyle kenevir tohumu yağı fonksiyonel gıda ve yağ asidi bileşimi olarak kabul edilmektedir. Örneğin, antioksidan bileşiklerinin varlığı nedeniyle romatoid artrit gibi hastalıklara karşı koruyucu etkisi bulunmaktadır. Benzer şekilde, yağ asidi bileşimi nedeniyle hiperkolesterolemi gibi durumlarda nutrasötik olarak kullanılabilirler. Bu nedenle, gıda takviyesi olarak düzenli bir şekilde tüketilmesi önerilir (Rapa ve ark., 2019).

Son yıllarda araştırmacılar tarafından büyük bir ilgi gören polimerik nanokapsüller ve nanopartiküller, kontrol edilebilir ilaç salımı, çeşitli kombine edilebilme özellikleri ve hedef bölgeye ulaşana kadar ilaç moleküllerini koruyabilme gibi özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir. Polimerik nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde, doğal polimerlerin biyolojik olarak parçalanabilirlik ve biyouyumluluk özellikleri, sentetik polimerlerin ise kontrol edilebilir kimyasal yapıları sahip olma avantajları tercih edilir. Alifatik poliester olan polikaprolakton (PCL) polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında, birçok ilaç molekülünü içine alabilme, toksik olmama, biyobozunurluk ve diğer özellikleri sayesinde elverişlidir (Sinha ve ark., 2004).

Biyolojik uyumlu ve biyobozunur bir polimer olan PCL, ilaçların biyoyararlanımını artırmak, hedeflendirmek ve sürekli salımını sağlamak için kullanılabilen FDA (Food and Drug Administration) onaylı biyobozunur bir polimerdir. Bu biyobozunur polimer, uygulama sonrasında vücuttan çıkarılması gerekmeyen bir yapıya sahiptir. PCL, özellikle ilaç teslimi amaçları için oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Badri ve ark., 2017).

Yumuşak jelatin kapsüller, düşük çözünürlüğe sahip bileşiklerin biyoyararlılığını artırmak için geliştirilen ve içerisinde su içermeyen çözelti, süspansiyon veya yarı katı formülasyonları kolayca kapsüle almak için kullanılacak benzersiz bir katı dozaj şeklidir (Gullapalli, 2010). Yumuşak jelatin kapsüller, ilaç veya gıda takviyelerinin güvenli ve etkili bir şekilde alınması için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Kapsüllenen maddenin hava, nem, oksidasyon ve ışıktan korunmasını sağlar. Bu sayede, ürünlerin raf ömrü uzar ve daha uzun süre kullanılmasına olanak tanır. Yumuşak jelatin kapsüller ilacı veya takviyeyi doğru dozda almak için hassas bir şekilde ölçmek zorunda kalmadan oral yolla kolay bir şekilde alınmasına imkân sağlar. Bazı ilaçlar veya takviyeler, kötü bir tat veya kokuya sahip olabilir. Yumuşak jelatin kapsüller, bu tatları maskeleyerek, ürünlerin daha kolay ve keyifli bir şekilde alınmasını, ilaçların ve takviyelerin güvenli bir şekilde taşınmasını ve saklanmasını sağlar. Yumuşak jelatin kapsüllerin kullanımının avantajları bunlarla sınırlı değildir. Yumuşak jelatin kapsüller ile üretim maliyeti Licaps, Coni-Snap ve Star-Lock kapsüllerle üretilen ilaçların ve gıda takviyelerinin üretim maliyetinden daha düşüktür. (Srividya ve ark., 2014; Benza ve Munyendo, 2011).

Bu tez çalışmasında, CBD içeren PCL nanopartiküller elde edilerek, soğuk sıkım kenevir tohumu yağı ile karıştırılarak elde edilen karışımın yumuşak jel kapsüllere yüklenerek uzun süreli salım yapan gıda takviyeleri elde etmek hedeflenmiştir. Bu amaçla, öncelikle PCL nanopartiküllerin sentezi gerçekleştirilmiş ve CBD içeren PCL nanopartiküller hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra, soğuk sıkım kenevir tohumu yağı ile karıştırılarak, uzun süreli salım sağlayan ve kolay kullanıma sahip yumuşak jel kapsülleri elde etmek için uygun formülasyonlar geliştirilmiştir. Elde edilen ürünlerin özellikleri incelenerek, kenevir bitkisinden elde edilen CBD'nin hidrofobik özelliğinden kaynaklanan kısıtlamaları ortadan kaldırmak, etkinliğini ve biyoyararlanımını artırmak için nanoteknolojik yöntemlerin kullanımının önemi ortaya koyulmuştur. Tez çalışması sonunda sağlıklı bir gıda takviyesi olarak kullanılacak yeni bir ürünün prototipi geliştirilmiştir.

1.1. Kenevir

Kenevir (*Cannabis sativa* L.), antik çağlardan beri ağırlıklı olarak Orta Asya'da (Hindistan ve Çin) yetiştirilen otsu tek yıllık bir bitkidir (Russo ve ark., 2007; Stevens ve ark., 2016; Jiang ve ark., 2006). *Cannabis sativa* yüzyıllardır lif, gıda, yağ ve ilaç kaynağı olmasının yanı sıra eğlence ve dini amaçlarla da kullanılmıştır (Piluzza ve ark., 2013). Kanabinoidler, terpenoidler, flavonoidler ve alkaloidler gibi bir dizi kimyasal aktif bileşiğe sahiptir (Andre ve ark., 2016). En aktif bileşikler, esas olarak çiçeklerin trikom boşluğunda biriken bir terpenofolik bileşikler sınıfı olan kanabinoidlerdir (Taura ve ark., 2007; Brenneisen, 2007).

Kenevir, dünya genelinde uzun bir geçmişe sahiptir ve kenevirin tıbbi olarak kullanımını anlatan ilk yazılı kaynak M.Ö. 2800'lü yıllarda Çin İmparatoru Shen Nung tarafından yazılan "Shen Nung Pen Ts'ao Ching" isimli Çin farmakopesidir (Pisanti ve Bifulco, 2018). Bu eski metne göre, kenevir yorgunluk, romatizma ve sıtma gibi rahatsızlıkları gidermek için reçete edilmiştir (Abel, 1980). Ayrıca Çinli doktorlar kenevirin tohumlarını, yağı ve proteinleri için kullanmışlardır. Tayvan'da bulunan birkaç Neolitik kanıt parçası, *Cannabis sativa*'nın 12.000 yıl önce birkaç farklı amaç için kullanıldığını (Li, 1973), böylelikle ip ve tekstil üretiminde önemli bir rol oynadığını kanıtlamıştır. Kenevir, bilinen en eski ekili lif bitkisi olarak anılmaktadır (Cherney ve Small, 2016) ve bugün bile balık ağlarının bir bileşeni olarak kullanılmaktadır (Savo ve ark., 2013).

Kenevir tohumları, hekimler tarafından egzama ve sedef hastalığı için tavsiye edilmiş olmakla birlikte (Anwar ve ark., 2006), enflamatuar hastalıklar için önerilen γ -linoleik asit açısından zengindir (Jeong ve ark., 2014). Ayrıca ilaç olarak kullanımı, Asur kil tabletlerinde (Anderson ve Scurlock, 2005) ve yaklaşık 3000 yıl öncesine dayanan Mısır Ebers Papirüsünde (Epstein, 2010) kapsamlı bir şekilde rapor edilmektedir. Kenevir antik Yunanlılar ve Romalılar arasında da iyi bilinmekteydi (Mercuri ve ark., 2002). Tarihçi Herodot (M.Ö. 400), kenevirin Kızıldenizliler arasında kullanımından bahsetmiştir ve Diodorus Siculus (M.Ö. 60), eski Mısırlı kadınların ağrıyı azaltmak ve ruh hallerini iyileştirmek için kenevir kullandıklarını bildirmiştir (Carod-Artal, 2013). Romalı tarihçi Pliny, Roma halkının ağrıyı hafifletmek için kenevir köklerinin kullanıldığını anlatmıştır (Ryz ve ark., 2017).

Kenevir yüzyıllar boyunca birçok din tarafından kutsal bir bitki olarak kabul edilmiştir (Touwn, 1981). Nitekim Asya kültürlerinin kutsal metinlerinde kenevirden yüce erdemleri olan bir bitki olarak bahsetmekte ve dini ritüellerin bir parçası olarak

görmektedir. Hindistan ve Tibet'te Hinduizm ve tantrik Budizm gelenekleri, meditasyonu ve ruhlarla iletişimi kolaylaştırmak için kenevir çiçeklerini ve reçinelerini kullanmıştır (Schultes ve ark., 1992).

Sonraki yüzyıllarda Avrupa vatandaşları, Afrika ve Doğu Hint Adaları'na giden maceracılar, deniz kaptanları, zengin gezginler, rahipler ve tüccarlar tarafından yazılan seyahatnameler sayesinde kenevirin sayısız kullanımını öğrenmişlerdir (Abel, 1980). Özellikle, Hindistan'ın fethiyle birlikte, kenevirin kullanım alışkanlıkları Avrupa kıtasına da aktarıldı. İki Portekizli doktor olan Garcia Da Orta ve Cristobal Acosta, öfori, sedasyon, iştahın uyarılması, halüsinasyonlar ve afrodisyak etkileri içeren kenevirin etkileri hakkında çalışmalar yapmışlardır (Lee, 2013). Ek olarak, 19. yüzyılın İngiliz tıbbında kenevir analjezik, antienflamatuar, antiemetik ve anti-konvülsan olarak tanıtılmıştır (Aldrich, 1997). Clarke ve Merlin, kenevirin psikoaktif etkisinin keşfinin tesadüfi olduğunu savunmuştur (Merlin, 2003; Clarke ve Merlin, 2013).

Bugün dünyadaki birçok yerli topluluk, çeşitli hastalıklar için farklı kenevir türlerini kullanmaktadır. Pakistan'ın kuzeyindeki Swat'ın Miandam bölgesinde, yara iyileşmesi için kenevirin toz haline getirilmiş yaprakları anodin, yatıştırıcı ve tonik olarak kullanılmaktadır (Akhtar ve ark., 2013). Nepal, Arunaçal Pradeş ve Haryana'dan gelen kırsal köylerden oluşan küçük etnik gruplar, insan ve hayvancılık gastrointestinal hastalıkları, ağrı ve yılan ısırığı için keneviri kullanmaktadır (Panghal ve ark., 2010; Kunwar ve ark., 2010; Namsa ve ark., 2011; Abbasi ve ark., 2013).

Farmakolojik bir bakış açısından, 1964'te Gaoni ve Mechoulam, ana fitokanabinoid olan D9-THC'yi izole edip sentezleyerek kanabinoidleri incelemenin yolunu açmıştır (Mechoulam ve Gaoni, 1965). 1980'lerde Pfizer, kanabinoid reseptörlerinin sentetik ligandlarının geliştirilmesi üzerinde çalışmıştır (Pertwee, 2006). Daha sonra, kanabinoid Tip-1 (CB1) reseptörü ilk olarak 1990'da ardından kanabinoid Tip-2 (CB2) reseptörü 1993'te keşfedilmiştir (Pertwee, 2006). Ayrıca, 1990'larda iki endojen CB reseptör ligandı, araşidonoleitolamin ve 2-araşidonilgliserol de keşfedilmiştir (Pertwee, 2006). Son olarak, yaklaşık aynı zamanlarda, Di Marzo ve meslektaşları, endojen ligandları, reseptörleri ve sentez ve bozunma enzimlerini içeren "endokanabinoid sistem" terimini ilk kez kullanmışlardır (Di Marzo ve ark., 1994). Bugüne kadar, alkol bağımlılığı, nikotin bağımlılığı, ölümcül bir hastalıkla ilgili kaygı ve kronik travma sonrası stres bozuklukları için bir tedavi olarak çeşitli bitkisel ve kimyasal etken maddelerinin klinik denemeleri vardır (Schenberg, 2018). *Cannabis sativa* ile ilgili olarak, birçok çalışma travmatik olayların yarattığı kabuslarını ortadan kaldırdığını

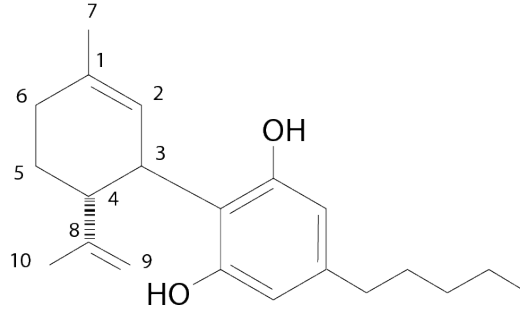
ve uykuyu iyileştirebileceğini bildirmiştir (Pedersen ve Sandberg, 2012; Babson ve ark., 2017). Yine de birçok ülkede kenevirin yetiştirilmesi ve pazarlanması günümüzde hala yasa dışıdır. Bu, kaçakçılığı teşvik etmekte ve standartlaştırılmış özütlerin bulunmasını zorlaştırmaktadır (Dragone ve ark., 2019). Bu nedenle, tıbbi olarak kontrollü ve kimyasal olarak standardize edilmiş bir kullanım, günümüzde kenevir kullanımına yönelik yasal bir girişim olabilir.

Kenevir bitkisi genel olarak iki tipe ayrılır. Bunlar fiber tipi ve kanabinoid tipi olarak adlandırılır. Fiber tipi kenevir bitkisi, uzun boylu ve lifler ve tohumlar için hasat edilir. Ancak, kanabinoid içeriği oldukça düşüktür. Kanabinoid tipi kenevir bitkisi daha kısa boyludur ve kanabinoid içeriği yüksektir. Kanabinoidler, bitkinin reçinelerinde bulunan kimyasal bileşiklerdir ve kenevir bitkisinin tıbbi kullanımı için önemlidir. THC ve CBD en yaygın kanabinoidlerdir ve THC psikoaktif etkilere sahiptir. Kenevir bitkisindeki THC seviyesine bağlı olarak, bitki endüstriyel kenevir veya marihuana olarak sınıflandırılabilir. Endüstriyel kenevir, THC seviyesi %0,3'ten az olan bitkilerdir ve endüstriyel amaçlar için kullanılırken, marihuana THC seviyesi daha yüksek bitkilerdir ve tıbbi veya rekreasyonel amaçlar için kullanılır (Chen ve Pan, 2021).

Kenevir bitkisinde biyoaktif bileşenler arasında yağlar, proteinler, kanabinoidler ve terpenler gibi bileşenler bulunmaktadır. Bu bileşenler hem bilimsel araştırmalarda hem de ürün geliştirmede giderek artan bir ilgi görmektedir (Fathordoobady ve ark., 2019; Pellati ve ark., 2018). Bu nedenle, kenevir ile ilgili çalışma alanları ve kenevir üretimi hızla artmaktadır. Ülkemizde de tıbbi kenevir üretimi üzerine özelleşmiş Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi (OMÜ) bulunmakta ve üniversite bünyesinde bulunan Kenevir Araştırma Enstitüsü bu alanda çalışmalar yapmaktadır.

1.1.1. Kanabidiol

Kanabidiol, *Cannabis sativa* bitkisinden elde edilen bir kanabinoiddir ve birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Izzo ve Camilleri 2009). CBD, ilk kez 1940'lı yıllarda kenevirden izole edilmiş ve 1963 yılında kimyasal yapısı tanımlanmıştır (Adams ve ark 1940, Mechoulam ve Shvo 1963, Mechoulam ve ark 1970). CBD'nin kenevir içerisindeki miktarı kenevirin fenotipine, yetiştirme ortamına ve ekstraksiyon metoduna göre değişiklik göstermektedir (Potter ve ark 2008, Mehmedic ve ark 2010). CBD, genellikle kenevir bitkisinin yapraklarından saflaştırılarak elde edilir. CBD'nin moleküler yapısı Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Kanabidiolün moleküler yapısı (Mechoulam ve Hanuš, 2002)

Kanabidiolün sinir hücrelerini koruduğu ve inflamasyonu azalttığı (Mehmedic ve ark 2010), ayrıca merkezi sinir sisteminde antioksidan, inflamatuvar ve antiapoptik özellikleri (Iuvone ve ark 2009) olduğu literatürde bulunan çalışmalarda bildirilmiştir. CBD'nin sinir sistemini sakinleştirici etkisi de bulunmaktadır ve Alzheimer, anksiyete, epilepsi, psikoz gibi sinir sistemi ve inflamasyon hastalıklarının tedavisinde etkili olduğunu rapor edilmiştir (Cunha ve ark 1980, Hampson ve ark 1998, Zuardi ve ark 2006). CBD'nin sindirim sisteminde bağırsak çalışmalarını düzenleyerek huzursuz bağırsak sendromu tedavisinde de aktif olarak kullanımı bildirilmiştir (Izzo ve Coutts 2005, Lahat ve ark 2012). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, CBD'nin sindirim sistemindeki motor aktiviteleri düzenlediği ve kolit oluşturulan farelerde bağırsak inflamasyonunu durdurduğu gözlemlenmiştir (Schicho ve Storr 2012).

Yapılan çalışma sonuçlarına göre, kanabidiol kullanımının bilişsel faaliyetlere, kalp atış hızına, kan basıncına ve vücut ısısına olumsuz bir etkisi gözlemlenmemiştir (Bergamaschi ve ark 2011). Ayrıca, sinir sistemi rahatsızlıklarının tedavisinde diğer ilaçlara göre daha hafif yan etkilere sahip olduğu ve bilinçsel performans ve hafızaya olumsuz bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Heyser ve ark 1993, Iffland ve Grotenhermen 2017). Kanabidiol diğer kanabinoidlerle birlikte kullanıldığında daha iyi sonuçlar vermektedir (Jamontt ve ark 2012). CBD ve THC'nin bir arada kullanımı, multipl skleroz (MS) hastalarındaki ağrılı durumların tedavisi için uygundur (Russo ve ark. 2007) ve Türkiye'de MS hastalığı tedavisinde %50 CBD ve %50 THC içeren ilaçlar kullanılmaktadır. 2018 yılında FDA, Lennox-Gastaut sendromu ve Dravet sendromu gibi epilepsinin ağır seyreden ve nadir görülen iki formunun tedavisinde kullanılmak üzere CBD içeren "Epidiolex" adlı ilacı onaylamıştır. Nabixsimols isimli bir ilaç CBD ve THC içerir ve mevcut diğer tedavilere cevap vermeyen MS'e bağlı spastisite tedavisinde kullanılmaktadır (Koca Çalışkan ve Yıldırım, 2020).

1.1.2. Kenevir tohumu yağı

Kenevir tohumları binlerce yıldır insan beslenmesinde kullanılmaktadır, ancak son zamanlarda hayvan yemi olarak kullanılmıştır. Son zamanlarda kenevir tohumlarının yüksek besin değeri keşfedilmiş ve insan beslenmesi için yeniden değerlendirilmeye başlanmıştır. Kenevir tohumlarının bileşimi hakkındaki literatür çalışmaları hızla artmış ve fonksiyonel gıda bileşenleri ve nutrasötik kaynağı olarak kenevir tohumlarını değerli bir besin kaynağı haline getirmiştir (Farinon ve ark., 2020; Xu ve ark., 2020)

Kenevir tohumu yağı, yumuşak bir tada sahip, sarımtırak bir renge sahip ve oda sıcaklığında sıvı halde bulunan bitkisel kökenli bir yağdır. Yağın organoleptik özellikleri, bitkinin yetiştirildiği bölgeye, yağın ekstraksiyon yöntemine ve tohumun olgunlaşma durumuna göre değişmektedir. Kenevir tohumu yağı, ticari yağlara göre daha düşük erime ve kaynama noktalarına sahiptir (Dunford, 2020). Kenevir tohumu yağı besleyici, terapötik ve biyoaktif özelliklere sahiptir. Yağın %80'i çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA) meydana gelmektedir. İçeriğinde linoleik asit ve α -linolenik asit gibi önemli ω -3/ ω -6 yağ asitleri yüksek oranda bulunmakta olup ω -3: ω -6 yağ asitlerini korumak için soğuk sıkım yöntemi tercih edilmektedir (Ustun-Argon, 2019). Bu yağ asitleri sayesinde, kenevir tohumu yağı metabolik hastalıkların tedavisinde (kanser, nörolojik bozukluklar, göz fonksiyonları, kardiyoloji vb.) potansiyel uygulama alanları sunar. Kenevir tohumu yağı ayrıca mineraller, fosfolipitler, karotenoidler gibi bazı bileşikler bakımından da zengindir (Lan ve ark., 2019; Mikulcova ve ark., 2017). Kenevir tohumu yağı içerisinde, esansiyel amino asitlerin metabolitleri olarak kabul edilen gamma-linolenik asit (GLA) ve stearidonik asit (SDA) bulunur. GLA ve SDA, atopik dermatit (egzama) ve bazı cilt hastalıklarında semptomları azaltmaya yardımcı olmaktadır (Leson, 2003).

Kenevir tohumu yağı, insan vücudunda sentezlenmeyen çoklu doymamış yağ asitleri ve esansiyel yağ asitleri içerdiğinden, günlük olarak ideal oranda besinler ile birlikte tüketildiğinde sağlık açısından çok faydalıdır. Kanın pıhtılaşması, tansiyon, ağrı, ödem, sindirim sistemi, bazı hormonların yapılması ve vücut sıcaklığının korunması gibi sağlık sorunlarını iyileştirmede fayda sağlamaktadır. Kenevir tohumu yağı, besin değerinin yüksek olması nedeniyle gıda takviyesi olarak büyük bir potansiyel oluşturmaktadır (Çelebi ve ark., 2017; Garcia ve ark., 2021). Kenevir tohumu yağı, taşıdığı fenol ve flavonoid içeriği sayesinde yüksek antioksidan kapasitesine sahiptir (Cerino ve ark., 2021). Antioksidanların, bağışıklığı güçlendirme ve kanser, kalp hastalığı gibi hastalıkları önleme yetenekleri mevcuttur (Cadenas ve Davies, 2000).

1.2. Partiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Kullanılan Polimerler

Polimerik nanopartiküller, çok yönlü ilaç taşıyıcısı olarak kullanılabilen ve çeşitli doğal veya sentetik kaynaklardan üretilebilen nanopartiküllerdir. İlaç yüklü nanopartiküllerin sentezi için seçilen polimer özellikleri oldukça önemlidir, çünkü sentezlenecek ilaç yüklü polimerin canlı ortamda toksik olmaması ve canlı vücuduna ait bağışıklık sisteminde immünojenik etki göstermemesi arzu edilir. Bu nedenle, biyouyumlu ve biyobozunur polimerler tercih edilir. İlaç taşıyıcı sistemlerin formülasyonlarında farklı polimerler kullanılabilir ve bu polimerler yapılarına, parçalanma özelliklerine ve kaynaklarına göre farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimerler doğal ve sentetik polimerler olarak iki kategoriye ayrılır. Polisakkarit veya protein yapılı olan polimerlere doğal polimerler denir (Özer, 2018).

Doğal polimerler, elde edildikleri kaynaklara göre kendi arasında tekrar sınıflandırılabilirken, sentetik polimerler yüksek miktarda üretilebilen, mekanik ve fiziksel özellikleri üretim esnasında kontrol edilebilen ve doğal polimerlere göre daha dayanıklı olan polimerlerdir. Ayrıca, şekil, yapı ve biyolojik bozunma hızı da kolaylıkla modifiye edilebilmektedir (Armentano ve ark., 2010). Nanopartikül hazırlamada yaygın olarak kullanılan bazı polimerler Çizelge 1.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Nanopartikül hazırlamada yaygın olarak kullanılan bazı polimerler (Mohanraj ve Chen, 2006; Tunçay ve Çalış, 1999)

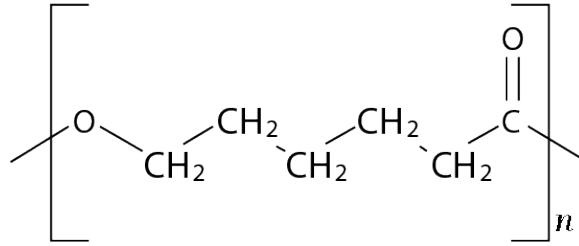
Sentetik polimerler	Doğal polimerler
Polikaprolakton	Aljinat
Polilaktid	Albümin
Polilaktik-ko-glikolik	Jelatin
N- Butil 2 Siyanoakrilat	Kitosan
Poli İzo Hekzil Siyanoakrilat	Kollajen
Poli N-bütil siyanoakrilat	Fibrinojen
Poliakrilat	LDL (Light density lipoprotein)
Polimetakrilat	Nişasta

1.2.1. Polikaprolakton

Polikaprolakton, 1930’ların başında Carothers grubu tarafından sentezlenen ilk polimerlerdendir (Van Natta, 1934). Polikaprolaktonun biyouyumlu ve biyobozunur olması ancak ticari olarak yaygınlaşması sentetik polimerlerin mikroorganizmalar tarafından bozundurulabileceğinin ortaya çıkarılmasından sonra olmuştur.

Polikaprolakton, biyolojik olarak parçalanabilen, sentetik, termoplastik, yarı kristal, hidrofobik ve biyouyumlu bir polimerdir (Sinha ve ark., 2004). Molekül ağırlığı

artıkça kristalinitesi azalır ve molekül ağırlığı geniş bir aralıkta değişkenlik gösterir. Polikaprolatonun kimyasal yapısı Şekil 1.2’de gösterilmiştir. Bu özelliklere ilaveten düşük erime sıcaklığına sahip olması ve toksik olmaması gibi birçok avantajı nedeniyle Avrupa İlaç Ajansı (Puga ve ark., 2012) ve ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı bir polimerdir (Xiang ve ark., 2022; Chandra ve ark., 1998; Okada, 2002; Nair ve Laurencin, 2007; Dash ve Konkimalla, 2012).



Şekil 1.2. Poli(ε-kaprolakton)’un kimyasal yapısı (McKeen, 2021)

PCL oda sıcaklığında 2-nitropropan, benzen, tolüen, diklorometan, karbon tetraklorit, kloroform ve sikloheksanonda yüksek çözünürlüğe sahipken 2-bütanon, aseton, asetonitril, dimetil formamit ve etil asetatda düşük çözünürlüğe sahiptir. Alkol, dietil eter, petrol eteri ve suda ise çözünmez (Sinha ve ark., 2004).

PCL, düşük camsı geçiş sıcaklığına (-60°C) ve düşük erime noktasına sahiptir (60°C). Yüksek geçirgenliği nedeniyle uzun süreli implante edilebilir cihazların hazırlanması ve kontrollü salım ve hedefli ilaç iletimi için yaygın olarak kullanılmaktadır (McKeen, 2021). PCL’nin doku mühendisliğinde ve kontrollü ilaç salımı ve diğer alanlarda yaygın olarak kullanılmasının en önemli nedenleri hemolize neden olmaması, vücutta bulunan trombositlerle ve iyonlarla etkileşime girmemesidir (Sun ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2022; Kang ve ark., 2010; Dorati ve ark., 2018). Bu özellikleri PCL’yi diğer polimerlerden ayırmakta ve ön plana çıkartmaktadır. Ayrıca farklı oranlarda birçok polimerle kopolimer oluşturabilmesi ve pek çok etken madde ile uyumlu olması kontrollü ilaç salım sistemlerinde ve biyomedikal uygulamalarda PCL’yi cazip kılmaktadır (Brode ve Koleske, 1972; Vion ve ark., 1986; Pitt ve ark., 1986).

PCL düşük mekanik mukavemete sahiptir ve hidrofobik moleküler yapıda olması beş metilen birimini içermesinden kaynaklanmaktadır. Bu sayede yavaş ve uzun bir bozunma gerçekleştirmektedir (He, 2019). PCL’nin bozunma hızı; molekül ağırlığına, kristalinite derecesine ve dış etkenlere bağlıdır. Birkaç günde ilaç salımı yapabileceği gibi bir yılı aşkın süre boyunca da ilaç salımı yapabilir. Molekül ağırlığı arttıkça ilaç salım

süresi de artmaktadır. Bu yüzden uzun süreli ilaç salım sistemlerinin tasarlanması için son derece uygundur. Bozunma sırasında yüzey erozyonu meydana gelmektedir. İlk önce amorf kısımlarda parçalanmalar meydana gelir ve buna bağlı olarak molekül ağırlığı sabit kalırken kristalinite derecesi artar. Daha sonra ester bağlarında kopmalar meydana gelir ve molekül ağırlığında azalma başlar. Bozunma yüksek sıcaklıklarda zincir uçlarından başlarken düşük sıcaklıklarda ise zincir üzerinden rastgele meydana gelir. Ayrıca hidroliz yoluyla veya enzimatik olarak parçalanabilen bir polimerdir. Polimer hidrolizle parçalanması sırasında ortaya çıkan karboksilik asitler nedeniyle otokatalize olur ve bozunma hızı artar. Aynı durum parçalanma enzimle katalize edildiğinde de geçerlidir (Sinha ve ark., 2004; Labet ve Thielemans, 2009; Woodruff ve Hutmacher, 2010; Zhang ve ark., 2014). Bakteri ve mantarlar gibi canlıların enzimatik aktivitesiyle biyolojik olarak parçalanabilen PCL, insan ve hayvan hücrelerinde parçalanma için gerekli enzimler mevcut olmadığı için enzimatik olarak parçalanamaz ve hidrolize maruz kaldır. Bu da bozunmanın uzun sürede meydana gelmesini sağlar (Vert, 2009).

1.3. İlaç Salım Kinetikleri

İlaçların uygun dozlarda ve sürelerde vücuda alınmasını sağlamak, yeni salım sistemleri tasarlamak ve oluşturmak, ilaçların uygun ve istenilen şekilde salınmasını sağlamak, ilaçların etkin terapötik etkisini ve güvenliğini geliştirmek, ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesi veya hali hazırdaki bir ilaç taşıyıcı sistemin iyileştirilmesi için matematiksel modelleme ve kinetik modellemeler kritik önem taşımaktadır (Kızıllhan, 2022).

1.3.1. Sıfıncı Derece Kinetik Modeli

Etken maddenin derişiminden bağımsız bir şekilde aynı zaman periyotlarında aynı miktar etken madde salımı yapan ilaç salım sistemleri Sıfıncı derece Kinetik modeline uyan ilaç salım sistemleridir (Bruschi, 2015). Sıfıncı derece kinetik modeli denklem 1 ile ifade edilmektedir.

$$Q_t = Q_0 + k_0 t \quad (1)$$

Q_t : t zamanında salınan etken madde miktarı

Q_0 : t=0 anında bulunan etken madde miktarı

k_0 : Sıfıncı derece salım hız sabiti

t: Zaman

Denklem 1’de yer alan sıfırıncı derece salım hız sabiti (k_0) salınan etken madde miktarının zamana karşı grafiğe geçirilmesi ile oluşan doğrunun eğiminden elde edilir.

1.3.2. Birinci Derece Kinetik Modeli

Salınan etken madde miktarının etken madde derişimine bağı olduğu salım sistemleri Birinci Derece modele uyan ilaç salım sistemleridir ve denklem 2 ile ifade edilmektedir (Padmaa ve ark., 2018).

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 \cdot t \quad (2)$$

Q_t : t zamanında salınan etken madde miktarı

Q_0 : t=0 anında salınan etken madde miktarı

K_1 : Birinci derece salım hız sabiti

t: Zaman

Denklem 2’de yer alan birinci derece salım hız sabiti (K_1) $\ln Q_t$ ’ye karşı zaman grafiği ile oluşan doğrunun eğiminden elde edilir.

1.3.3. Higuchi Kinetik Modeli

Higuchi tarafından 1961 yılında homojen veya heterojen matris sistemlerden etken madde salımını açıklamak için ortaya konulan ilk matematiksel modeldir ve homojen matris sistemler için Higuchi Modeli denklem 3 ile ifade edilmektedir (Higuchi, 1963).

$$Q = A \cdot \sqrt{D(2C - C_s) \cdot C_s \cdot t} \quad (3)$$

Q: t zamanında birim yüzey alanından salınan etken madde miktarı

A: İlaç taşıyıcıya ait yüzey alanı

C: Matris içerisindeki başlangıç etken madde derişimi

C_s : Matris içerisindeki etken madde çözünürlüğü

D: Matris içerisindeki etken madde difüzyon katsayısı

t: Zaman

1.3.4. Hixson-Crowell Kinetik Modeli

Hixson-Crowell salım kinetiği modeline göre salım hızı parçacıkların yüzey alanının hacminin küp kökü ile orantılıdır ve partiküllerin yüzey alanındaki değişimiyle meydana gelen etken madde salımını açıklamaktadır. Hixson-Crowell salım kinetik modeli denklem 4 ile ifade edilmektedir (Bruschi, 2015).

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = \kappa.t \quad (4)$$

W_0 : Etken maddenin farmasötik dozaj formundaki başlangıç miktarı

W_t : t zamanında farmasötik dozaj formunda kalan etken madde miktarı

t: Zaman

κ : Yüzey-hacim ilişkisini oluşturan sabit

1.3.5. Korsmeyer-Peppas Kinetik Modeli

Korsmeyer ve arkadaşları tarafından polimerik sistemlerde meydana gelen etken madde salımını tanımlayan eşitlik modeli denklem 5 ile ifade edilmektedir (Mauger, 1986). Etken madde salımı difüzyonla beraber polimerik yapının bozunması ile gerçekleşiyorsa;

$$M_t / M_\infty = kt^n \quad (5)$$

M_t/M_∞ : t zamanında salınan etken madde fraksiyonu

k: Salım hız sabiti

n: Salım kuvveti

t: Zaman

Salım kuvveti n, çeşitli geometrilere sahip matrislerde meydana gelen farklı salım mekanizmalarını ifade etmektedir. n değerinin 0,5 olduğu durumlarda etken madde salımının Fickian difüzyonuna uyarak gerçekleştiği görülmüştür. n değerinin $0,45 < n < 0,89$ aralığında olduğu durumunda etken madde salımının Fickian difüzyonuna uymayan difüzyonla meydana geldiği, n değerinin 0,89 veya bu değerden daha büyük olduğu durumlarda ise etken madde salımı II. durum ya da süper II. durum mekanizmaları ile gerçekleştiği görülmektedir (Padmaa ve ark., 2018). 'n' değerine bağımlı salım mekanizmaları Çizelge 1.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Korsmeyer–Peppas denkleminde bulunan n değerine göre salım mekanizmaları (Dash, 2010)

Salım Kuvveti (n)	Etken Madde Taşıma Mekanizması	Hız
0,5	Fickian Difüzyonu	$t^{-0,5}$
$0,45 < n < 0,89$	Fickian Olmayan Difüzyon	t^{n-1}
0,89	II. Durum	Sıfırıncı derece salım
$0,89 <$	Süper II. Durum	t^{n-1}

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

İlaç enkapsüle nanopartiküllerin hazırlanması için çok çeşitli yöntemler mevcuttur. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılan yöntemler emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma, emülsifikasyon-çözücü difüzyonu, çoklu emülsiyon-çözücü buharlaştırma, çoklu emülsifikasyon-çözücü difüzyonu, İyonik jelyasyon, kontrollü desolvasyon, diyaliz membran, nanopresipitasyon ve tuzla çöktürmedir (Özer, 2018).

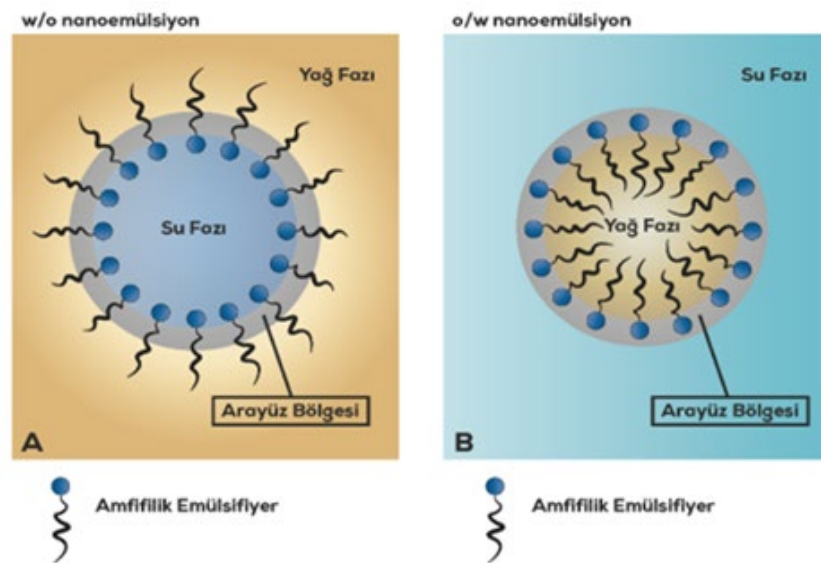
2.1.1. Emülsifikasyon çözücü buharlaştırma tekniği

Emülsifikasyon çözücü buharlaştırma yöntemi 1981 yılında Gurny ve ekibi tarafından keşfedilen polimerlerden doğrudan nanopartikül hazırlamak için kullanılan en eski yöntemdir (Gurny ve ark., 1981). Bu yöntemde, polimer ve ilaç önce uçucu ve su ile karışmayan bir çözücüde (örneğin, diklorometan, kloroform, etil asetat) çözünür. Daha sonra, sürfaktan içeren sulu bir fazda (örneğin, poli vinilalkol, poloksamer gibi surfaktanlar içeren bir fazda) emülsifiye edilir. Emülsifikasyon işlemi, yağ/su nanodamcıklarının yüksek enerjili homojenizatör veya sonikatör kullanılarak oluşturulmasıyla gerçekleşir. Nanodamcıklar daha sonra organik çözücü karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında veya vakum altında uçurular ve böylece nanopartiküller çöker (Crucho ve Barros, 2017). Bu yöntem yüksek enkapsülasyon verimliliği sağlar. Ancak, polimer fazında lipofilik ilaçlar çözündürülebildiğinden, hidrofilik ilaçlar enkapsüle edilecekse su fazında çözündürülmeleri gerekmektedir (Grabnar ve Kristl, 2011).

2.2. Nanoemülsiyon

Emülsiyonlar, birbiri içerisinde karışmayan en az iki sıvının birbirleri içinde damlacıklar halinde dağılması sonucu oluşan heterojen sistemlerdir. Bu sistemler, bir hidrofilik ve bir lipofilik fazdan oluşurlar ve iç ve dış faz olarak adlandırılırlar. Dış faz, sürekli bir fazdır ve iç fazı damlacıklar şeklinde taşır (İlyasoğlu ve El, 2010). Nanoemülsiyonlar ise birbirleriyle karışmayan iki sıvı fazdan biri nanoboyutlu damlacıklar şeklinde bulunurken (dağılmış faz) diğer faz ise başka bir sıvı fazda (sürekli faz) bulunur. Nanoemülsiyonlar, bir emülsifiyer kullanılarak bir apolar yağ fazı ve bir polar sulu fazın karıştırılması ile oluşur. İlk olarak, daha büyük damlacıkların oluşturduğu makroemülsiyon (kaba emülsiyon) meydana gelir ve ikinci basamakta bu

makroemülsiyon nanodamlacıklara bölünür (Gurpret ve Singh, 2018). Damlacıkların deformasyonu ve parçalanması, arayüzey alanını ve arayüzey enerjisini önemli ölçüde artırır. Bu nedenle, nanoemülsiyonların oluşumu kendiliğinden gelişigüzel gerçekleşmez ve enerji ihtiyacı gerektirir. Emülsifiyerlerin görevi, iki karışmayan faz arasındaki arayüzey gerilimini azaltmak ve damlacıkları parçalamak için gerekli kesme kuvvetini azaltmaktır (Tadros, 2014). Ayrıca, yeni oluşan damlacıkların yüzeyinde adsorbe olan emülsiyonlayıcı molekülleri, komşu damlacıklar arasında bir fiziksel bariyer oluşturarak onları stabilize eder ve iki damlacığın birbiri ile birleşmesini önler (Tadros ve ark., 2004). Emülsifiyerlerin damlacıkları stabil hale getirme yeteneği, amfifilik yapısından kaynaklanmaktadır. Emülsifiyer molekülleri, kuyruk ve kafa bölgesi olarak adlandırılan hidrofobik ve hidrofilik grupları içerir. Yağın su içinde (o/w) dağıldığı bir emülsiyona emülsifiyer molekülleri eklendiğinde, kuyruklar yağ damlacıklarına doğru uzanırken kafaları sürekli faz yönünde dışarıya doğru yönlendirirler. Ters (su içinde yağ, w/o) nanoemülsiyonlarda ise emülsifiyer moleküllerin yönelimi tersine çevrilir. Polar olmayan kuyruklar dışarıya, polar kafalar ise su damlacıklarının merkezine doğru yönlendirilir. Yağ içindeki su emülsiyonları sıradan emülsiyonlar olarak adlandırılırken (Goodarzi ve Zendejboudi, 2018), su içindeki yağ emülsiyonları ters veya invert emülsiyonlar olarak adlandırılır. Emülsiyon, başka bir sürekli faza daha fazla dağıldığında, çoklu emülsiyon veya emülsifiye edilmiş emülsiyon olarak adlandırılır. Örneğin, yağ-su-yağ (o/w/o) emülsiyonu, sürekli yağ fazında asılı daha büyük su damlacıklarında dağılmış küçük yağ damlacıklarından oluşan bir çoklu emülsiyondur.



Şekil 2.1. Amfifilik emülsifiyerlerle stabilize edilmiş nanoemülsiyon damlacıklarının gösterimi A) yağ içinde su fazı (w/o) ve B) su içinde yağ fazı (o/w) (Kupikowska-Stobba ve Kasprzak, 2021)

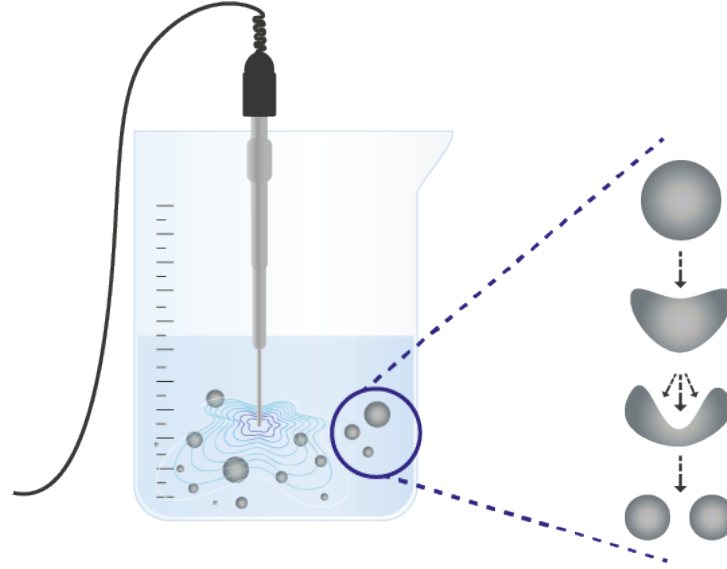
Nanoemülsiyon hazırlama yöntemleri, yüksek enerjili yöntemler ve düşük enerjili yöntemler olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Yüksek enerjili yöntemler, dağılmış fazı nanodamlacıklara ayırmak için yüksek kesme kuvvetleri kullanır (Maali ve Mosavian, 2013). Düşük enerjili yöntemlerde ise nanodamlacık oluşumu için gerekli enerji, emülsiyon bileşenlerinin kimyasal potansiyelindeki değişikliklerden kaynaklanır ve bu değişiklikler, yağ-su karışımının bileşimi veya sıcaklığındaki değişimler tarafından tetiklenir. Yüksek enerjili yöntemlerde kullanılan cihazlar, rotor stator yüksek hızlı homojenizasyon, mikrofluidizerler ve ultrasonik cihazlardır. Yüksek enerjili ve düşük enerjili nanoemülsifikasyon yöntemleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Düşük enerjili ve yüksek enerjili nanoemülsifikasyon üretim yöntemleri

Düşük Enerjili Nanoemülsifikasyon	Yüksek Enerjili Nanoemülsifikasyon
Kendiliğinden Nanoemülsifikasyon Metodu	Rotor Stator Yüksek Hızlı Homojenizasyon
Çözücü Çökeltme Yöntemi	Mikrofluidik Sistemler
Kabarcık Patlama Yöntemi	Ultrasonik Homojenizasyon
Geçişsel Faz İnversiyon (TPI)	
Katakstrofik Faz İnversiyon (CPI) Yöntemi	

2.2.1. Ultrasonikasyon

Ultrasonikasyon, nanoemülsiyon üretimi için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Ultrasonik homojenleştirme yöntemi yüksek frekanslı ses dalgalarını (20 kHz ve üzeri) kullanarak çalışır ve doğrudan nanoemülsiyon oluşturmak ya da oluşturulmuş bir emülsiyonun boyutunu küçültmek için kullanılır (Singh ve ark., 2017). Ultrasonik cihazlar, yüksek enerjili ultrasonik dalgalar üreten güç kaynağı ve bir piezoelektrik probtan oluşur. Kaba bir emülsiyon ultrasonik işleme maruz kaldığında, ses dalgaları mekanik titreşim ve akustik kavitasyon oluşturarak yüksek basınç ve türbülans oluşturur. Bu işlem, kavitasyon ile kabarcık meydana getirir ve damlacıkları nanodamlacıklara böler. Ultrasonik yöntemle nanoemülsiyon hazırlanması Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Bu yöntemde nano damlacık boyutunu belirleyen faktörler ultrasonik dalgaların amplitüdü (genliği) ve ultrasonik işlem süresidir. Uzun süre ultrasonik işlem, damlacık boyutunu azaltırken enerji girdisinde bir artışa neden olur. Ultrasonik, diğer yüksek enerjili emülsifikasyon yöntemlerine göre nanoemülsiyon oluşturmak için en az enerji gerektiren yöntemdir. Ayrıca, yüzey aktif madde kullanmadan nanoemülsiyon oluşturmayı da mümkün kılar (Kupikowska-Stobba ve Kasprzak, 2021).



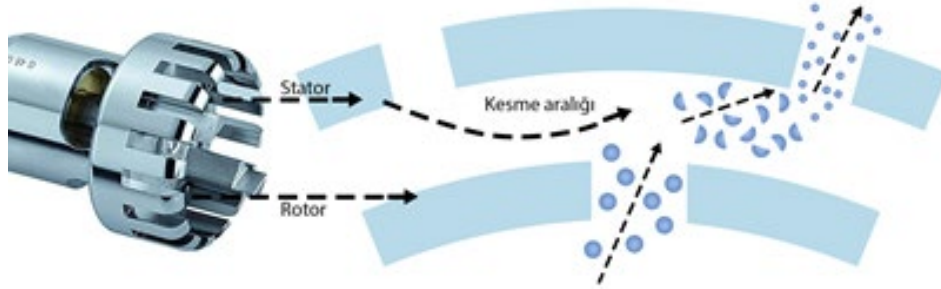
Şekil 2.2. Ultrasonikasyon yöntemiyle nanoemülsiyonun hazırlanması (Singh ve ark., 2017)

Yüksek enerjili yöntemlerin en büyük avantajlarından biri, çok yönlülükleridir ve hemen hemen her bileşimdeki yağ-su karışımlarından nanoemülsiyonların etkili bir şekilde üretilmesidir. Homojen bir yağ fazının sulu faza mekanik karıştırma yoluyla eklenmesiyle kaba bir emülsiyon hazırlanır ve daha sonra farklı genliklerde ultrasonik işleme tabi tutulur. Ultrasonik işlem, diğer yüksek enerjili yöntemlerden daha az enerji harcayan bir yöntemdir. Bu yöntemler, yüzey aktif madde içermeyen neredeyse herhangi bir bileşimdeki yağ-su karışımlarından nanoemülsiyonların etkili bir şekilde üretilmesine izin verir. Bu metodun dezavantajları ise homojenizatörlerin yüksek maliyetleri ve homojenizatör yüzeylerindeki emülsiyonların sürtünmesi ile ortaya çıkan büyük miktardaki ısıdır, bu da cihazın çalışması sırasında soğutma ihtiyacını ortaya çıkarır. Homojenizasyon sırasında oluşan ısı, proteinler ve nükleik asitler gibi termosensitif bileşikler içeren nanoemülsiyonların oluşturulmasını engellemektedir. Yüksek enerjili nanoemülsifikasyonun başka bir dezavantajı ise nişasta, metilselüloz ve kitosan gibi yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin parçalanması ve bozunmasıdır. Bu da molekül ağırlığının azalmasına ve viskozite veya bozunma hızı gibi özelliklerinde değişikliklere neden olur (Kupikowska-Stobba ve Kasprzak, 2021).

2.2.2. Rotor stator yüksek hızlı homojenizasyon

Rotor stator terimi, belirli bir tasarımı değil, bir dizi mikser geometrisini ifade eder (Håkansson, 2018). Rotor Stator yüksek hızlı homojenizatörler birkaç farklı üretici tarafından üretilmektedir ve her birinin kendine özgü tasarımı vardır. Rotor stator yüksek

kesmeli homojenizasyon yöntemi, nanoemülsiyonlar oluşturmak için kullanılan bir yöntemdir (Anton ve ark., 2008). Bu yöntemde, organik bir fazın içine emülsifiyer fazı eklenir ve Ultra-Turrax cihazı kullanılarak yüksek hızda karıştırılır, böylece nanoboyutta damlacıklar oluşur.



Şekil 2.3. Ultra-Turrax homojenleştiricinin rotor/stator düzeninin karıştırma mekanizması (Sand Chee ve Jawaid, 2019)

Homojenizasyon odasındaki bozucu kuvvet, yüksek hızlı homojenizatörlerin dönen rotoru ile stator arasındaki dar açıklıkta yüksek basınç altında oluşturulmaktadır. Ayrıca, kesici jetlerin çarpışması sonucu kayma kuvvetleri oluşmaktadır. Hidrolik kesme, yoğun türbülans ve kavitasyon kuvvetleri, emülsiyonları nano boyutlu damlacıklara parçalar. Damlacık boyutu istenen seviyeye gelene kadar, damlacık parçalanması ve stabilizasyon adımları birkaç kez tekrarlanır (Kumar ve ark., 2019).

2.3. Literatür Çalışmaları

Byun ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada, antioksidan özellikteki α -tokoferolün kontrollü salımını sağlamak için α -tokoferol enkapsüle poli ϵ -kaprolakton nanopartikülleri sentezlemişlerdir. Nanopartikülleri, ultrasonikasyon tekniği ve emülsiyon buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlamışlardır. Bu çalışmada, birincil emülsiyon oluşturmuşlar ve sonrasında organik çözücünün buharlaştırılması ile polimerik nanopartiküller elde etmişlerdir. Ayrıca farklı PCL konsantrasyonu ve farklı ultrasonikasyon süresinin nanopartikül özellikleri üzerindeki etkileri incelemişlerdir. Duncan'ın çoklu aralık testi ile hesapladıkları yüzde kapsülleme verimliliğinin ultrasonikasyon süresi arttıkça kapsülleme verimliliğinin ve nanopartikül boyutunun azaldığını gözlemlemişlerdir. Yapılan morfoloji ve karakterizasyon çalışmaları sonucunda nanopartiküllerin boyut dağılımı, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli

sırasıyla 203,6 nm, 0,183 ve -21,7 mV olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, hazırlanan nanopartiküllerin küçük, homojen ve kararlı olduğunu göstermektedir. Tokoferol, nanopartiküllere başarıyla yüklenmiş ve %75,5 yükleme verimi elde edilmiştir. Nanopartiküllerin şekli taramalı elektron mikroskobu görüntüleriyle belirlenmiş ve yaklaşık olarak küresel morfolojiye sahip oldukları görülmüştür. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi analizi, nanopartiküllerde hem uzun zincirli α -tokoferol hem de PCL'nin varlığını doğrulamışlardır. Yaptıkları *in vitro* salım çalışmalarında, α -tokoferol yüklü PCL nanopartiküllerinin 5 gün boyunca kontrollü salım sağladığı ve 5 gün sonunda %75 oranında α -tokoferol salımı olduğu görülmüştürler. Sonuç olarak bu çalışma ile α -tokoferol enkapsüle PCL nanopartikülleri ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilir olduğunu ve kontrollü ilaç salımı potansiyeline sahip olduğunu tespit etmişlerdir (Byun ve ark., 2011).

Guerreiro ve arkadaşlarının 2012 yılında yayınlanan çalışmalarında amilin adlı insülin salgılayan pankreas hormonunun düşük çözünürlüğü ve amiloid agregasyona yatkınlığı nedeniyle terapötik kullanımını artırmak için kontrollü salım teknolojilerinin geliştirilmesi amacıyla, emülsiyon-çözücü buharlaşma yöntemi kullanarak ultrasonikasyon ile yaklaşık 200 nm boyutunda ve düşük polidispersite indeksine sahip, %80 kapsülleme verimi ve %90 reaksiyon verimi olan amilin proteinini yüklü PCL nanopartiküller elde etmişlerdir. Elde edilen nanopartiküllerin *in vitro* olarak 240 saat boyunca kontrollü bir salım sergilediğini göstermişlerdir. Ayrıca, yapılan *in vivo* çalışmasında farelere subkutan olarak uygulanan nanopartiküllerin farmakolojik değerlendirmesi yapılmıştır. Bu değerlendirme sonucunda, salınan insan amilinin biyoaktivitesi ve etkinliği azalmış glisemiye yol açarak en az 36 saat boyunca devam ettiğini tespit etmişlerdir. Elde edilen bu sonuçlar, insan amilinin terapötik kontrollü ve sürekli salımı için sınırlı bir parçacık sisteminin kullanım potansiyelini göstermektedir (Guerreiro ve ark., 2012)

Abamor'un 2018 yılında gerçekleştirdiği çalışmada, Leishmaniasis (Layşmanyaz) hastalığının tedavisi için yeni bir yaklaşım olarak doğal bir polifenolik flavonoid olan kuersetin yüklü Polikaprolakton Nanopartiküllerinin kullanımı incelemiştir. Leishmaniasis, parazitik bir hastalıktır ve bu hastalığın tedavisi için mevcut olan ilaçlar genellikle yüksek yan etki riski taşımaktadır. Kuersetin enkapsüle PCL nanopartiküller elde etmek için tek emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile %80 genlikte ultrasonikasyon kullanılarak sentezi gerçekleştirmiş ve sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonunu ve *L. infantum* parazitleri üzerindeki *in vitro* antileishmanial

etkinliğini analiz etmiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi kullanılarak Quercetin'in yüklenmesi doğrulanmıştır. Nanopartiküllerin karakterizasyonu ise, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi, taramalı elektron mikroskopisi ve dinamik ışık saçılması yöntemleriyle yapılmıştır. Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonu sonucunda ortalama boyutu 380 nm, zeta potansiyeli -6,56 mV ve PDI değeri 0,21 olarak belirlen kuersetin yüklü nanopartiküller sentezlendiğini tespit etmiştir. Kuersetin yüklenme etkinliği %64 ve reaksiyon verimliliği %55 olarak hesaplanmış ve 192 saatlik salım kinetiğinde inkübasyon sonrasında, nanopartiküllerin kuersetin salımını %58 olarak tespit etmiştir. Sentezlenen kuersetin yüklü nanopartiküllerin *L. infantum* promastigotları ve amastigotları üzerindeki IC₅₀ değerleri sırasıyla 86 ve 144 µg/mL bulmuştur. Bu veriler, kuersetin yüklü nanopartiküllerin *L. infantum* parazitleri üzerinde güçlü bir antileishmanial etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir (Abamor, 2018).

Abamor ve arkadaşları 2018 yılında *Nigella sativa* yağı içeren poli-ε-kaprolakton nanopartikülleri tek emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi %80 genlikte ultrasonikasyon kullanılarak sentezlemiş ve 50, 100, 150 ve 200 mg dozlarda nigella sativa yağı içeren PCL nanopartiküller elde etmiş ve bu partiküllerin *Leishmania infantum* promastigotları ve amastigotları üzerindeki antileishmanial etkinliklerini incelemiştir. Yapılan karakterizasyon sonucunda nanopartiküllerin boyutları 200 ile 390 nm arasında değiştiğini tespit etmiş, kapsülleme verimini %80 ile %98 aralığında olduğunu ve yaptığı 288 saatlik *in vitro* salım kinetiğinde yaklaşık %85 salım yaptığını hesaplamıştır. Elde edilen *Nigella sativa* yağı yüklü PCL nanopartiküllerin *L. infantum* promastigotları ve amastigotları üzerinde önemli antileishmanial etkileri olduğunu göstermiştir (Abamor ve ark., 2018).

Mahmoudi ve arkadaşları 2021 yılında Alzheimer hastalığı tedavisinde onaylı bir ilaç olan memantin etken maddesini polikaprolakton ile enkapsüle nanopartikül elde ederek ilacın daha iyi emilim sağlamasını ve ilacın yan etki riskini azaltmayı amaçlamışlardır. Memantin, Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan bir N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistidir. Memantin enkapsüle PCL nanokapsülleri arayüzey biriktirme ve çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanarak hazırlamışlardır. Hazırlanan nanokapsüllerin boyutu, yüzey yükü, yüklenme verimi, ilaç salımı ve morfolojisi gibi özellikleri karakterize etmişlerdir. Yüzey yükü, zeta potansiyeli ölçümü ile belirlenmiştir. Yüklenme verimi, spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanmıştır. İlaç salımı testleri, *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, memantin yüklü polikaprolakton nanokapsüllerinin boyutlarının

ortalama olarak 184,3 nm olduğu bulunmuştur. Yükleme verimi %61,2 ve ilaç salımı %75 olarak tamamlanmıştır. Ayrıca, nanokapsüllerin yüzey yükü de -25,6 mV olarak ölçülmüştür. 40 gün boyunca yaptıkları fizikokimyasal stabilite çalışmalarında, nanopartiküllerin herhangi bir agregasyon olmaksızın çözeltide stabil olduğunu görmüşlerdir. Yaptıkları bu çalışma sonucunda memantin yüklü PCL nanopartiküllerin Alzheimer hastalığı için kullanılabilecek umut verici bir sistem olduğunu görmüşlerdir (Mahmoudi ve ark., 2020).

Nawaz ve arkadaşlarının 2021 de yaptığı çalışmada, yanık yara ve farklı cilt bozukluklarının iyileştirme uygulamaları için akriflavin (acriflavine) enkapsüle polikaprolakton nanopartiküllerinin geliştirilmesi ve optimizasyonunu amaçlanmıştır. Akriflavin enkapsüle PCL nanopartiküllerin optimizasyonu için Box-Behnken tasarımı kullanılmışlardır. Akriflavin sağlık sektöründe sıklıkla kullanılan antimikrobiyal bir maddedir. Akriflavin enkapsüle PCL nanopartikülleri mekanik homojenleştirici kullanarak çözücü uzaklaştırma yöntemiyle elde etmişler ve formülasyonların optimizasyonu için 15 farklı deneyle Box-Behnken tasarımını yürütmüşlerdir. Box-Behnken tasarımı PCL konsantrasyonu, akriflavin konsantrasyonu ve PVA konsantrasyonu ile 3 faktörlü olarak tasarlanmıştır. Bu tasarım matrisi sayesinde minimum sayıda deneyle optimum optimizasyonu hesaplamayı amaçlamış ve PCL miktarı, dış fazın karıştırma hızı ve PVA konsantrasyonunun partikül boyutu, polidispersite indeks ve kapsülleme verimliliği üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda, Akriflavin enkapsüle PCL nanopartiküllerinin boyutu, PCL konsantrasyonu, akriflavin konsantrasyonu ve PVA konsantrasyonu ile ilişkili olarak değiştiği görülmüştür. En iyi sonuçlar, PCL konsantrasyonu %1,0 (w/v), akriflavin konsantrasyonu %0,2 (w/v) ve PVA konsantrasyonu %1,5 (w/v) olarak belirlenmiştir. Optimize edilmiş akriflavin yüklü poli ϵ -kaprolakton nanopartiküllerin zeta potansiyeli, PDI, partikül boyutu ve kapsülleme verimliliği sırasıyla -3,98 mV, 0,270, 469,2 nm ve 71,9% olarak bulmuşlardır. Sonuç olarak Box-Behnken tasarımı kullanarak nanopartikül formülasyonlarının optimize edilmesi, ilaç teslim sistemlerinin geliştirilmesinin önemi göz önüne serilmiş ve akriflavin yüklü polikaprolakton nanopartiküllerinin yanık yaralarının tedavisi için bir potansiyel tedavi yöntemi olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Nawaz ve ark., 2021).

Javaid ve arkadaşları, 2021 yılında sefotaksim adlı antibiyotik ilacın kontrollü salımını sağlamak amacıyla polikaprolakton temelli polimerik nanopartiküllerin geliştirilmesi ve karakterizasyon çalışmalarını yapmışlardır. Sefotaksim, geniş

spektrumlu bir beta-laktam antibiyotiktir ve birçok bakteriyel enfeksiyonun tedavisinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada sentezledikleri sefotaksim enkapsüle PCL nanopartiküllerin antifouling özellikleri ve *in vitro* ilaç salım uygulamalarındaki etkinliği değerlendirilmiştir. Başlangıçta, sefotaksim enkapsüle PCL nanopartiküllerinin sentezi emülsiyon çözeltisi polimerizasyonu (ECP) yöntemiyle yapılmıştır. Bu yöntem sayesinde, ilaç molekülleri polimer matris içerisine homojen bir şekilde dağıtılmış ve istenen boyutta nanopartiküller elde edilmiştir. Sentezlenen boş ve ilaç yüklü nanopartiküllerin ortalama boyutları sırasıyla 200 nm ve 216 nm, ilgili yükleri ise -16,8 mV ve -11,2 mV olarak hesaplanmıştır. Sefotaksim enkapsüle PCL nanopartiküllerin *in vitro* ilaç salım profilleri pH 5,5 ve pH 7,4 olmak üzere 2 farklı pH değerinde incelenmiş ve uzun süreli salım gözlemlenmiştir. İlaç salım oranlarının pH ve sıcaklık gibi çevresel faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterdiği görülmüştür. Ayrıca, salıverilen ilacın miktarı ve hızı, nanopartikül boyutu ve ilaç yükleme verimliliği ile de doğrudan ilişkilendirilmiştir. Antifouling aktivitesi, Gram pozitif *Staphylococcus aureus* ve Gram negatif *Escherichia coli* olmak üzere iki bakteri suşuna karşı gözlemlenmiş ve sefotaksim yüklü PCL nanopartiküllerin topikal ilaç iletim sistemleri ve cilt uygulamaları için umut verici bir aday olabileceğini göstermişlerdir (Javaid ve ark., 2021).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Kanabidiol ($\geq 98\%$)(Cayman), Metanol (Merck, chromatography grade), Poli- ϵ -Kaprolakton (Mw: 14 000, Sigma Aldrich), Poli- ϵ -Kaprolakton (Mw: 45 000, Sigma Aldrich), Poli- ϵ -Kaprolakton (Mw: 80 000, Sigma Aldrich), Polivinil alkol (Mw: 30 000–70 000) (Sigma Aldrich), Diklorometan (for analysis, Merck), Asetonitril (HPLC grade, Sigma-Aldrich), Fenolftalein (Merck), Tween®80 (Sigma Aldrich), Kloroform (Carlo Erba), Glasiyel asetik asit (Merck), Disodyum hidrojen fosfat (Merck), Jelatin (200 Bloom, Seljel A.Ş.), Phosphate Buffered Saline (Invitrogen), Etanol (Merck, chromatography grade), Aseton (Tekkim), n-heptan (Merck), Dietil eter (Chemlab), Nişasta (starch soluble, Merck), Potasyum Hidroksit (Afg Bioscience), Potasyum iyodür (Honeywell-Fluka), Sodyum Klorür (Sigma Aldrich), Sodyum Tiyosülfat (Afg Bioscience), Hidroklorik asit (Isolab), Sodyum dihidrojen fosfat (Sigma Aldrich), RPMI 1640 (L-Glutamine, Lonza), DMEM (1 g/L Glucose with L-Glutamine, Lonza), Gentamycin (Sigma Aldrich), FAME Mix (Supelco 37 Component, Sigma Aldrich), Fetal Bovine Serum (Heat-Inactivated European Grade, Biological Industries), Gliserin (Bitkisel %99.7, Evyap), Nile Red Floresans boya (Sigma Aldrich), XTT (Cell proliferation kit, Sartorius).

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Ultra-Turrax (IKA® T25 D Ultra-Turrax), Ultrasonik homojenleştirici (Bandelin GM 3200, 200 W, 20 kHz, KE 76 prop), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (Prominence LC-20 AD, Shimadzu), Santrifüj (NF800R, Nüve), Ultrasonik banyo (180 W, ISOLAB Laborgeräte GmbH), Gaz Kromatografisi (GC 2010 Plus, Shimadzu), İnkübaörlü çalkalayıcı (Unimax 1010 & Incubator 1000, Heidplph Persia), UV/Vis Spektrometre (Multiskan SkyHigh Microplate UV/Vis Spectrophotometer, Thermofisher), Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (GeminiSEM 500, ZEISS), Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (Setaram, Labsys Evo), Floresans mikroskop (BAB-TAM-F, BAB), Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (IRTracer-100, Shimadzu), Disintegration Tester (Logan DST-3/6, Logan Instruments), Hassas terazi (Explorer EX224/AD, Ohaus), Ultra safsu cihazı (Millipore UV Water Purification, Merck), Liyofilizatör (Hypercool HC-4110, Gyrozen), Zeta Sizer (Nanoplus 3, Micromeritics), Manyetik karıştırıcı (MSH-20A, Daihan), Vorteks (MaXshake VM30, Daihan).

3.2. Yöntem

3.2.1. PCL nanopartiküllerinin ön formülasyon çalışmaları

Üretim için en uygun boyuttaki PCL nanopartiküllerin elde edilebilmesi için çözücü buharlaştırma tekniği ile farklı molekül ağırlığına sahip (14 000, 45 000 ve 80 000 MA) polikaprolakton çeşitleri kullanıldı. Çözücü buharlaştırma tekniğinin ilk aşamasında 150 mg polimer oda sıcaklığında 5 mL diklorometan içinde çözündürülerek yağ fazı (O) elde edildi.

Dış sulu faz (W) olarak kullanılmak üzere PVA çözeltisi (%0,5) 5 g PVA 1000 mL'lik balon jöjeye alındı ve deiyonize su ile 1000 mL'ye tamamlandı. PVA çözeltisi, 60 °C'de 45 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda çözündürülerek hazırlandı. 50 mL PVA çözeltisine yağ fazı 2,5 mL/dk akış hacminde 3500 rpm karıştırma hızında eklendi ve Ultra-Turrax (IKA® T25 D Ultra-Turrax) için 25000 rpm'de ve ultrasonik homojenleştirici (Bandelin GM 3200, 200 W, 20 kHz, KE 76 uç) için 5 dakika süreyle %72 genlikte homojenize edildi. Elde edilen çözelti, organik çözücünün uygun şekilde buharlaşmasına ve nanopartiküllerin sertleşmesine izin vermek için manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 3 saat boyunca 600 rpm'de sürekli karıştırıldı. Nanopartikül oluşumu sadece ikinci aşamada meydana geldiğinden, ikinci aşama boyut belirleme aşaması olarak kabul edilmektedir (Iqbal ve ark., 2014). Farklı molekül ağırlığına sahip PCL plasebo nanopartikül elde parametreleri Çizelge 3.1'de verildi. Oluşan partiküller 9000 rpm'de santrifüj edilerek geri kazanıldı. Elde edilen nanopartiküllerden PVA'yı uzaklaştırmak için pelet deiyonize su ile 3 kez yıkanarak süpernatant uzaklaştırıldı. Son olarak nanopartiküller depolama sırasında polimer hidrolizini önlemek için -80 °C'de 24 saat dondurularak ve liyofilizatörde kurutuldu.

Çizelge 3.1. Farklı molekül ağırlığına sahip PCL plasebo nanopartikül elde parametreleri

PCL M _A	Homojenizatör	PCL (mg)	%Amp/Rpm	PVA (a/h)	O/W
14000	Ultra-Turrax	150	25000	%0,5 (50 mL)	5 dk
45000	Ultra-Turrax	150	25000	%0,5 (50 mL)	5 dk
80000	Ultra-Turrax	150	25000	%0,5 (50 mL)	5 dk
14000	Ultrasonik	150	72%	%0,5 (50 mL)	5 dk
14000*	Ultrasonik	150	72%	%0,5 (50 mL)	5 dk
45000	Ultrasonik	150	72%	%0,5 (50 mL)	5 dk
80000	Ultrasonik	150	72%	%0,5 (50 mL)	5 dk

*0,2 mikrometre gözenek çaplı filtre ile süzüldü.

3.2.2. CBD enkapsüle edilmiş PCL nanopartiküllerin hazırlanması

Ön formülasyon çalışmaları sonrası nanopartikül üretimi için ultrasonik homojenleştirici ve 14 000 M_A'ya sahip PCL kullanımına karar verildi ve yağ fazı (O)

hazırlanması için etken madde (CBD) ve 150 mg polimer (PCL) oda sıcaklığında 5 mL diklorometan içinde çözündürülerek yağ fazı elde edildi. Dış sulu faz (W) olarak 50 mL PVA çözeltilisine yağ fazı 2,5 mL/dk akış hacminde 3500 rpm karıştırma hızında eklendi ve %72 genlikte 5 dakika homojenize edildi. Elde edilen O/W emülsiyonu, organik çözücünün uygun şekilde buharlaşmasına ve nanopartiküllerin sertleşmesine izin vermek için manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 3 saat boyunca 600 rpm'de sürekli karıştırıldı. Oluşan partiküller 9000 rpm'de santrifüj edilerek geri kazanıldı. Elde edilen nanopartiküllerden PVA'yı uzaklaştırmak için pelet deiyonize su ile 3 kez yıkanarak süpernatant uzaklaştırıldı. Son olarak nanopartiküller depolama sırasında polimer hidrolizini önlemek için -80 °C'de 24 saat dondurularak ve liyofilizatörde kurutuldu.

Bu tez çalışmasında, nanopartiküllerin maksimum yükleme kapasitesi, farklı başlangıç etken madde: polimer oranlarıyla (150 mg PCL başına 5, 10, 15, 30 mg CBD) hazırlanarak değerlendirildi. Nile Red (Nil kırmızısı) floresans boya (2 mg/mL) içeren nanopartiküller de aynı yöntemle yağ fazında çözündürülerek hazırlandı.

3.2.3. Nanopartiküllerin morfolojisi ve karakterizasyonu

3.2.3.1. Partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli analizi

Nanopartiküller hazırlandıktan sonra partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli zeta sizer (Micromeritics – Nanoplus 3) cihazı kullanılarak belirlendi. Ortalama parçacık boyutu, 50 okuma ile üç ardışık ölçümün ortalaması alınarak hesaplandı. Her numune, 10 dakika ultrasonik banyoya (ISOLAB Laborgeräte GmbH 180 W) maruz bırakıldıktan sonra çoklu saçılmayı önlemek için kuvars küvette 20:1 deiyonize su içerisine seyreltilerek hazırlandı ve daha sonra kuvars küvet analiz için cihaza yerleştirildi. Her numune için ortalama parçacık boyutu belirlendi. İzotonik stabilite sağlamak için zeta potansiyeli analizinden önce 1 mM NaCl ilave edildi (Nawaz ve ark., 2021). Her numune için partikül boyutu ve zeta potansiyel değeri üç kopya halinde ölçüldü ve ortalama değerleri alındı. Polidispersite indeksi (PDI), DLS ölçümleri ekipman yazılımı kullanılarak belirlendi (NanoPlus V 5.10 - Micromeritics Instrument Corp.).

3.2.3.2. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) analizleri

Nanopartiküllerin yüzeyi ve şekli, alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (ZEISS GeminiSEM 500) ile incelendi. Düz bir alüminyum plaka üzerine çift taraflı karbon bant yerleştirildi ve nanoparçacıklar bu plaka üzerinde oda sıcaklığında kurutuldu. Numuneler son olarak argonlu atmosferde ortalama 4,24 nm kalınlığında iridyum ile

kaplandı. Örnekler 2 kV'luk ekstra yüksek voltaj altında FE-SEM ile gözlemlendi. Ayrıca plasebo ve CBD enkapsüle PCL nanopartiküllerin (14 000 M_A) morfolojik karakterizasyonu, FE-SEM cihazı STEM başlığı kullanılarak sıvı ortamda da gözlemlendi. Üretilen plasebo ve CBD enkapsüle PCL nanopartiküllerden bir damla 200 mesh bakır ızgaralara yerleştirildi ve adsorpsiyon gerçekleşene kadar bekletildi, ardından fazla kısmı filtre kâğıdı ile çıkarıldı. Analizler, 30 kV hızlandırma ile gerçekleştirildi.

3.2.3.3. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi analizi

CBD enkapsüle PCL nanopartiküllerin etken madde ve polimer arasındaki etkileşimleri Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) (Shimadzu IRTracer-100, Japan) ile tespit edildi. Etken madde ve polimer arasındaki etkileşimler fonksiyonel grupların IR spektrumlarında meydana gelen bant kaymaları ve değişimleri ile tespit edilmektedir (Danafar ve ark., 2014). CBD ile PCL'nin etkileşimi ve enkapsülasyonun gerçekleştiğinin doğrulanması amacı ile saf PCL ve CBD'nin toz örnekleri ile liyofilize edilmiş CBD-PCL-NP ve plasebo PCL-NP örnekleri 350 cm⁻¹ ile 4500 cm⁻¹ spektrum aralığında 16'şar kez taranarak analiz edildi.

3.2.3.4. İlaç yükleme ve kapsülleme verimliliği (%EE)

PCL nanopartiküllerin içerisinde bulunan CBD miktarının belirlenmesi için Shimadzu Prominence LC-20 AD yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanıldı. Analizler SPD M20A UV-VIS DAD dedektörü, Restek marka ters fazlı C18 kolon (5 µm, 150 x 4,6mm) kullanılarak 205 nm dalga boyunda gerçekleştirildi.

CBD içeren PCL nanopartiküllerinin yüzde enkapsülasyon etkinliği (%EE) denklem 6 kullanılarak hesaplandı. Enkapsüle edilmiş CBD miktarını belirlemek için 15 mg nanopartikül, 1 mL DCM içinde çözüldü ve daha sonra HPLC mobil fazı ile 30 mL'ye tamamlandı. 0,45µm şırınga filtresi ile süzüldü ve analiz yapıldı. Mobil faz olarak asetonitril:su (85:15 h/h) karışımı kullanıldı. Mobil faz, 1 mL/dk'lık bir akış hızında verildi (De La Ossa ve ark., 2012). Kalibrasyon eğrisi Cayman firmasından satın alınan kanabidiol standartı kullanılarak 0,1 - 0,25 - 0,50 - 0,75 - 1 - 2,5 - 5 - 10 µg/mL (ppm) (r²= 0,9997) aralığında oluşturuldu. Analizinin toplam çalışma süresi 10 dakika ve alıkonma süresi 4,35 dk olarak belirlendi. Analitik yöntem, ICHQ2 (R1) (European Medicines Agency ICH Q2 (R1) Validation of analytical procedures) analitik yöntemlerin doğrulanması kılavuzuna göre doğrulandı. Tüm ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

$$\% EE = \frac{\text{Ölçülen CBD miktarı (mg)}}{\text{Başlangıçtaki CBD miktarı (mg)}} \times 100 \quad (6)$$

3.2.3.5. Reaksiyon verimi

Liyofilizasyon işleminden sonra kurutulmuş CBD enkapsüle PCL nanopartiküllerin ağırlığı hassas terazi ile tartıldı ve reaksiyon verimi (%RE) denklem 7'ye göre hesaplandı.

$$\% RE = \frac{\text{Sentezlenen nanopartikül miktarı(mg)}}{\text{Başlangıçta eklenen CBD (mg) + PCL miktarı (mg)}} \times 100 \quad (7)$$

3.2.3.6. İlaç-polimer çözünürlüğü ve uyumluluğu

Etken madde ve polimerin fiziksel durumunu ve etkileşimini değerlendirmek için saf CBD, saf PCL ve PCL-CBD fiziksel karışımları (sırasıyla 30:1, 15:1, 10:1 ve 5:1 oranlarında) 15 mg ağırlığında hazırlanarak diferansiyel taramalı kalorimetri (Setaram – Labsys Evo, Fransa) ile incelendi. Numuneler, 20 mL/dk N₂ (g) akışı altında 25 ila 300 °C'ye 10 °C/dk hızında ısıtılarak analiz edildi (Khuroo ve ark., 2018).

3.2.4. *In vitro* salım çalışmaları

In vitro salım çalışmaları bağırsak ve mide ortamını simüle etmek için sırasıyla pH 7,4 ve pH 1,2'de gerçekleştirildi.

3.2.4.1. Bağırsak ortamı *in vitro* salım çalışmaları

Bağırsak ortamında pH 7,4'de bağırsak ortamında *in vitro* salım çalışmaları, 150 mg PCL başına 5, 10, 15 ve 30 mg CBD enkapsüle PCL nanopartiküller üzerinden yürütüldü. Liyofilize edilmiş 15'er mg CBD dozajları içeren PCL nanopartiküller cam erlenlerde 30 mL pH 7,4 PBS: Tween[®]80 (%0,1 (w/v)) çözeltisi içerisinde süspanse edildi. Şişeler ağızları kapatılarak sürekli olarak 37 °C'de 35 strok/dk (çalkalama esnasında vorteks oluşmaması için) çalkalamayla çalıştırılan inkübatörlü çalkalayıcıya (Unimax 1010 & Incubator 1000, Heidplh Persia, Almanya) yerleştirildi. Belirli zaman aralıklarında (salımın başlatıldığı gün itibari ile 8 saat boyunca her saat başı, 5 gün boyunca 24 saatte bir kez) 28 mL süpernatant alınarak 0,45 µm gözenek çaplı filtre ile süzüldü ve bölüm 3.2.3.4'te belirtildiği gibi HPLC ile CBD içeriği 3 tekrarlı şekilde analiz edildi. Analiz için şişelerden alınan 28 mL ortam çözeltisi tekrar ilave edildi.

3.2.4.2. Mide ortamı *in vitro* salım çalışmaları

Mide ortamında *in vitro* salım çalışmaları pH 1,2'de 150 mg PCL başına 5, 10, 15 ve 30 mg CBD enkapsüle PCL nanopartiküller üzerinden yürütüldü. UV/Vis spektrofotometresi (Multiskan SkyHigh Microplate UV/Vis Spectrophotometer Thermofisher, A.B.D.) kullanılarak kalibrasyon eğrisi Cayman firmasından satın alınan kanabidiol standartı ile 0,50 - 0,75 - 1 - 2,5 - 5 - 10 µg/mL (ppm) ($r^2= 0,9962$) aralığında oluşturuldu. Liyofilize edilmiş 15'er mg farklı CBD dozajları içeren PCL nanopartiküller kapaklı cam şişelerde 30 mL HCl Ultrasaf su pH 1,2-Tween®80 içerisinde süspanse edildi. HCl-ultrasaf su içerisinde Tween®80 %0,1 (w/v) oranında eklendi (pH 1,2). Şişeler ağızları kapatılarak sürekli olarak 37 °C'de 35 strok/dk çalkalamayla çalıştırılan inkübatörde çalkalandı (Unimax 1010 & Incubator 1000, Heidolph Persia, Almanya). Belirli zaman aralıklarında (salımın başlatıldığı an itibari ile 8 saat boyunca her saat başı) 28 mL süpernatant alınarak 0,45 µm filtre ile süzülerek ve UV Spektrofotometre ile CBD içeriği 3 tekrarlı şekilde analiz edildi. Analiz için şişelerden alınan 28 mL ortam tekrar ilave edildi.

3.2.5. *In vitro* hücre proliferasyon çalışmaları

CBD'nin L929 normal fibroblast ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinin üremeleri üzerine etkilerinin belirlenmesi için öncelikle hücreler %10 fetal dana serumu (FBS) ve antibiyotik içeren tam besiyerinde (sırasıyla DMEM ve RPMI 1640) üretildi. CBD 100 µM-0,39 µM aralığında 9 farklı konsantrasyonda kuyulara dağıtılırken, hücre kontrolü ve besiyeri kontrolü olarak belirlenen kuyulara CBD içermeyen besiyeri eklendi. Aktif halde üremekte olan hücreler 96 kuyulu hücre kültürü plakasına, besiyeri kontrolü olan kuyular hariç olmak üzere, her kuyuya 5000 hücre olacak şekilde 50 µL besiyeri içerisinde ekildi. Plakalar 24, 48 ve 72 saat süreyle CO₂'li inkübatörde 37°C'de bekletildi. İnkübasyon sonrası her kuyuya 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromide içeren ve mitokondri aktivitesini ölçen XTT sitotoksitesite (Sartorius) solüsyonu eklendi ve 4 saat inkübe edildi. Canlı hücrelerin yüzdesini hesaplayabilmek üzere kuyulardaki absorpsiyon, ELISA plaka okuyucusunda 450 nm'de ölçüldü. CBD eklenmemiş kontrol hücrelerin üremesi %100'e karşılık gelecek şekilde CBD'nin hücre canlılığına etkisi % canlılık değerleri olarak hesaplandı. Her zaman dilimi için en az sekiz kuyudan sonuçlar ve standart sapmaları hesaplanıp t-testi uygulandı ($p<0,05$). Hücrelerin yüzde üremesinden yola çıkarak CBD'nin L-929 ve MCF-7 hücreleri üzerine etkileri ve IC₅₀ (hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) değerleri hesaplandı.

3.2.6. PCL-NP'lerin hücre içerisine alınımının test edilmesi

PCL-NP'lerin hücrelerin içerisine alındığını göstermek için Nil kırmızısı floresans boya kullanılarak bölüm 3.2.2'de bahsedildiği gibi 150 mg PCL polimere 10 mg boya enkapsulasyonu yapıldı, PBS ile yıkamalar tamamlandı. Nil kırmızısı hidrofobik bir boya olduğundan (Sackett ve Wolff, 1987), PCL nanoparçacıklarına verimli bir şekilde yüklendi. L929 rat fibroblast hücrelerine Nil kırmızısı yüklü PCL NP'ler eklendikten sonra 37°C'de 2 saat inkübasyonun ardından hücreler toplandı ve hücre içerisindeki floresan birikim floresans mikroskop (BAB-TAM-F, Türkiye) altında 40X ve 60X büyütmede Chroma Technology filtre seti AT-TRICT-REDSHFT 540/25x, 620/60m, AT565DC kullanılarak görüntülendi.

3.2.7. Kenevir tohumu yağında yapılan analizler

Tez çalışmasında prototip ürün olarak modifiye salım CBD-NP'lerin kenevir yağı içerisinde jelatin ile kapsüllenmesi planlandığı için kullanılacak olan kenevir tohumu yağında da kalite testleri yapıldı. Yağın güvenli ve sağlıklı kullanımı için en önemli kalite kriterleri olan serbest yağ asitliği, peroksit sayısı değeri ve yağ asitleri kompozisyonu tayini titrimetrik yöntemler ve gaz kromatografisi ile analiz edildi.

3.2.7.1. Serbest yağ asitliği (%FFA) tayini

Kenevir tohumu yağ numunesinin serbest yağ asidi (%FFA) içeriği % oleik asit türünden tespit edilmiştir. 10 g kenevir yağı numunesi 100 mL dietil eter:etanol (60:40 v/v) karışımı içinde çözüldü. Daha sonra karışıma 1 mL fenolftalein indikatörü ilave edildi. 0,1N KOH çözeltisi ile renk değişimi (pembe renk) gerçekleşene kadar çalkalanarak titre edildi Kütle yüzdesi olarak ifade edilen %FFA denklem 8 ile hesaplandı:

$$\% \text{ FFA} = \frac{V \times C \times M}{m \times 10} \quad (8)$$

Denklemden: V = kullanılan titre edilmiş KOH çözeltisinin hacmidir; C = KOH konsantrasyonudur; M = sonucun ifade edilmesi için kullanılan asidin molar ağırlığıdır (oleik asit = 282); ve m = analiz edilen yağ numunesinin tartım ağırlığıdır (Rapa ve ark., 2019).

3.2.7.2. Peroksit sayısı tayini

Kenevir tohumu yağı numunesinin peroksit sayısı (PN); kg yağdaki aktif oksijenin milieşdeğer (O_2 meq/kg) miktarının ölçüsüdür ya da diğer bir deyişle yağdaki hidroperoksit içeriğinin ifadesidir. 5 g kenevir tohumu yağı 10 mL kloroform içerisinde çalkalanarak çözüldü. Ardından 15 mL asetik asit ve 1 mL potasyum iyodür çözeltisi sırasıyla eklendi. Işıktan korunmak için oda sıcaklığında karanlık ortamda 5 dakika bekletildi ve 5 dakika sonra üzerine 75 mL distile su eklendi. 3 damla %1,0'lik nişasta çözeltisi indikatör olarak eklendikten sonra 0,01N sodyum tiyosülfat çözeltisi ile titre edildi. Peroksit Sayısı Meq O_2 /kg cinsinden denklem 9 ile hesaplandı.

$$PN = \frac{V \times T}{m} \times 1000 \quad (9)$$

Denklemden: V; Titrasyonda harcanan sodyum tiyosülfat çözeltisinin hacmidir (mL), T; kullanılan sodyum tiyosülfat çözeltisinin normalitesidir ve m; analiz edilen yağ numunesinin tartım ağırlığıdır (Rapa ve ark., 2019).

3.2.7.3. Yağ asitleri kompozisyonu tayini

Zade Vital İlaç Kimya Gıda San. ve Tic. A.Ş. firmasından ısıl işleme maruz bırakılmadan soğuk sıkım yöntemi ile elde edilen kenevir tohumu yağına ait yağ asit kompozisyonu gaz kromatografi cihazı (Shimadzu GC 2010 Plus, Japonya) ve gaz kromatografi-alev iyonlaştırma dedektörü (GC-FID) ile tespit edildi. Oda sıcaklığında 65 mg kenevir tohumu yağı tartılarak 2 mL 2 N metanol içeren potasyum hidroksit çözeltisi içinde çözüldü ve vorteks cihazı ile 5 dk karıştırıldı. Vorteksle 5 dk karıştırılan yağ numunesinin üzeri n-heptan ile 10 mL'ye tamamlandı ve tekrar 1 dk vorteks ile karıştırıldı. Metil esterleri türevlerine dönüşen yağ numunesi 3000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Santrifüjlenen yağ numunesinin üst fazı (organik faz) alınarak, 0,45 µm filtreden geçirilerek amber renkli GC vialine transfer edildi. Kenevir tohumu yağına ait esansiyel yağ asitlerini belirlemek için kullanılan gaz kromatografi cihazının çalışma koşulları Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'te belirtilmiştir. Gaz kromatografisinde elde edilen piklerin tanınması için esansiyel yağların alıkonulma zamanları standart çözelti ile elde edilen kromatogramlar kullanılarak belirlendi. Bu tez çalışmasında alıkonma zamanları 37 bileşenli FAMEMIX karışım standartına göre belirlendi. FAMEMIX karışım standardı 1 mL 37 bileşenli FAMEMIX karışımından alınarak 10 mL'ye n-heptan ile tamamlanarak GC sistemine enjekte edilip belirlendi.

Çizelge 3.2. Gaz Kromatografi sisteminin çalışma koşulları

Sistem	Çalışma Koşulları
Analiz İçin Kullanılan Cihaz	Shimadzu GC 2010 Plus
Kolon	Silika, $\ell = 100$ m, $\varnothing = 0,25$ mm \times 0,20 μ m, poli(bis siyanopropil siloksan) (film kalınlığı 0,20 μ m)
Dedektör	Alevli iyonlaştırma (FID)
Enjeksiyon Hacmi	1,0 μ L
Enjeksiyon Sıcaklığı	250°C (4°C/dk.)
Taşıyıcı Gaz	Helyum
Akış Hızı	1,5 mL/dk
Ayırma Oranı	1:99,7

Çizelge 3.3. Shimadzu GC-2010 Plus Enstrümental sistemin sıcaklıkları

	Sistem Sıcaklığı (°C)
Kolon	140→240 (4°C/dk.)
Enjeksiyon yuvası	250
Dedektör	260

3.2.8. Yumuşak jelatin kapsül ile üretim

Hidroforobik etken maddelerin biyoyararlanımını arttırmak ve uzun süreli stabilite sağlamak amacıyla kenevir tohumu yağı ve CBD enkapsüle PCL nanopartiküller nihai ürün aşamasında yumuşak jelatin kapsüller halinde formüle edildi.

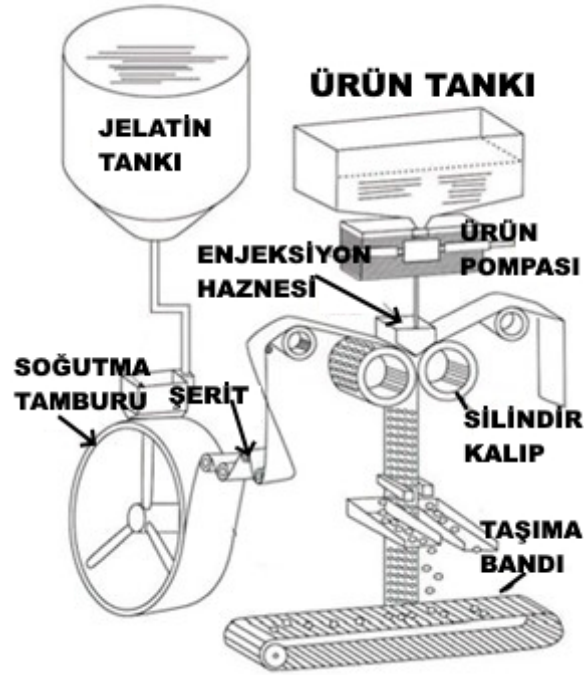
3.2.8.1. Jelatin eldesi

Kapsülleme öncesi jelatin şeridi elde etmek için Jelatin (200 Bloom), gliserin ve deiyonize su 45:17:38 (w/v/v) oranlarında 65°C sıcaklıkta 35 rpm'de vakum altında (0,06 milibar) homojen hale gelene kadar karıştırıldı. Elde edilen karışım jelatin tankına aktarılarak 30 dakika dinlendirildikten sonra katı bir jelatin şeridi oluşturmak için 15°C'de döner bir soğutma tamburu üzerine yayıldı.

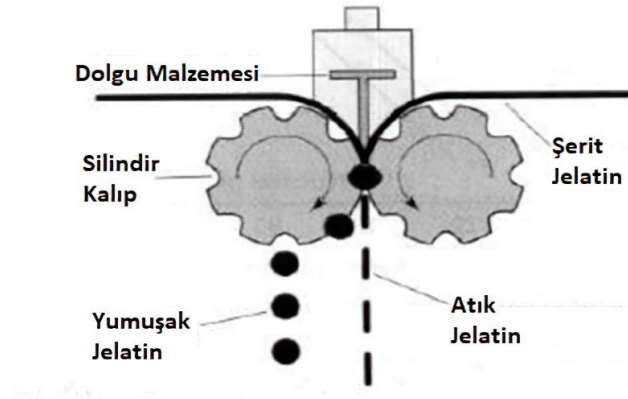
3.2.8.2. Kenevir tohumu yağı içerisinde CBD enkapsüle PCL nanopartiküllerin jelatin kapsül üretiminin yapılması

CBD enkapsüle PCL nanopartiküller, soğuk sıkım kenevir tohumu yağı ile karıştırılıp kapsülleme makinasının ürün deposuna eklendi. Yumuşak jelatin makinesi CBD enkapsüle PCL nanopartiküllü kenevir tohumu yağını Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de gösterildiği gibi sisteme enjekte ederken aynı anda jelatin şeridi sisteme beslendi. Kalıp sistemi jelatin şeritlerin iki yarısını keserek ve hermetik olarak kapanarak kapsülleme işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen yumuşak jelatin kapsüllerin jelatin kabuğunda bulunan

fazla nemin giderilmesi ve sertleştirilmesi için tamburlu kurutucu kullanılarak nem giderimi gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Yumuşak Jel Kapsülleme makinesinin parça ve bileşenleri



Şekil 3.2. Yumuşak jelatin kapsül dolum işlemi

3.2.8.3. Nihai ürün prototipinin paketlenmesi ve ambalajlanması

Elde edilen nihai ürün otomatik blister makinasında her blisterde 10 adet kapsül bulunacak şekilde el değmeden blisterlenerek kutulandı.

3.2.9. Nihai ürün prototipinin farmasötik etkinlik ve kalite kontrol testleri

Kapsül formülasyonunun hazırlanması ve kapsül doldurma işlemi sırasında, oluşturulan kapsüllerin istenilen özellikleri sağladığından emin olmak için kalite kontrol

testleri uygulandı. Bu tez çalışmasında üretilen nihai ürüne Avrupa farmakopesine göre ağırlık sapması (Ph. Eur. 2.9.5) ve dağılma testi (Ph. Eur. 2.9.1) yapıldı.

3.2.9.1. Ağırlık sapması

Yumuşak jelatin kapsüllerde ağırlık tekdüzeliği, üretim esnasında makinada sorun olup olmadığını ve üretim kontrollerinin iyi yapıp yapılmadığını gösteren kalite ölçülerinden en önemlisidir. PCL kaplı CBD NP içeren kenevir tohumu yağı yumuşak jelatin kapsülleri numunelerinden 20 kapsül tek tek tartılarak ağırlıkları belirlendi. Temiz ve kuru bir kesme aparatı (makas) ile kapsüller kesilerek açıldı, içerik aseton ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Oda sıcaklığında 20 dakika beklenerek kapsülde kalan çözücünün buharlaşması sağlandı. Çözücüsü uzaklaştırılan boş kapsüller tek tek tartılarak brüt ağırlıktan boş kapsül ağırlığı çıkartıldı ve PCL kaplı CBD NP içeren kenevir tohumu yağı net ağırlıkları hesaplandı.

Analiz sonucunda her kapsüle ait ağırlık sapması, ortalama ağırlığın %10'undan büyük ya da küçük olmamalıdır. Uygun olmayan sonuçların çıkması halinde 20 kapsül tekrar alınarak analiz tekrarlanır (Asaad, 2022).

3.2.9.2. Dağılma testi

Dağılma testi Logan DST-3/6 disintegration tester cihazı ile yapıldı. Cihazın sıvı haznesine farmakopeye (Ph. Eur. 2.9.1) göre hazırlanan suni mide ve suni bağırsak vasatı 1 litre konularak cihazın sıcaklığı $37 \pm 0,5$ °C'ye ayarlandı. Dakikada hazne içine 31 defa inip çıkan sepetin içine 6 adet nano CBD jelatin kapsül konularak cihaz çalıştırıldı. Yumuşak jelatin kapsüllerin dağılma süreleri her numune için ayrı ayrı tayin edildi. Suni mide vasatı için 8,3 mL HCL alınarak 1000 mL'ye distile su ile tamamlandı. Suni bağırsak vasatı için 7,8 g NaH_2PO_4 ve 7,1 g Na_2HPO_4 tartılarak 1000 mL distile su içinde çözünerek hazırlandı.

3.2.10. Moleküler yerleştirme çalışmaları

Moleküler yerleştirme, günümüzde yaygın olarak kullanılan ve bir protein veya ligand arasındaki interaksiyonların modellenmesine olanak tanıyan bilgisayar tabanlı analiz yöntemidir. Bu yöntemin avantajları, ilaç geliştirme ve moleküler biyoteknolojide moleküller arası etkileşimin tahmin edilmesinde kritik rol oynayabilmesidir. İlk olarak, moleküler yerleştirme, potansiyel ilaç moleküllerinin belirli bir protein tarafından nasıl yakalanabileceğini veya bir ligandın belirli bir proteine nasıl bağlanabileceğini simüle

etme olanağı sunar. Ayrıca, moleküler yerleştirme sayesinde protein-protein veya protein-ligand etkileşimlerinin enerji profilleri hesaplanabilir ve bu interaksyonların stabilitesi ve güçleri değerlendirilebilir. Bu tez çalışmasında literatür taraması sonucunda CBD ile etkileşime en çok giren reseptörler belirlenmiş ve etken madde reseptör ilişkileri moleküler yerleştirme yapılarak belirlenmiştir.

3.2.10.1. Reseptörler ve ligandın hazırlanması

Kanabinoid 1 reseptörü (CB1), kanabinoid 2 reseptörü (CB2), delta opioid reseptörü (δ -OP), G protein bağımlı reseptör 55 (GPR55), Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ve 5-hidroksitriptamin 1A reseptörü (5-HT1A) reseptörlerinin kristalografik yapısı Protein Veri Bankasından (PDB) elde edilmiştir (Berman, 2000). Reseptörün erişim kodları ve çözünürlük değerleri sırasıyla 5U09, 5ZTY, 4EA3, 4N6H, 3J5Q ve 7E2Y ve 2.60 Å, 2.80 Å, 3.01 Å, 1.80 Å, 3.80 Å ve 3.00 Å'dur.

Moleküler yerleştirme işlemi öncesinde optimizasyon için PDB formatındaki proteinlerin su moleküllerinin kaldırılması, polar hidrojen atomlarının eklenmesi ve Kollman yüklerinin eklenmesi AutoDockTools-1.5.7 yazılımı kullanılarak yapıldı. Hidrojen atomlarının eklenmesi ve yük gruplarının nötralizasyonundan sonra pdbqt formatında çıktı dosyaları alındı. CBD ligandının PDB uzantılı yapısı PubChem veri tabanlarından (cannabidiol 644019) alındı. Moleküler yerleştirme işlemi öncesi ligandların enerji minimizasyonu ve Hartree-Fock teori seviyesindeki geometri optimizasyonu PerkinElmer Chemdraw V.22.0.0.22 ile yapıldı.

3.2.10.2. Moleküler yerleştirme

Moleküler yerleştirme Autodock Vina v1.1.2 yazılımı ile gerçekleştirildi. Izgara kutucuk değerleri (Grid box) ve merkez koordinat değerleri Çizelge 3.4'te verildi. Hazırlanan reseptörler ve ligand moleküler yerleştirme işleminden sonra Pymol Edu v.2.5.4 programı ile reseptör-ligand bağlanma pozisyonları görselleştirildi ve BIOVIA Discovery Studio 2021 yazılımı ile oluşan bağ yapıları 2B görsel olarak tespit edildi (Suttithumsatid ve ark., 2022).

Çizelge 3.4. Izgara Kutucuğu (Grid box) değerleri ve merkez koordinat değerleri

Reseptör Adı	Kodu	Merkez Koordinat Değerleri (X, Y, Z)	Izgara Değerleri (X, Y, Z)
CB1	5U09	9, -9, -18	55, 58, 80
CB2	5ZTY	4, -4, -28	43, 57, 87
δ-OP	4EA3	-3, -78, -68	48, 39, 85
GPR55	4N6H	21, -36, 23	44, 94, 77
TRPV1	3J5Q	-25, 17, 8	46, 82, 88
5-HT1A	7E2Y	97, 89, 64	38, 35, 66

3.2.10.3. Farmakokinetik/ADMET profilinin belirlenmesi

CBD'nin farmakokinetik özelliklerinin belirlenmesi ve değerlendirilmesi için Swiss Institute of Bioinformatics çevrimiçi yazılımı SwissADME kullanılarak ADMET (absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite) profilleri belirlendi (Daina ve ark., 2017). CBD'ye ait SMILES zinciri CCCCC1cc(O)c(c(c1)O)C1C=C(C)CCC1C(=C)C olarak PubChem OEChem V2.3.0 yazılımı ile hesaplandı. Çevrim içi yazılıma CBD'nin kanonik SMILES zinciri eklenerek kan-beyin bariyeri geçirgenliği, Log K_p değeri ve P-glikoproteinlere bağlanma değerleri, inhibitör sitokrom P450 (CYP450), klirens ve hacim dağılımı, Lipinski kuralı ve biyoyararlanım gibi parametreler tahmin edildi. Ayrıca, GUSAR-Online web tabanlı sunucu kullanılarak CBD'ye ait *in silico* toksisitesi OECD projesine dayalı olarak farelerde oral uygulama öldürücü doz LD₅₀ tahminleri değerlendirildi (Lagunin ve ark., 2011).

3.2.11. İstatistik analiz

İstatistiksel analizler Student's t-test kullanılarak yapıldı. Tüm testler üç paralel halinde yapıldı ve sonuçlar ortalama \pm SD olarak ifade edildi. *In vitro* salım verileri salım kinetiği matematiksel modellerine uygulanarak ve en iyi uyumu belirlemek için korelasyon katsayıları (r^2) kullanıldı.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

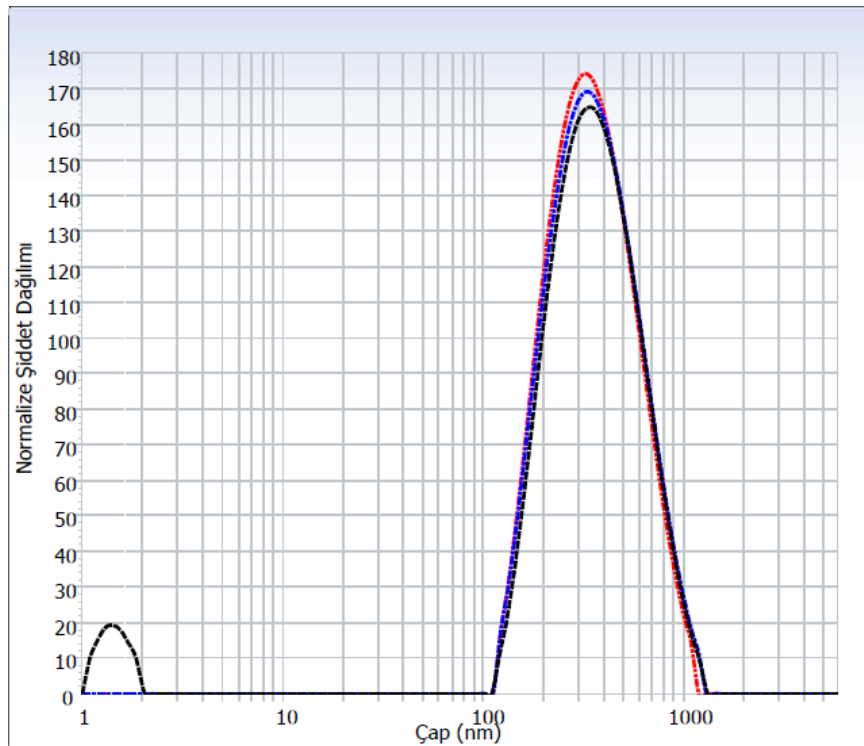
4.1. PCL Nanopartiküllerinin Ön Formülasyon Çalışmaları Sonuçları

Farklı molekül ağırlıklarına ve üretim tekniğine sahip PCL plasebo nanopartiküllere ait ortalama partikül büyüklüğü, Zeta Sizer Dinamik Işık Saçılımı (PDI) ve Zeta Potansiyeli ölçümleri yapılmıştır. Her numuneye ait Dinamik Işık Saçılımı ve Zeta Potansiyeli ölçümleri Şekil 4.1 ile Şekil 4.14 arasında verilmiştir. Tüm sonuçlar Çizelge 4.1’de özetlenmiştir.

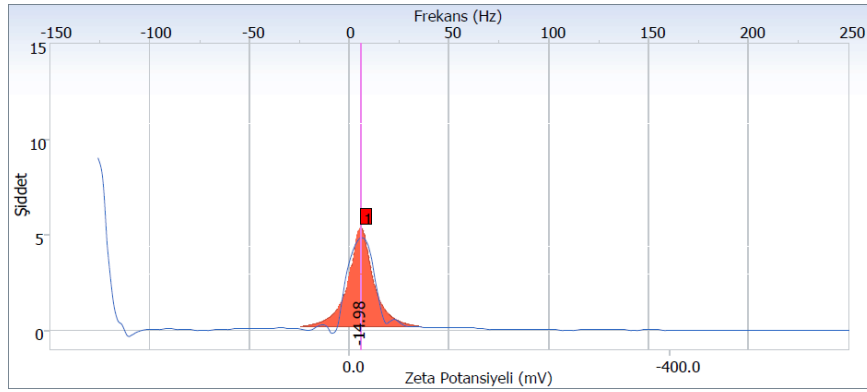
Çizelge 4.1. Farklı molekül ağırlıklarına sahip PCL plasebo nanopartiküllere ait boyut ve PDI ve zeta potansiyeli sonuçları (n=3)

PCL M _A	Homojenizatör	%Amp / Rpm	Ort. Çap (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli
14000	Ultra-Turrax	25000 rpm	327,9 ±6,51	0,259 ±0,027	-14,98 (mV)
45000	Ultra-Turrax	25000 rpm	338,1 ±4,46	0,271 ±0,038	-17,17 (mV)
80000	Ultra-Turrax	25000 rpm	392,4 ±13,79	0,250 ±0,011	-15,72 (mV)
14000	Ultrasonik	72% Genlik	207,5 ±0,45	0,114 ±0,044	-23,37 (mV)
14000*	Ultrasonik	72% Genlik	202,4 ±6,36	0,110 ±0,018	-20,16 (mV)
45000	Ultrasonik	72% Genlik	235,6 ±2,29	0,107 ±0,020	-21,12 (mV)
80000	Ultrasonik	72% Genlik	264,6 ±6,85	0,108 ±0,020	-24,11 (mV)

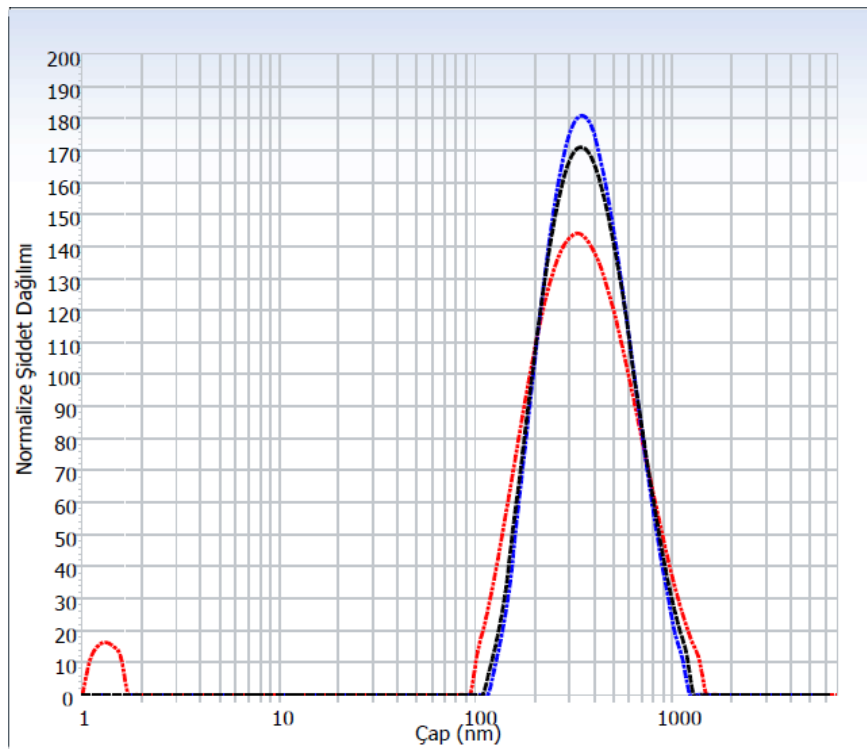
*0,2 µm gözenek çapına sahip filtre ile süzölmüştür.



Şekil 4.1. Ultra-Turrax ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_A:14 000)

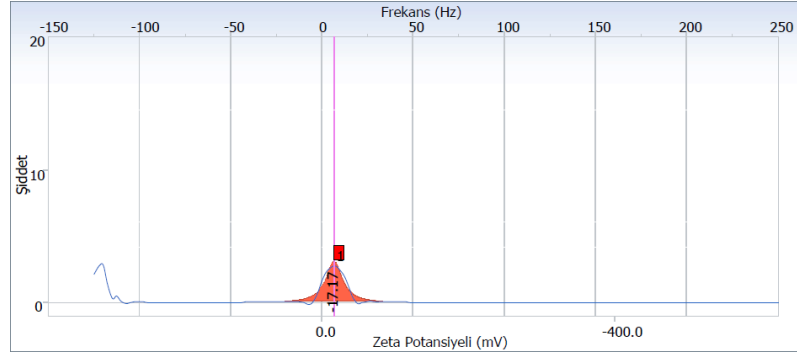


Şekil 4.2. Ultra-Turrax ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL MA:14000, İletkenlik 0,0563 mS/cm)

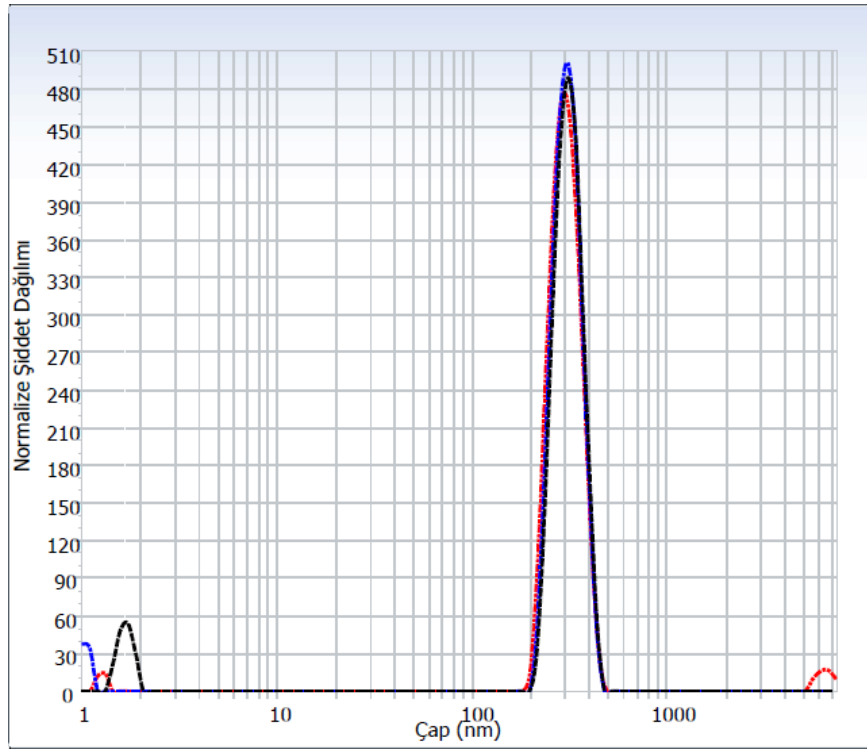


Şekil 4.3. Ultra-Turrax ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL MA:45000)

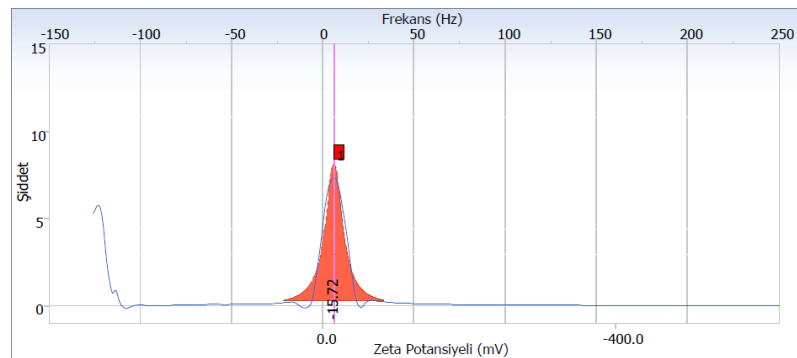
Dinamik ışık saçılımı analiz sonuçlarına göre 25 000 rpm de Ultra-turrax ile yapılan üretimlerde 14 000, 45 000 ve 80 000 molekül ağırlığına sahip PCL için sırasıyla ortalama $327,9 \pm 6,51$ nm, $338,1 \pm 4,46$ nm ve $392,4 \pm 13,79$ nm boyutunda; ultrasonik homojenleştirici ile 200 W, 20 kHz ve %72 genlikte yapılan üretimlerde ise sırasıyla ortalama $207,5 \pm 0,45$ nm, $235,6 \pm 2,29$ nm ve $264,6 \pm 6,85$ nm boyutunda nanopartiküller elde edildi.



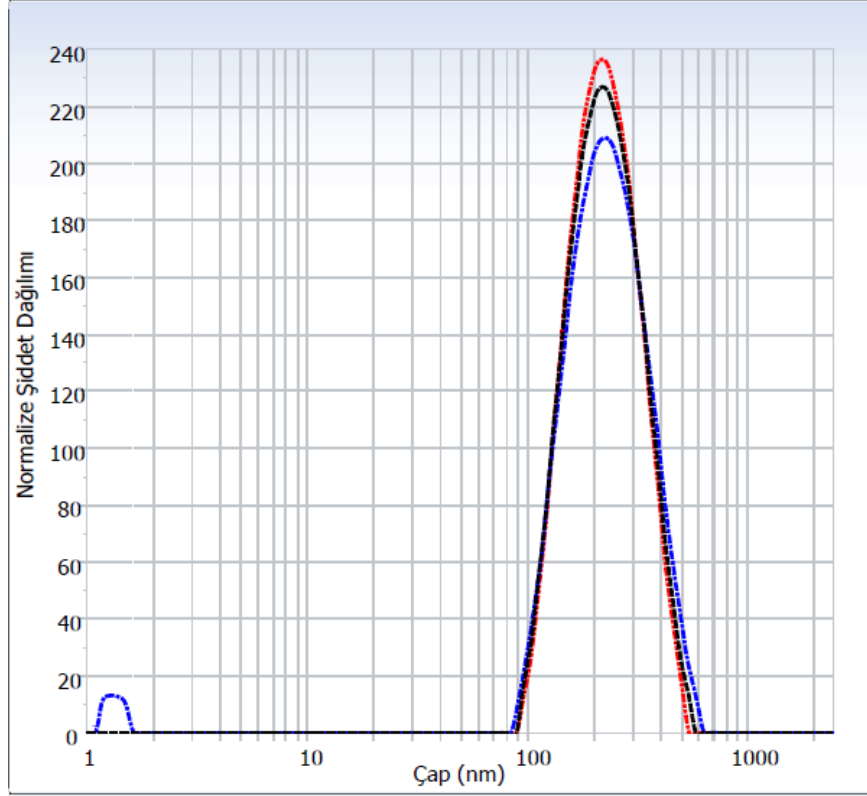
Şekil 4.4. Ultra-Turrax ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_A :45000, İletkenlik 0,0503mS/cm)



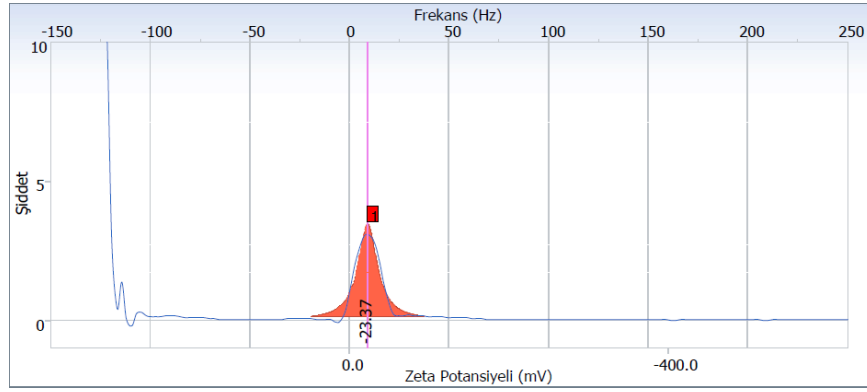
Şekil 4.5. Ultra-Turrax ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_A :80000)



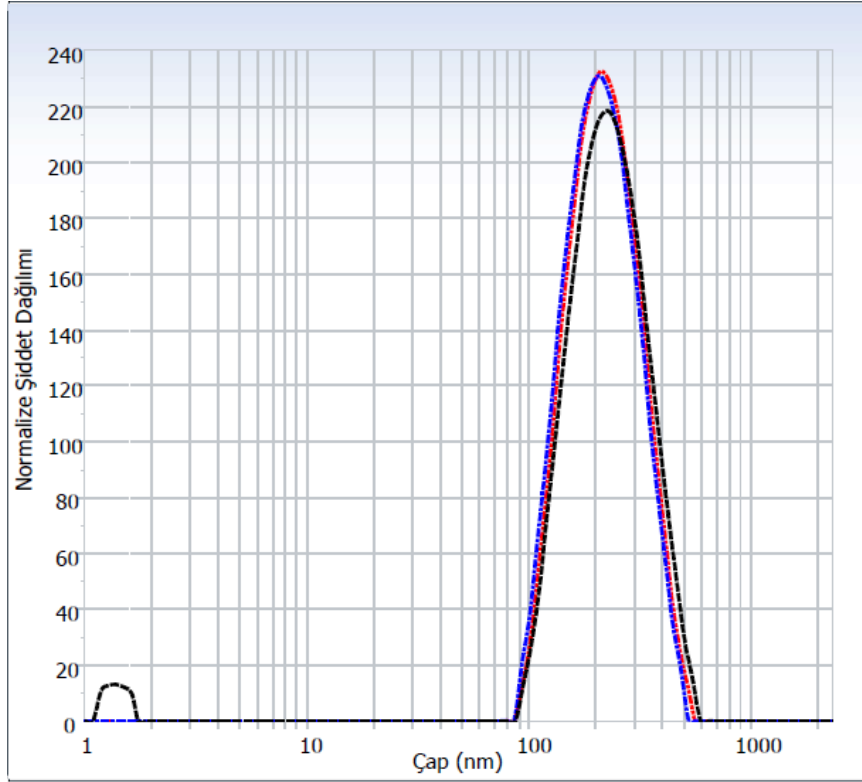
Şekil 4.6. Ultra-Turrax ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_A :80000, İletkenlik 0,0555 mS/cm)



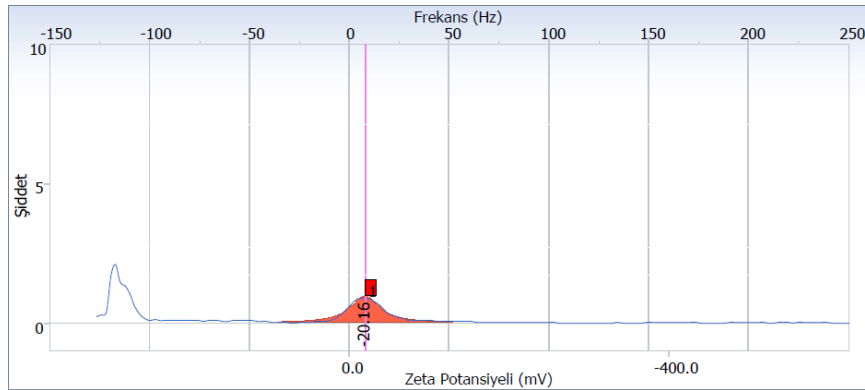
Şekil 4.7. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_n :14000)



Şekil 4.8. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_n :14000, iletkenlik 0,1652 mS/cm)

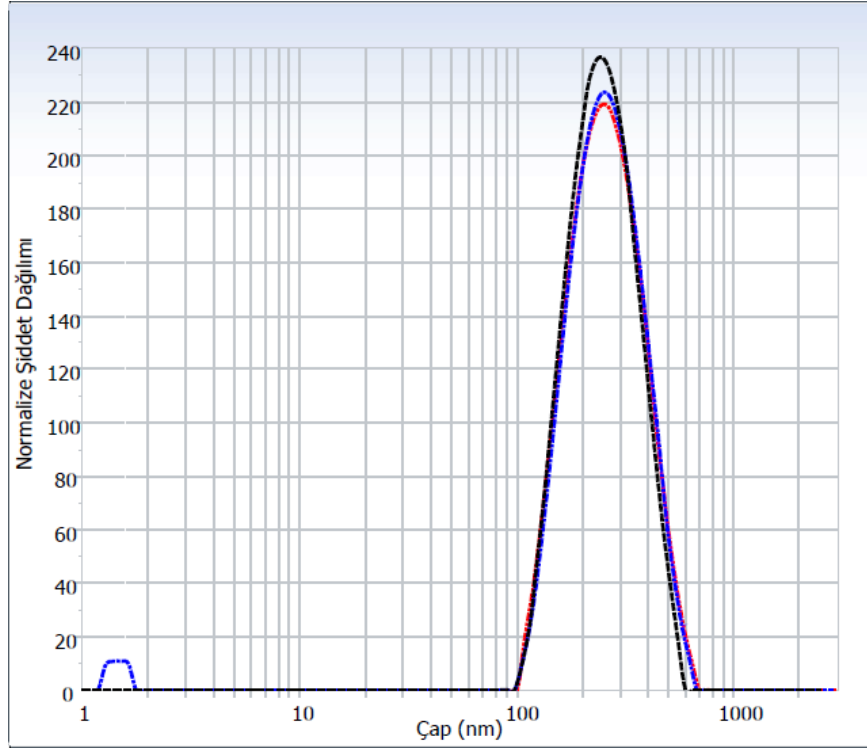


Şekil 4.9. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen ve 0,22 μm filtreden geçirilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_A :14000)

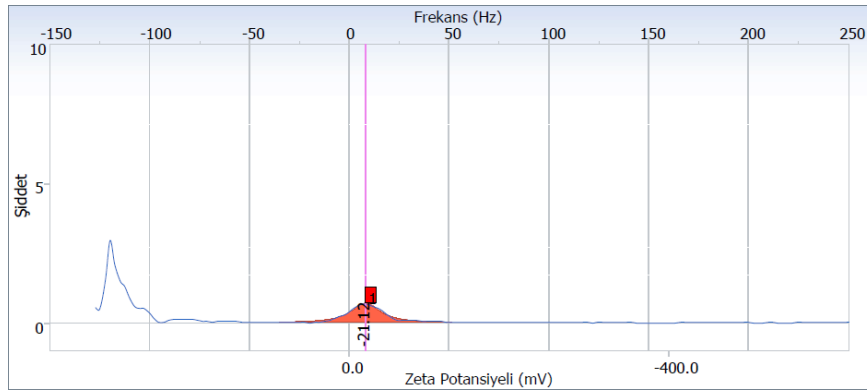


Şekil 4.10. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen ve 0,22 μm filte ile süzülen plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_A :14000, İletkenlik 0,1327 mS/cm)

En düşük partikül boyutuna sahip üretim ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 14 000 molekül ağırlığına sahip PCL'un 0,22 μm filtreden süzüldükten sonra elde edildi ve 202,4 nm partikül boyutu tespit edildi. 14 000 molekül ağırlığına sahip süzülen ve süzülmeyen nanopartiküller arasında kayda değer bir boyut farkı olmadığı için CBD yüklü üretimler için 14 000 molekül ağırlığına sahip PCL ile üretildi ve süzme prosedürü kullanılmadı.

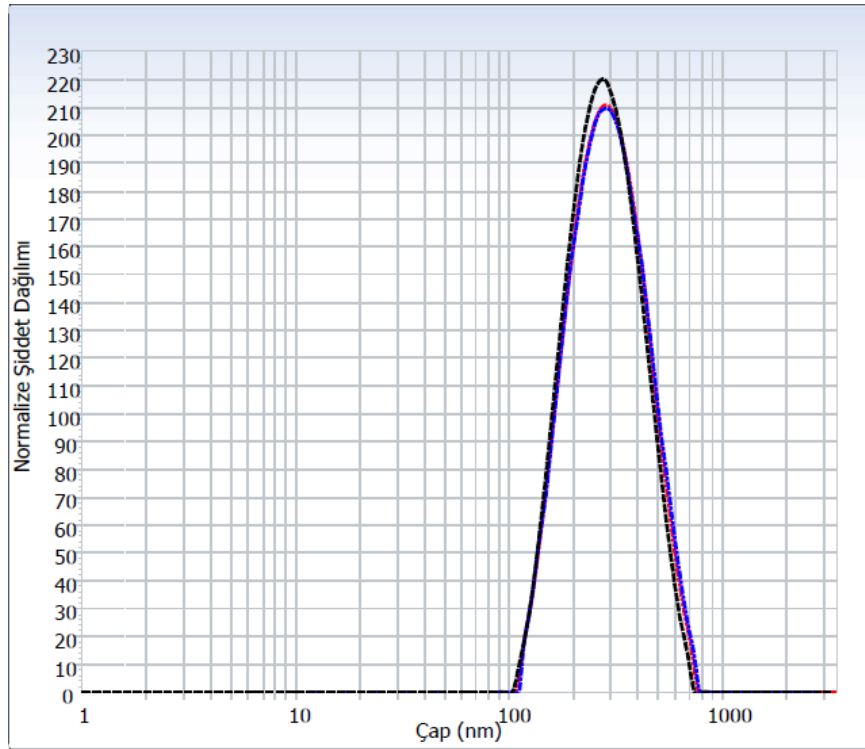


Şekil 4.11. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_A :45000)

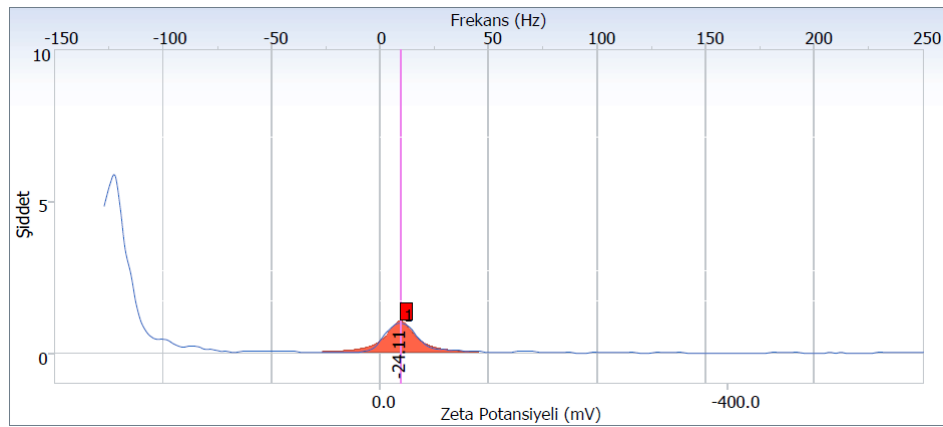


Şekil 4.12. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_A :45000, İletkenlik 0,1388 mS/cm)

Peroral uygulamalar için optimum nanopartikül büyüklüğü 100 nm ile 800 nm arasındadır. 100 nm'den küçük nanopartiküller parenteral yol için uygundur. 1000 nm'den büyük partiküllerde ise fagositoz riski görülebilir (Wang ve ark., 2017). Hem Ultra-Turrax hemde ultrasonik homojenleştirici ile elde edilen nanopartiküllerin peroral kullanım için uygun olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.13. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_A :80000)



Şekil 4.14. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen Plasebo PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_A :80000, İletkenlik 0,1388 mS/cm)

Çoklu dağılım indeksi (PDI) parçacık boyutu dağılımını gösterir ve ultrasonikasyon ile üretilen partiküllerin PDI değerleri 0,2'den küçük olarak tespit edilmiştir. Polimer tabanlı nanopartiküller alanında 0,2'den küçük PDI değerleri uygun olarak kabul edilmektedir (Danaei ve ark., 2018). PDI sonuçlarına göre ultrasonik homojenleştirici ile üretilen nanopartiküllerin partikül boyutu ve nanopartiküllerin dağılımı açısından iyi bir tekdüzelik ve homojenlik göstermektedir. Ultra-Turrax ile

yapılan üretimlerde ise PDI değerleri 0,2'den yüksek olduğu için tekdüzelik ve homojenlik açısından uygun kabul edilmemektedir.

Zeta potansiyeli; parçacık yüzeyindeki yükü temsil eder ve nanopartiküllerin stabilitesi, çökelme ve agregasyonu önlemek için itici kuvvetlerin yeterince güçlü olması gereken yerçekimi ve itici kuvvetler arasındaki dengenin göstergesidir (Diyanat ve ark., 2019). PCL bir polyester türü olduğu için, PCL'nin kimyasal yapısında karboksilik grupların ($-COO^-$) bulunması nedeniyle nanopartiküllerin zeta potansiyeli negatiftir (Mahmoudi ve ark., 2022).

Optimizasyon aşamasında üretilen plasebo nanopartiküllere ait zeta potansiyeli değerleri ultra-turrax ile yapılan üretimlerde 14 000, 45 000 ve 80 000 molekül ağırlığına sahip PCL için sırasıyla -14,98, -17,17 ve -15,72 mV olarak hesaplandı. Ultrasonik homojenleştirici ile yapılan üretimlerde sırasıyla -23,37, -21,12 ve -24,11 mV olarak hesaplandı. Filte edilmiş olan PCL nanopartikülün ise -20,16 mV zeta potansiyeline sahip olduğu tespit edildi.

Javaid ve arkadaşları plasebo PCL nanopartiküllerde ve -16,8 mV'lik ve sefotaksim yüklü PCL nanopartiküller için -11,1 mV zeta potansiyeli (Javaid ve ark., 2021), Mahmoudi ve arkadaşları plasebo PCL nanopartiküllerde -29,3 mV ve memantin yüklü PCL nanopartiküller için -26,5 mV (Mahmoudi ve ark., 2021), Diyanat ve arkadaşları plasebo PCL nanopartiküllerde -25,8 mV ve pretilaklor yüklü PCL nanopartiküllerde -23,0 mV olarak tespit etmişlerdir (Diyanat ve ark., 2019). Bu sonuçlara göre PCL ile enkapsüle edilecek etken maddenin hidrofobikliği arttıkça zeta potansiyeli değerinin mutlak değer içerisinde azaldığı sonucu çıkarılabilir.

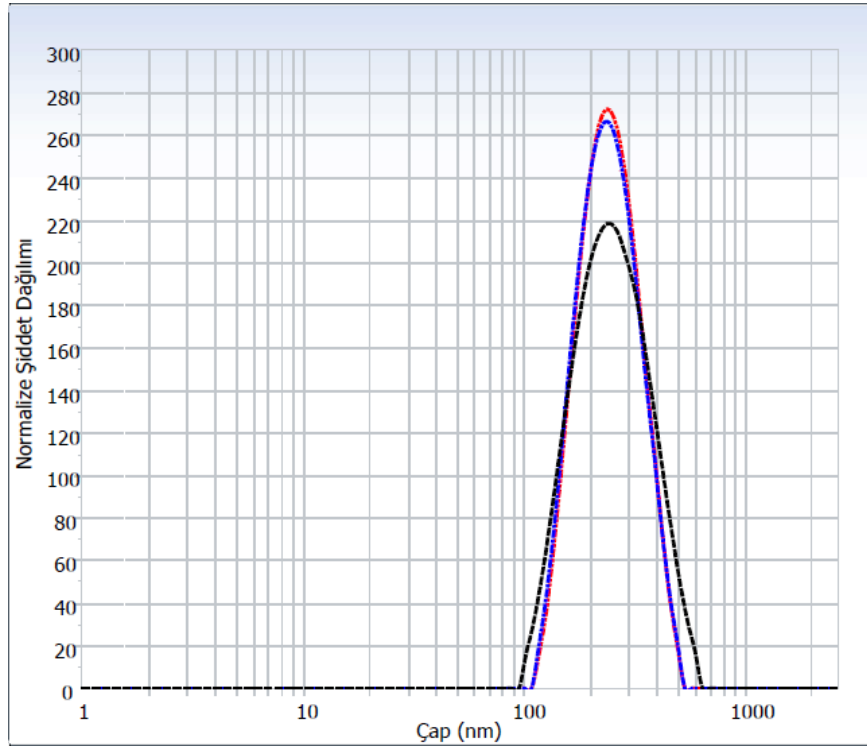
Optimizasyon çalışmalarına yönelik sonuçlar değerlendirildiğinde hem boyut hem de kararlılık ve standardizasyon açısından en uygun üretim şartının 14 000 MA PCL ile %72 genlikte ultrasonikatör ile elde sağlanmasından dolayı bu şartlarla enkapsülasyon çalışmalarına geçilmiştir.

4.2. CBD Enkapsüle Edilmiş Nanopartiküllerin Morfolojisi ve Karakterizasyonu

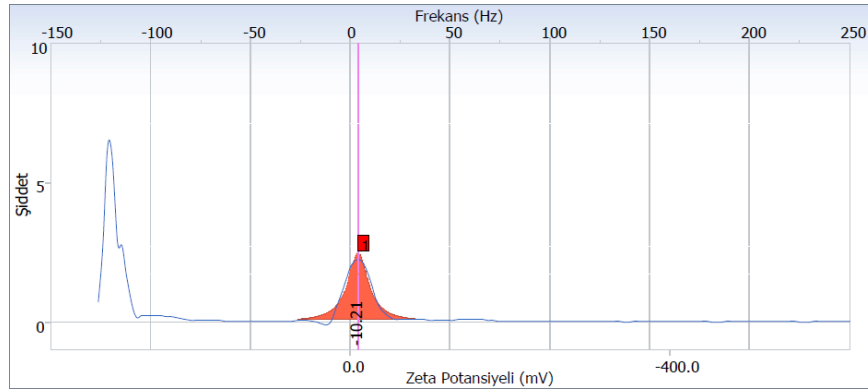
4.2.1. Nanopartiküllerin partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli sonuçları

Farklı miktarlarda CBD enkapsüle edilmiş PCL-NP'lerin ortalama partikül büyüklüğü, Zeta Sizer Dinamik Işık Saçılımı (PDI) ve Zeta Potansiyel ölçümleri yapılmıştır. Her numuneye ait Dinamik Işık Saçılımı ve Zeta Potansiyeli ölçümleri Şekil

4.15 ile Şekil 4.22 arasında verilmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar Çizelge 4.2’de özetlenmiştir.



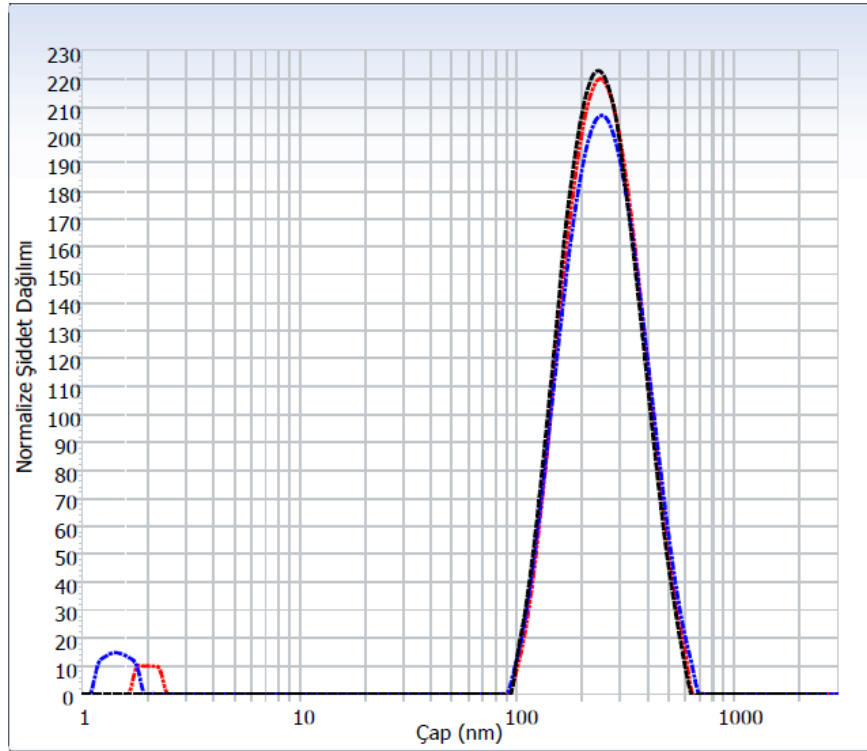
Şekil 4.15. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 5 mg CBD yüklü PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_n :14000)



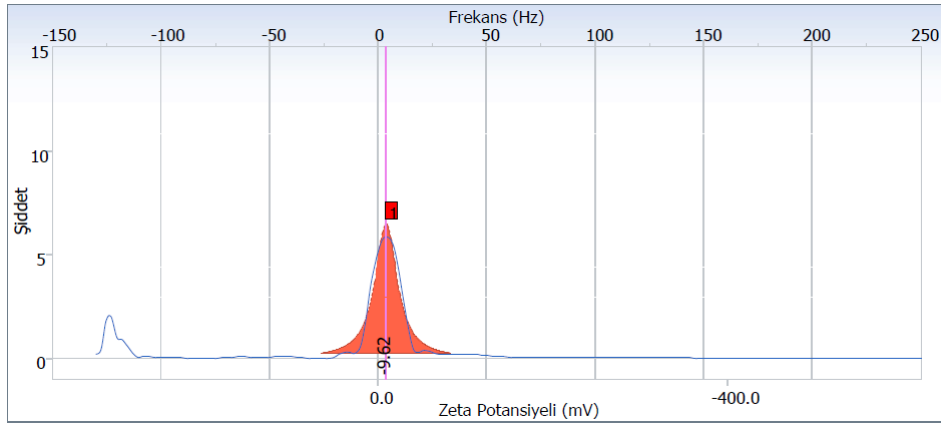
Şekil 4.16. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 5 mg CBD yüklü PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_n :14000, İletkenlik 0,1735 mS/cm)

Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 5 mg CBD-PCLNP’lerin boyut dağılımına göre en küçük NP boyutu 149,1 nm ve en yüksek NP boyutu 363,8 nm olarak ölçülürken, NP’lerin ortalama boyutlarının 227,2 nm olduğu tespit edilmiştir. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 10 mg CBD-PCL-NP’lere ait boyut dağılımına göre en küçük

NP boyutu 138,9 nm ve en yüksek NP boyutu 393,1 nm olarak ölçülürken, NP'lerin ortalama boyutlarının 225,5 nm olduğu tespit edilmiştir.

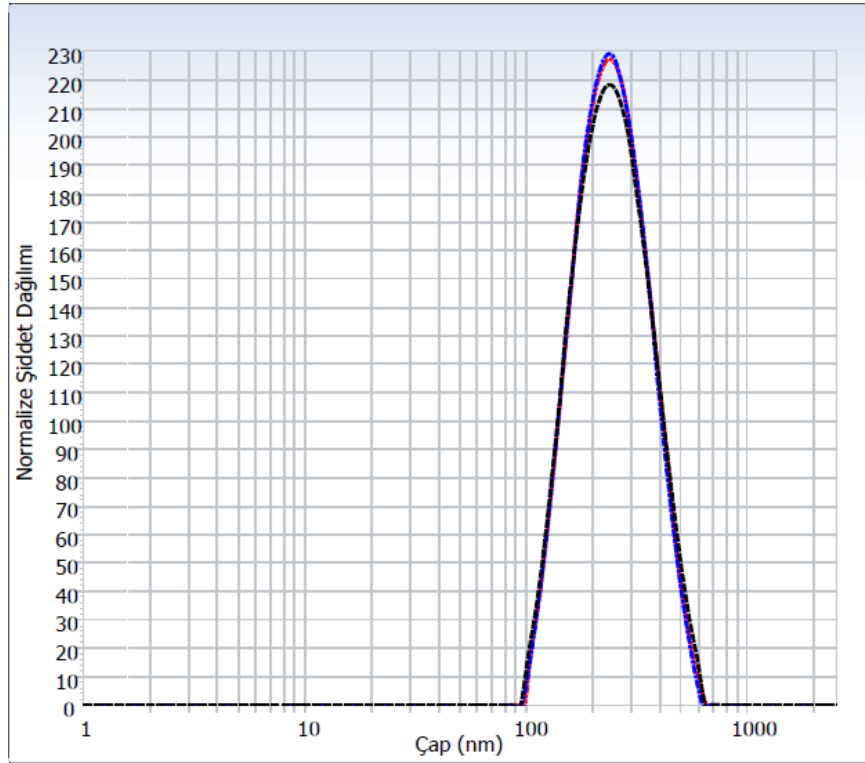


Şekil 4.17. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 10 mg CBD yüklü PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_n :14000)

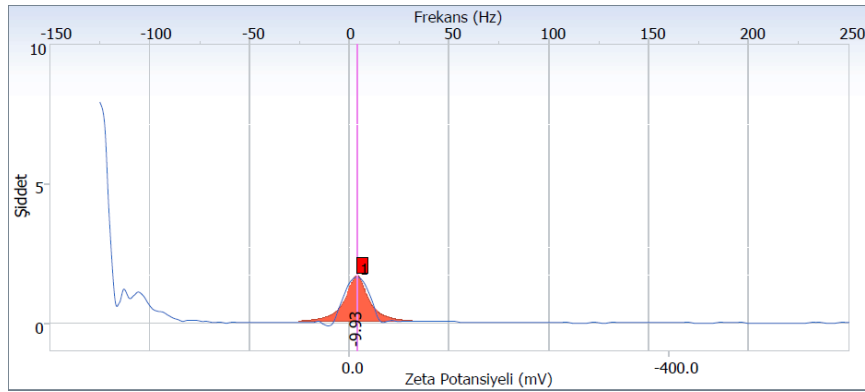


Şekil 4.18. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 10 mg CBD yüklü PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_n :14000, İletkenlik 0,0060 mS/cm)

Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 15 mg CBD-PCL-NP'lere ait boyut dağılımına göre en küçük nanoparçacık boyutu 141,9 nm ve en yüksek nanoparçacık boyutu 382,4 nm olarak ölçülürken, NP'lerin ortalama boyutlarının 227,7 nm olduğu tespit edilmiştir.

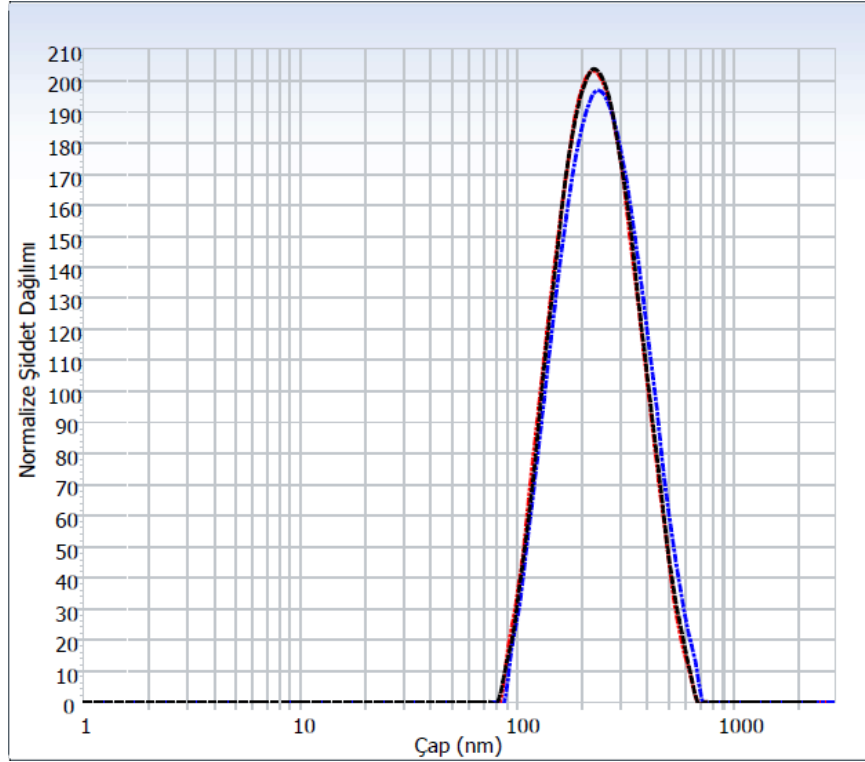


Şekil 4.19. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 15 mg CBD yüklü PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_n :14000)

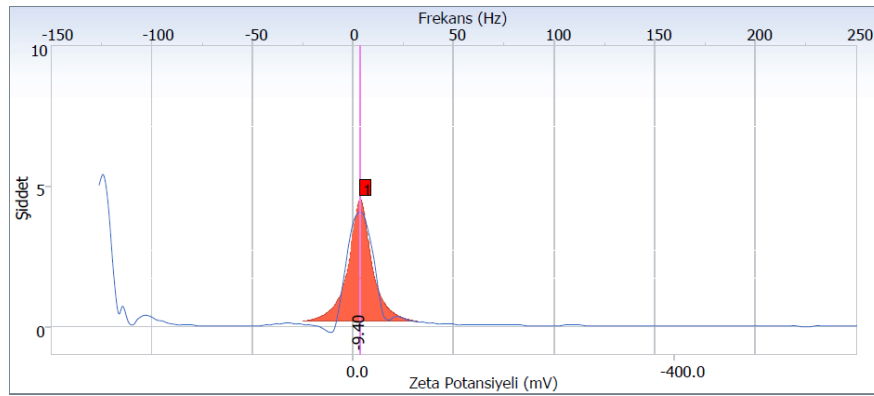


Şekil 4.20. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 15 mg CBD yüklü PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_n :14000, İletkenlik 0,1256 mS/cm)

Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 30 mg CBD-PCL-NP'lere ait boyut dağılımına göre en küçük nanoparçacık boyutu 129,9 nm ve en yüksek nanoparçacık boyutu 393,3 nm olarak ölçülürken, nanoparçacıkların ortalama boyutlarının 216,9 nm olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.21. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 30 mg CBD yüklü PCL nanopartiküle ait Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği (PCL M_n :14000)



Şekil 4.22. Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen 30 mg CBD yüklü PCL nanopartiküle ait Zeta Potansiyeli grafiği (PCL M_n :14000, İletkenlik 0,1263 mS/cm)

Ultrasonikasyon yöntemi ile üretilen 5 mg, 10 mg, 15 mg ve 30 mg CBD enkapsüle nanopartiküllerin parçacık boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli Çizelge 4.2’de verilmektedir.

Çizelge 4.2. Farklı CBD miktarı içeren PCL nanopartiküllere ait boyut ve PDI ve zeta potansiyeli sonuçları (n=3)

NP	Homojenizatör	%Amp / Rpm	Ort. Çap (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli
5 mg	Ultrasonik	72% Genlik	227,2 ±2,35	0,100 ±0,004	-10,21 (mV)
10 mg	Ultrasonik	72% Genlik	225,5 ±0,53	0,133 ±0,029	-9,62 (mV)
15 mg	Ultrasonik	72% Genlik	227,7 ±1,55	0,094 ±0,014	-9,93 (mV)
30 mg	Ultrasonik	72% Genlik	216,9 ±6,81	0,126 ±0,031	-9,40 (mV)

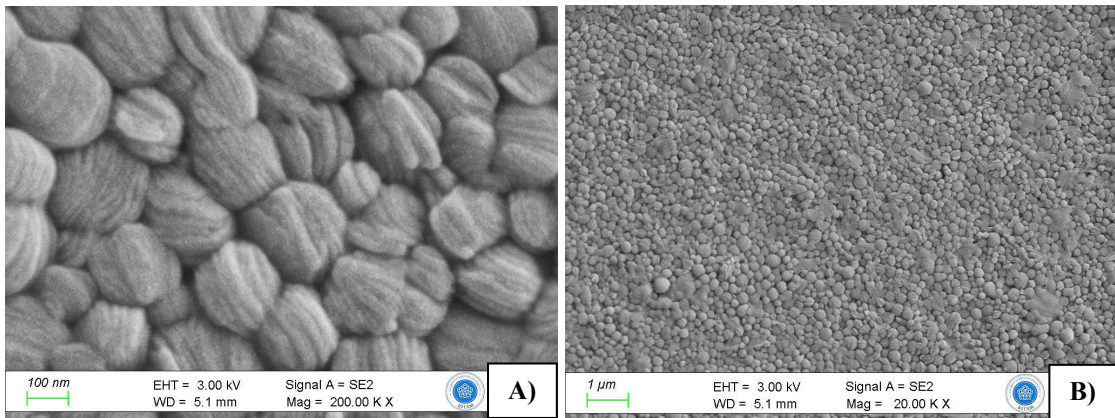
Üretilen CBD yüklü PCL nanopartiküller (5 mg, 10 mg, 15 mg ve 30 mg CBD) sırasıyla -10,21, -9,62, -9,93 ve -9,40 mV'lik bir potansiyel değerleri tespit edildi. Potansiyel değerlerindeki artış, CBD'nin polimer matrisinde hapsolmasına rağmen, CBD'nin kısmen de olsa parçacık yüzeyinde de bulunduğu göstergesi olabilir ve CBD'nin PCL kabuğunda da bulunması nedeniyle CBD'nin yüzdede kısmi adsorpsiyonuna bağlı olarak zeta değerini arttırdığını gösterir ve CBD'nin PCL ile inkorporasyonu ile ilişkilidir. Sonuç olarak CBD'nin PCL nanopartikül yüzeyindeki yükleri artırarak zeta potansiyelini pozitif yönde arttırdığı sonucuna varılabilir.

Zeta potansiyel değeri 0 ile ±5 mV arasında parçacıklar kümeleşme veya bir araya gelme eğilimi sergilerler ve hızlı partikül agregasyonu meydana gelebilmektedir. ±5 ile ±20 mV arasında partiküller minimal düzeyde kararlıdır. ±20 ile 40 mV arasında partiküller orta düzeyde kararlıdır (Ateş, 2018). Zeta potansiyel değeri ±30 mV'tan daha büyük olduğu şartlarda stabilite daha yüksek olmasına rağmen NP'ler toksisiteye neden olabilirler (Wang ve ark., 2017). Ultrasonik homojenleştirici ile üretilen nanopartiküller orta düzey kararlılık gösterirken CBD yüklü PCL nanopartiküller ise düşük düzeyde kararlılık göstermektedirler. Buna karşın hem plasebo hem de CBD yüklü nanoparçacıklar toksisite risk değerinin altında zeta potansiyeli değerleri göstermişlerdir.

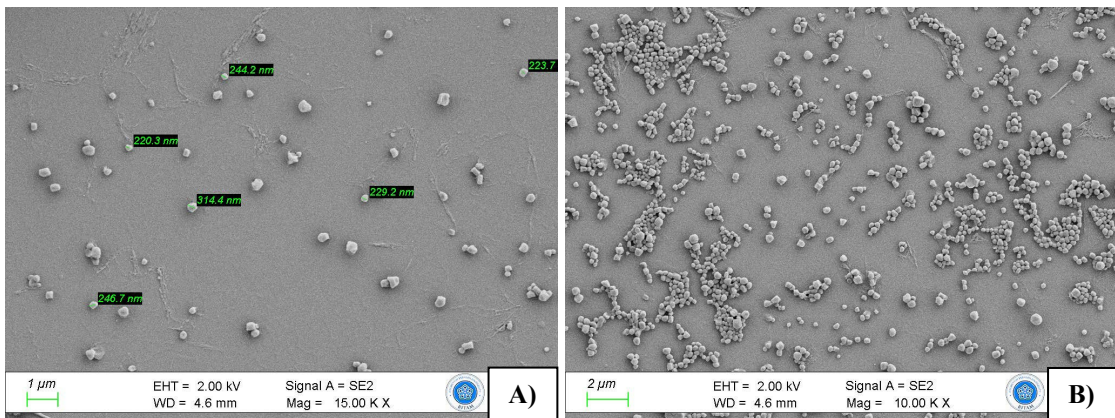
4.2.2. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu sonuçları

Plasebo PCL ve 30 mg CBD enkapsüle edilmiş PCL nanopartiküllerin morfolojik özellikleri, alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelendi. Santrifüj sonrası toplanan NP peleti liyofilizatörde kurutulmuş olup FE-SEM görüntüleri Şekil 4.23 A ve 4.23 B'de gösterilmektedir. Oda sıcaklığında numune tutucu üzerine 1 damla seyreltik nanopartikül damlatılarak oda sıcaklığında kurutulan nanopartiküller FE-SEM ile görüntülenmiş olup görüntüleri Şekil 4.24 A ve 4.24 B'de gösterilmektedir. Üretilen plasebo ve CBD-NP'ler STEM ve FE-SEM görüntüleme öncesi saf su ile 1:20 oranında seyreltilerek hazırlandı ve analiz öncesi 3 dk ultrasonik buzlu banyoda sonikasyona maruz bırakıldı. STEM görüntüleri Şekil 4.25 A ve 4.25 B'de

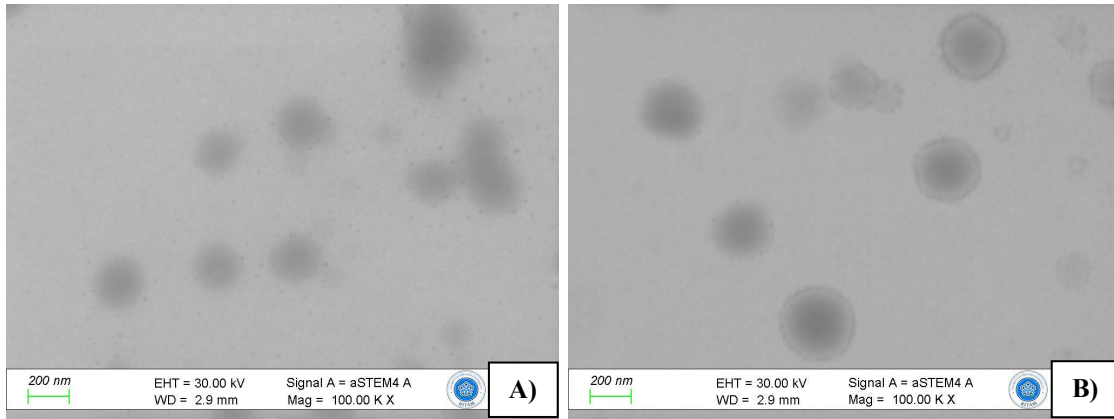
gösterilmektedir. STEM analiziyle düzgün küresel nanopartiküller görülürken FE-SEM analizinde neredeyse küresele yakın şekilsiz nanopartiküller gözlemlenmiş olup bu sonuç literatürdeki benzer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (Mahmoudi ve ark., 2021). FE-SEM görüntülemelerinde kısmi aglomerasyon meydana geldiği tespit edilmiştir. Wu ve Clark çalışmalarında elektrospey tekniği kullanarak farklı çözücülerin buharlaştırılmasının uyarlanması ile farklı yapılara sahip PCL nano ve mikro parçacıkları elde etmişlerdir. Nanopartiküllerinin oluşmasında aglomerasyon gözlemlenmiştir. (Wu ve Clark, 2007). Bu durum kurutma sırasında nanopartiküller üzerinde etkili olan suyun yüzey geriliminden kaynaklanmış olabilir. Ayrıca FE-SEM ve STEM görüntülerinde plasebo PCL nanopartiküller ile 30 mg CBD enkapsüle PCL nanopartiküllerin yüzeyleri arasında gözle görülür bir şekilde morfolojik farklılıklar mevcuttur. Bu farklılıklar polimer yüzeyinde de yüksek lipofilik özelliğe sahip CBD'nin adsorbe edilmesinden kaynaklandığı ve CBD'nin parçacık yüzeyinde de bulunduğu düşünülebilir.



Şekil 4.23. Liyofilizasyonla kurutulmuş PCL nanopartiküllerin FE-SEM görüntülemesi
A) 200 000X B) 20 000X



Şekil 4.24. 1:20 oranında seyreltilmiş PCL nanopartiküllerin FE-SEM görüntülemesi
A) 200 000X B) 20 000X



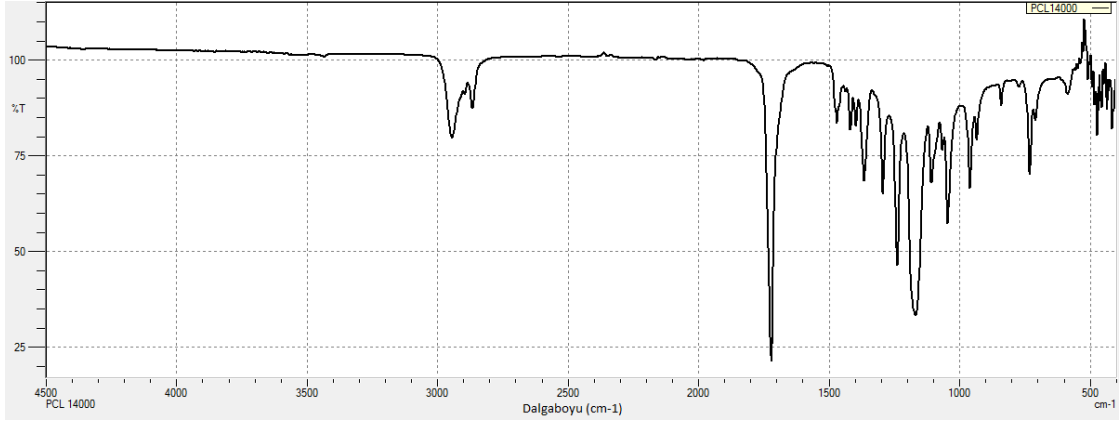
Şekil 4.25. PCL nanopartiküllerin STEM görüntülemesi A) Plasebo PCL-NP B) 30 mg CBD enkapsüle PCL-NP

Ayrıca FE-SEM görüntülerinde nanopartiküller arasında görülen köprüler formülasyonda kullanılan PVA'nın yapışkan doğasından meydana gelmektedir. Yapısı gereği yapışkan olan PVA'yı partikül yıkamadan sonra bile tamamen uzaklaştırmak zor olmaktadır (Fong, 1983). FE-SEM görüntüleri, tamamen polimerik bir yapıya sahip nanopartiküller elde edildiğini doğrulamaktadır. Genel olarak, sıvı ortamda bulunan nanopartiküllerin STEM analiz sonuçları ile kurutulmuş partiküllere ait FE-SEM görüntüleri birbirileri ile tamamen tutarlıdır.

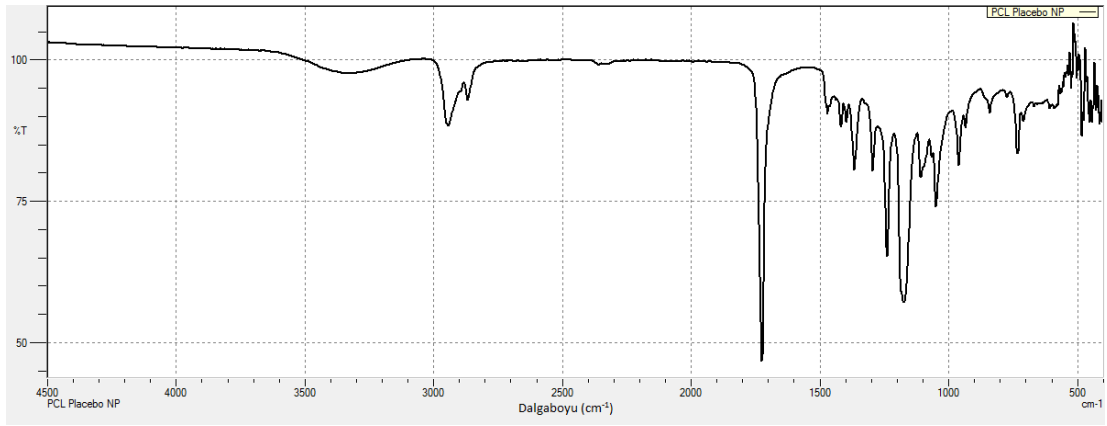
4.2.3. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi sonuçları

Etken madde ve polimer arasındaki moleküler etkileşim hakkında bilgi sahibi olmak için FT-IR analizi yapıldı. Saf PCL ve Saf CBD'ye ait karakteristik bantlar Şekil 4.33'de ve Saf PCL, Saf CBD, Plasebo PCL nanopartikül, CBD içeren (5 mg, 10 mg, 15 mg, 30 mg) PCL nanopartiküllere ait FT-IR spektrumları Şekil 4.34'te verilmiştir.

PCL'ye ait karakteristik bantlar 2866 cm^{-1} simetrik alifatik gerilme ve 2943 cm^{-1} de asimetrik alifatik gerilme olarak görüldü. Güçlü karakteristik karbonil grubu ($\text{C}=\text{O}$) 1720 cm^{-1} gerilme bandında görüldü. PCL'nin $\text{C}-\text{O}$ ve $\text{C}-\text{C}$ gerilme titreşim bantları 1292 cm^{-1} de görüldü. Ayrıca simetrik $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ titreşim bantı 1168 cm^{-1} ve asimetrik $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ titreşim bantı 1238 cm^{-1} de görüldü (Badri ve ark., 2017).

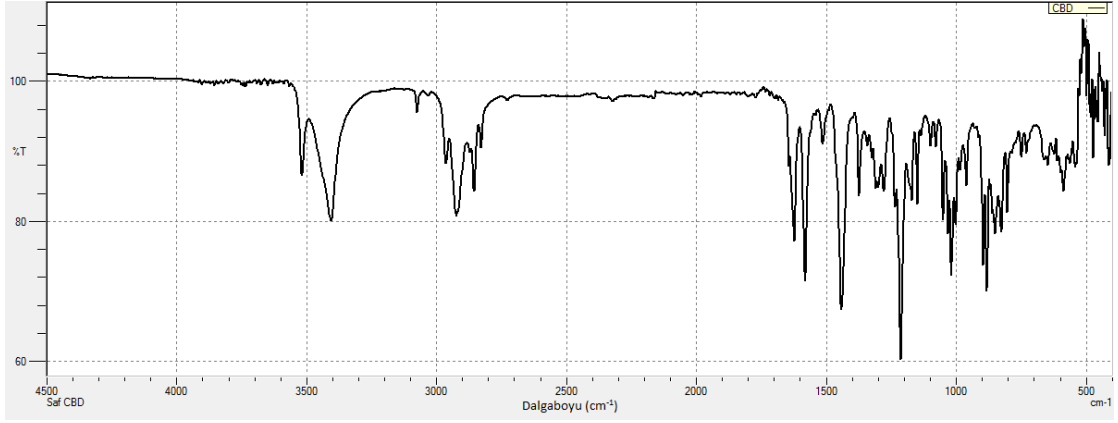


Şekil 4.26. Saf PCL'ye ait FT-IR spektrumu (14 000 M_A)



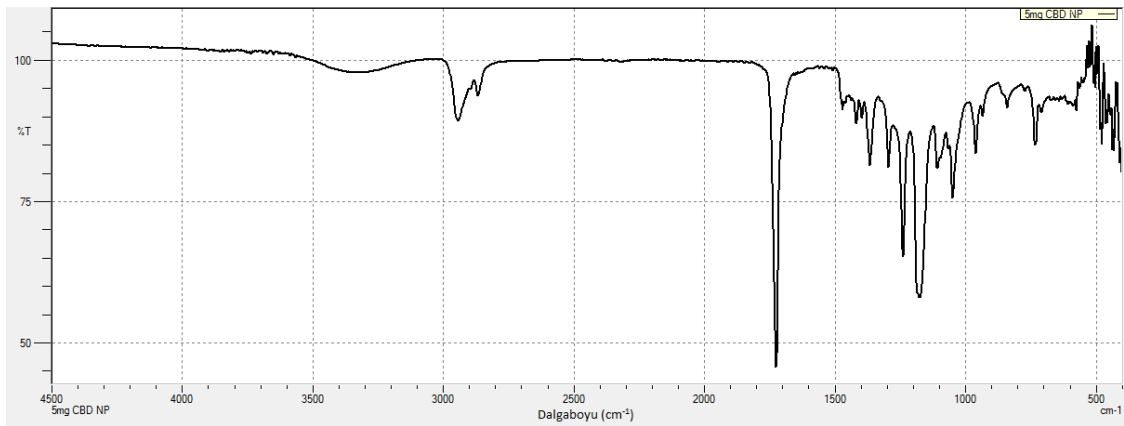
Şekil 4.27. Plasebo PCL nanopartiküle ait FT-IR spektrumu

CBD'ye ait karakteristik bantlar 3518 cm^{-1} , 3404 cm^{-1} , 1628 cm^{-1} ve 1585 cm^{-1} olarak tespit edildi (Vlad ,2021). CBD'nin FT-IR spektrumunda, 3404 cm^{-1} ile 3518 cm^{-1} aralığındaki belirgin bantlara ait moleküler titreşimler O-H (aromatik) gerilme titreşimlerine karşılık gelirken, 3074 cm^{-1} 'deki bantlar C-H gerilme (fenil), 2924 cm^{-1} metil ve metilen gruplarının göstergesi, 1585 cm^{-1} fenil halkasındaki C = C gerilme (fenil halkası) göstergesi, C-O gerilme titreşimleri 1213 cm^{-1} 'de görüldü (Moqejwa ve ark., 2022).

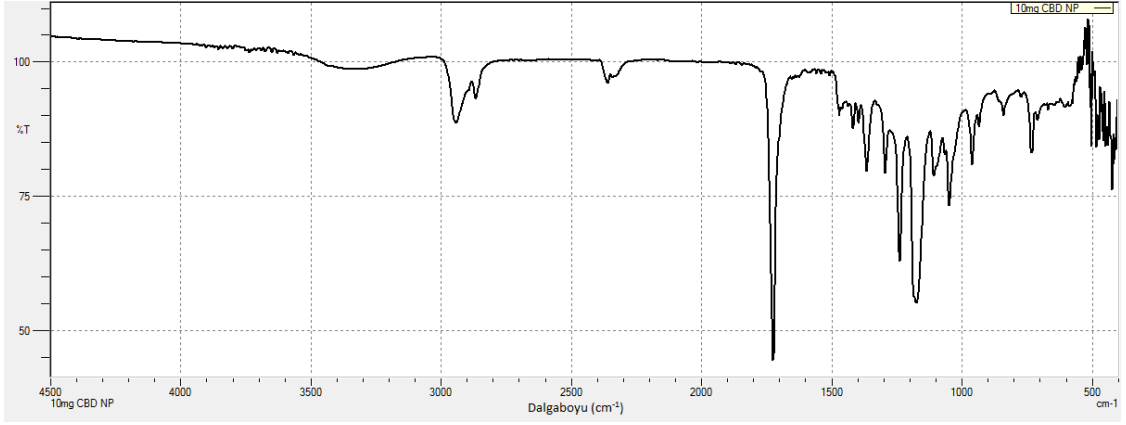


Şekil 4.28. Saf CBD'ye ait FT-IR spektrumu

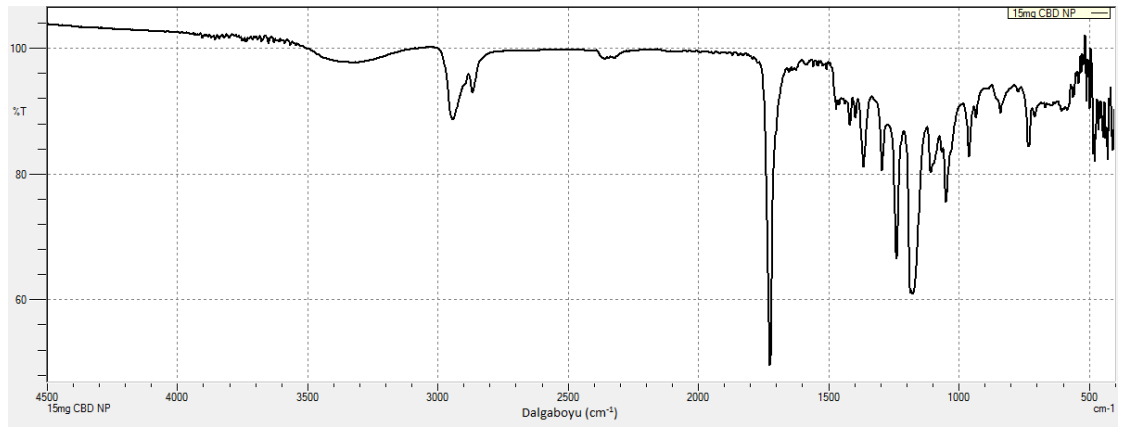
CBD yüklü PCL nanopartiküllerde, 30 mg CBD içeren PCL nanopartiküle ait FTIR spekturumunda CBD'ye ait karakteristik gruplara ilişkin 1585 cm^{-1} ve 1628 cm^{-1} bantları gözlemlendi. OH grubu tarafından oluşan çekme titreşimi, CBD içeren PCL nanopartiküllerin hepsinde 2860 cm^{-1} ve 2945 cm^{-1} bantlarında mevcuttur. 1442 cm^{-1} 'deki bant, metilen veya metoksi gruplarının (C–H deformasyonu) özelliği olduğundan, CBD için temsili bir bant olarak kabul edilemez (Vlad ve ark., 2021). PCL içerisinde bulunan CBD varlığı, =C–H alifatik gruplarına ait bantların (1585 cm^{-1} ve 1628 cm^{-1}) varlığıyla PCL bantları karşılaştırılarak vurgulanabilir. Bu iki özel bant, Andriotis ve arkadaşlarının 2020'de ve Vlad ve arkadaşlarının 2021'de yaptığı çalışmalarda da gözlemlenmiştir (Vlad ve ark., 2021; Andriotis ve ark., 2020).



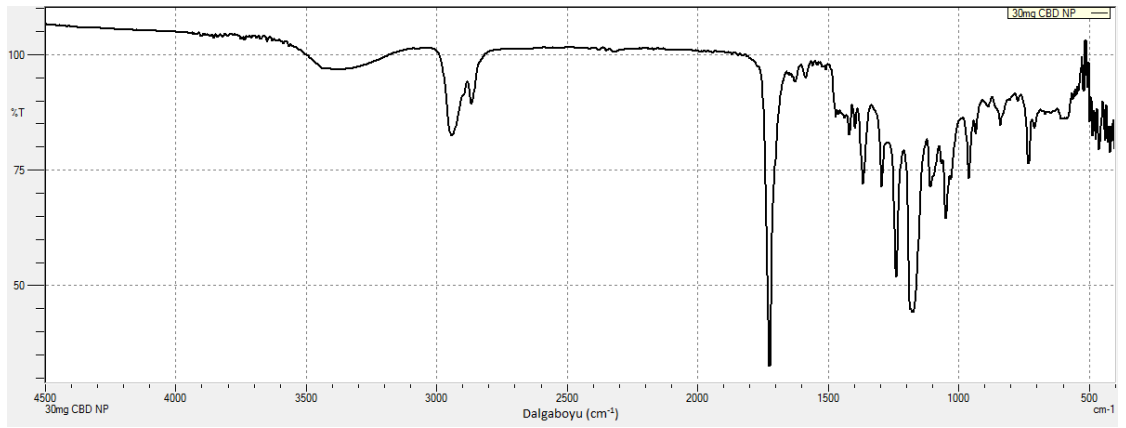
Şekil 4.29. 5 mg CBD içeren PCL nanopartiküle ait FT-IR spektrumu



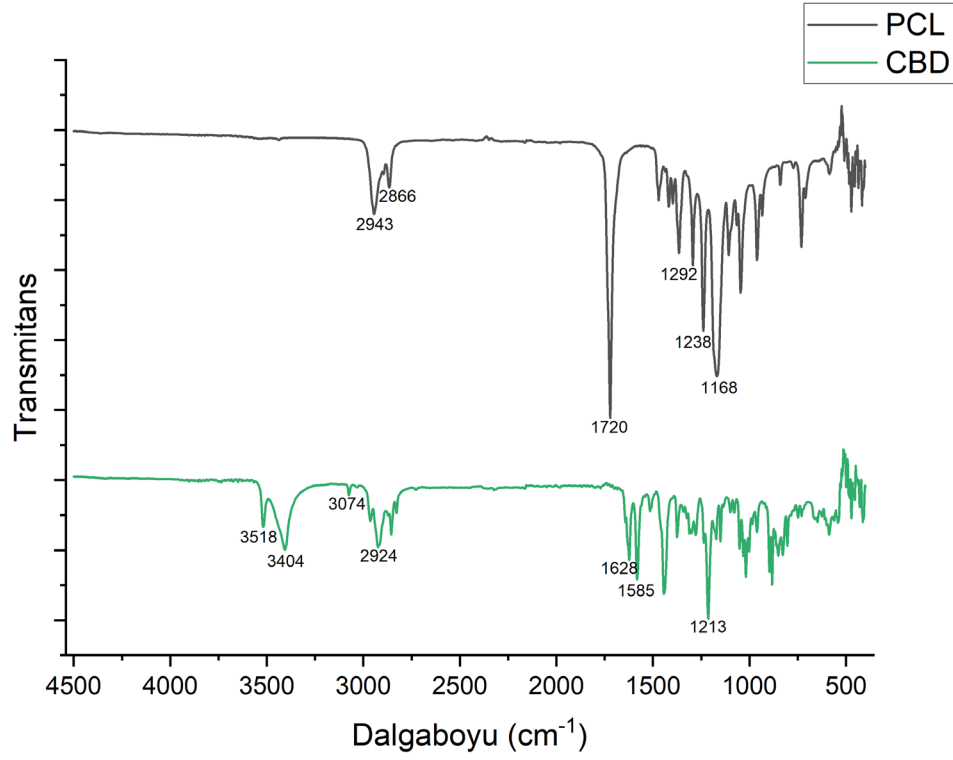
Şekil 4.30. 10 mg CBD içeren PCL nanopartiküle ait FT-IR spektrumu



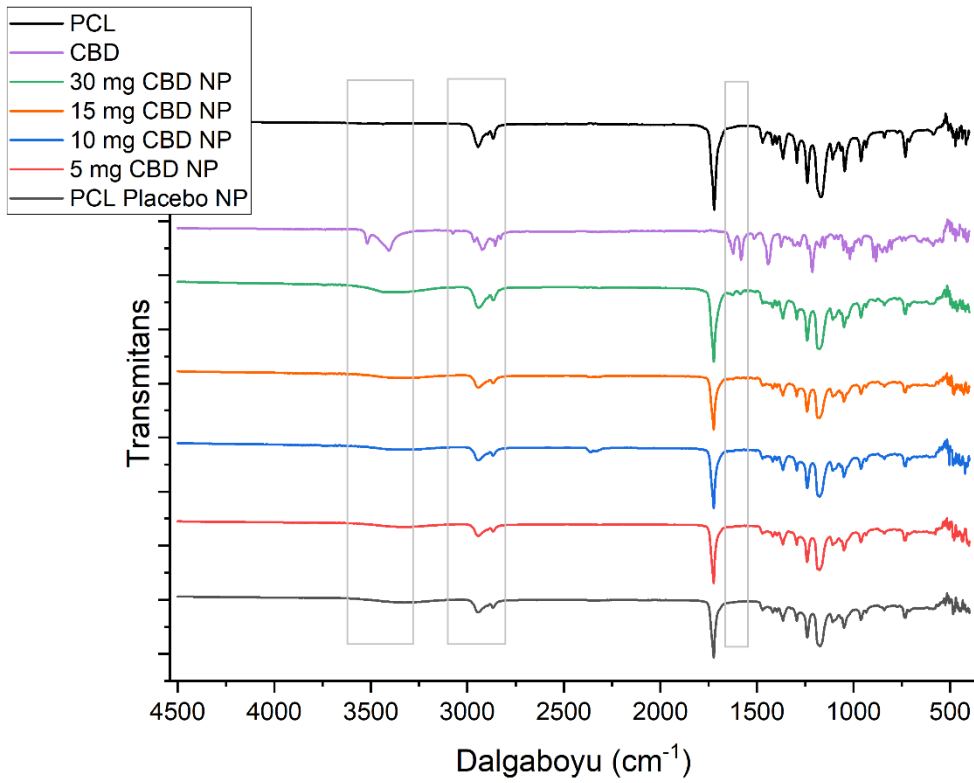
Şekil 4.31. 15 mg CBD içeren PCL nanopartiküle ait FT-IR spektrumu



Şekil 4.32. 30 mg CBD içeren PCL nanopartiküle ait FT-IR spektrumu



Şekil 4.33. Saf PCL ve Saf CBD'ye ait FT-IR spektrumu



Şekil 4.34. Saf PCL, Saf CBD, Plasebo PCL nanopartikül, CBD içeren (5 mg, 10 mg, 15 mg, 30 mg) PCL nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu

CBD içeren PCL nanopartiküllere ait FTIR spektrumlarında CBD'nin pikleri sadece 30 mg CBD içeren PCL nanopartiküllerde görüntülendi, daha düşük dozaj miktarları içeren nanopartiküllerde ise net bir şekilde gözlelenemedi. Bunun nedeni CBD'nin 150 mg PCL polimer matrisinde moleküler halde dağılmış olması olabilir (Nawaz ve ark., 2021). FTIR spektrumlarına göre elde edilen nanoparçacıklarda, CBD ve PCL arasında herhangi bir etkileşim veya kimyasal uyumsuzluk görülmemiştir.

4.2.4. İlaç yükleme ve kapsülleme verimliliği

Farklı CBD miktarları içeren enkapsüle PCL nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği HPLC kullanılarak 205 nm dalga boyunda 3 kez ölçüm alınarak denklem 6 kullanılarak hesaplandı.

Farklı miktarlarda CBD enkapsüle PCL nanopartiküller (5 mg, 10 mg, 15 mg ve 30 mg CBD) için kapsülleme verimleri sırasıyla %74,39, %82,06, %88,74 ve %94,75 olarak hesaplanmış olup sonuçlar Çizelge 4.3'te gösterilmektedir. CBD enkapsüle PCL nanopartiküllerin kapsülleme verimleri CBD'nin PCL polimerine büyük oranda yüklendiğine işaret etmektedir.

Çizelge 4.3'te gösterildiği gibi, başlangıçtaki etken madde:polimer oranının artması, etken madde yüklemesini de arttırarak, tüm durumlarda %74,39 ila %94,75 arasında değişen enkapsülasyon verimlerine neden oldu. Bu, kanabidiolün yüksek lipofilik özelliğine atfedilebilir, bu nedenle CBD harici sulu fazda çözünmek yerine polimer içinde hapsolmaya eğilim göstermiştir.

Çizelge 4.3. Farklı CBD miktarı içeren enkapsüle PCL nanopartiküllere ait kapsülleme verimleri (n=3)

NP	% Kapsülleme Verimi
5 mg CBD	74,39 ±1,44
10 mg CBD	82,06 ±0,19
15 mg CBD	88,74 ±0,95
30 mg CBD	94,75 ±0,61

Abamor ve arkadaşları hidrofobik bir madde olan çörek otu yağı enkapsüle PCL nanopartiküllerin farklı konsantrasyonlardaki kapsülleme verimlerini 50, 100, 150 ve 200 mg/mL için sırasıyla %98,6, %98,8, %80,5 ve %71,6 olarak bulmuşlardır (Abamor ve ark., 2018). Mahmudi ve arkadaşları ürettikleri memantin yüklü polikaprolakton nanopartiküllerden %77 kapsülleme verimi elde ettiklerini bildirmişlerdir (Mahmoudi ve ark., 2021). Bu sonuçlara göre hidrofobiklik arttıkça ekten maddenin PCL içersinde hapsolma veriminin arttığı sonucu çıkartılabilir.

4.2.5. Reaksiyon Verimi

Denklem 7'ye göre hesaplanan reaksiyon verimi plasebo nanopartiküller için %79,75 olarak hesaplandı. Farklı miktarlarda CBD enkapsüle PCL nanopartiküller (5 mg, 10 mg, 15 mg ve 30 mg CBD) için reaksiyon verimleri sırasıyla %75,26, %71,71, %73,71 ve %70,91 olarak hesaplandı ve sonuçlar Çizelge 4.4'te gösterildi.

Çizelge 4.4. Plasebo ve farklı CBD miktarı içeren PCL nanopartiküllere ait reaksiyon verimleri

NP	% Reaksiyon Verimi
5 mg CBD	75,26
10 mg CBD	71,71
15 mg CBD	73,71
30 mg CBD	70,91
Plasebo	79,75

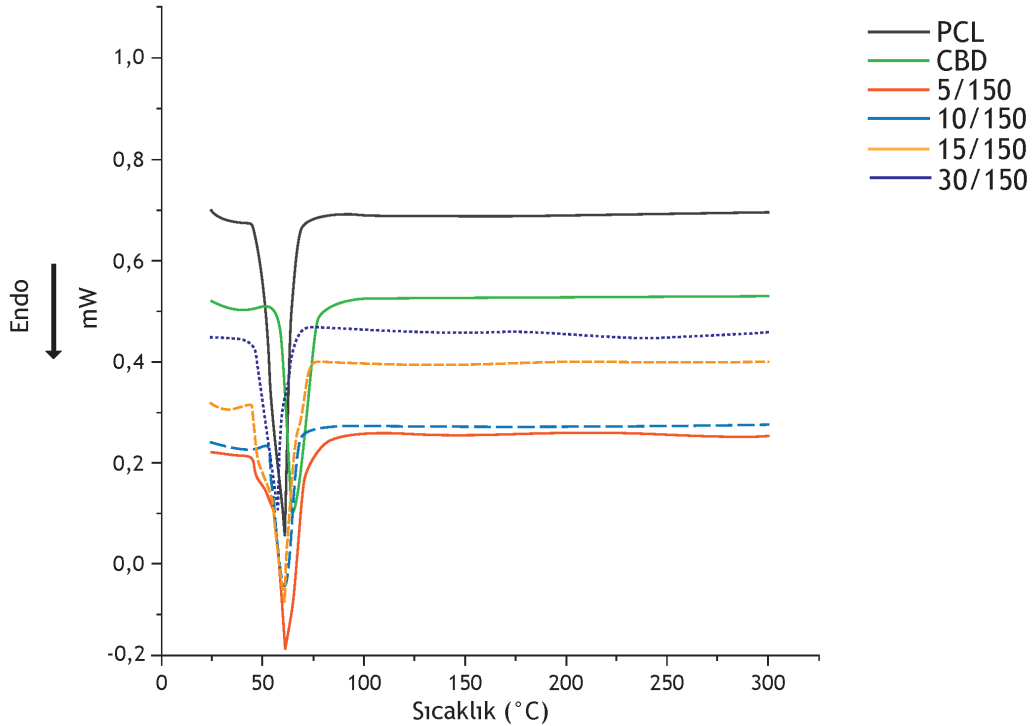
Abamor ve arkadaşları elde ettikleri çörek otu yağı enkapsüle PCL nanopartiküllerin farklı konsantrasyonlardaki reaksiyon verimlerini 50, 100, 150 ve 200 mg/mL için sırasıyla %40,7, %48,6, %57,4 ve %51,2 olarak bulmuşlardır (Abamor ve ark., 2018). Çetin 2023 yılında yaptığı çalışmada 5-Florourasil ve timokinon enkapsüle PCL nanopartiküller elde etmiş ve 5-Florourasil enkapsüle PCL nanopartikül için %56,33 ve timokinon enkapsüle PCL nanopartiküller için %46,20 reaksiyon verimi elde etmiştir (Çetin, 2023).

4.2.6. İlaç-polimer çözünürlüğü ve uyumluluğu

Saf CBD, saf PCL ve PCL-CBD fiziksel karışımları form ve bozulma açısından değerlendirildi. Saf CBD, saf PCL ve PCL-CBD fiziksel karışımlarına ait DSC termogramları Şekil 4.35'de ve sonuçlar Çizelge 4.5'te gösterildi. Literatürde bulunan çalışmalarla uyumlu olarak, saf CBD için erime noktasına karşılık gelen 69,82°C'de (Moqejwa ve ark., 2022) 77.45 J/g entalpi değeri (Fraguas-Sánchez ve ark., 2020) ve saf PCL için erime noktasına karşılık gelen 68,81°C'de (Alex ve ark., 2014) 77.45 J/g entalpi değeri (Hernán Pérez de la Ossa ve ark., 2012) keskin endotermik tepe olarak gözlemlendi. Bu keskin pik CBD'nin kristal doğası ile uyumludur.

PCL-CBD karışımlarının termogramları, PCL polimerinin erime endotermine karşılık gelen mg cinsinden PCL/CBD 150/5 oranı için 68,93 °C'de 89,34 J/g entalpi, 150/10 oranı için 68,81 °C'de 87,76 J/g entalpi, 150/15 oranı için 68,71 °C'de 85,21 J/g entalpi ve 150/30 oranı için 68,14 °C'de 82,46 J/g entalpi ile endoterm sergilemiştir.

CBD ve PCL'nin her ikisi de hidrofobik maddeler olduğu için CBD'nin NP'lerin içine kapsüllemiş veya NP'lerin yüzeyine adsorbe edilmiş olması daha olası görünmektedir (Badri ve ark., 2017).



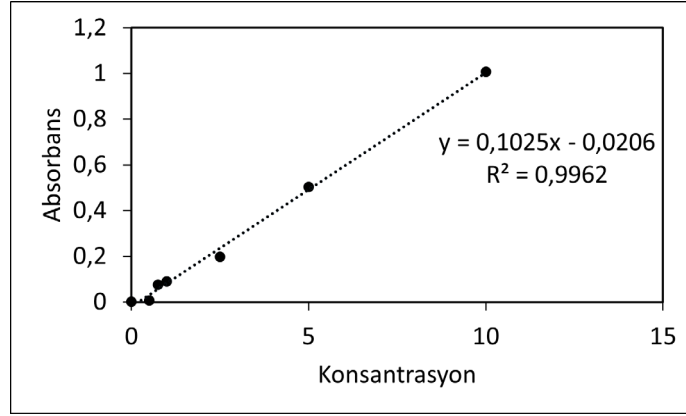
Şekil 4.35. Saf CBD, saf PCL ve PCL-CBD fiziksel karışımlarına ait DSC termogramları

Çizelge 4.5. Saf CBD, saf PCL ve PCL-CBD fiziksel karışımlarına ait DSC analiz sonuçları

Numune	T tepe (°C)	ΔH (J/g)
Saf PCL	68,81	99,41
Saf CBD	69,82	77,45
150/5	68,93	89,34
150/10	68,81	87,76
150/15	68,71	85,21
150/30	68,14	82,46

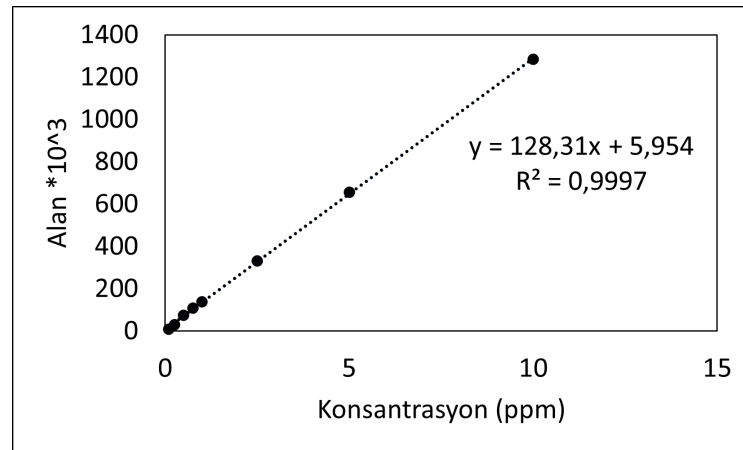
4.3. *In Vitro* Salım Çalışmaları Sonuçları

In vitro ilaç salım çalışmaları, mide ve bağırsak ortamını simüle etmek için pH 1,2 ve pH 7,4'de 37°C'de, pH 1,2 için 8 saat ve pH 7,4 için 96 saat boyunca gerçekleştirildi. Ölçümler pH 1,2 mide ortamı için 8 saat boyunca her saat başı 3 tekrarlı şekilde UV/Vis spektrofotometresi kullanılarak 205 nm dalga boyunda yapıldı. Kalibrasyon eğrisi satın alınan kanabidiol standartı ile 0,50 - 0,75 - 1 - 2,5 - 5 - 10 $\mu\text{g/mL}$ (ppm) ($r^2= 0,9962$) aralığında oluşturuldu ve Şekil 4.36'da gösterildi.



Şekil 4.36. CBD'ye ait 6 noktalı UV spektrofotometrede elde edilen kalibrasyon eğrisi

Bağırsak ortamı pH 7,4 için ölçümler salım çalışmasının başladığı gün itibari ile 8 saat boyunca her saat başı, 5 gün boyunca 24 saatte bir kez alınarak 205 nm dalga boyunda 3 tekrarlı şekilde HPCL ile analiz edildi. CBD'nin tespitinde uygun dalga boyunun belirlenmesi için CBD standardı Diode Array (PDA/DAD) dedektörlerde 190-820 nm dalga boyu aralığında tarama yapılarak 205 nm olarak tespit edildi. Kalibrasyon eğrisi kanabidiol standardı kullanılarak 0,1 - 0,25 - 0,50 - 0,75 - 1 - 2,5 - 5 - 10 µg/mL (ppm) ($r^2 = 0,9997$) aralığında belirlendi ve Şekil 4.37'de gösterildi.

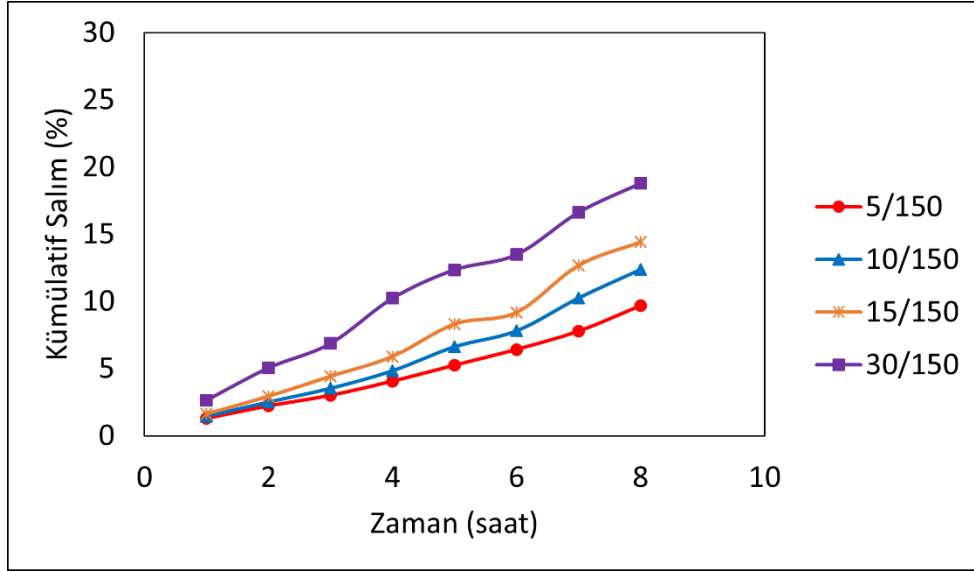


Şekil 4.37. CBD'ye ait 8 noktalı HPLC'de elde edilen kalibrasyon eğrisi

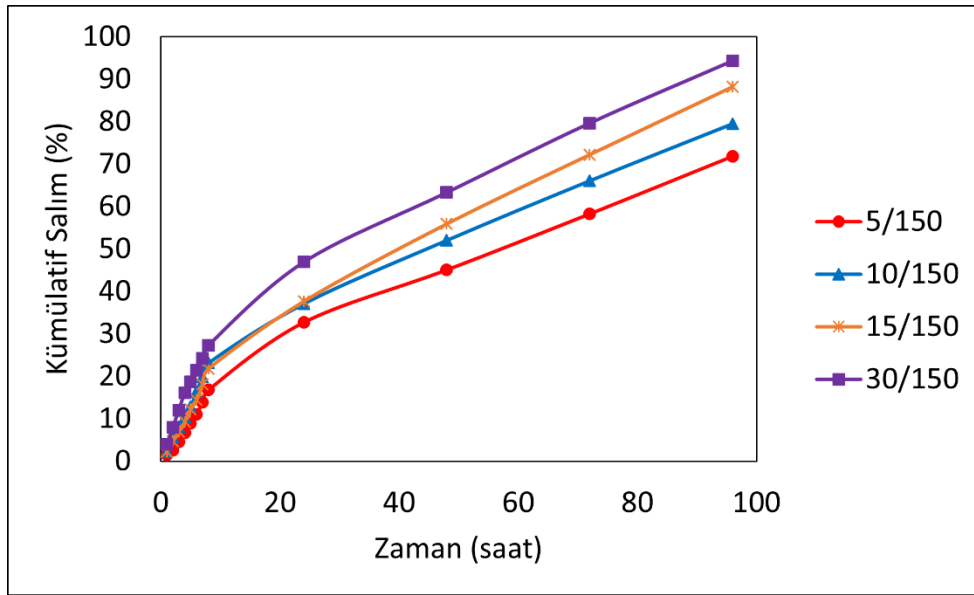
pH 1,2 için zamana karşı kümülatif etken madde salım yüzdesi grafiği Şekil 4.38'de ve pH 7,4 için zamana karşı kümülatif etken madde salım yüzdesi grafiği Şekil 4.39'da verilmektedir. Üç tekrarlı ölçülen her bir zaman noktasındaki standart sapma %2'den az olarak tespit edildi.

İki farklı pH için ilk 8 saatteki kümülatif salım yüzdeleri kıyaslandığında pH 7,4'te 5 mg, 10mg, 15mg ve 30mg CBD enkapsüle PCL nanopartiküller için sırasıyla

%16,76, %23,10, %21,79 ve %27,31 olarak tespit edilirken pH 1,2 için %9,23, %12,39, %12,95 ve %16,60 salım yaptıkları tespit edildi. İki farklı pH'a ait kümülatif salım yüzdeleri pH 1,2 için Çizelge 4.6'da, pH 7,4 için Çizelge 4.7'de gösterildi.



Şekil 4.38. pH 1,2 mide ortamında CBD enkapsüle PCL nanopartiküllere ait *in vitro* salım profili



Şekil 4.39. pH 7,4 bağırsak ortamında CBD enkapsüle PCL nanopartiküllere ait *in vitro* salım profili

Çizelge 4.6. pH 1,2 mide ortamında CBD enkapsüle PCL nanopartiküllere ait *in vitro* % salım sonuçları (n=3)

Zaman (saat)	5 mg NP	10 mg NP	15mg NP	30 mg NP
1	1,28 ±0,02	1,44 ±0,08	1,62 ±0,04	2,65 ±0,10
2	2,21 ±0,01	2,51 ±0,01	2,93 ±0,01	5,06 ±0,01
3	3,00 ±0,01	3,53 ±0,01	4,42 ±0,01	6,88 ±0,01
4	4,05 ±0,03	4,84 ±0,02	5,90 ±0,01	10,24 ±0,01
5	5,24 ±0,03	6,62 ±0,02	8,31 ±0,01	12,35 ±0,01
6	6,42 ±0,02	7,82 ±0,02	9,18 ±0,02	13,49 ±0,01
7	7,78 ±0,03	10,26 ±0,02	12,86 ±0,01	16,62 ±0,01
8	9,67 ±0,03	12,39 ±0,02	14,43 ±0,02	18,79 ±0,03

Çizelge 4.7. pH 7,4 bağırsak ortamında CBD enkapsüle PCL nanopartiküllere ait *in vitro* % salım sonuçları (n=3)

Zaman (saat)	5 mg NP	10 mg NP	15mg NP	30 mg NP
1	1,44 ±0,02	2,19 ±0,08	2,21 ±0,04	3,96 ±0,10
2	2,51 ±0,25	5,74 ±0,14	4,65 ±0,02	8,00 ±0,10
3	4,55 ±0,24	8,10 ±0,17	6,91 ±0,01	11,98 ±0,10
4	6,67 ±0,17	10,37 ±0,18	9,24 ±0,07	16,11 ±0,09
5	8,91 ±0,18	12,82 ±0,11	12,17 ±0,16	18,68 ±0,08
6	10,97 ±0,22	16,34 ±0,05	14,42 ±0,18	21,34 ±0,10
7	13,87 ±0,23	19,84 ±0,27	18,12 ±0,17	24,23 ±0,12
8	16,76 ±0,21	23,10 ±0,27	21,79 ±0,19	27,31 ±0,13
24	32,65 ±0,18	37,06 ±0,26	37,63 ±0,39	46,89 ±0,29
48	45,02 ±0,55	51,99 ±0,80	55,87 ±0,46	63,27 ±0,18
72	58,23 ±0,83	66,03 ±1,16	72,17 ±0,85	79,60 ±0,48
96	71,81 ±0,84	79,47 ±1,29	88,16 ±0,82	94,28 ±0,65

8 saatin sonunda pH 1,2 asidik mide ortamda salınan kümülatif etken madde yüzdesi, pH 7,4 bağırsak ortamında salınan etken madde yüzdesinden 5 mg, 10 mg, 15 mg ve 30 mg CBD enkapsüle PCL NP'ler için sırasıyla %81,7, %46,4, 35,9 ve 39,2 daha az olduğundan dolayı, PCL ile sentezlenen CBD NP'lerin hidrofilik ilaçlar için pH duyarlı nano taşıyıcılar olduğu önerilebilir (Saqib ve ark., 2020). pH 7,4 mide vasatında 96. saatin sonunda 5 mg, 10 mg, 15 mg ve 30 mg CBD enkapsüle PCL nanopartiküller için sırasıyla %71,84, %79,47, %88,16 ve %94,28 olarak bulundu. 96 saat boyunca yavaş ve uzun bir salım yapması, PCL'nin hidrofobik matrisin çekirdeğindeki ilacın difüzyonu ile ilgili olup (Chen ve ark., 2012; de la Ossa ve ark., 2012) ve PCL'nin hidrofobik karakterinden kaynaklanmaktadır. En kristalli ve hidrofobik polimerler, en yavaş bozunma oranını sergilerler. Ayrıca bu yavaş salım PCL nanopartiküllerin yüzeyinde az miktarda da olsa CBD adsorbe edildiğinin de göstergesidir çünkü CBD doğası gereği hidrofobik olduğundan PCL nanopartikül matrisinden salınma çok daha azdır (Snehalatha ve ark., 2008).

Mevcut çalışmada tercih edilen PCL molekül ağırlığı bağırsak ortamında 96 saate kadar uzatılmış ve 96. saatin sonunda 30 mg CBD enkapsüle PCL NP için %100'e yakın bir salım gerçekleşmiştir (%94,28). Bu nedenle salım çalışmaları 96 saate kadar uzatılmıştır. Bu durum, bu tez çalışmasında kullanılan polimerlerin düşük moleküler ağırlığından kaynaklanmaktadır. Lamprecht ve arkadaşları salım ortamındaki polimerlerin yavaş bozunması nedeniyle molekül ağırlığı daha yüksek polimerlerden salımın aylarca uzatılabileceğini bildirmişlerdir (Lamprecht ve ark., 2000).

4.3.1. *In vitro* salım kinetikleri

CBD enkapsüle PCL NP'lere ait salım verileri, salım kinetiğini belirlemek ve salım sürecini anlamak için sıfıncı derece, birinci derece, Higuchi, Korsmeyer-Peppas ve Hixson-Crowell kinetik modellerine uyarlandı ve hesaplanan kolerasyon katsayıları pH 1,2 için Çizelge 4.8 ve pH 7,4 için Çizelge 4.9'da gösterildi.

Çizelge 4.8. pH 1,2 mide ortamı için kinetik modellere ait kolerasyon katsayıları

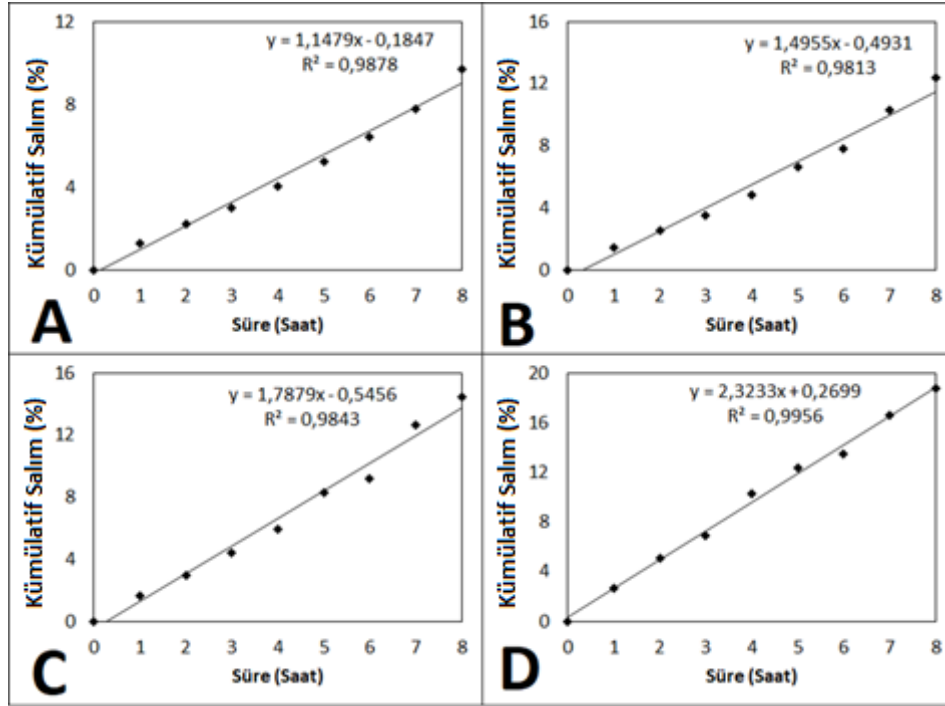
NP	Sıfıncı Derece	Birinci Derece	Korsmeyer-Peppas	Higuchi	Hixson-Crowell
5/150	0,9878	0,9846	0,9883	0,8739	0,9859
10/150	0,9813	0,9760	0,9839	0,8509	0,9781
15/150	0,9843	0,9790	0,9804	0,8601	0,9811
30/150	0,9956	0,9957	0,8222	0,8739	0,9959
Ortalama	0,9873	0,9838	0,9687	0,8647	0,9853

Çizelge 4.9. pH 7,4 bağırsak ortamı için kinetik modellere ait kolerasyon katsayıları

NP	Sıfıncı Derece	Birinci Derece	Korsmeyer-Peppas	Higuchi	Hixson-Crowell
5/150	0,9619	0,9908	0,9541	0,9883	0,9868
10/150	0,9476	0,9882	0,9035	0,922	0,9838
15/150	0,9659	0,9783	0,9330	0,9907	0,9909
30/150	0,9414	0,9621	0,8569	0,9883	0,9852
Ortalama	0,9542	0,9799	0,9119	0,9899	0,9867

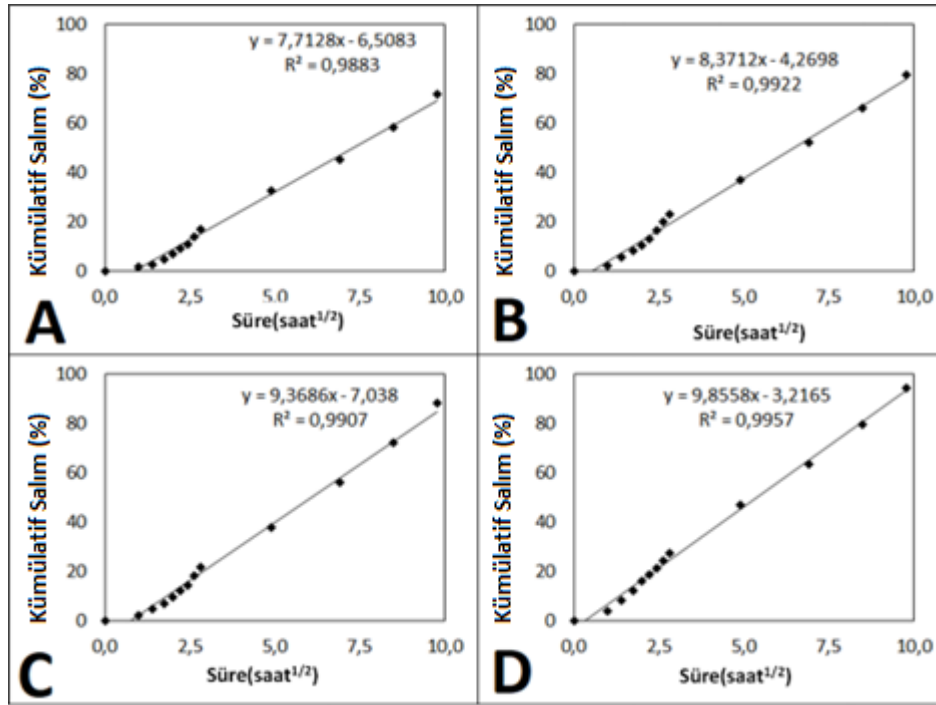
Oral yolla ilaç alımında ilacın midede kalma süresi kişinin interdigestif veya sindirim durumunda olmasına bağlı olarak 5 dakika ile 5 saat arasında değişiklik göstermektedir (Soppimath ve ark., 2001). Tok midede ise bu süre 8 saate kadar çıkmaktadır (Waterman, 2007). Bu tez kapsamında, CBD'nin gıda takviyelerinde kullanılması için elverişli bir dozaj formu geliştirilmesi amacı ile gıda takviyesinin midede en fazla 8 saat kalacağı göz önünde bulundurularak *in vitro* salım kinetiği çalışmaları mide ortamı pH 1,2 de saat 8 sürdürülmüştür. Çizelge 4.8'deki sonuçlara göre 4 farklı CBD miktarı içeren NP'lere ait en yüksek kolerasyon sayısı ortalama 0,9873

olarak Sıfırncı Derece Salım Kinetik model tespit edildi. Bu modele göre etken maddenin derişiminden bağımsız bir şekilde aynı zaman periyotlarında aynı miktar etken madde salımı yaptığını göstermektedir (Bruschi, 2015). Bunun nedeni CBD'nin kısmen de olsa parçacık yüzeyinde de bulunduğunun göstergesi olabilir.



Şekil 4.40. pH 1,2 mide ortamı için sıfırncı derece kinetik modeli grafikleri A) 5/150 CBD/PCL B) 10/150 CBD/PCL C) 15/150 CBD/PCL D) 30/150 CBD/PCL

Çizelge 4.9'de gösterilen sonuçlar, CBD enkapsüle PCL NP'lerin pH 7,4 bağırsak ortamında salımının Higuchi kinetik modeline göre gerçekleştiğini göstermektedir. Bu model, homojen matris sisteminden ilaç salımını zamanın kareköküne bağlı olarak kontrol edildiğini ve salımın Fickian difüzyonu ile gerçekleştiğini göstermektedir (Higuchi, 1963). Bu kinetiğe göre, ilacın salım miktarının zamanla azaldığı anlamına gelmektedir. Bu durumun sebebi, ilacın başlangıçta en kısa difüzyon yolunu oluşturan yüzey bölgesinden salınmasından kaynaklanmaktadır. Ancak ilacın çözünme süreci ilerledikçe, çözünme ortamına maruz kalan etken madde alanı azalmaktadır. Yüzeydeki etken madde miktarı tükendikten sonra, film tabakasının bir sonraki katmanı ilacı salmaya başlayarak, difüzyon yolunun uzunluğunun artmasına neden olur.



Şekil 4.41. pH 7,4 bağırsak ortamı için Higuchi kinetik modeli grafikleri A) 5/150 CBD/PCL B) 10/150 CBD/PCL C) 15/150 CBD/PCL D) 30/150 CBD/PCL

Ayrıca, Higuchi modeli, Fickian difüzyonun yanı sıra etken madde salım mekanizmasına etki eden polimer zincirlerinin gevşemesini de dikkate alarak, etken madde salım mekanizmasına etkisini göstermektedir (Monteiro ve ark., 2016). Bağırsak ortamı çalışmalarında hesaplanan sonuç literatürdeki diğer çalışmalarla da uyumludur (Kolluru ve ark., 2020; Monteiro ve ark., 2016; Mello ve Ricci-Júnior, 2011).

4.4. *In Vitro* Hücre Proliferasyon Testi

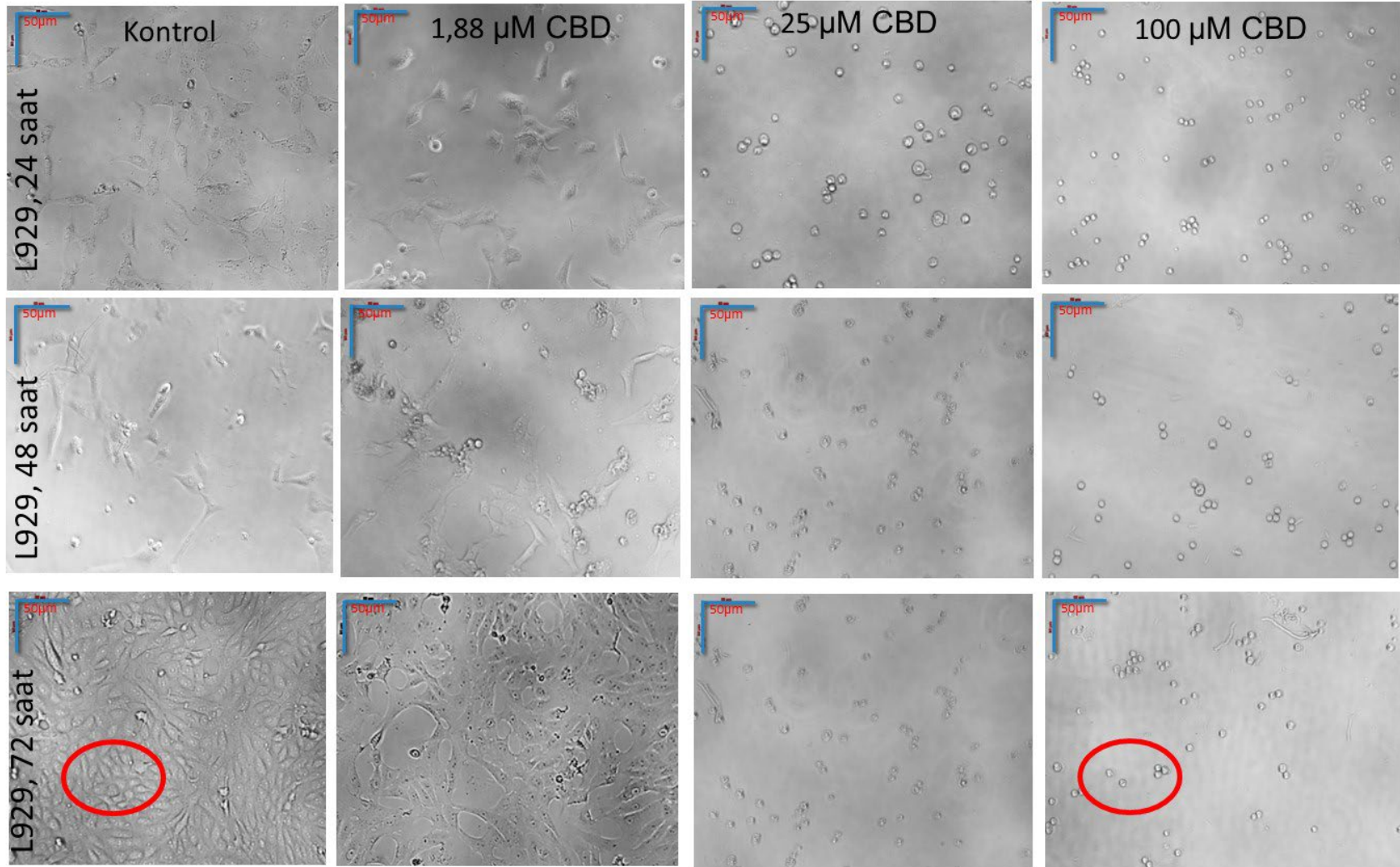
CBD etken maddesinin L929 normal fibroblast ve MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde etkisinin belirlenmesi için *in vitro* hücre proliferasyon testi yapılmıştır. Test sonuçlarına göre meme kanserine model olarak kullanılan MCF-7 hücreleri L929 hücreleriyle karşılaştırıldığında CBD'ye karşı daha dirençli bir çoğalma profili sergilemiştir. Farklı zaman dilimlerinde hesaplanan IC₅₀ değerleri Çizelge 4.10'da verilmektedir.

Çizelge 4.10. CBD etken maddesinin hücre çoğalması üzerine etkisi

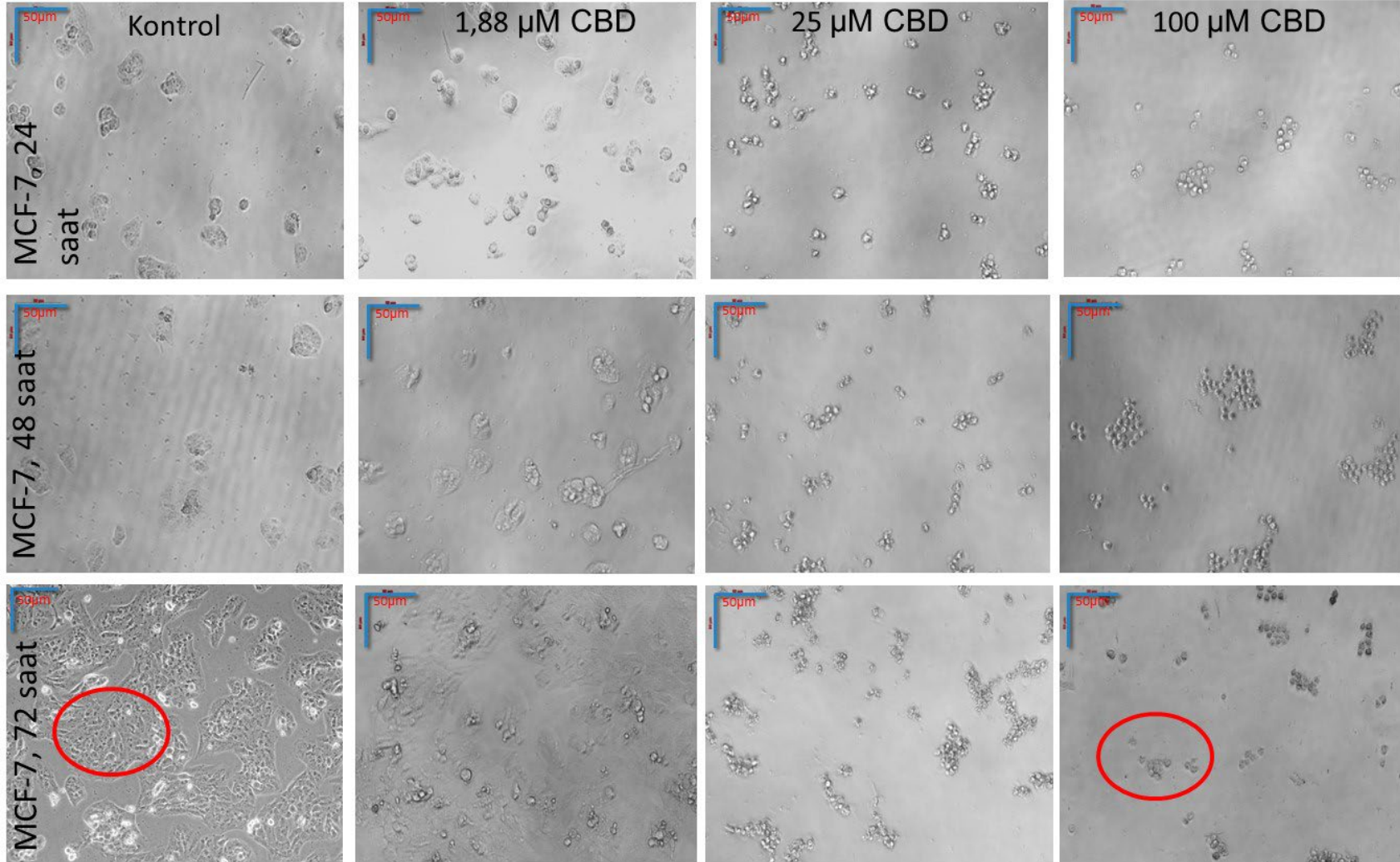
Zaman (saat)	IC ₅₀ (µM)	
	Hücre hattı	
	L929	MCF-7
24	0,79 ± 0,08	19,88 ± 0,87
48	1,12 ± 0,05	18,73 ± 0,75
72	6,17 ± 0,12	18,17 ± 0,82

CBD'nin L929 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi hücrelerin maruz kaldıkları süre arttıkça azalmıştır. CBD'nin normal fibroblast hücrelerine sitotoksik etkisi 24, 48, 72 saatte sırasıyla azalmıştır (Çizelge 4.10, Şekil 4.42). Bu durum hücre sayısı attıkça her hücreye düşen CBD konsantrasyonunun azalmasından kaynaklanmış olabilir. CBD'nin MCF7 meme kanseri hücreleri üzerine antiproliferatif etkisi L929 hücrelerine olduğundan daha az olmakla beraber zamana bağlı anlamlı bir farklılık göstermemiştir (Çizelge 4.10, Şekil 4.43). CBD normal fibroblast hücrelerine meme kanseri hücrelerine olan etkiyle karşılaştırıldığında 72 saat sonunda 3 kat daha fazla antiproliferatif etki oluşturmuştur. Bu durum kanser hücrelerinin çeşitli etken maddelere göstermekte olduğu ilaç dirençliliğinden ileri geliyor olabilir. Bölüm 4.8'de verilen Moleküler Yerleştirme çalışmamızın sonucuna CBD'nin ratlatda damar yolundan uygulandığında LD₅₀ değeri kg başına 799 mg olduğu ve oral uygulamada güvenli bulunmuştur.

Mato ve arkadaşları bir çalışmalarında 10 µM CBD'nin 24 saat uygulamasının oligodentrosit sinir hücrelerinde %30 antiproliferatif etki gösterdiğini belirtmişlerdir (Mato ve ark., 2010). Bu tez çalışmasındaki sonuçlar CBD'nin normal ve kanserli hücrelerin çoğalmasını azaltıcı etki yaptığını göstermektedir. CBD'nin kanser tedavisinde etkisinin değerlendirilebilmesi için normal hücreler zarar vermemek adına kanserli dokuları hedeflemeye yönelik nano formülasyonlar geliştirilebilir. CBD'nin kanser hücrelerini hedeflediği NP formülasyonu tasarımında NP'ler üzerinde kanser dokusuna yönelik hedeflendirme modifikasyonlarına ihtiyaç duyulacaktır. Bu modifikasyonlar antikanser CBD-NP formülasyonunun normal dokulara zarar vermeden kanser dokusuna ulaşmasını sağlamalıdır.



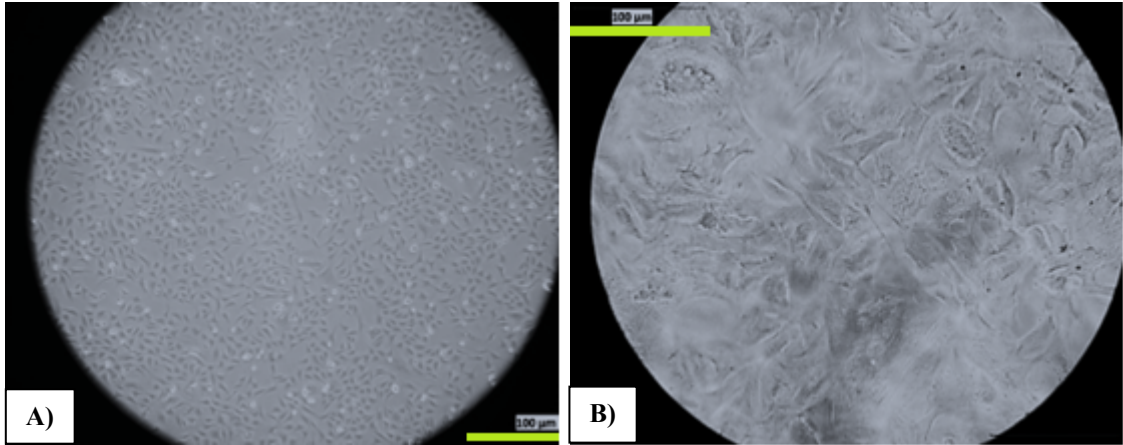
Şekil 4.42. CBD'nin farklı konsantrasyonlarının L929 hücrelerine zamana bağlı etkisinin ters mikroskop altında gösterilmesi (10 X)



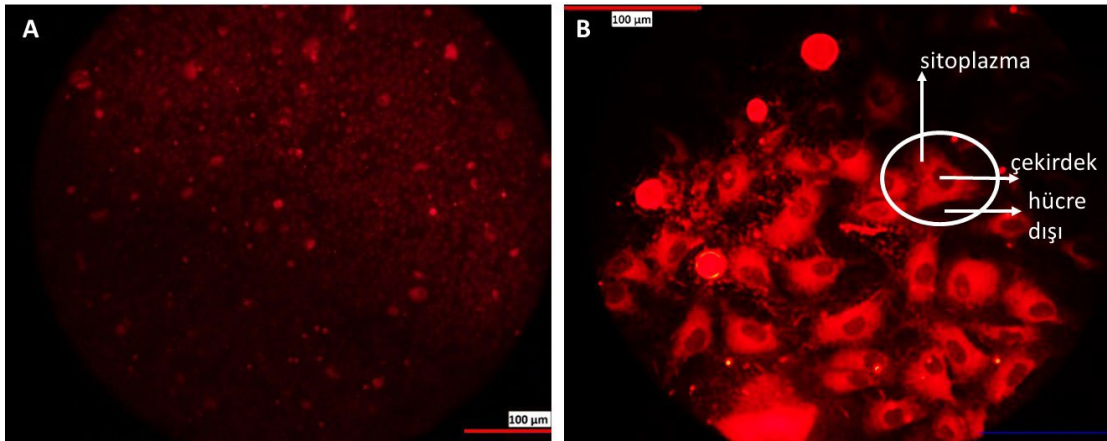
Şekil 4.43. CBD'nin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerine zamana bağlı etkisinin ters mikroskop altında gösterilmesi (10 X)

4.5. PCL-NP'lerin Hücre İçerisine Alımı Testi

Nil kırmızısı floresan boya enkapsüle edilmiş PCL nanoparçacıkların L929 fibroblast hücreleri tarafından hücre alımı floresan mikroskobu altında görüntülendi. L929 hücrelerinin ışık mikroskobu görünümü ve floresan görüntüleri Şekil 4.44 ve 4.45'de gösterilmektedir.



Şekil 4.44. Ters (invert) floresan mikroskobu altında L929 hücrelerinin filtre aktif edilmeden önceki görünümü A) 40X, B) 60X



Şekil 4.45. Ters (invert) floresan mikroskobu altında L929 hücrelerinin floresan filtre aktif durumdayken görünümü A) 40X, B) 60X

L929 fibroblast hücrelerinin hücre alımını incelemek için nanoparçacıklarla 37°C'de 2 saat inkübasyonun ardından alınan floresan mikroskobu görüntülerinde nanopartiküllerin hücreler içinde önemli bir içselleştirme gösterdiğini ve tutulduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda etken madde yüklü PCL nanopartikül sistemlerinin ilaçları herhangi bir ilave işlevlendirme olmaksızın doğrudan hücrelere ilaç taşıyıcı olarak kullanılabilceğini göstermektedir.

4.6. Kenevir Tohumu Yağı Analiz Sonuçları

Yağın kalitesini belirlemek, gıda takviyesi olarak kullanımının uygunluğunu ve raf ömrünü etkileyen faktörlerin tespiti için soğuk sıkım kenevir tohumu yağına serbest yağ asitliği, peroksit sayısı analizi ve yağ asitleri kompozisyonu analizi yapıldı.

4.6.1. Serbest yağ asitliği analiz sonuçları

Serbest Yağ Asitleri (FFA) bitkisel yağların üretimi ve raf ömrünün belirlenmesindeki en önemli kalite parametrelerinden birisidir ve trigliserit yapıda olmayan ve serbest halde bulunan yağ asitleridir. Soğuk sıkım kenevir tohumu yağına ait serbest yağ asitliği analiz sonucu $1,75 \pm 0,006$ olarak hesaplandı (n=3).

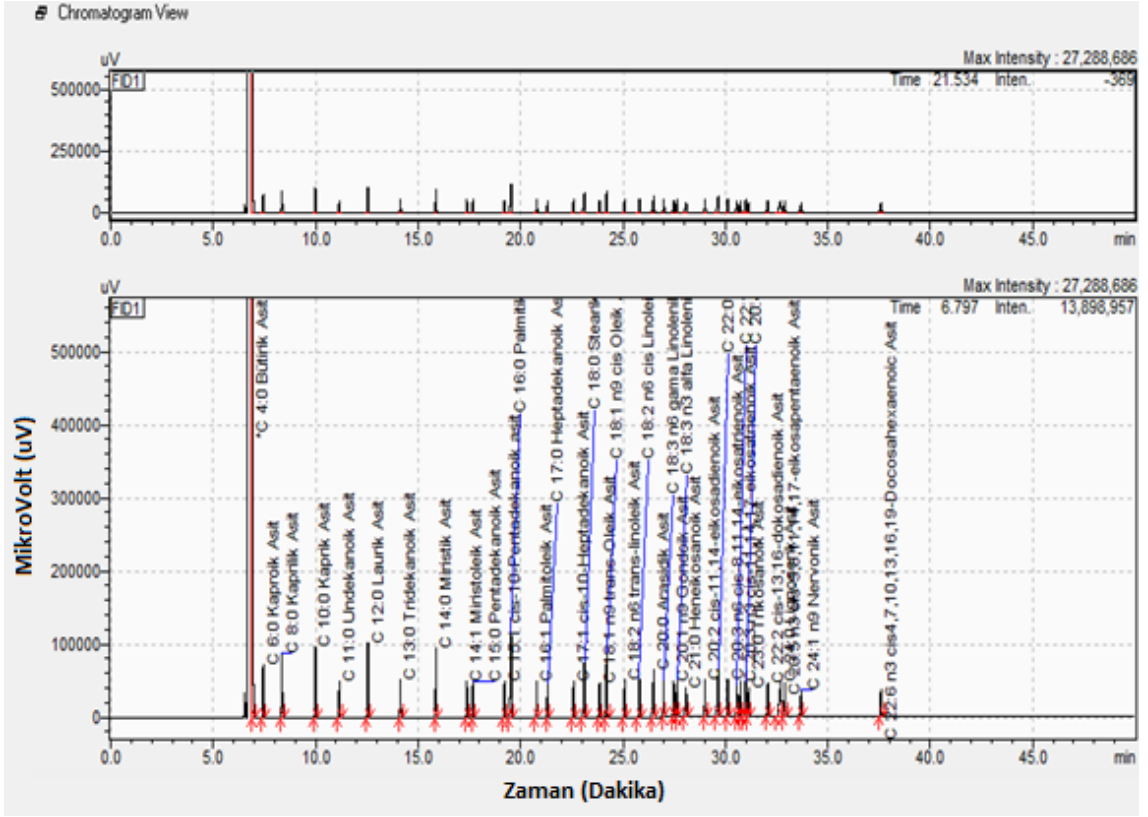
4.6.2. Peroksit sayısı analiz sonuçları

Peroksit sayısı bitkisel yağlarda bulunan aktif oksijen miktarının bir ölçüsüdür. 1 kg bitkisel yağda bulunan peroksit oksijeninin miliekivalen gram olarak tanımlanmaktadır ve bitkisel yağların bozularak birincil oksidasyon ürünlerinin oluşması ve acılaştırmasının tespitindeki en önemli kalite parametrelerinden birisidir. Soğuk sıkım kenevir tohumu yağına ait peroksit sayısı $7,76 \pm 0,21$ olarak hesaplandı.

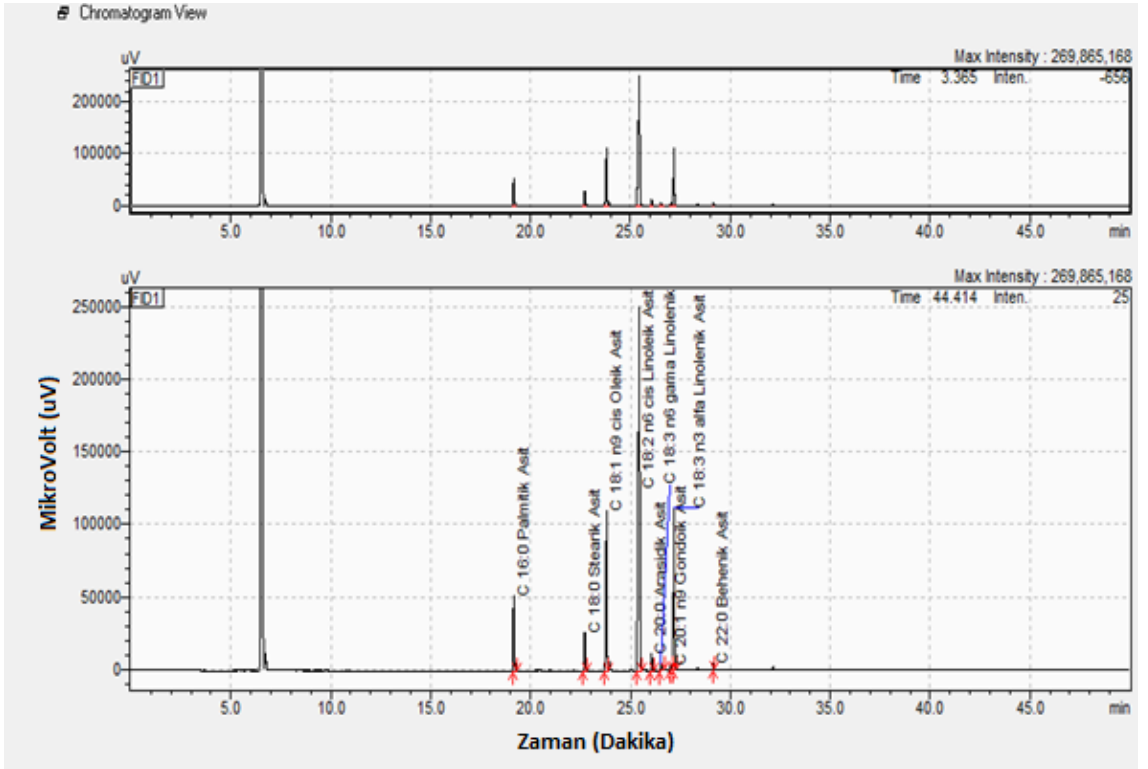
4.6.3. Yağ asitleri kompozisyonu analizi

Soğuk sıkım kenevir tohumu yağının GC-FID analizi öncesinde metil esterleri türevlerine dönüştürdüğümüz yağ asitlerinin tespiti için 37 bileşenli FAMEMIX karışımı standardı kullanıldı ve 37 yağ asidi bileşeninin alan dağılımı Şekil 4.46'da ve Çizelge 4.11'de gösterildi.

Soğuk sıkım kenevir tohumu yağına ait esansiyel yağ asitlerinin tespiti için 37 bileşenli FAMEMIX karışımı alıkonma zamanları referans alınarak metil ester kompozisyonu yüzde alan cinsinden hesaplanmaları yapıldı.



Şekil 4.46. 37 bileşenli FAMEMIX karışımı standardına ait kromatogram (GC)



Şekil 4.47. Soğuk sıkım kenevir tohumu yağına ait kromatogram (GC)

Çizelge 4.11. 37 bileşenli FAMEMIX karışımı standardında bulunan yağ asitlerinin alıkonma zamanları, %Alan ve %Yükseklik sonuçları (GC)

Sıra	Alıkonma Zamanı (dk)	Adı	%Alan	%Yükseklik
1	6,902	C 4:0 Bütirik Asit	8,894	20,773
2	7,443	C 6:0 Kaproik Asit	3,030	2,731
3	8,354	C 8:0 Kaprilik Asit	3,393	3,357
4	9,989	C 10:0 Kaprik Asit	3,582	3,729
5	11,151	C 11:0 Undekanoik Asit	1,804	1,893
6	12,551	C 12:0 Laurik Asit	3,688	3,853
7	14,136	C 13:0 Tridekanoik Asit	1,845	1,923
8	15,880	C 14:0 Miristik Asit	3,739	3,612
9	17,384	C 14:1 Miristoleik Asit	1,850	1,896
10	17,676	C 15:0 Pentadekanoik Asit	1,864	1,908
11	19,220	C 15:1 cis-10-Pentadekanoik asit	1,861	1,890
12	19,543	C 16:0 Palmitik Asit	5,695	4,399
13	20,801	C 16:1 Palmitoleik Asit	1,888	1,907
14	21,324	C 17:0 Heptadekanoik Asit	1,898	1,793
15	22,589	C 17:1 cis-10-Heptadekanoik Asit	1,920	1,902
16	23,121	C 18:0 Stearik Asit	3,893	2,929
17	23,862	C 18:1 n-9 trans-Oleik Asit	1,906	1,765
18	24,207	C 18:1 n-9 cis Oleik Asit	3,922	3,326
19	25,081	C 18:2 n-6 trans-linoleik Asit	1,942	1,934
20	25,804	C 18:2 n-6 cis Linoleik Asit	1,990	1,993
21	26,512	C 20:0 Arasidik Asit	3,957	2,465
22	26,992	C 18:3 n-6 gama Linolenik Asit	1,943	1,951
23	27,482	C 20:1 n-9 Gondoik Asit	1,937	1,800
24	27,643	C 18:3 n-3 alfa Linolenik Asit	1,959	1,958
25	28,083	C 21:0 Heneikosanoik Asit	1,991	1,463
26	29,007	C 20:2 cis-11,14-eikosadienoik Asit	1,963	1,869
27	29,662	C 22:0 Behenik Asit	4,060	2,508
28	30,116	C 20:3 n-6 cis-8,11,14-eikosatrienoik Asit	1,968	1,926
29	30,569	C 22:1 n-9 Erusik Asit	1,978	1,643
30	30,743	C 20:3 n-3 cis-11,14,17-eikosatrienoik Asit	1,925	1,769
31	30,994	C 20:4 n-6 Arasidonik Asit	1,980	1,822
32	31,139	C 23:0 Trikosanoik Asit	2,017	1,424
33	32,073	C 22:2 cis-13,16-dokosadienoik Asit	1,951	1,685
34	32,715	C 24:0 Lignoserik Asit	4,058	1,784
35	32,900	C 20:5 n-3 cis-5,8,11,14,17-eikosapentaenoik Asit	1,878	1,703
36	33,704	C 24:1 n-9 Nervonik Asit	1,987	1,338
37	37,599	C 22:6 n-3 cis4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic Asit	1,843	1,379
	Toplam		100	100

Soğuk sıkım kenevir tohumu yağına ait yağ asitlerinin 37 bileşenli FAMEMIX standardına göre palmitik asit bağıl alıkonma zamanı yaklaşık 19,543 dakika, stearik asit yaklaşık 23,121 dakika, oleik asit yaklaşık 24,207 dakika, linoleik asit yaklaşık 25,804, α -linolenik asit yaklaşık 27,643 dakika, γ -linolenik asit yaklaşık 26,992 dakika, arasidik asit yaklaşık 26,512 dakika, gondoik asit yaklaşık 27,482 dakika ve behenik asit yaklaşık 26,992 dakika olarak hesaplandı. Soğuk sıkım kenevir tohumu yağında ise baskın yağ asidinin C18:2 (%53,54) olduğu belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.73'de ve Çizelge 4.12'de gösterildi.

Çizelge 4.12. Soğuk sıkım kenevir tohumu yağına ait yağ asitleri, alıkonma zamanları ve %konsantrasyonları

Sıra	Alıkonma Zamanı	Adı	%Konsantrasyon
1	19,157	C 16:0 Palmitik Asit	6,497
2	22,714	C 18:0 Stearik Asit	3,753
3	23,808	C 18:1 n-9 cis Oleik Asit	18,332
4	25,451	C 18:2 n-6 cis Linoleik Asit	53,547
5	26,061	C 20:0 Arasidik Asit	1,363
6	26,529	C 18:3 n-6 gama Linolenik Asit	0,716
7	27,026	C 20:1 n-9 Gondoik Asit	0,532
8	27,183	C 18:3 n-3 alfa Linolenik Asit	14,707
9	29,153	C 22:0 Behenik Asit	0,553
	Toplam		100

Türk Farmakope Dergisi Milli Monografi'na göre kenevir tohumu yağına ait yağ asitlerinin olması gereken kabul aralıkları C16:0 palmitik asit %4-9 aralığında, C18:0 stearik asit %1-5 aralığında, C18:1 (n-9) oleik asit %8-20 aralığında, C18:2 (n-6) linoleik asit %46-65 aralığında, C18:3 (n-3) α -linolenik asit %14-28 aralığında, C18:3 (n-6) γ -linolenik asit en fazla %5, C20:0 araşidik asiten fazla %2, C20:1 (n-9) eikosenoik asit en fazla %1, C22:0 behenik asit en fazla %0,6 olarak verilmiştir (Selvi ve ark., 2019). Bu monografa göre bu tez çalışmasında kullanılan kenevir tohumu yağının bütün yağ asit değerleri uygundur.

4.7. Nihai Ürünün Farmasötik Etkinlik ve Kalite Kontrol Test Sonuçları

4.7.1. Ağırlık sapması

Yumuşak jelatin kapsülleme işleminden sonra elde edilen nihai üründen 20 tane dolu kapsül Ph. Eur. 2.9.5'e göre sırayla hassas terazide tartıldı, kapsüller boşaltılıp boş kapsüller tekrar sırayla tartıldı. Ağırlık sapması analizi sonucunda minimum yağ ağırlığı 939 mg ve maksimum yağ ağırlığı 1030,2 mg ve ortalama yağ ağırlığı $984,6 \pm 25,1$ mg olarak tespit edildi ve sonuçlar Tablo 4.13'de verildi.

20 kapsül ile yapılan analiz sonucuna göre her kapsüle ait ağırlık sapması, ortalama ağırlığın %10 undan küçüktür. Bu sonuçlara göre üretim sürecindeki dozajlama hatasının kabul edilebilir ölçülerde olduğunu ve ürünlerin belirtilen etken madde miktarlarına uygun ve başarılı bir şekilde yumuşak jelatin kapsül içerisine doldurulduğunu gösterir (Asaad, 2022).

Çizelge 4.13. Yumuşak jelatin kapsül ağırlık sapması sonuçları

no	Dolu Kapsül (mg)	Boş Kapsül (mg)	Yağ Ağırlığı (mg)
1	1275,3	301,3	974,1
2	1261,4	305,4	956
3	1284	293,8	985,1
4	1279	308,6	970,4
5	1256,4	309,8	946,4
6	1289,1	306,4	982,7
7	1236,1	295,6	940,6
8	1283	304,4	978,6
9	1278,5	316	962,7
10	1268,6	304,2	964,2
11	1239,2	300,1	939
12	1311,2	307,6	1003,6
13	1300,2	313,5	986,6
14	1327,4	302	1025,5
15	1362,8	300	962,8
16	1328,5	298,2	1030,2
17	1282,8	309,7	973,3
18	1256,6	302,9	953,7
19	1249	301,6	947,7
20	1278,4	304,6	973,9
		Ortalama	984,6

4.7.2. Dağılım testi

Europen Farmakope 2.9.1'e göre hazırlanan suni mide ortamında (pH 1,2) ve suni bağırsak ortamında disintegration cihazı ile $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta yapılan analiz sonuçlarına göre yumuşak jelatin kapsüller suni mide ortamında 6 dk. 13 sn. ile 6 dk. 58 sn. arasında ve suni bağırsak ortamında 7 dk. 33 sn. ile 8 dk. 04 sn. arasında tamamen dağıldı. Ph. Eur. 2.9.1 kalite standardına göre dağılım zamanı maksimum 30 dakika olduğunu dikkate alarak, suni mide ve suni bağırsak ortamlarında yapılan testlerin kabul edilebilir süreler içerisinde tamamlandığını göstermektedir.

4.8. Moleküler Yerleştirme Çalışmaları

Elde edilen nihai ürün otomatik blister makinasında her blisterde 10 adet kapsül bulunacak şekilde el değmeden blisterlenerek kutulandı. Kutu mukavemetinin sağlanması için 300 g Amerikan Bristol kutu kullanıldı (Şekil 4.48).



Şekil 4.48. Nihai ürün prototipi (Modifiye Salım Nano CBD)

4.9. Moleküler Yerleştirme Çalışmaları

4.9.1. Moleküler yerleştirme sonuçları

CBD molekülünün literatür taraması sonucunda seçilen 6 farklı reseptörlere (CB1, CB2, δ -OP, GPR55, TRPV1 ve 5-HT1A) In silico olarak moleküler yerleştirme yöntemi ile kenetlenme işlemi yapıldı ve Gibbs serbest enerjileri (ΔG) hesaplandı. Her bir reseptöre ait en yüksek afinite değerleri Çizelge 4.14'te gösterildi.

Çizelge 4.14. CBD'nin CB1, CB2, δ -OP, GPR55, TRPV1 ve 5-HT1A reseptörlerine moleküler yerleştirme işlemi sonuçları

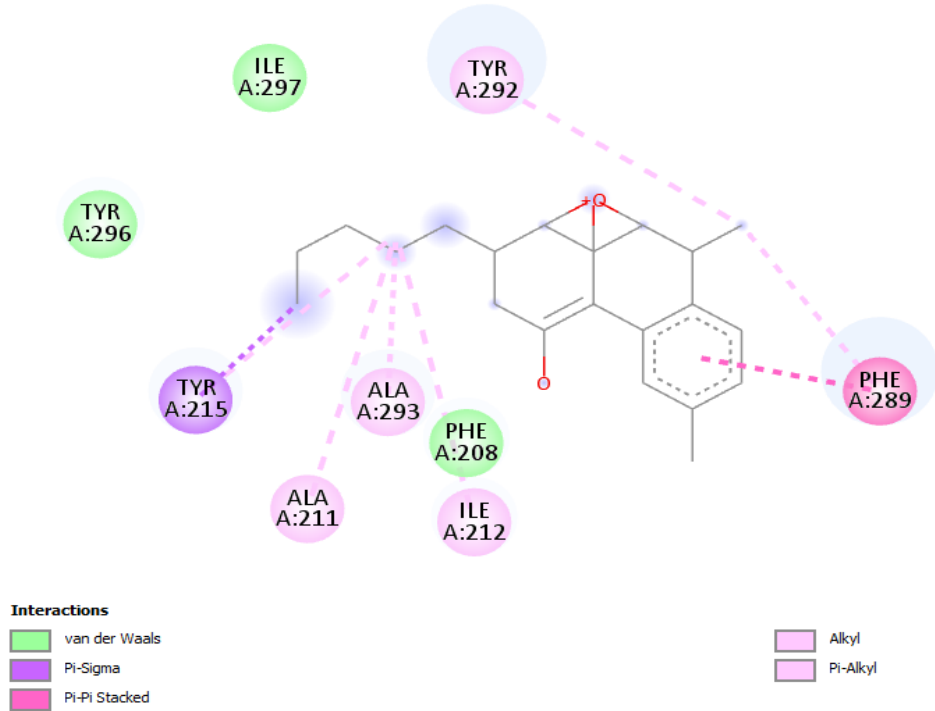
Reseptör Kodu	Reseptör Adı	Bağlanma Enerjisi (Kcal/mol)	Etkileşim türü
5U09	CB1	-9,3	Alkil, Pi-Alkil, Pi-Pi Yığılı, Pi-Sigma, Van Der Waals
5ZTY 4N6H	CB2 İnsan Delta-Opioid Reseptörü	-9,8 -8,8	Alkil, Pi-Alkil, Van Der Waals Alkil, Olumsuz Pozitif-Pozitif Etkileşimi, Pi-Alkil, Van Der Waals
4EA3	N-OFQ Opioid Reseptörü	-9,0	Alkil, Konvensiyonel Hidrojen Bağı, Pi-Alkil, Van Der Waals
7E2Y	Serotonin 1A (5-HT1A)	-7,2	Alkil, Konvensiyonel Hidrojen Bağı, Pi-Alkil, Pi-Katyon, Van Der Waals
3J5Q	TRPV1	-8,8	Pi-Alkil, Van Der Waals

CB1 reseptörüne karşı CBD'nin en yüksek afiniteye sahip tutunma pozisyonu Şekil 4.49'da gösterilmiştir. CBD CB1 reseptörüne -9,3 Kcal/mol ile bağlanmıştır.



Şekil 4.49. En yüksek enerjiye sahip kanabidiol analogunun CB1 reseptörüne karşı etkileşimi

CBD İzolösün 297, Tirozin 296 ve Fenilalanin 208 ile Van Der Waals bağı, Tirozin 215 ile Pi Sigma bağı, Alanin 211 Alanin 293 ve İzolösün 212 ile Pi Alkil bağı, Fenilalanin 289 ile Pi-Pi yığın bağı ve Tirozin 292 ile Alkil bağı yapmıştır ve Şekil 4.50'de gösterilmiştir.



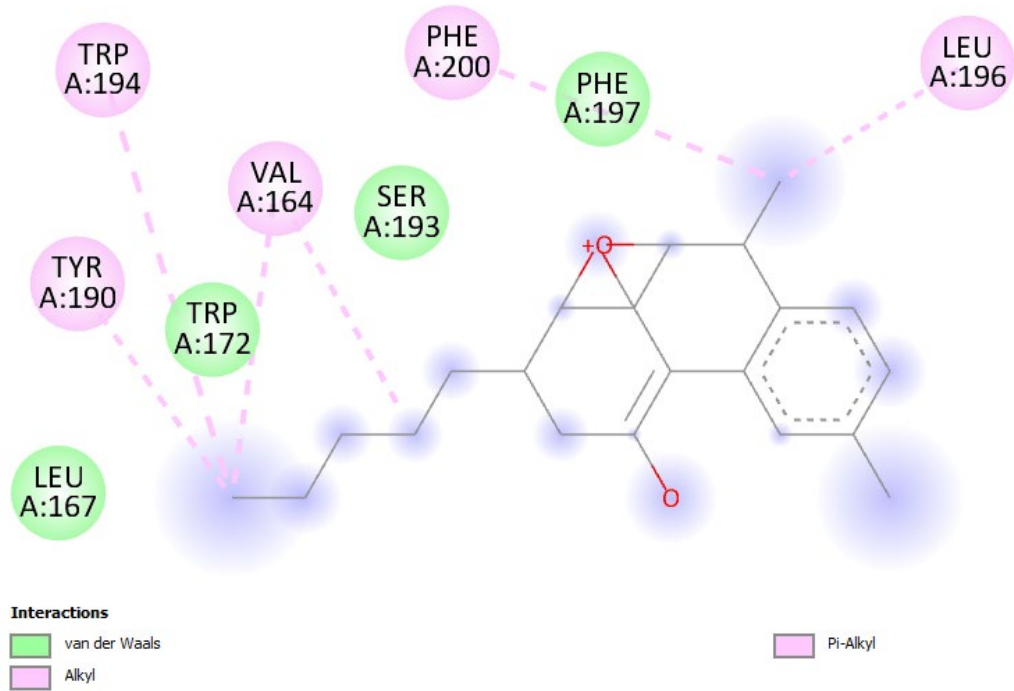
Şekil 4.50. CBD'nin CB1 reseptörüne bağlanma etkileşimlerinin iki boyutlu çizimi

CB2 reseptörüne karşı CBD'nin en yüksek afiniteye sahip tutunma pozisyonu Şekil 4.51'de gösterilmiştir. CBD CB2 reseptörüne -9,8 Kcal/mol ile bağlanmıştır.



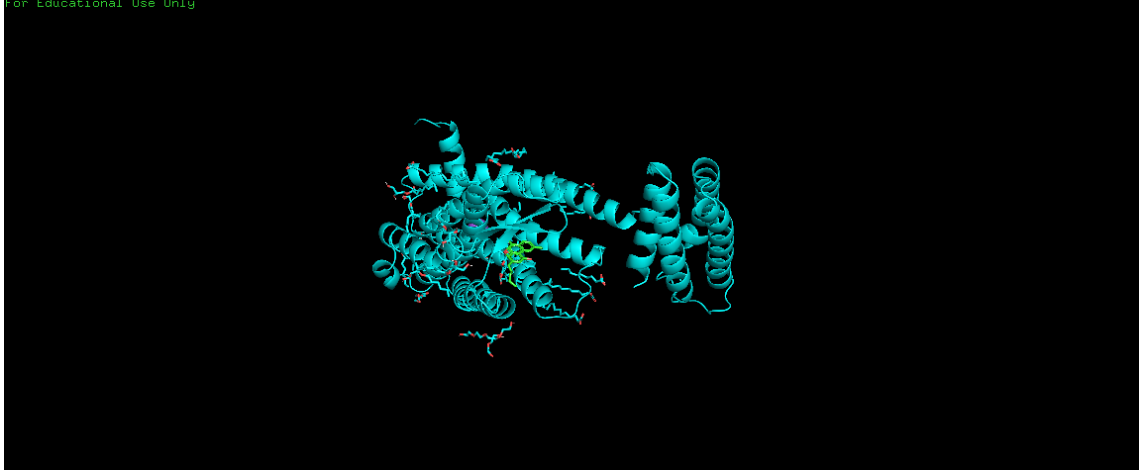
Şekil 4.51. En yüksek enerjiye sahip kanabidiol analogunun CB2 reseptörüne karşı etkileşimi

CBD, CB2 reseptörü ile Lösin 167 Triptofan 172 Serin 193 ve Fenilalanin 197 ile Van Der Waals, Tirozin 190 Triptofan 194 Fenilalanin 200 ve Lösin 196 ile Alkil bağı, Valin 164 ile Pi-Alkil bağı yapmıştır ve Şekil 4.52'de gösterilmiştir.



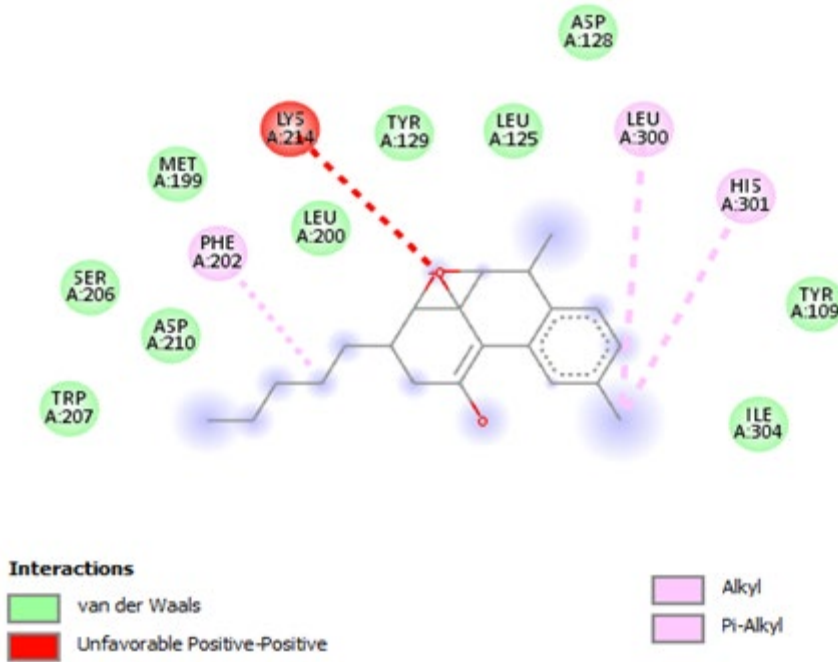
Şekil 4.52. CBD'nin CB2 reseptörüne bağlanma etkileşimlerinin iki boyutlu çizimi

Human Delta-Opioid reseptörüne karşı CBD'nin en yüksek afiniteye sahip tutunma pozisyonu Şekil 4.53'te gösterilmiştir. CBD CB2 reseptörüne -8,8 Kcal/mol ile bağlanmıştır.



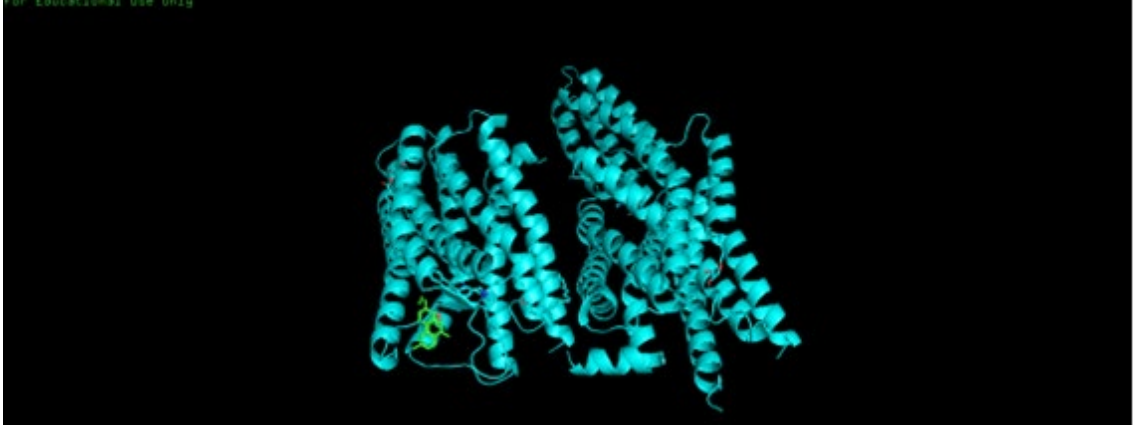
Şekil 4.53. En yüksek enerjide sahip kanabidiol analogunun İnsan Delta-Opioid reseptörüne karşı etkileşimi

CBD, İnsan Delta-Opioid reseptörü ile Lizin 214 ile Olumsuz Pozitif-Pozitif etkileşimi, Triptofan 207 Serin 206 Aspartat 210 ve 128 Metiyonin 199 Lösin 200 ve 125 Tirozin 129 ve 109 İzolösin 304 Van Der Waals bağı, Fenilalanin 202 ile Alkil bağı ve Lösin 300 ve Histidin 301 ile Pi Alkil bağı yapmıştır ve Şekil 4.54'de gösterilmiştir.



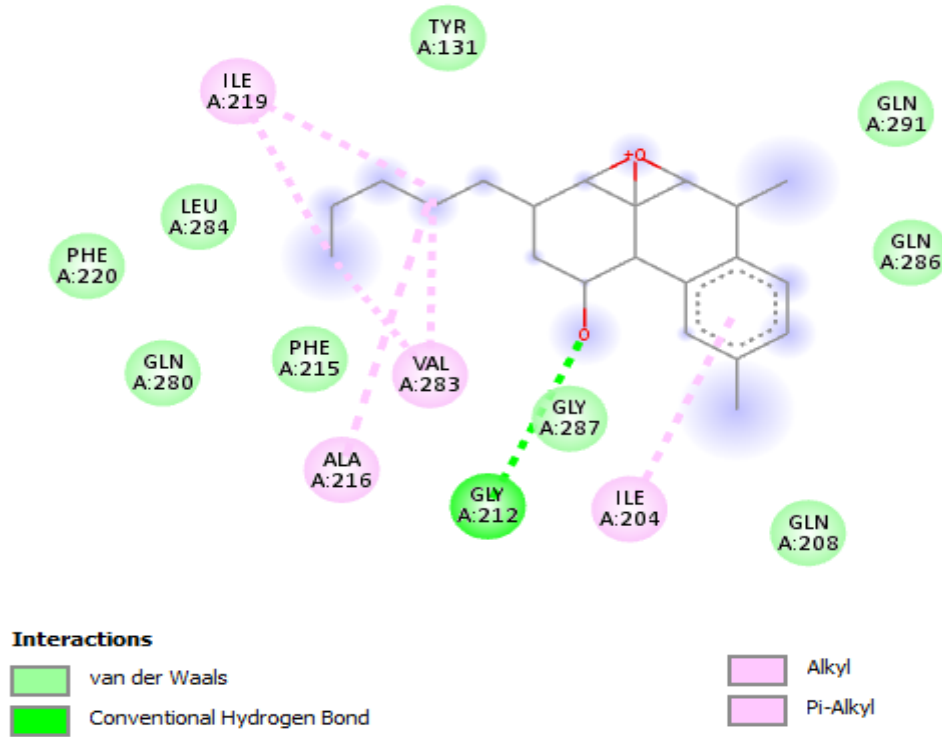
Şekil 4.54. CBD'nin Human Delta-Opioid reseptörüne bağlanma etkileşimlerinin iki boyutlu çizimi

N-OFQ Opioid reseptörüne karşı CBD'nin en yüksek afiniteye sahip tutunma pozisyonu Şekil 4.55'te gösterilmiştir. CBD CB2 reseptörüne -9,0 Kcal/mol ile bağlanmıştır.



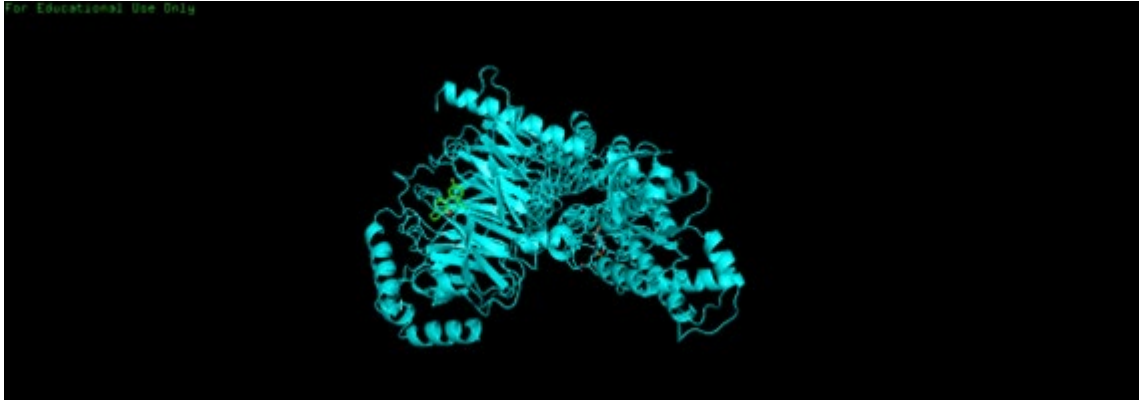
Şekil 4.55. En yüksek enerjiye sahip kanabidiol analogunun N-OFQ Opioid reseptörüne karşı etkileşimi

CBD, N-OFQ Opioid reseptörü ile Glisin 212 Konvensiyonel Hidrojen bağı, Glutamin 208 ve 280 ve 291 Glisin 287 ve 286 Fenilalanin 215 ve 220 Lösin 284 Tirozin 131 ile Van Der Waals bağı, Alanin 216 İzolösin 204 ile Alkil bağı ve İzolösin 219 Valin 283 ile Pi Alkil bağı yapmıştır ve Şekil 4.56'da gösterilmiştir.



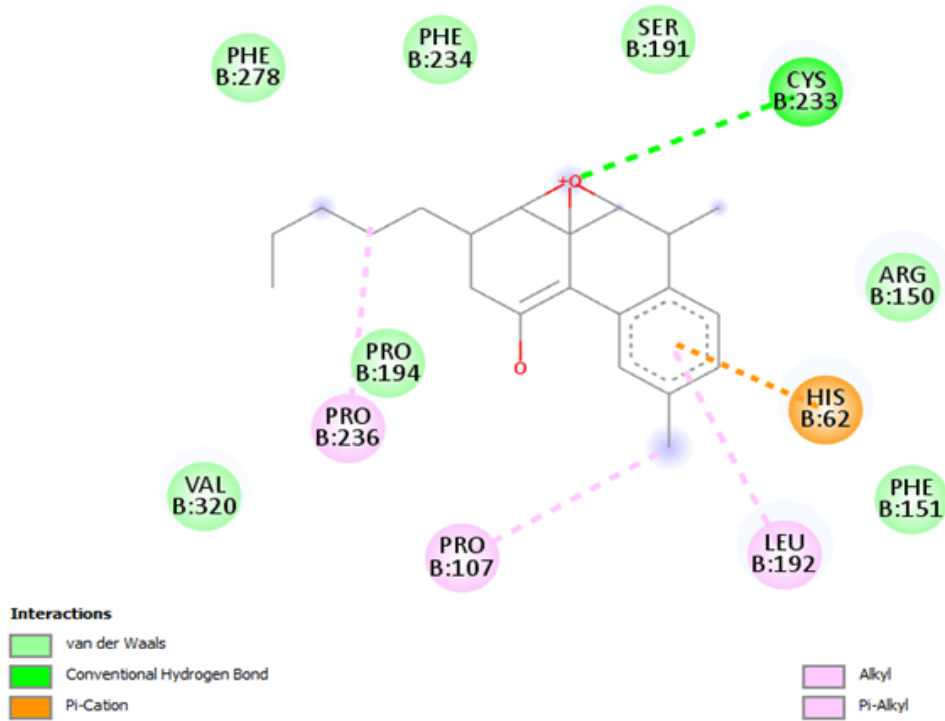
Şekil 4.56. CBD'nin N-OFQ Opioid reseptörüne bağlanma etkileşimlerinin iki boyutlu çizimi

Serotonin 1A reseptörüne karşı CBD'nin en yüksek afiniteye sahip tutunma pozisyonu Şekil 4.57'de gösterilmiştir. CBD Serotonin 1A reseptörüne -7,2 Kcal/mol ile bağlanmıştır.



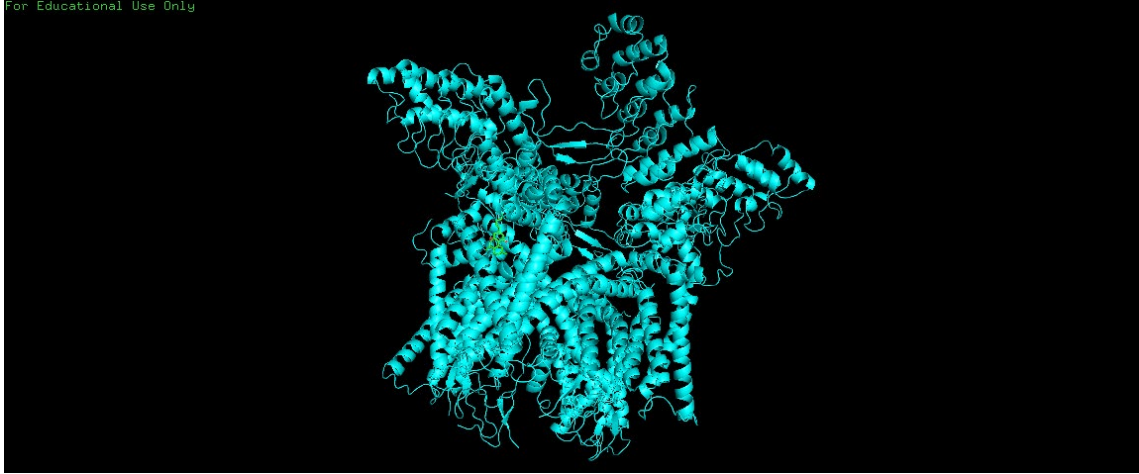
Şekil 4.57. En yüksek enerjiye sahip kanabidiol analogunun Serotonin 1A (5-HT1A) reseptörüne karşı etkileşimi

CBD, Serotonin 1A reseptörü ile Histidin 62 ile Pi Katyon bağı, Sistein 233 ile Konvensiyonel Hidrojen bağı, Fenilalanin 278 234 151 Serin 191 Arjinin 150 Valin 320 Prolin 194 ile Van Der Waals bağı, Prolin 107 ve 192 ile Alkil bağı ve Lösin 192 ile Pi Alkil bağı yapmıştır ve Şekil 4.58'de gösterilmiştir.



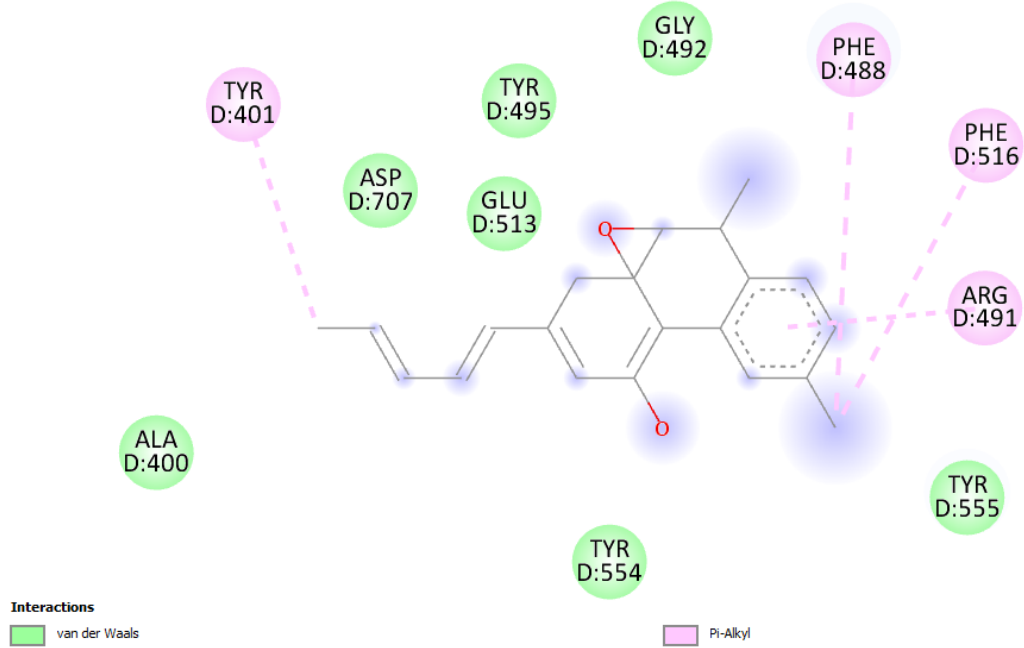
Şekil 4.58. CBD'nin Serotonin 1A (5-HT1A) reseptörüne bağlanma etkileşimlerinin iki boyutlu çizimi

TRPV1 reseptörüne karşı CBD'nin en yüksek afiniteye sahip tutunma pozisyonu Şekil 4.59'da gösterilmiştir. CBD TRPV1 reseptörüne -8,8 Kcal/mol ile bağlanmıştır.



Şekil 4.59. En yüksek enerjiye sahip kanabidiol analogunun TRPV1 reseptörüne karşı etkileşimi

CBD, TRPV1 reseptörü ile Alanin 400 Aspartat 707 Glutamat 513 Tirozin 495 554 ve 555 Glisin 492 ile Van Der Vaals bağı, Tirozin 401 Fenilalanin 488 ve 516 Arjinin 491 ile Pi Alkil bağı yapmıştır ve Şekil 4.60'ta gösterilmiştir.



Şekil 4.60. CBD'nin TRPV1 reseptörüne bağlanma etkileşimlerinin iki boyutlu çizimi

CBD'nin CB1, CB2, δ -OP, GPR55, TRPV1 ve 5-HT1A reseptörleri için Gibbs serbest enerjileri sırasıyla -9,3, -9,8, -8,8, -9,0, -7,2 Kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

Antistio Aviz-Amador ve arkadaşları LS-61176, CBD ve Tetrahidrokanabinol'ün (THC) CB1 ve CB2 kanabinoid reseptörleri üzerindeki biyolojik aktivitesini tahmin etmek için yaptıkları çalışmada moleküler yerleştirme yöntemi ile LS-61176, CBD ve THC'nin CB1 kanabinoid reseptörüne bağlanma serbest enerjileri sırasıyla -9,9 Kcal/mol, -8,5 Kcal/mol ve -9,4 Kcal/mol olarak, CB2 kanabinoid reseptörüne bağlanma serbest enerjileri ise sırasıyla -10,7 Kcal/mol, -9,3 Kcal/mol ve -10,4 Kcal/mol olarak hesaplamışlardır (Aviz-Amador ve ark., 2021). Çalışmamızda CBD ile CB1 ve CB2 bağlanma a serbest enerjileri sırasıyla -9,3 ve -9,8 Kcal/mol olarak hesaplanmış olup, Aviz-Amador ve arkadaşlarının bulgularına benzer bağlanma etkileşimleri sergiledikleri söylenebilir. Wiwit Suttithumsatid ve arkadaşları THC ve CBD'nin a-glukosidaz hedef proteini ile etkileşimlerini moleküler yerleştirme yöntemi ile incelemiş ve a-glukosidaz reseptörü ile THC'nin bağlanma serbest enerjisini -7,5 Kcal/mol, CBD'nin bağlanma serbest enerjisini -6,9 Kcal/mol olarak hesaplamışlardır. Bahsi geçen çalışmada CBD ve THC'nin iyi bir a-glukosidaz inhibitörü potansiyeline sahip olabileceği gösterilmiştir (Suttithumsatid ve ark., 2022).

Çalışmamızda CBD'nin etkileşime girdiğinde en fazla enerji uyumu gösterdiği reseptörler CB2 ve CB1 reseptörleri olarak tespit edilmiştir. GPR55 ve TRPV1 reseptörleri ile de yüksek uyum ve benzer afinite göstermiştir. Bağlanma eğilimi bu iki reseptör arasında büyük farklılıklar göstermemektedir. En düşük etkileşim ise 5-HT1A reseptörü ile gerçekleşmiştir. Franzen ve arkadaşları dişi ratlar üzerinde yaptıkları denemelerde CBD'nin şartlanılmış korkunun ifadesini, 5-HT1A'yı aktive ederek azalttığını göstermişlerdir (Franzen ve ark., 2023). Anand ve arkadaşları yetişkin sıçanlarda düşük dozlarda CBD ile TRPV1 inhibisyonunu sağlayarak akut ve kronik ağrının azaldığını tespit etmişlerdir (Anand ve ark., 2020). Whalley ve arkadaşları kronik epileptik fareler üzerinde yaptığı çalışmada CBD, GPR55'in epilepsi nöbetlerindeki rolünü değiştirmiş ve antikonvülsan etki mekanizması olduğunu göstermişlerdir (Whalley ve ark., 2018). Kathmann ve arkadaşları CBD'nin delta opioid reseptörlerinde allosterik bir modülatör olduğunu bildirmişlerdir (Kathmann ve ark., 2006).

CBD ile CB1 arasında Van Der Waals, Pi-Sigma, Pi-Pi Yığını, Alkil, Pi-Alkil etkileşimleri ve CB2 ile Van Der Waals, Alkil, Pi-Alkil etkileşimleri vardır. İnsan Delta-Opioid reseptörü ile Van Der Waals, Alkil, Pi-Alkil, Olumsuz Pozitif-Pozitif, N-OFQ Opioid reseptörü ile Van Der Waals, Alkil, Pi-Alkil, Konvensiyonel Hidrojen Bağı etkileşimleri görülmüştür. Serotonin 1A reseptörü ile Van Der Waals, Alkil, Pi-Alkil, Pi-Pi Yığını, Konvensiyonel Hidrojen Bağı, Pi-Katyon ve TRPV1 reseptörü Van Der Waals,

Pi-Alkil etkileşimleri olduğu gözlemlenmiştir. Hidrojen bağları, reseptör ve ligantların molekülünün yapısal bütünlüğünde çok önemlidir (Abelian ve ark., 2021). NH-O, OH-O, OH-N ve NH-N gibi konvansiyonel hidrojen bağları, biyomoleküler yapıdaki temel dengeleyici kuvvetleri temsil etmektedir (Horowitz ve Trievel,2012). Pi-alkil bağı gibi etkileşim türleri, reseptörün bağlanma cebindeki ligandın hidrofobik etkileşimi arttırmaktadır (Arthur ve Uzairu, 2019). İlaç özelliği gösterebilmesi için molekülün Lipinski kurallarını sağlaması gerekir. Lipinski kurallarına göre; molekülün ağırlığı 500 Da'dan küçük, hidrojen bağı vericisi sayısı 5'ten küçük, hidrojen bağı alıcısı sayısı 10'dan küçük, MLogP değeri 4,15'ten küçük değerlerde olmalıdır (Daina ve ark., 2017). İlaça benzerlik teorisine göre, CBD'nin fizikokimyasal özellikleri kabul edilebilir aralıktadır (Lipinski, 2004). Lipofilik ve suda çözünürlük değeri, gastrointestinal ilaç absorpsiyonu (GI-DA) ve kan beyin bariyeri (BBB) geçirgenliği kabul edilebilir farmakokinetik parametreler aralığında olduğu tespit edilmiştir (Kimura ve Higaki, 2002). Log Kp değeri -3,59 cm/sn ile iyi bir deri geçirgenliğine sahiptir (Bibi ve Sakata, 2017).

4.8.2. Farmakokinetik/ADMET profili

CBD'nin farmakokinetik profili, farelerde oral uygulama öldürücü doz LD₅₀ tahmini ve bir etken maddenin ilaç olarak kabul edilip edilmeyeceğini belirlemek için adsorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım profili sonuçları Çizelge 4.15'te listelenmiştir.

Çizelge 4.15. CBD'ye ait ADMET parametreleri ve Rat oral toksisite çevrimiçi SwissADME ve GUSAR tahmini

Parametre	Kanabidiol (CBD)
Kan beyin bariyeri (BBB) geçirgenliği	BBB+
Gastrointestinal ilaç emilimi (GI-DA)	GI-DA+
P-glikoprotein (P-gp) substratı	Yok
CYP1A2 inhibitörü	Yok
CYP2C19 inhibitörü	Var
CYP2C9 inhibitörü	Var
CYP2D6 inhibitörü	Var
CYP3A4 inhibitörü	Var
Günlük Kp (cilt geçirgenliği)	-3,59 cm/sn
Lipsinki Kuralı	Kabul edilebilir
(MW ≤ 500, logP ≤ 5, HBD ≤ 5, HBA ≤ 10)	MLOGP > 4.15
Biyoyararlanım Puanı	0,55
Rat LD ₅₀ öldürücü doz (mg/Kg) / OECD Sınıfı	799,2 / (IV)

Literatürde, CBD'nin ağız yoluyla uygulanmasına bağlı olarak akut toksisite raporları, 800 mg/kg ile 2460 mg/kg aralığında LD₅₀ doz değerleri göstermiştir. GUSAR

çevrimiçi tahmininde ise, *in vivo* rapor sonuçlarından daha düşük bir LD₅₀ doz değeri olan 799,2 mg/kg tahmin edilmiştir. (Beaulieu, 2005; Stohs and Ray, 2020).

Moleküler yerleştirme çalışmaları, CBD'nin CB1, CB2, δ -OP, GPR55, TRPV1 ve 5-HT1A reseptörleri için önemli afiniteye sahip bir molekül olduğunu ortaya koymuştur. Bunun yanı sıra, ADMET tahminleri, kan-beyin bariyerini yüksek bir şekilde geçebilme yeteneğiyle ilişkili olan vaskülarize organlarda (akciğer, kalp, beyin, karaciğer) yüksek bir penetrasyona sahip olduğunu göstermektedir. Moleküler yerleştirme sonuçları ve analizleri, CBD'nin tedavide kullanılabilir özellikte bir etken madde olabileceğini önermektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Bu tez çalışmasında, yumuşak jelatin teknolojisinin CBD enkapsüle PCL nanopartiküllerin uzatılmış/ modifiye salım sistemleri SR&MR olarak kenevir tohumu yağı ile çalışılması ve salım özelliklerinin incelenmesi, gıda takviyelerinde kullanılmak üzere elverişli bir dozaj formu geliştirilmesi amaçlanmıştır. CBD'nin yüksek lipofilik özellikleri, kullanım ve dozlamayı zorlaştırmakta ve farmasötik olarak yararlanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle farklı molekül ağırlıklarına sahip polikaprolakton (PCL) polimerleri kullanılarak, ultrasonik homojenleştirici ve ultra-turrax kullanılarak, emülsifikasyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile sentezlenen nanopartiküller ile optimizasyon çalışmaları yapılmış ve uygun polimer seçilerek CBD'nin kapsülmesi sağlanmıştır. Optimizasyon çalışmalarında, farklı molekül ağırlıklarının ve farklı üretim yöntemlerinin partikül boyutuna ve zeta potansiyeline etkileri değerlendirilmiştir. Ultra-Turrax ve Ultrasonik homojenizasyon yöntemleri kullanılarak elde edilen farklı molekül ağırlığına sahip PCL ile elde edilen nanopartiküllerin 3 tekrarlı şekilde boyut, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri yapılmıştır. Ultra-Turrax yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre, PCL molekül ağırlığı arttıkça nanopartikül boyutları da artmaktadır. Ortalama boyut 14 000, 45 000 ve 80 000 molekül ağırlığına sahip PCL nanopartiküller için sırasıyla $327,9 \pm 6,51$ nm, $338,1 \pm 4,46$ nm ve $392,4 \pm 13,79$ nm olarak ölçülmüştür. PDI değerleri ise, ultra-turrax ile yapılan üretimlerde 0,2'den yüksektir. Zeta potansiyeli değerleri ise, tüm örneklerde negatif bir değer almıştır ve en düşük değer $-17,17$ (mV) ile ultrasonikasyon ile elde edilen 45 000 molekül ağırlığına sahip PCL nanopartiküllerde ölçülmüştür. Ultrasonikasyon yöntemi kullanarak elde edilen sonuçlara göre, 14 000 molekül ağırlığına sahip PCL nanopartiküllerin boyutları Ultra-Turrax yöntemine göre daha küçüktür ve $207,5 \pm 0,45$ nm olarak ölçülmüştür. 45 000 ve 80 000 PCL molekül ağırlığına sahip nanopartiküllerin boyutları ise, Ultra-Turrax yöntemi ile elde edilen sonuçlara benzerdir. Tüm örneklerde, PDI değerleri 0,2'den düşüktür ve en düşük PDI değeri 80 000 PCL molekül ağırlığına sahip nanopartiküllerde ölçülmüştür. Zeta potansiyeli değerleri, tüm örneklerde negatif bir değer almıştır ve en düşük değer $-24,11$ (mV) ile 80 000 PCL molekül ağırlığına sahip nanopartiküllerde ölçülmüştür. Ayrıca, 14 000 PCL molekül ağırlığına sahip nanopartiküllerin boyutları $0,2$ μ m gözenek çapına sahip filtre ile süzildükten sonra daha da küçülmüştür ve $202,4 \pm 6,36$ nm olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak, PCL molekül ağırlığının nanopartikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli üzerinde belirgin bir etkisi olduğu görülmüştür. Sonuçlar değerlendirildiğinde çalışmalara, 14 000

MA'ya sahip PCL ve %72 genlikle ultrasonik homojenleştirici kullanılarak devam edilmesine karar verilmiştir.

Optimizasyon sonrası elde edilmiş plasebo NP'ler ve 5mg, 10 mg, 15 mg ve 30 mg CBD enkapsüle PCL NP için sırasıyla -23,37, -10,21, -9,62, -9,93 ve -9,40 mV'lik potansiyel değerleri tayin edilmiştir. Ayrıca, plasebo NP'ler ve 5 mg, 10 mg, 15 mg ve 30 mg CBD enkapsüle PCL NP'lerin sırasıyla ortalama 207,5 nm, 227,2 nm, 225,5 nm, 227,7 nm ve 216,9 nm boyuta sahip oldukları belirlenmiştir. Plasebo PCL nanopartiküllerin morfolojik özellikleri, alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelendi ve elde edilen sonuçlara göre, Stem görüntülerinde düzgün küresel nanopartiküller elde edilirken, FE-SEM görüntülerinde neredeyse küresele yakın şekilsiz nanopartiküller görülmüştür. FE-SEM görüntüleri, tamamen polimerik bir yapıya sahip katı nanopartiküller elde edildiğini doğruladı. Genel olarak, sıvı ortamda bulunan nanopartiküllerin STEM sonuçları ile kurutulmuş partiküllere ait FE-SEM görüntüleri birbirleri ile tamamen tutarlıdır. NP'lerin DSC analizi ile etken madde-polimer uyumluluğu ortaya çıkartılmıştır. Ayrıca, FT-IR analizi sonuçlarıyla, CBD'nin NP'ler içine kapsüllendiği gösterilmiştir.

In vitro salım çalışmaları sonucunda, CBD ekapsüle PCL nanopartiküllerin hidrofobik karakteri ve yavaş bozunma oranı nedeniyle ilacın yavaş ve uzun bir süre boyunca salındığı tespit edilmiştir. Ayrıca, tercih edilen PCL nanopartiküllerin uzatılmış salım yapması nedeniyle salım çalışmaları mide ortamı pH 1,2'de 8 saat ve bağırsak ortamı pH 7,4'te 96 saate kadar uzatılmıştır. Bağırsak ortamında 96. saatin sonunda 5 mg, 10 mg, 15 mg ve 30 mg CBD enkapsüle PCL nanopartiküller sırasıyla %71,84, %79,47, %88,16 ve %94,28'lik bir salım gerçekleşmiştir. pH 1,2 mide ortamında ise için %9,23, %12,39, %12,95 ve %16,60 salım gerçekleşmiştir. CBD enkapsüle PCL NP'lerinin pH 7,4 bağırsak ortamında Higuchi kinetik modeline göre salındığı ve bu modele göre ilacın salım miktarının zamanla azaldığı görülmektedir. Ayrıca, ilacın çözünme süreci ilerledikçe, ilacın salındığı alanın azaldığı dikkat çekmiştir. pH 1,2 mide ortamında Sıfırıncı Derece Salım Kinetik modeli ile uyumludur ve ilacın derişiminden bağımsız olarak aynı miktarlarda salındığını göstermektedir.

CBD'nin çeşitli reseptörlerle etkileşiminin incelenmesi için moleküler yerleştirme yöntemi kullanılarak *in silico* analizleri yapılmıştır ve CBD'nin reseptörlerle etkileşimi hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. CBD'nin reseptörler üzerindeki yapısal davranışları, afinitesi ve toksisitesi değerlendirilmiştir. Bu analizler, CBD'nin çeşitli hastalıkların tedavisinde etkili olabileceğini göstermektedir.

Sonuçlar, CBD enkapsüle PCL NP'lerinin kenevir tohumu yağıyla birlikte, yumuşak jelatin kapsül formunda bir gıda takviyesi olarak uygun olduğunu göstermiştir. Gıda takviyesi uygulaması için kullanılmak üzere elde edilen kenevir tohumu yağının yumuşak jelatin kapsül formunda prototip üretimi gerçekleştirilerek ambalajlanmıştır. Kapsülün, uzun süreli CBD salımı yaparak serbest CBD tüketimine göre terapötik avantajlara sahip olduğu söylenebilir.

5.2 Öneriler

Bu tez çalışmasında geliştirilen CBD enkapsüle PCL NP'lerin öncelikle üç boyutlu hastalık doku modelleri üzerinde denemeleri, daha sonra *in vivo* klinik öncesi çalışmaları yapılabilir. Bu çalışmalar, ilacın emilim hızı, metabolizması, güvenilirliği ve etkinliği gibi faktörleri aydınlatmayı sağlayacaktır.

Bu çalışmada polikaprolakton polimeri kullanılmıştır. Farklı polimerlerin kullanımı ya da kopolimer kullanımı da potansiyel olarak incelenebilir. Farklı polimerlerin kullanımı, NP'lerin boyutu, yüzey özellikleri, etken madde tutma kapasitesi ve salım hızı gibi özellikleri üzerinde farklı etkileri araştırılabilir. Ayrıca lipitler, proteinler veya karbonhidratlar gibi farklı bileşenlerin kullanımı ile hedef proteine hedeflendirme yapılarak biyolojik etkinliği artırılabilir.

CBD'nin farklı ilaçlarla kombinasyonu da düşünülebilir. İki veya daha fazla etken maddenin birleştirilerek, ilaçların terapötik etkilerini arttırabilecek veya ilaç yan etkilerini azaltabilecek kombinasyonlar elde edilebilir.

Bu çalışmada 5 mg, 10 mg, 15 mg ve 30 mg CBD dozajları kullanılmıştır. Farklı dozajlar da incelenebilir ve NP'lerin farklı dozajlarda kullanımının etkisi araştırılabilir.

CBD enkapsüle PCL NP'lerin depolama süresi ve depolama koşulları da araştırılabilir. Bu, NP'lerin uzun süreli depolanmasının mümkün olup olmadığını ve stabilitesinin nasıl etkilenebileceğini belirleyebilir.

Nihai ürün eldesi olarak yumuşak jelatin kapsüller yerine sert kapsül uygulamaları, ilaç formülasyonlarının stabilitesi ve depolama süresi açısından daha avantajlı olabilir.

CBD enkapsüle NP'ler, ultrasonik homojenleştirici ve Ultra-Turrax kullanılarak sentezlenmiştir. Farklı üretim yöntemleri ile NP'lerin üretim sürecini optimize etmek, maliyetleri düşürmek ve üretim kalitesini artırmak için çalışmalar yürütülebilir.

CBD'nin NP'lerin in silico olarak farklı hastalıkların tedavisinde kullanılabilirliğini, örneğin anti-enflamatuar etkilerinin araştırılması için artrit modellerinde test edilebilirliği incelenebilir.

6. KAYNAKLAR

- Abamor, E. S., Tosyali, O. A., Bagirova, M., & Allahverdiyev, A. (2018). Nigella sativa oil entrapped polycaprolactone nanoparticles for leishmaniasis treatment. In IET Nanobiotechnology (Vol. 12, Issue 8, pp. 1018–1026). Institution of Engineering and Technology (IET). <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5115>
- Abamor, E. Ş. (2018). A New Approach To The Treatment of Leishmaniasis: Quercetin-Loaded Polycaprolactone Nanoparticles. In Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry (pp. 1071–1082). Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.417831>
- Abbasi, A. M., Khan, S. M., Ahmad, M., Khan, M. A., Quave, C. L., & Pieroni, A. (2013). Botanical ethnoveterinary therapies in three districts of the Lesser Himalayas of Pakistan. In Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine (Vol. 9, Issue 1). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-9-84>
- Abel, E. L. (1980). Marihuana. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2189-5>
- Abelian, A., Dybek, M., Wallach, J., Gaye, B., & Adejare, A. (2021). Pharmaceutical chemistry. In Remington (pp. 105-128). Academic Press.
- Adams, R., Hunt, M., & Clark, J. H. (1940). Structure of cannabidiol, a product isolated from the marihuana extract of Minnesota wild hemp. Journal of the American Chemical Society, 62, 196-200.
- Akhtar, N., Rashid, A., Murad, W., & Bergmeier, E. (2013). Diversity and use of ethnomedicinal plants in the region of Swat, North Pakistan. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 9, 25.
- Aldrich, M. (1997). History of therapeutic cannabis. In M. L. Mathre (Ed.), Cannabis in Medical Practice: A Legal, Historical and Pharmacological Overview of the Therapeutic use of Marijuana (pp. 35-55). McFarland & Co.: Jefferson, NC, and London. (ISBN 0786403616).
- Alex, A. T., Joseph, A., Shavi, G., Rao, J. V., & Udupa, N. (2014). Development and evaluation of carboplatin-loaded PCL nanoparticles for intranasal delivery. In Drug Delivery (Vol. 23, Issue 7, pp. 2144–2153). Informa UK Limited. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.948643>
- Anand, U., Jones, B., Korchev, Y., Bloom, S. R., Pacchetti, B., Anand, P., & Sodergren, M. H. (2020). CBD effects on TRPV1 signaling pathways in cultured DRG neurons. Journal of Pain Research, 13, 2269. <https://doi.org/10.2147/jpr.s258433>
- Anderson, B. R., & Scurlock, J. (2005). Diagnoses in Assyrian and Babylonian Medicine. University of Illinois Press: Champaign, Illinois, United States. (ISBN 0252029569)
- Andre, C. M., Hausman, J.-F., & Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules. Frontiers in Plant Science, 7, 19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>.
- Andriotis, E. G., Monou, P.-K., Louka, A., Papaefstathiou, E., Eleftheriadis, G. K., & Fatouros, D. G. (2020). Development of food grade 3D printable ink based on pectin containing cannabidiol/cyclodextrin inclusion complexes. Drug Development and Industrial Pharmacy, 46(10), 1569–1577. doi:10.1080/03639045.2020.1791168
- Anonim (2013). Türk Gıda Kodeksi Takviye Edici Gıdalar Tebliği. Ağustos 2013 (Tebliğ No: 2013/49), Resmi Gazete Tarihi: 16.08.2013, Sayısı: 28737.
- Anton, N., Benoit, J.-P., & Saulnier, P. (2008). Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. In Journal of Controlled

- Release (Vol. 128, Issue 3, pp. 185–199). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.02.007>
- Anwar, F., Latif, S., & Ashraf, M. (2006). Analytical characterization of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil from different agro-ecological zones of Pakistan. In *Journal of the American Oil Chemists' Society* (Vol. 83, Issue 4, pp. 323–329). Wiley. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-1207-x>
- Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S., & Keryn, J. M. (2010). Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer Degradation and Stability*, 95(11), 2126-2146.
- Arthur, D. E., ve Uzairu, A. (2019). Molecular docking studies on the interaction of NCI anticancer analogues with human Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit. In *Journal of King Saud University - Science* (Vol. 31, Issue 4, pp. 1151–1166). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.01.011>
- Asaad, M. Y. (2022). Türkiye piyasasında bulunan CHIA (*salvia hispanica* l.) tohumu yağı içeren yumuşak jelatin kapsüller üzerinde kalite kontrol çalışmaları (Publication No. 715427) [Masterdissertation, MersinUniversity].
- Atalay, D., & Erge, H. S. (2018). DIETARY SUPPLEMENTS AND THEIR EFFECTS ON HEALTH. In *Food and Health* (pp. 98–111). Scientific Web Journals (SWJ). <https://doi.org/10.3153/fh18010>
- Ateş, M. (2018). Nanoparçacıkların ölçme ve inceleme teknikleri [Measurement and examination techniques for nanoparticles]. *Turkish Journal of Scientific Reviews*, 11(1), 63-69. E-ISSN: 2146-0132.
- Aviz-Amador, A., Contreras-Puentes, N., & Mercado-Camargo, J. (2021). Virtual screening using docking and molecular dynamics of cannabinoid analogs against CB1 and CB2 receptors. In *Computational Biology and Chemistry* (Vol. 95, p. 107590). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2021.107590>
- Babson, K. A., Sottile, J., & Morabito, D. (2017). Cannabis, cannabinoids, and sleep: A review of the literature. *Current Psychiatry Reports*, 19, 23. <https://doi.org/10.1007/s11920-017-0775-9>.
- Badri, W., Miladi, K., Robin, S., Viennet, C., Nazari, Q. A., Agusti, G., Fessi, H., & Elaissari, A. (2017). Polycaprolactone Based Nanoparticles Loaded with Indomethacin for Anti-Inflammatory Therapy: From Preparation to Ex Vivo Study. In *Pharmaceutical Research* (Vol. 34, Issue 9, pp. 1773–1783). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2166-7>
- Beaulieu, P. (2005). Toxic Effects of Cannabis and Cannabinoids: Animal Data. In *Pain Research and Management* (Vol. 10, Issue suppl a, pp. 23A-26A). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2005/763623>
- Benza, H. I., & Munyendo, W. L. L. (2011). A review of progress and challenges in soft gelatin capsules formulations for oral administration. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 10(1), Article-004, ISSN 0976-044X. Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, 24 Tongji Xiang Nanjing 210009, P.R. CHINA.
- Bergamaschi, M.M., Queiroz, R.H.C., Chagas, M.H.N., De Oliveira, D.C.G., De Martinis, B.S., Kapczinski, F., Martín-Santos, R. (2011). Cannabidiol reduces the anxiety induced by simulated public speaking in treatment-naïve social phobia patients. *Neuropsychopharmacology*, 36(6), 1219.
- Berman, H. M. (2000). The Protein Data Bank. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 28, Issue 1, pp. 235–242). Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>

- Bibi, S., & Sakata, K. (2017). An Integrated Computational Approach for Plant-Based Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 1 Inhibitors. In *Current Computer-Aided Drug Design* (Vol. 13, Issue 4). Bentham Science Publishers Ltd. <https://doi.org/10.2174/1573409913666170406145607>
- Brenneisen, R. (2007). Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other Cannabis constituents. In M.A. ElSohly (Ed.), *Marijuana and the Cannabinoids*. Forensic Science and Medicine (pp. 17–49). Humana Press, New York, United States. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-947-9_2.
- Brode, G. L., & Koleske, J. V. (1972). Lactone polymerization and polymer properties. *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry*, 6, 1109-1144. doi: 10.1080/00222337208061411
- Bruschi, M. L. (2015). 5 - Mathematical models of drug release, *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* (pp. 63-86). Woodhead Publishing.
- Byun, Y., Hwang, J. B., Bang, S. H., Darby, D., Cooksey, K., Dawson, P. L., Park, H. J., & Whiteside, S. (2011). Formulation and characterization of α -tocopherol loaded poly ϵ -caprolactone (PCL) nanoparticles. In *LWT - Food Science and Technology* (Vol. 44, Issue 1, pp. 24–28). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.032>
- Cadenas, E., & Davies, K. J. A. (2000). Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3–4), 222–230. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00317-8)
- Carod-Artal, F.J. (2013). Psychoactive plants in ancient Greece. *Neuroscience & History*, 1, 28–38. <http://nah.sen.es/en/130-journals/volume-1/issue-1/241-psychoactive-plants-in-ancient-greece>.
- Cerino, P., Buonerba, C., Cannazza, G., D’Auria, J., Ottoni, E., Fulgione, A., Di Stasio, A., Pierri, B., & Gallo, A. (2021). A Review of Hemp as Food and Nutritional Supplement. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 6(1), 19–27. <https://doi.org/10.1089/can.2020.0001>
- Chandra, R., & Rustgi, R. (1998). Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, 23, 1273–1335.
- Chen, C., & Pan, Z. (2021). Cannabidiol and terpenes from hemp – ingredients for future foods and processing technologies. In *Journal of Future Foods* (Vol. 1, Issue 2, pp. 113–127). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.01.001>
- Chen, J., Li, S., & Shen, Q. (2012). Folic acid and cell-penetrating peptide conjugated PLGA–PEG bifunctional nanoparticles for vincristine sulfate delivery. In *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 47, Issue 2, pp. 430–443). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.07.002>
- Cherney, J.H., Small, E. (2016). Industrial hemp in North America: production, politics and potential. *Agronomy*, 6, 58. <https://doi.org/10.3390/agronomy6040058>.
- Clarke, R.C., Merlin, M.D. (2013). *Cannabis, Evolution and Ethnobotany*. University of California Press, Berkeley, California, United States, pp. 60–66. (ISBN 9780520292482)
- Crucho, C. I. C., & Barros, M. T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering C*, 80, 771-784.
- Cunha, J., Carlini, E. A., Pereira, A. E., Ramos, O. L., Pimentel, C., Gagliardi, R., Sanvito, W. L., Lander, N., & Mechoulam, R. (1980). Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology*, 21, 175-185.

- Çelebi, Ş., Kaya, H., & Kaya, A. (2017). Omega-3 Yağ Asitlerinin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Alinteri Zirai Bilimler Dergisi*, 32(2), 105–112. <https://doi.org/10.28955/alinterizbd.319437>
- Çetin, F. (2023). Mide kanserine karşı 5-fluorourasil ve timokinon yüklü polikaprolakton tabanlı nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi (Yüksek lisans tezi). Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı.
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. In *Scientific Reports* (Vol. 7, Issue 1). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. In *Pharmaceutics* (Vol. 10, Issue 2, p. 57). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Danafar, H., Davaran, S., Rostamizadeh, K., Valizadeh, H., & Hamidi, M. (2014). Biodegradable m-PEG/PCL Core-Shell Micelles: Preparation and Characterization as a Sustained Release Formulation for Curcumin. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*; eISSN 2251-7308. <https://doi.org/10.5681/APB.2014.074>
- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 67, 217-223.
- Dash, T.K. & Konkimalla, V.B. (2012). Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release*, 158, 15-33.
- De La Ossa, D. H. P., Ligresti, A., Gil-Alegre, M. E., Aberturas, M. R., Molpeceres, J., Di Marzo, V., & Suárez, A. T. (2012). Poly-ε-caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: Development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficacy. *Journal of controlled release*, 161(3), 927-932.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.-C., & Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. In *Nature* (Vol. 372, Issue 6507, pp. 686–691). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1038/372686a0>
- Diyanat, M., Saeidian, H., Baziari, S., & Mirjafary, Z. (2019). Preparation and characterization of polycaprolactone nanocapsules containing pretilachlor as a herbicide nanocarrier. In *Environmental Science and Pollution Research* (Vol. 26, Issue 21, pp. 21579–21588). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05257-0>
- Dorati, R., Conti, B., Colzani, B., Dondi, D., Lazzaroni, S., Modena, T., & Genta, I. (2018). Ivermectin controlled release implants based on poly-D, l-lactide and poly-ε-caprolactone. In *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (Vol. 46, pp. 101–110). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.04.014>
- Dragone, D., Prarolo, G., Vanin, P., & Zanella, G. (2019). Crime and the legalization of recreational marijuana. In *Journal of Economic Behavior & Organization* (Vol. 159, pp. 488–501). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jebo.2018.02.005>
- Dunford, N. (2020). Hemp Seed Oil Properties. Oklahoma State University. <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:5sKTGmRJKdAJ:https://>

- /shareok.org/rest/bitstreams/1f222da4-afda-4ce6-acb9-f49e363612ab/retrieve+&cd=1&hl=tr&ct=clnk&gl=tr
- ElSohly, M. A., Radwan, M. M., Gul, W., Chandra, S., & Galal, A. (2017). Phytochemistry of Cannabis sativa L. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (pp. 1–36). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_1
- Epstein, H.A. (2010). A natural approach to soothing atopic skin. *Skinmed*, 8, 95-97.
- Farinon, B., Molinari, R., Costantini, L., & Merendino, N. (2020). The seed of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional Quality and Potential Functionality for Human Health and Nutrition. *Nutrients*, 12, 1935.
- Fathordoobady, F., Singh, A., Kitts, D. D., & Pratap Singh, A. (2019). Hemp (*Cannabis Sativa* L.) Extract: Anti-Microbial Properties, Methods of Extraction, and Potential Oral Delivery. In *Food Reviews International* (Vol. 35, Issue 7, pp. 664–684). Informa UK Limited. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1600539>
- Fong, J. W. (1983). U.S. Patent No. 4,384,975. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Fraguas-Sánchez, A. I., Torres-Suárez, A. I., Cohen, M., Delie, F., Bastida-Ruiz, D., Yart, L., Martin-Sabroso, C., & Fernández-Carballido, A. (2020). PLGA Nanoparticles for the Intraperitoneal Administration of CBD in the Treatment of Ovarian Cancer: In Vitro and In Ovo Assessment. In *Pharmaceutics* (Vol. 12, Issue 5, p. 439). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050439>
- Franzen, J. M., Werle, I., Vanz, F., de Oliveira, B. B., Martins Nascimento, L. M., Guimarães, F. S., & Bertoglio, L. J. (2023). Cannabidiol attenuates fear memory expression in female rats via hippocampal 5-HT1A but not CB1 or CB2 receptors. In *Neuropharmacology* (Vol. 223, p. 109316). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109316>
- Garcia, F. L., Ma, S., Dave, A., & Acevedo-fani, A. (2021). Structural and Physicochemical Characteristics of Oil Bodies from Hemp Seeds (*Cannabis sativa* L.). *Foods*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/foods10122930>
- Goodarzi, F., & Zendehboudi, S. (2018). A Comprehensive Review on Emulsions and Emulsion Stability in Chemical and Energy Industries. In *The Canadian Journal of Chemical Engineering* (Vol. 97, Issue 1, pp. 281–309). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cjce.23336>
- Grabnar, P. A., & Kristl, J. (2011). The manufacturing techniques of drug-loaded polymeric nanoparticles from preformed polymers. *Journal of Microencapsulation*, 28(4), 323-335.
- Guerreiro, L. H., Da Silva, D., Ricci-Junior, E., Girard-Dias, W., Mascarenhas, C. M., Sola-Penna, M., Miranda, K., & Lima, L. M. T. R. (2012). Polymeric particles for the controlled release of human amylin. In *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (Vol. 94, pp. 101–106). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.01.021>
- Gullapalli, R. P. (2010). Soft Gelatin Capsules (Softgels). In *Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 99, Issue 10, pp. 4107–4148). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1002/jps.22151>
- Gurny, R., Peppas, N. A., Harrington, D. D., & Banker, G. S. (1981). Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 7, 1-25.
- Gurpret, K., & Singh, S. K. (2018). Review of Nanoemulsion Formulation and Characterization Techniques. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(5).

- OMICS Publishing Group. <https://doi.org/10.4172/pharmaceutical-sciences.1000422>
- Håkansson, A. (2018). Rotor-Stator Mixers: From Batch to Continuous Mode of Operation—A Review. In *Processes* (Vol. 6, Issue 4, p. 32). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pr6040032>
- Hampson, A.J., Grimaldi, M., Axelrod, J., Wink, D. (1998). Cannabidiol and (-) Δ^9 -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), 8268-8273.
- He, N., Li, L., Wang, P., Zhang, J., Chen, J., & Zhao, J. (2019). Dioxide/chitosan/poly(lactide-co-caprolactone) composite membrane with efficient cu(II) adsorption. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 580, 123687.
- Hernán Pérez de la Ossa, D., Ligresti, A., Gil-Alegre, M. E., Aberturas, M. R., Molpeceres, J., Di Marzo, V., & Torres Suárez, A. I. (2012). Poly- ϵ -caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: Development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficacy. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 161, Issue 3, pp. 927–932). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.05.003>
- Heyser, C.J., Hampson, R.E., & Deadwyler, S.A. (1993). Effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on delayed match to sample performance in rats: Alterations in short-term memory associated with changes in task specific firing of hippocampal cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 264(1), 294-307.
- Higuchi, T. (1963). Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52, 1145-1149.
- Horowitz, S., & Trievel, R. C. (2012). Carbon-Oxygen Hydrogen Bonding in Biological Structure and Function. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 287, Issue 50, pp. 41576–41582). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1074/jbc.r112.418574>
- Iffland, K., & Grotenhermen, F. (2017). An update on safety and side effects of cannabidiol: A review of clinical data and relevant animal studies on chronic CBD administration. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2(1), 139-154.
- Iqbal, M., Valour, J.-P., Fessi, H., & Elaissari, A. (2014). Preparation of biodegradable PCL particles via double emulsion evaporation method using ultrasound technique. In *Colloid and Polymer Science* (Vol. 293, Issue 3, pp. 861–873). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s00396-014-3464-9>
- Iuvone, T., Esposito, G., De Filippis, D., Scuderi, C., & Steardo, L. (2009). Cannabidiol: A promising drug for neurodegenerative disorders? *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 15(1), 65-75.
- Izzo, A. A., & Camilleri, M. (2009). Cannabinoids in intestinal inflammation and cancer. *Pharmacological Research*, 60(2), 117-125.
- Izzo, A. A., & Coutts, A. A. (2005). Cannabinoids and the digestive tract. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 168, 573-598.
- İlyasoğlu, H. ve El, S.N. (2010). Nanoemülsiyonlar: Oluşumları, yapıları ve kolloidal salınım sistemleri olarak gıda sektöründe kullanım alanları. *GIDA*, 35(2), 143-150.
- Jamontt, J. M., Molleman, A., Pertwee, R. G., & Parsons, M. E. (2012). The effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol alone and in combination on damage, inflammation and in vitro motility disturbances in rat colitis. *British Journal of Pharmacology*, 160(3), 712-723.

- Javaid, S., Ahmad, N. M., Mahmood, A., Nasir, H., Iqbal, M., Ahmad, N., & Irshad, S. (2021). Cefotaxime Loaded Polycaprolactone Based Polymeric Nanoparticles with Antifouling Properties for In-Vitro Drug Release Applications. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 13, p. 2180). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym13132180>
- Jeong, M., Cho, J., Shin, J.-I., Jeon, Y.-J., Kim, J.-H., Lee, S.-J., Kim, E.-S., & Lee, K. (2014). Hempseed oil induces reactive oxygen species- and C/EBP homologous protein-mediated apoptosis in MH7A human rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cells. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 154, Issue 3, pp. 745–752). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.052>
- Jiang, H.-E., Li, X., Zhao, Y.-X., Ferguson, D. K., Hueber, F., Bera, S., Wang, Y.-F., Zhao, L.-C., Liu, C.-J., & Li, C.-S. (2006). A new insight into *Cannabis sativa* (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 108, Issue 3, pp. 414–422). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.05.034>
- Kang, Y. M., Lee, S. H., Lee, J. Y., Son, J. S., Kim, B. S., Lee, B., Chun, H. J., Min, B. H., Kim, J. H., & Kim, M. S. (2010). A biodegradable, injectable, gel system based on MPEG-b-(PCL-ran-PLLA) diblock copolymers with an adjustable therapeutic window. In *Biomaterials* (Vol. 31, Issue 9, pp. 2453–2460). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.115>
- Kathmann, M., Flau, K., Redmer, A., Tränkle, C., & Schlicker, E. (2006). Cannabidiol is an allosteric modulator at mu-and delta-opioid receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 372(5), 354-361.
- Khuroo, T., Verma, D., Khuroo, A., Ali, A., & Iqbal, Z. (2018). Simultaneous delivery of paclitaxel and erlotinib from dual drug loaded PLGA nanoparticles: Formulation development, thorough optimization and in vitro release. In *Journal of Molecular Liquids* (Vol. 257, pp. 52–68). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.02.091>
- Kızıllhan, E. (2022). Kontrollü İlaç Salımı İçin Hidrojel ve Organogel Hibrit Materyallerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu [Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı].
- Kimura, T., & Higaki, K. (2002). Gastrointestinal Transit and Drug Absorption. In *Biological & Pharmaceutical Bulletin* (Vol. 25, Issue 2, pp. 149–164). Pharmaceutical Society of Japan. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.149>
- Kolluru, L. P., Chandran, T., Shastri, P. N., Rizvi, S. A. A., & D'Souza, M. J. (2020). Development and evaluation of polycaprolactone based docetaxel nanoparticle formulation for targeted breast cancer therapy. In *Journal of Nanoparticle Research* (Vol. 22, Issue 12). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s11051-020-05096-y>
- Kumar, M., Bishnoi, R. S., Shukla, A. K., & Jain, C. P. (2019). Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. In *Preventive Nutrition and Food Science* (Vol. 24, Issue 3, pp. 225–234). The Korean Society of Food Science and Nutrition. <https://doi.org/10.3746/pnf.2019.24.3.225>
- Kunwar, R. M., Shrestha, K. P., & Bussmann, R. W. (2010). Traditional herbal medicine in Far-west Nepal: a pharmacological appraisal. In *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* (Vol. 6, Issue 1). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-6-35>
- Kupikowska-Stobba, B., & Kasprzak, M. (2021). Fabrication of nanoparticles for bone regeneration: new insight into applications of nanoemulsion technology. In *Journal*

- of Materials Chemistry B (Vol. 9, Issue 26, pp. 5221–5244). Royal Society of Chemistry (RSC). <https://doi.org/10.1039/d1tb00559f>
- Labet, M., & Thielemans, W. (2009). Synthesis of polycaprolactone: a review. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 38, Issue 12, p. 3484). Royal Society of Chemistry (RSC). <https://doi.org/10.1039/b820162p>
- Lagunin, A., Zakharov, A., Filimonov, D., & Poroikov, V. (2011). QSAR Modelling of Rat Acute Toxicity on the Basis of PASS Prediction. In *Molecular Informatics* (Vol. 30, Issues 2–3, pp. 241–250). Wiley. <https://doi.org/10.1002/minf.201000151>
- Lahat, A., Lang, A., & Ben-Horin, S. (2012). Impact of cannabis treatment on the quality of life, weight and clinical disease activity in inflammatory bowel disease patients: A pilot prospective study. *Digestion*, 85(1), 1-8.
- Lamprecht, A., Ubrich, N., Hombreiro Pérez, M., Lehr, C.-M., Hoffman, M., & Maincent, P. (2000). Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 196, Issue 2, pp. 177–182). Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(99\)00422-6](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(99)00422-6)
- Lan, Y., Zha, F., Peckrul, A., Hanson, B., Johnson, B., Rao, J., & Chen, B. (2019). Genotype x Environmental Effects on Yielding Ability and Seed Chemical Composition of Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) Varieties Grown in North Dakota, USA. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96(12), 1417–1425. <https://doi.org/10.1002/aocs.12291>
- Lee, M. A. (2013). *Smoke signals: A social history of marijuana: Medical, recreational and scientific*. Scribner Paperback Edition. New York. (ISBN 1439102600).
- Leson, G. (2003). *Nutritional Profile and Benefits of Hemp Seed, Nut and Oil*. The Veto Hemp Report, USA/Brattleboro, 1540–1580.
- Li, H.-L. (1973). An archaeological and historical account of cannabis in China. In *Economic Botany* (Vol. 28, Issue 4, pp. 437–448). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/bf02862859>
- Lipinski, C. A. (2004). Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. In *Drug Discovery Today: Technologies* (Vol. 1, Issue 4, pp. 337–341). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>
- Maali, A., & Mosavian, M. T. H. (2013). Preparation and Application of Nanoemulsions in the Last Decade (2000–2010). In *Journal of Dispersion Science and Technology* (Vol. 34, Issue 1, pp. 92–105). Informa UK Limited. <https://doi.org/10.1080/01932691.2011.648498>
- Mahmoudi, M., Saeidian, H., Mirjafary, Z., & Mokhtari, J. (2020). Preparation and characterization of memantine loaded polycaprolactone nanocapsules for Alzheimer's disease. In *Journal of Porous Materials* (Vol. 28, Issue 1, pp. 205–212). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s10934-020-00981-2>
- Mahmoudi, M., Saeidian, H., Mirjafary, Z., & Mokhtari, J. (2021). Controlled Release 7-Methoxytacrine-Polycaprolactone Nanocapsules Drug-Delivery System for Alzheimer's Disease Treatment: Synthesis and Physico-Chemical Characterization. In *Journal of Polymers and the Environment* (Vol. 30, Issue 6, pp. 2280–2290). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02349-2>
- Mato, S., Victoria Sánchez-Gómez, M., & Matute, C. (2010). Cannabidiol induces intracellular calcium elevation and cytotoxicity in oligodendrocytes. In *Glia* (Vol. 58, Issue 14, pp. 1739–1747). Wiley. <https://doi.org/10.1002/glia.21044>

- Mauger, J. W., Chilko, D., & Howard, S. (1986). On the analysis of dissolution data. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 12, 969-992.
- McKeen, L. (2021). The effect of heat aging on the properties of sustainable polymers. In *The Effect of Long Term Thermal Exposure on Plastics and Elastomers* (pp. 313–332). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85436-8.00001-1>
- Mechoulam, R., & Gaoni, Y. (1965). A Total Synthesis of dl- Δ^1 -Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish¹. In *Journal of the American Chemical Society* (Vol. 87, Issue 14, pp. 3273–3275). American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/ja01092a065>
- Mechoulam, R., & Hanuš, L. (2002). Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: chemical aspects. In *Chemistry and Physics of Lipids* (Vol. 121, Issues 1–2, pp. 35–43). Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/s0009-3084\(02\)00144-5](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(02)00144-5)
- Mechoulam, R., & Shvo, Y. (1963). Hashish. I. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron*, 19, 2073-2078.
- Mechoulam, R., Shani, A., Edery, H., & Grunfeld, Y. (1970). Chemical basis of hashish activity. *Science*, 169(3946), 611-612.
- Mehmedic, Z., Chandra, S., Slade, D., Denham, H., Foster, S., Patel, A. S., Ross, S. A., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2010). Potency trends of Δ^9 -THC and other cannabinoids in confiscated cannabis preparations from 1993 to 2008. *Journal of Forensic Sciences*, 55(5), 1209-1217
- Mello, V. A. de, & Ricci-Júnior, E. (2011). Encapsulation of naproxen in nanostructured system: structural characterization and in vitro release studies. In *Química Nova* (Vol. 34, Issue 6, pp. 933–939). FapUNIFESP (SciELO). <https://doi.org/10.1590/s0100-40422011000600004>
- Mercuri, A. M., Accorsi, C. A., & Bandini Mazzanti, M. (2002). The long history of Cannabis and its cultivation by the Romans in central Italy, shown by pollen records from Lago Albano and Lago di Nemi. In *Vegetation History and Archaeobotany* (Vol. 11, Issue 4, pp. 263–276). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s003340200039>
- Merlin, M. D. (2003). COVER ARTICLE: Archaeological Evidence for the Tradition of Psychoactive Plant Use in the Old World. In *Economic Botany* (Vol. 57, Issue 3, pp. 295–323). Springer Science and Business Media LLC. [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2003\)057\[0295:aefcto\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2003)057[0295:aefcto]2.0.co;2)
- Mikulcova, V., Kasparkova, V., Humpolicek, P., & Bunkova, L. (2017). Formulation, Characterization and Properties of Hemp Seed Oil and Its Emulsions. *Molecules*, 22(700), 13. <https://doi.org/10.3390/molekuller22050700>
- Mohanraj, V.J., Chen, Y. (2006). Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), 561-573.
- Monteiro, M. S. S. B., Lunz, J., Sebastião, P. J., & Tavares, M. I. B. (2016). Evaluation of Nevirapine Release Kinetics from Polycaprolactone Hybrids. In *Materials Sciences and Applications* (Vol. 07, Issue 11, pp. 680–701). Scientific Research Publishing, Inc. <https://doi.org/10.4236/msa.2016.711055>
- Montserrat-de la Paz, S., Marín-Aguilar, F., García-Giménez, M. D., & Fernández-Arche, M. A. (2014). Hemp (*Cannabis sativa* L.) Seed Oil: Analytical and Phytochemical Characterization of the Unsaponifiable Fraction. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 62, Issue 5, pp. 1105–1110). American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/jf404278q>
- Moqejwa, T., Marimuthu, T., Kondiah, P. P. D., & Choonara, Y. E. (2022). Development of Stable Nano-Sized Transfersomes as a Rectal Colloid for Enhanced Delivery of

- Cannabidiol. In *Pharmaceutics* (Vol. 14, Issue 4, p. 703). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040703>
- Nair, L.S. & Laurencin, C.T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 32, 762-798.
- Namsa, N. D., Mandal, M., Tangjang, S., & Mandal, S. C. (2011). Ethnobotany of the Monpa ethnic group at Arunachal Pradesh, India. In *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* (Vol. 7, Issue 1). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-7-31>
- Nawaz, T., Iqbal, M., Khan, B. A., Nawaz, A., Hussain, T., Hosny, K. M., Abualsunun, W. A., & Rizg, W. Y. (2021). Development and Optimization of Acriflavine-Loaded Polycaprolactone Nanoparticles Using Box–Behnken Design for Burn Wound Healing Applications. In *Polymers* (Vol. 14, Issue 1, p. 101). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym14010101>
- Okada, M. (2002). Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, 27, 87–133.
- Özer, S. (2018). Vasküler endotelial büyüme faktörü yüklü polikaprolakton nanopartiküllerinin hazırlanması, karakterizasyonu ve in vitro salım çalışmaları. (Yüksek lisans tezi, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı).
- Padmaa, P. M., Preethy Ani, J., Cm, S., & Peter, C. G. V. (2018). Release kinetics – concepts and applications. *IJPRT*, 8(12).
- Panghal, M., Arya, V., Yadav, S., Kumar, S., & Yadav, J. P. (2010). Indigenous knowledge of medicinal plants used by Saperas community of Khetawas, Jhajjar District, Haryana, India. In *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* (Vol. 6, Issue 1). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-6-4>
- Pedersen, W., & Sandberg, S. (2012). The medicalisation of revolt: a sociological analysis of medical cannabis users. In *Sociology of Health & Illness* (Vol. 35, Issue 1, pp. 17–32). Wiley. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9566.2012.01476.x>
- Pellati, F., Brighenti, V., Sperlea, J., Marchetti, L., Bertelli, D., & Benvenuti, S. (2018). New Methods for the Comprehensive Analysis of Bioactive Compounds in *Cannabis sativa* L. (hemp). In *Molecules* (Vol. 23, Issue 10, p. 2639). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules23102639>
- Pertwee, R. G. (2006). Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 147, Issue S1, pp. S163–S171). Wiley. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706406>
- Piluzza, G., Delogu, G., Cabras, A., Marceddu, S., & Bullitta, S. (2013). Differentiation between fiber and drug types of hemp (*Cannabis sativa* L.) from a collection of wild and domesticated accessions. In *Genetic Resources and Crop Evolution* (Vol. 60, Issue 8, pp. 2331–2342). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s10722-013-0001-5>
- Pisanti, S., & Bifulco, M. (2018). Medical Cannabis: A plurimillennial history of an evergreen. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 234, Issue 6, pp. 8342–8351). Wiley. <https://doi.org/10.1002/jcp.27725>
- Pitt, C. G., Andraday, A. L., Bao, Y. T., & Sarnuei, N. K. P. (1987). Estimation of the rate of drug diffusion in polymers. In P. I. Lee & W. R. Good (Eds.), *Controlled-Release Technology, Pharmaceutical Applications* (pp. 49-77). American Chemical Society.

- Potter, D. J., Clark, P., & Brown, M. B. (2008). Potency of Δ^9 -THC and other cannabinoids in cannabis in England in 2005: Implications for psychoactivity and pharmacology. *Journal of Forensic Sciences*, 53(1), 90-94.
- Puga, A. M., Rey-Rico, A., Magariños, B., Alvarez-Lorenzo, C., & Concheiro, A. (2012). Hot melt poly- ϵ -caprolactone/poloxamine implantable matrices for sustained delivery of ciprofloxacin. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 8, Issue 4, pp. 1507–1518). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.12.020>
- Rapa, M., Ciano, S., Rocchi, A., D'Ascenzo, F., Ruggieri, R., & Vinci, G. (2019). Hempseed Oil Quality Parameters: Optimization of Sustainable Methods by Miniaturization. In *Sustainability* (Vol. 11, Issue 11, p. 3104). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/su11113104>
- Russo, E. B. (2007). History of Cannabis and Its Preparations in Saga, Science, and Sobriquet. In *Chemistry & Biodiversity* (Vol. 4, Issue 8, pp. 1614–1648). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790144>
- Russo, E. B., Guy, G. W., & Robson, P. J. (2007). Cannabis, pain, and sleep: Lessons from therapeutic clinical trials of Sativex, a cannabis-based medicine. *Chemistry & Biodiversity*, 4(8), 1729-1743.
- Ryz, N. R., Remillard, D. J., & Russo, E. B. (2017). Cannabis Roots: A Traditional Therapy with Future Potential for Treating Inflammation and Pain. In *Cannabis and Cannabinoid Research* (Vol. 2, Issue 1, pp. 210–216). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/can.2017.0028>
- Sackett, D. L., & Wolff, J. (1987). Nile red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces. In *Analytical Biochemistry* (Vol. 167, Issue 2, pp. 228–234). Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90157-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90157-6)
- Sand Chee, S., & Jawaid, M. (2019). The Effect of Bi-Functionalized MMT on Morphology, Thermal Stability, Dynamic Mechanical, and Tensile Properties of Epoxy/Organoclay Nanocomposites. In *Polymers* (Vol. 11, Issue 12, p. 2012). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym11122012>
- Saqib, M., Ali Bhatti, A. S., Ahmad, N. M., Ahmed, N., Shahnaz, G., Lebaz, N., & Elaissari, A. (2020). Amphotericin B Loaded Polymeric Nanoparticles for Treatment of Leishmania Infections. In *Nanomaterials* (Vol. 10, Issue 6, p. 1152). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nano10061152>
- Savo, V., La Rocca, A., Caneva, G., Rapallo, F., & Cornara, L. (2013). Plants used in artisanal fisheries on the Western Mediterranean coasts of Italy. In *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* (Vol. 9, Issue 1). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-9-9>
- Schenberg, E. E. (2018). Psychedelic-Assisted Psychotherapy: A Paradigm Shift in Psychiatric Research and Development. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 9). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00733>
- Schicho, R., & Storr, M. (2012). Topical and systemic cannabidiol improves trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Pharmacology*, 89(3-4), 149-155.
- Schultes, R. E., Hoffman, A., & Ratsch, C. (1992). *Plants of the Gods – Their Sacred, Healing and Hallucinogenic Powers*. Healing Arts Press, Rochester, Vermont, United States, 92-101. (ISBN 0-89281-979-0)
- Selvi, S., Temiz, N. N., Gökyer, A., Büyükhehvacıgil, S., Büyükhehvacıgil, H. F., & Koparal, B. (2019). Kenevir tohumu yağı. *Türk Farmakope Dergisi*, 4(2), 19-23.
- Singh, Y., Meher, J. G., Raval, K., Khan, F. A., Chaurasia, M., Jain, N. K., & Chourasia, M. K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 252, pp. 28–49). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>

- Sinha, V. R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., & Trehan, A. (2004). Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 278(1), 1–23.
- Snehalatha, M., Venugopal, K., & Saha, R. N. (2008). Etoposide-Loaded PLGA and PCL Nanoparticles I: Preparation and Effect of Formulation Variables. In *Drug Delivery* (Vol. 15, Issue 5, pp. 267–275). Informa UK Limited. <https://doi.org/10.1080/10717540802174662>
- Soppimath, K. S., Kulkarni, A. R., Rudzinski, W. E., & Aminabhavi, T. M. (2001). MICROSPHERES AS FLOATING DRUG-DELIVERY SYSTEMS TO INCREASE GASTRIC RETENTION OF DRUGS. In *Drug Metabolism Reviews* (Vol. 33, Issue 2, pp. 149–160). Informa UK Limited. <https://doi.org/10.1081/dmr-100104401>
- Srividya, B., Sowmya, C., & Surya Prakash Reddy, C. (2014). Capsules and its technology: An overview. *Review Article*, 2(9), ISSN 2348-8948. Raghavendra Institute of Pharmaceutical Education and Research, Ananthapuramu, Andhra Pradesh, India – 515721.
- Stevens, C. J., Murphy, C., Roberts, R., Lucas, L., Silva, F., & Fuller, D. Q. (2016). Between China and South Asia: A Middle Asian corridor of crop dispersal and agricultural innovation in the Bronze Age. In *The Holocene* (Vol. 26, Issue 10, pp. 1541–1555). SAGE Publications. <https://doi.org/10.1177/0959683616650268>
- Stohs, S., & Ray, S. (2020). Is cannabidiol hepatotoxic or hepatoprotective: A review. In *Toxicology Research and Application* (Vol. 4, p. 239784732092294). SAGE Publications. <https://doi.org/10.1177/2397847320922944>
- Sun, B., Zhou, Z., Li, D., Huang, H., Guo, J., Gao, N., ... & Qian, Z. (2019). Polypyrrole-coated poly(l-lactic acid-co- ϵ -caprolactone)/silk fibroin nanofibrous nerve guidance conduit induced nerve regeneration in rat. *Materials Science and Engineering C*, 94, 190-199. doi: 10.1016/j.msec.2018.09.008
- Suttithumsatid, W., Shah, M. A., Bibi, S., & Panichayupakaranant, P. (2022). α -Glucosidase inhibitory activity of cannabidiol, tetrahydrocannabinol and standardized cannabinoid extracts from *Cannabis sativa*. In *Current Research in Food Science* (Vol. 5, pp. 1091–1097). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.07.002>
- Tadros, T. F. (2014). Surfactants: An introduction. In T. F. Tadros (Ed.), *An Introduction to Surfactants* (pp. 135-152). De Gruyter.
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vols. 108–109, pp. 303–318). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>
- Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Shoyama, Y., & Morimoto, S. (2007). Phytocannabinoids in *Cannabis sativa*: Recent Studies on Biosynthetic Enzymes. In *Chemistry & Biodiversity* (Vol. 4, Issue 8, pp. 1649–1663). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790145>
- Touw, M. (1981). The Religious and Medicinal Uses of Cannabis in China, India and Tibet. In *Journal of Psychoactive Drugs* (Vol. 13, Issue 1, pp. 23–34). Informa UK Limited. <https://doi.org/10.1080/02791072.1981.10471447>
- Tunçay, M., & Çaliş, S. (1999). İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan biyoparçalanabilir sentetik ve doğal polimerler. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24(2), 109-123.
- Ustun-Argon, Z. (2019). Phenolic Compounds, Antioxidant Activity and Fatty Acid Compositions of Commercial Cold-Pressed Hemp Seed (*Cannabis Sativa* L.) Oils

- from Turkey. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 10, 166-173.
- Van Natta, F. J., Hill, J. W., & Carruthers, W. H. (1934). Polymerization and ring formation, ϵ -caprolactone and its polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 455-459.
- Vert, M. (2009). Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 437-446. doi: 10.1007/s10856-008-3608-7
- Vion, J. M., Jerome, R., Teyssie, P., Aubin, M., & Prudhomme, R. E. (1986). Synthesis, characterization, and miscibility of caprolactone random copolymers. *Macromolecules*, 19(7), 1828-1838. doi: 10.1021/ma00160a003
- Vlad, R.-A. (2021). STRUCTURAL AND THERMAL ANALYSIS OF CANNABIDIOL ORODISPERSIBLE FORMULATIONS. In *FARMACIA* (Vol. 69, Issue 3, pp. 426–433). Societatea de Stiinte Farmaceutice din Romania. <https://doi.org/10.31925/farmac.2021.3.5>
- Vlad, R.-A., Antoanea, P., Todoran, N., Muntean, D.-L., Rédei, E. M., Silași, O. A., Tătaru, A., Bîrsan, M., Imre, S., & Ciurba, A. (2021). Pharmacotechnical and analytical preformulation studies for cannabidiol orodispersible tablets. In *Saudi Pharmaceutical Journal* (Vol. 29, Issue 9, pp. 1029–1042). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.07.012>
- Wang, L., Du, J., Zhou, Y., & Wang, Y. (2017). Safety of nanosuspensions in drug delivery. In *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (Vol. 13, Issue 2, pp. 455–469). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.08.007>
- Waterman, K. C. (2007). A Critical Review of Gastric Retentive Controlled Drug Delivery. In *Pharmaceutical Development and Technology* (Vol. 12, Issue 1, pp. 1–10). Informa UK Limited. <https://doi.org/10.1080/10837450601168680>
- Whalley, B. J., Bazelat, M., Rosenberg, E., & Tsien, R. (2018). A role of GPR55 in the antiepileptic properties of cannabidiol (CBD)(P2. 277).
- Williams, C., & Nutbrown, D. L. (2021). A Review of Research into the Health Benefits of Cannabidiol (CBD). *The Neighborhood Academy: Pittsburgh, PA, USA*.
- Woodruff, M. A., & Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. In *Progress in Polymer Science* (Vol. 35, Issue 10, pp. 1217–1256). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>
- Wu, Y., & Clark, R. L. (2007). Controllable porous polymer particles generated by electrospraying. In *Journal of Colloid and Interface Science* (Vol. 310, Issue 2, pp. 529–535). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.02.023>
- Xiang, Z., Guan, X., Ma, Z., Shi, Q., Pantelev, M., & Atullakhanov, F. I. (2022). Bioactive engineered scaffolds based on PCL-PEG-PCL and tumor cell-derived exosomes to minimize the foreign body reaction. *Biomaterials and Biosystems*, 7, 100055. <https://doi.org/10.1016/j.bbioss.2021.100055>.
- Xu, Y., Li, J., Zhao, J., Wang, W., Griffin, J., Li, Y., Bean, S., Tilley, M., & Wang, D. (2020). Hempseed as a nutritious and healthy human food or animal feed source: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(12), 4757-4769.
- Zhang, D., Li, Z., Shi, H., Yao, Y., Du, W., Lu, P., Liang, K., Hong, L., & Gao, C. (2022). Micropatterns and peptide gradient on the inner surface of a guidance conduit synergistically promotes nerve regeneration in vivo. In *Bioactive Materials* (Vol. 9, pp. 134–146). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.07.010>

Zuardi, A. W., Crippa, J. A. S., Hallak, J. E. C., Moreira, F. A., & Guimaraes, F. S. (2006). Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, as an antipsychotic drug. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39(4), 421-429.

7. EKLER

EK-1 European Pharmacopoeia V8. EUP-2.9.1

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

2.9.1. Disintegration of tablets and capsules

2.9. PHARMACEUTICAL
TECHNICAL PROCEDURES

04/2011:20901

2.9.1. DISINTEGRATION OF TABLETS
AND CAPSULES⁽¹⁾

This test is provided to determine whether tablets or capsules disintegrate within the prescribed time when placed in a liquid medium under the experimental conditions presented below.

For the purposes of this test, disintegration does not imply complete dissolution of the unit or even of its active constituent. Complete disintegration is defined as that state in which any residue of the unit, except fragments of insoluble coating or capsule shell, remaining on the screen of the test apparatus or adhering to the lower surface of the discs, if used, is a soft mass having no palpably firm core.

♦ Use apparatus A for tablets and capsules that are not greater than 18 mm long. For larger tablets or capsules use apparatus B. ♦

TEST A - TABLETS AND CAPSULES OF NORMAL SIZE

Apparatus. The apparatus consists of a basket-rack assembly, a 1 L, low-form beaker, 149 ± 11 mm in height and having an inside diameter of 106 ± 9 mm for the immersion fluid, a thermostatic arrangement for heating the fluid between 35°C and 39°C , and a device for raising and lowering the basket in the immersion fluid at a constant frequency rate between 29 and 32 cycles per minute, through a distance of 55 ± 2 mm. The volume of the fluid in the vessel is such that at the highest point of the upward stroke the wire mesh remains at least 15 mm below the surface of the fluid, and descends to not less than 25 mm from the bottom of the vessel on the downward stroke. At no time should the top of the basket-rack assembly become submerged. The time required for the upward stroke is equal to the time required for the downward stroke, and the change in stroke direction is a smooth transition, rather than an abrupt reversal of motion. The basket-rack assembly moves vertically along its axis. There is no appreciable horizontal motion or movement of the axis from the vertical.

Basket-rack assembly. The basket-rack assembly consists of 6 open-ended transparent tubes, each 77.5 ± 2.5 mm long and having an inside diameter of 21.85 ± 1.15 mm and a wall 1.9 ± 0.9 mm thick; the tubes are held in a vertical position by 2 plates, each 90 ± 2 mm in diameter and 6.75 ± 1.75 mm in thickness, with 6 holes, each 24 ± 2 mm in diameter, equidistant from the centre of the plate and equally spaced from one another. Attached to the under surface of the lower plate is a woven stainless steel wire cloth, which has a plain square weave with 2.0 ± 0.2 mm mesh apertures and with a wire diameter of 0.615 ± 0.045 mm. The parts of the apparatus are assembled and rigidly held by means of 3 bolts passing through the 2 plates. A suitable means is provided to suspend the basket-rack assembly from the raising and lowering device using a point on its axis.

The design of the basket-rack assembly may be varied somewhat provided the specifications for the glass tubes and the screen mesh size are maintained. The basket-rack assembly conforms to the dimensions shown in Figure 2.9.1.-1.

Discs. The use of discs is permitted only where specified or allowed. Each tube is provided with a cylindrical disc 9.5 ± 0.15 mm thick and 20.7 ± 0.15 mm in diameter. The disc is made of a suitable, transparent plastic material having a specific gravity of 1.18-1.20. 5 parallel 2 ± 0.1 mm

holes extend between the ends of the cylinder. One of the holes is centered on the cylindrical axis. The other holes are centered 6 ± 0.2 mm from the axis on imaginary lines perpendicular to the axis and parallel to each other. 4 identical trapezoidal-shaped planes are cut into the wall of the cylinder, nearly perpendicular to the ends of the cylinder. The trapezoidal shape is symmetrical; its parallel sides coincide with the ends of the cylinder and are parallel to an imaginary line connecting the centres of 2 adjacent holes 6 mm from the cylindrical axis. The parallel side of the trapezoid on the bottom of the cylinder has a length of 1.6 ± 0.1 mm and its bottom edges lie at a depth of 1.5 mm to 1.8 mm from the cylinder's circumference. The parallel side of the trapezoid on the top of the cylinder has a length of 9.4 ± 0.2 mm and its centre lies at a depth of 2.6 ± 0.1 mm from the cylinder's circumference. All surfaces of the disc are smooth.

If the use of discs is specified, add a disc to each tube and operate the apparatus as directed under Procedure. The discs conform to the dimensions shown in Figure 2.9.1.-1.

The use of automatic detection employing modified discs is permitted where the use of discs is specified or allowed. Such discs must comply with the requirements of density and dimension given in this chapter.

Procedure. Place 1 dosage unit in each of the 6 tubes of the basket and, if prescribed, add a disc. Operate the apparatus using the specified medium, maintained at $37 \pm 2^\circ\text{C}$, as the immersion fluid. At the end of the specified time, lift the basket from the fluid and observe the dosage units: all of the dosage units have disintegrated completely. If 1 or 2 dosage units fail to disintegrate, repeat the test on 12 additional dosage units. The requirements of the test are met if not less than 16 of the 18 dosage units tested have disintegrated.

♦ TEST B - LARGE TABLETS AND LARGE CAPSULES

Apparatus. The main part of the apparatus (Figure 2.9.1.-2.) is a rigid basket-rack assembly supporting 3 cylindrical transparent tubes 77.5 ± 2.5 mm long, 33.0 mm \pm 0.5 mm in internal diameter, and with a wall thickness of 2.5 ± 0.5 mm. Each tube is provided with a cylindrical disc 31.4 ± 0.13 mm in diameter and 15.3 ± 0.15 mm thick, made of transparent plastic with a relative density of 1.18-1.20. Each disc is pierced by 7 holes, each 3.15 ± 0.1 mm in diameter, 1 in the centre and the other 6 spaced equally on a circle of radius 4.2 mm from the centre of the disc. The tubes are held vertically by 2 separate and superimposed rigid plastic plates 97 mm in diameter and 9 mm thick, with 3 holes. The holes are equidistant from the centre of the plate and equally spaced. Attached to the under side of the lower plate is a piece of woven gauze made from stainless steel wire 0.63 ± 0.03 mm in diameter and having mesh apertures of 2.0 ± 0.2 mm. The plates are held rigidly in position and 77.5 mm apart by vertical metal rods at the periphery. A metal rod is also fixed to the centre of the upper plate to enable the assembly to be attached to a mechanical device capable of raising and lowering it smoothly at a constant frequency of between 29 and 32 cycles per minute, through a distance of 55 ± 2 mm.

The assembly is suspended in the specified liquid medium in a suitable vessel, preferably a 1 L beaker. The volume of the liquid is such that when the assembly is in the highest position the wire mesh is at least 15 mm below the surface of the liquid, and when the assembly is in the lowest position the wire mesh is at least 25 mm above the bottom of the beaker and the upper open ends of the tubes remain above the surface of the liquid. A suitable device maintains the temperature of the liquid at 35 - 39°C .

The design of the basket-rack assembly may be varied provided the specifications for the tubes and wire mesh are maintained.

(1) This chapter has undergone pharmacopoeial harmonisation. See chapter 5.8. Pharmacopoeial harmonisation.

Method. Test 6 tablets or capsules either by using 2 basket-rack assemblies in parallel or by repeating the procedure. In each of the 3 tubes, place 1 tablet or capsule and, if prescribed, add a disc; suspend the assembly in the beaker containing

the specified liquid. Operate the apparatus for the prescribed period, withdraw the assembly and examine the state of the tablets or capsules. To pass the test, all 6 of the tablets or capsules must have disintegrated.♦

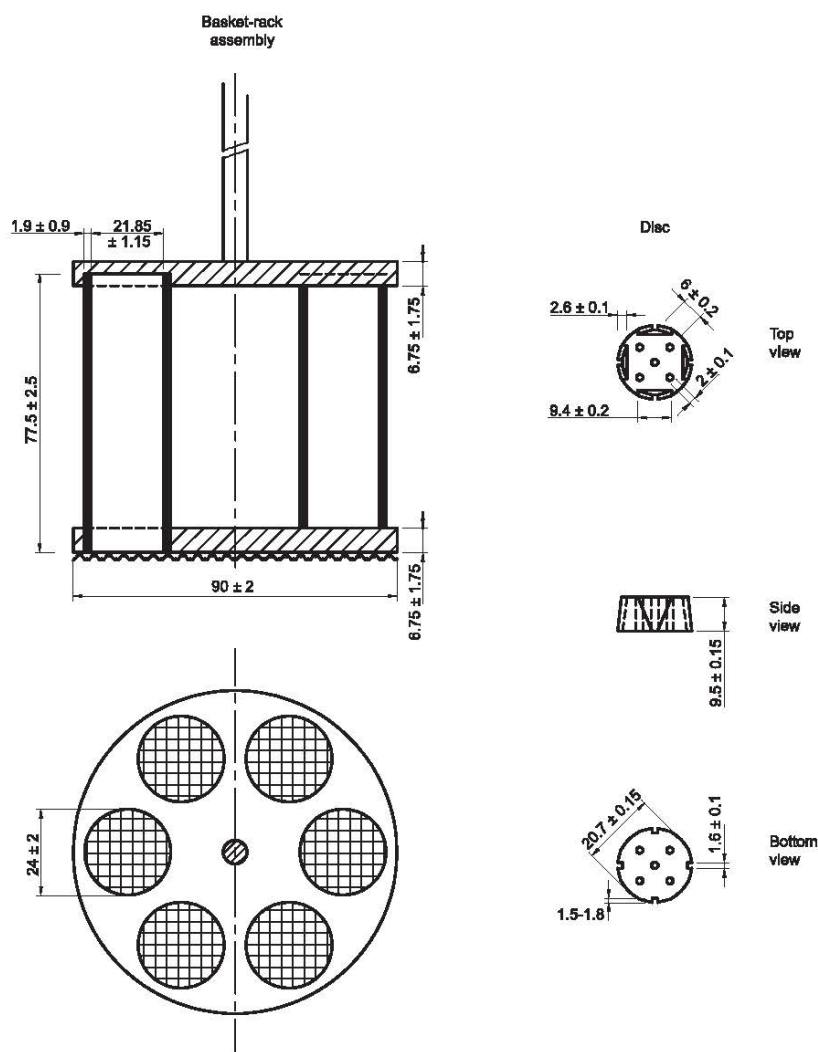


Figure 2.9.1.-1. – Disintegration apparatus A

Dimensions in millimetres

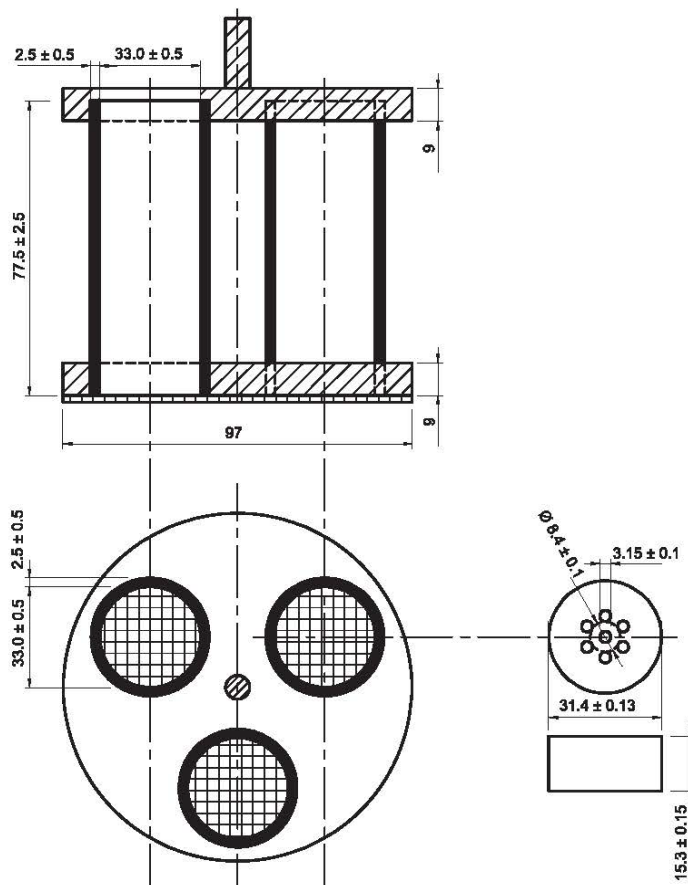


Figure 2.9.1.-2. – Disintegration apparatus B
Dimensions in millimetres

01/2008:20902

2.9.2. DISINTEGRATION OF SUPPOSITORIES AND PESSARIES

The disintegration test determines whether the suppositories or pessaries soften or disintegrate within the prescribed time when placed in a liquid medium in the experimental conditions described below.

Disintegration is considered to be achieved when:

- dissolution is complete,
- the components of the suppository or pessary have separated: melted fatty substances collect on the surface of the liquid, insoluble powders fall to the bottom and soluble components dissolve, depending on the type of preparation, the components may be distributed in one or more of these ways,
- there is softening of the sample that may be accompanied by appreciable change of shape without complete separation of the components, the softening is such that the suppository or pessary no longer has a solid core offering resistance to pressure of a glass rod,

d) rupture of the gelatin shell of rectal or vaginal capsules occurs allowing release of the contents,

e) no residue remains on the perforated disc or if a residue remains, it consists only of a soft or frothy mass having no solid core offering resistance to pressure of a glass rod (vaginal tablets).

Apparatus. The apparatus (Figure 2.9.2.-1) consists of a sleeve of glass or suitable transparent plastic, of appropriate thickness, to the interior of which is attached by means of three hooks a metal device consisting of two perforated stainless metal discs each containing 39 holes 4 mm in diameter; the diameter of the discs is similar to that of the interior of the sleeve; the discs are about 30 mm apart. The test is carried out using three such apparatuses each containing a single sample. Each apparatus is placed in a beaker with a capacity of at least 4 L filled with water maintained at 36-37 °C, unless otherwise prescribed. The apparatuses may also be placed together in a vessel with a capacity of at least 12 L. The beaker is fitted with a slow stirrer and a device that will hold the cylinders vertically not less than 90 mm below the surface of the water and allow them to be inverted without emerging from the water.

Table 2.9.5.-1

Pharmaceutical Form	Average Mass	Percentage deviation
Tablets (uncoated and film-coated)	80 mg or less	10
	More than 80 mg and less than 250 mg	7.5
	250 mg or more	5
Capsules, granules (uncoated, single-dose) and powders (single-dose)	Less than 300 mg	10
	300 mg or more	7.5
Powders for parenteral administration* (single-dose)	More than 40 mg	10
Suppositories and pessaries	All masses	5
Powders for eye-drops and powders for eye lotions (single-dose)	Less than 300 mg	10
	300 mg or more	7.5

* When the average mass is equal to or below 40 mg, the preparation is not submitted to the test for uniformity of mass but to the test for uniformity of content of single-dose preparations (2.9.6).

POWDERS FOR PARENTERAL ADMINISTRATION

Remove any paper labels from a container and wash and dry the outside. Open the container and without delay weigh the container and its contents. Empty the container as completely as possible by gentle tapping, rinse it if necessary with *water R* and then with *alcohol R* and dry at 100–105 °C for 1 h, or, if the nature of the container precludes heating at this temperature, dry at a lower temperature to constant mass. Allow to cool in a desiccator and weigh. The mass of the contents is the difference between the weighings. Repeat the procedure with another 19 containers.

01/2008:20906

2.9.6. UNIFORMITY OF CONTENT OF SINGLE-DOSE PREPARATIONS

The test for uniformity of content of single-dose preparations is based on the assay of the individual contents of active substance(s) of a number of single-dose units to determine whether the individual contents are within limits set with reference to the average content of the sample.

The test is not required for multivitamin and trace-element preparations and in other justified and authorised circumstances.

Method. Using a suitable analytical method, determine the individual contents of active substance(s) of 10 dosage units taken at random.

Apply the criteria of test A, test B or test C as specified in the monograph for the dosage form in question.

TEST A

Tablets, powders for parenteral administration, ophthalmic inserts, suspensions for injection. The preparation complies with the test if each individual content is between 85 per cent and 115 per cent of the average content. The preparation fails to comply with the test if more than one individual content is outside these limits or if one individual content is outside the limits of 75 per cent to 125 per cent of the average content.

If one individual content is outside the limits of 85 per cent to 115 per cent but within the limits of 75 per cent to 125 per cent, determine the individual contents of another 20 dosage units taken at random. The preparation complies with the test if not more than one of the individual contents of the 30 units is outside 85 per cent to 115 per cent of the average content and none is outside the limits of 75 per cent to 125 per cent of the average content.

(6) This chapter has undergone pharmacopoeial harmonisation. See chapter 5.8. Pharmacopoeial harmonisation.

TEST B

Capsules, powders other than for parenteral administration, granules, suppositories, pessaries. The preparation complies with the test if not more than one individual content is outside the limits of 85 per cent to 115 per cent of the average content and none is outside the limits of 75 per cent to 125 per cent of the average content. The preparation fails to comply with the test if more than 3 individual contents are outside the limits of 85 per cent to 115 per cent of the average content or if one or more individual contents are outside the limits of 75 per cent to 125 per cent of the average content.

If 2 or 3 individual contents are outside the limits of 85 per cent to 115 per cent but within the limits of 75 per cent to 125 per cent, determine the individual contents of another 20 dosage units taken at random. The preparation complies with the test if not more than 3 individual contents of the 30 units are outside the limits of 85 per cent to 115 per cent of the average content and none is outside the limits of 75 per cent to 125 per cent of the average content.

TEST C

Transdermal patches. The preparation complies with the test if the average content of the 10 dosage units is between 90 per cent and 110 per cent of the content stated on the label and if the individual content of each dosage unit is between 75 per cent and 125 per cent of the average content.

01/2010:20907

2.9.7. FRIABILITY OF UNCOATED TABLETS⁽⁶⁾

This chapter provides guidelines for the friability determination of compressed, uncoated tablets. The test procedure presented in this chapter is generally applicable to most compressed tablets. Measurement of tablet friability supplements other physical strength measurements, such as tablet breaking force.

Use a drum, with an internal diameter between 283–291 mm and a depth between 36–40 mm, of transparent synthetic polymer with polished internal surfaces, and subject to minimum static build-up (see Figure 2.9.7.-1.). One side of the drum is removable. The tablets are tumbled at each turn of the drum by a curved projection with an inside radius between 75.5–85.5 mm that extends from the middle of the drum to the outer wall. The outer diameter of the central ring is between 24.5–25.5 mm. The drum is attached to the horizontal axis of a device that rotates at 25 ± 1 r/min. Thus, at each turn the tablets roll or slide and fall onto the drum wall or onto each other.

For tablets with a unit mass equal to or less than 650 mg, take a sample of whole tablets corresponding as near as possible to 6.5 g. For tablets with a unit mass of more than 650 mg, take a sample of 10 whole tablets. The tablets are carefully dedusted prior to testing. Accurately weigh the tablet sample, and place the tablets in the drum. Rotate the drum 100 times, and remove the tablets. Remove any loose dust from the tablets as before, and accurately weigh.

Generally, the test is run once. If obviously cracked, cleaved, or broken tablets are present in the tablet sample after tumbling, the sample fails the test. If the results are difficult to interpret or if the weight loss is greater than the targeted value, the test is repeated twice and the mean of the 3 tests determined. A maximum loss of mass (obtained from a single test or from the mean of 3 tests) not greater than 1.0 per cent is considered acceptable for most products.

If tablet size or shape causes irregular tumbling, adjust the drum base so that the base forms an angle of about 10° with the horizontal and the tablets no longer bind together when lying next to each other, which prevents them from falling freely.