

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORAL UYGULAMA AMACIYLA İNSÜLİN TAŞIYICI SİSTEMLERİN
HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE SALIM ÇALIŞMALARI

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Eczacı
Gülşah EREL

İZMİR
(2015)

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORAL UYGULAMA AMACIYLA İNSÜLİN TAŞIYICI SİSTEMLERİN
HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE SALIM ÇALIŞMALARI

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Eczacı

Gülşah EREL

DANIŞMAN

Prof. Dr. A. Gülten KANTARCI

İZMİR

(2015)

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

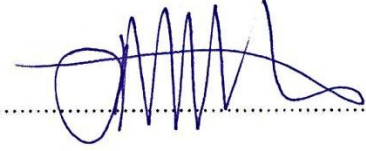
(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. A. Gülten KANTARCI
(Danışman)



Üye : Prof. Dr. Gökhan ERTAN



Üye : Prof. Dr. Zeki TOPÇU



Yüksek Lisans Teziniñ kabul edildiği tarih: 29.01.2015

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım süresince, deneyimi ve bilgi birikimi ile yol haritamın oluşmasını sağlayan, fikirleriyle çalışmamın gelişmesine imkân tanıyan, daha iyisini yapmam adına beni her fırsatta motive eden tez danışmanım Prof. Dr. A. Gülten Kantarcı'ya;

Her zaman manevi desteğini hissettiğim, her türlü zorluğu aşmamda yardımcı olan Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Zeki Topçu'ya,

Çalışmalarım süresince yardımları ve destekleri ile yanımda olan Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Yücel Başpınar'a,

Tezimin büyük bölümünde emekleri olan, *in vivo* hayvan denemeleri başta olmak üzere birçok alanda bana destek sağlayan Dr. Mustafa Kotmakçı'ya,

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalında doktora yapan arkadaşlarım Uzm. Esra Öztürk, Uzm. Müge Şenarısoy, Uzm. Gizem Yaylı, Uzm. Uğur Karagöz'e,

Deneylerimin karakterizasyon kısmını gerçekleştirmek için Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarındaki olanaklardan yararlanmamı sağlayan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. K. Özgen Özer'e ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında emeği geçen tüm Öğretim Üyeleri ve Araştırma Görevlilerine,

In vitro salım çalışmaları sırasında olanaklarından faydalandığım Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı'na, bilgi ve birikimleriyle bu konuda yardımcı olan Uzm. Çiğdem Yengin ve tüm FABAL çalışanlarına,

İnsülinin konformasyonel stabilitesinin belirlendiği sirküler dikroizm çalışmalarında destekleri için Arven İlaç Biyoteknoloji

Bölüm Müdürü Dr. Ecz. İrem Yenice'ye, Uzman Yasin Kara'ya, olanaklarından yaralandığımız Arven İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.' ne,

Gerçekleştirdiğimiz toksisite çalışmaları için Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı olanaklarından yararlanmamızı sağlayan E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Cumhuri Gündüz'e ve yardımları için Araş. Gör. Dr. Vildan Bozok Çetintaş'a,

Tezimin *in vivo* çalışmalarını gerçekleştirirken engin deneyimleri ile yardımcı olan Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Sekreteri Prof. Dr. Ülkü Karabay Yavaşoğlu'na, Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme & Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi Faz Öncesi Araştırmalar Birimine ve çalışanlarına, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Sumru Sözer Karadağlı'ya,

Eğitimim boyunca aktardıkları bilgiler ve gösterdikleri özveriler sonucu donanımlı bir eczacı olmamı sağlayan Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesinin tüm öğretim üye ve görevlilerine,

Tez araştırmalarım boyunca her zora düştüğümde benden yardımını esirgemeyen, motivasyonum kırıldığında başarıya olan inancımı kaybetmememi sağlayan ve her anlamda büyük emekleri olan Dr. Sevil Zencir ve Uzm. Ecz. Hasan Akbaba'ya,

Hayatımın her alanında beni doğru yönde etkileyen, maddi ve manevi desteklerini daima kalbimde hissettiğim sevgili ailem; babam Av. Nejat Erel' e, biricik kardeşim Ali Nihat Erel'e ve kendisiyle aynı mesleğe sahip olduğum için her zaman gurur duyduğum annem Ecz. Hatice Erel'e,

Sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

ORAL UYGULAMA AMACIYLA İNSÜLİN TAŞIYICI SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE SALIM ÇALIŞMALARI

Uluslararası Diyabet Federasyonunun 2013 yılı verilerine göre tüm dünyada 382 milyon kişi diyabet hastasıdır ve her sene dünya sağlık harcamalarının 548 milyon dolarlık kısmı diyabete harcanmaktadır. İnsüline bağımlı diyabet hastaları her gün tekrarlayan dozlarda enjeksiyon uygulamasına maruz kalmaktadır. Biyoteknolojideki gelişmeler birçok proteinin terapötik amaçlı kullanımının önünü açmıştır. Diabetes Mellitus tedavisinde kullanılan insülin bunlardan bir tanesidir.

Protein yapısındaki bir ilaç korunmadığı sürece mide ve bağırsaktaki proteaz etkinlikleri, midedeki asidik pH, mukus, proteaz içeren mikrovilluslar gibi fiziksel bariyerler nedeniyle oral biyoyararlanımı %1-2 'den daha düşüktür. Bu nedenle proteinlerin oral uygulanmasını sağlamak için farklı formülasyon stratejileri geliştirilmiştir.

Bu tezde, insülin taşınmasında oral olarak uygulanabilecek bir mikroemülsiyon sistemi geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla yapılan ön formülasyon denemeleri sonucunda yağ olarak Plurol Oleik, sürfaktan olarak Tween 80 ve Lesitin, kosürfaktan olarak etanol içeren S/Y mikroemülsiyon sistemi geliştirilmiştir. Rekombinant insülin solüsyonu (100 IU/mL) formülasyona iç faz olarak ilave edilmiştir. Hazırlanan insülin taşıyıcı mikroemülsiyon sistemini daha kararlı hale getirmek ve insülini mide asiditesi ve enzimlerinden korumak için formülasyonun iç fazına farklı oranlarda kitozan ve sodyum tripolifosfat çözeltileri ilave edilmiştir.

Elde elde edilen formülasyonların karakterizasyonları yapılmış, fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir. Stabilité çalışmalarında +4°C' de 6 ay boyunca stabil kaldıkları gözlenmiştir. Sirküler dikroizm ile yapılan analizlerde insülinin konformasyonel stabilitesinin kitozan ve sodyum tripolifosfat ilavesinden ve hazırlama koşullarından etkilenmediği gösterilmiştir.

Ayrıca, formülasyonların farklı pH değerlerinde mide ve bağırsak vasatında gösterdikleri salım özellikleri incelenmiştir. Buna göre midede insülini en çok koruyan ve bağırsakta en yüksek oranda insülin salımı sağlayan formülasyon serisi ile çalışmalara devam edilmiştir. Bu formülasyonlar ile L929 fare fibroblast hücre hattında toksisite testleri yapılmıştır ve bu hücreler üzerine olan toksik dozlar saptanmıştır.

Wistar Albino sıçanlar ile *in vivo* hayvan deneyleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, sıçanlara intragastrik olarak standart insülin çözeltisi, iç fazda sadece insülin içeren mikroemülsiyon formülasyonu ve kitozan ile sodyum tripolifosfat içeren optimum mikroemülsiyon formülasyonu uygulanmıştır. Geliştirilen optimum formülasyon, uygulamayı takiben 1. saatten 8. saate kadar etkin bir kan glukoz düzeyi düşüşü sağlamıştır. Kan glukoz düzeyinde elde edilen bu düşüş uygulamadan 8 saat sonrasına kadar diğer gruplara göre anlamlı bulunmuştur.

Sonuç olarak, tez kapsamında geliştirilen ve iç fazında insülin, kitozan ve sodyum tripolifosfat solüsyonlarını içeren S/Y mikroemülsiyon sistemleri insülinin oral yolla uygulanması için alternatif bir dozaj formu olarak önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: mikroemülsiyon, insülin, kitozan, salım çalışması, *in vivo* çalışma

ABSTRACT

PREPARATION OF INSULIN CARRIER SYSTEMS FOR ORAL DELIVERY, CHARACTERIZATION AND RELEASE STUDY

According to the International Diabetes Federation's data in 2013, 382 million people around the world are suffering from Diabetes Mellitus and 548 million dollars of the world's health expenditure is spent on diabetes each year. Patients with insulin dependent Diabetes Mellitus are exposed to repeatedly injection administration each day. Developments in biotechnology has opened the opportunity for therapeutic use of many proteins. Insulin, which is used in the treatment of diabetes mellitus, is one of them.

Oral bioavailability of an unprotected protein drug is less than 1-2% due to the gastric and intestinal protease activity and physical barriers like acidic gastric pH, mucus, and protease-containing microvilli. For this reason, versatile formulation strategies are needed in order to provide oral applicability to proteins.

In our thesis, it was aimed to develop microemulsion system which is, applicable for oral insulin delivery. For this purpose, in the preformulation experiments a water-in-oil microemulsion system which is composed of Plurol Oleique as the oil, Tween80 and Lecithin as surfactants, etanol as co-surfactant, was developed. A solution of recombinant insulin (100 IU/mL) was added as the internal water phase. Different ratios of chitosan and sodium tripolyphosphate were examined for the inner phase of the microemulsion to obtain more stable system, with higher protective function against acidic and enzymatic degradation.

The obtained formulations were characterized and their physicochemical properties were investigated. According to stability studies, formulations were stable at +4°C for 6 months. Circular dichroism analyses revealed that conformational stability of insulin is not affected by the preparation conditions and the presence of chitosan and/or sodium tripolyphosphate.

Furthermore, release properties of formulations were investigated under different pH levels, to simulate gastric and intestinal conditions. According to these studies, further experiments were carried out with the formulations which provided greater gastric protection and higher intestinal insulin release. Toxicity studies on L929 mouse fibroblast cells were performed with these formulations and toxic doses on these cells were determined.

In vivo experiments were carried out with Wistar Albino rats. In these experiments standard insulin solution, microemulsion containing only insulin and optimal microemulsion which contains chitosan and sodium tripolyphosphate were administered intragastrically to the animals. The optimal formulation provided effective reduction on blood glucose level from the 1st to the 8th hour after administration. The reduction on blood glucose level was statistically significant at the 8th hour, as compared to the other groups.

In conclusion, the developed water-in-oil microemulsion system containing insulin, chitosan and sodium tripolyphosphate in the inner phase may be suggested as an alternative dosage forms for oral insulin delivery.

Keywords: microemulsion, insulin, chitosan, *in vitro* release study, *in vivo* study

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	XIV
ŞEKİLLER DİZİNİ	XV
KULLANILAN KISALTMALAR.....	XVI
I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II. GENEL BİLGİLER	2
1. Peptit ve Proteinler Hakkında Genel Bilgiler.....	2
2. Peptid ve Protein İçeren İlaç Taşıyıcı Sistemler Hakkında Genel Bilgiler.....	3
2.1. Peptit ve Protein İçeren İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Uygulama Yolları	3
2.1.1. Parantral Yol	3
2.1.2. Non-invasiv Uygulama Yolları.....	3
3. Diabetes Mellitus	4
3.1. Diyabet Tipleri	5
3.1.1. Tip 1 Diyabet (İnsüline Bağımlı DM).....	5
3.1.2. Tip 2 Diyabet (İnsüline Bağımlı Olmayan DM)	5
3.1.3. Gestasyonel Diyabet.....	6
3.2. İnsülin Tedavi Protokolleri.....	6
4. İnsülin	6
4.1. İnsülin Hakkında Genel Bilgiler	6
4.2. İnsulin Kaynakları ve Rekombinant İnsülin Üretimi	8
4.3. İnsulin İçeren Farmasötik Şekiller	11
4.3.1. Pulmoner İnsülin Uygulanması	12

4.3.2. Bukkal İnsülin Uygulanması	12
4.3.3. Nasal İnsülin Uygulanması.....	13
4.3.4. Oral İnsülin Uygulanması	13
5. Gastrointestinal Sistem	14
5.1. Gastrointestinal Sistemden Transport Mekanizmaları	16
5.1.1. Paraselüler Transport.....	17
5.1.2. Transselüler Transport	17
5.1.3. Taşıyıcı Aracılı Transport	17
5.1.4. Reseptör Aracılı Transport	18
6. Proteinlerin İntestinal Absorpsiyonundaki Bariyerler.....	18
7. Peptit ve Protein Taşıyıcı Sistemlerin Oral Biyoyararlanımını Arttırmak İçin Kullanılan Formülasyon Stratejileri	19
7.1. Penetrasyon Arttırıcılar	19
7.2. Enzim İnhibitörleri	19
7.3. Polimer Konjugasyonu ile Protein Yapı Modifikasyonu	20
7.4. Protein Enkapsülasyonu: Taşıyıcı Sistemler	20
7.4.1. Lipozomlar	20
7.4.2. Katı Lipit Nanopartiküller	21
7.4.3. Mikroemülsiyonlar	21
7.4.3.1. Mikroemülsiyonların Genel Tanımı	22
7.4.3.2. Mikroemülsiyonların Bileşenleri	23
7.4.3.3. Mikroemülsiyonların Hazırlanması.....	24
7.4.3.4. Mikroemülsiyonların Karakterizasyonları.....	25
7.4.3.5 Mikroemülsiyonların Kullanılışları.....	25
7.5. Protein Enkapsülasyonu: Üretim Sistemleri	25
8. Kitozan Hakkında Genel Bilgiler	25

8.1. Kitozanın Yapısı ve Elde Edilme Yöntemleri	25
8.2. Fizikokimyasal Özellikleri	26
8.3. Eczacılıkta Kullanımı	26
9. Sodyum Tripolifosfat Hakkında Genel Bilgiler	28
9.1. Sodyum Tripolifosfatın Yapısı ve Elde Edilme Yöntemleri	28
9.2. Fizikokimyasal Özellikleri	28
9.3. Eczacılıkta Kullanımı	28
10. Diğer Formülasyon Bileşenleri	29
10.1. Plurol Oleik (Poligliseril-3 oleat)	29
10.2. Lesitin	29
II. MATERYAL VE METOD	30
1. Tez Çalışmasında Kullanılan Materyaller	30
1.1. Kullanılan Biyolojik ve Kimyasal Maddeler	30
1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	31
1.3. Kullanılan Hücre Kültürleri.....	32
1.4. Kullanılan Deney Hayvanları	32
1.5. Tampon ve Çözeltiler.....	33
2. Deneysel Çalışmalar	34
2.1. İnsülinin Teşhisi.....	34
2.1.1. İnsülinin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Elektroforetik Teşhisi.....	34
2.1.2. İnsülinin Moleküler Eleme Yüksek Basıncı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Kantitatif Teşhisi	35
2.1.2.1. HPLC ile Standart Eğri Çizimi	35
2.1.2.2. HPLC Yönteminin Validasyonu	36
2.1.2.2.1. Doğrusallık.....	36

2.1.2.2.2. Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik.....	36
2.1.2.2.3. Kesinlik	36
2.1.2.2.3.1. Tekrar Edilebilirlik	36
2.1.2.2.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik.....	36
2.1.2.2.4. Örnek Solüsyonun Stabilitesi	37
2.1.2.2.5. Özgünlük, Seçicilik	37
2.2. İnsülin İçeren Mikroemülsiyonların Hazırlanması	37
2.2.1. Ön Formülasyon Çalışmaları	37
2.2.2. Mikroemülsiyon Formülasyonu ve Faz Diyagramının Hazırlanması	38
2.2.3. İnsülin İçeren Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Hazırlanması	38
2.2.4. Mikroemülsiyon Formülasyonunda Yapılan Modifikasyonlar	39
2.2.4.1. İç Faza Kitozan İlavesi	39
2.2.4.2. İç Faza Sodyum Tripolifosfat İlavesi.....	39
2.3. Hazırlanan Mikroemülsiyon Formülasyonlarının ve İç Fazlarının Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyellerinin Belirlenmesi	41
2.4. İnsülin Yüklü Formülasyonlardan İn-vitro Salım Çalışmaları	41
2.4.1. İnsülin Yüklü Formülasyonlardan pH 1,2' de Gerçekleştirilen Salım Çalışmaları	41
2.4.2. İnsülin Yüklü Formülasyonlardan pH 6,8' de Gerçekleştirilen Salım Çalışmaları	42
2.5. Seçilen Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	42
2.5.1. Viskozite Ölçümü.....	43
2.5.2. pH Ölçümü	43
2.5.3. Elektriksel İletkenlik Ölçümü	43

2.5.4. Refraktif indeks ölçümü.....	43
2.6. Stabilite Çalışmaları	43
2.6.1. İnsülinin Konformasyonel Stabilitesi.....	43
2.6.2. Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Stabilitesi.....	46
2.7. Toksisite Çalışmaları.....	46
2.8. İn-vivo Çalışma	47
2.8.1. İstatistiksel değerlendirme	48
III. BULGULAR.....	49
1. İnsülinin Teşhis Çalışmaları.....	49
1.1. İnsülin'in Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Elektroforetik Teşhisi	49
1.2. İnsülinin Moleküler Eleme Yüksek Basıncı Sıvı Kromatografi ile Kantitatif Teşhisi	
1.2.1. HPLC ile Standart Eğri Çizimi	50
1.2.2. Yöntemin Validasyonuna Ait Bulgular	50
1.2.2.1. Doğrusallık	50
1.2.2.2. Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik	50
1.2.2.3. Kesinlik.....	51
1.2.2.3.1. Tekrar Edilebilirlik	51
1.2.2.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik	52
1.2.2.4. Örnek Solüsyonun Stabilitesi	53
1.2.2.5. Özgünlük, Seçicilik Bulguları	54
2. Mikroemülsiyon Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	54
2.1. Mikroemülsiyon Formülasyonuna Ait Faz Diyagramı.....	54
3. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Bulguları	55
4. İnsülin Yüklü Formülasyonlardan İn-vitro Salım Çalışmaları	58

4.1. İnsülin Yüklü Formülasyonlar ile pH 1,2' de Gerçekleştirilen Salım Çalışmaları	58
4.2. İnsülin Yüklü Formülasyonlar ile pH 6,8' de Gerçekleştirilen Salım Çalışmaları	59
5. Seçilen Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular	60
5.1. Viskozite Ölçümüne Ait Bulgular.....	60
5.2. pH Ölçümüne Ait Bulgular	61
5.3. Elektriksel İletkenlik Ölçümüne Ait Bulgular.....	61
5.4. Refraktif indeks ölçüm bulguları	61
6. Stabilité Çalışmaları	62
6.1. İnsülinin Konformasyonel Stabilitesi	62
6.2. Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Stabilitesi	66
7. Toksisite Çalışmalarına Ait Bulgular.....	66
8. İn-vivo Çalışma Bulguları.....	69
9. İn-vivo Çalışmanın İstatistiksel Değerlendirilmesi	71
IV. TARTIŞMA	73
V. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	82
VI. KAYNAKÇA.....	83
ÖZGEÇMİŞ	91

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1 Piyasada bulunan bazı peptit ve protein yapıdaki ilaçların listesi	2
Tablo 2 İnsülin üretiminde kullanılan konak hücreler	10
Tablo 3 İnsülin aktarımı için non-invasiv yollar	11
Tablo 4 Kitozanın farmasötik endüstride kullanılma nedenleri	27
Tablo 5 Mikroemülsiyon formülasyonunda kullanılan madde ve miktarları	40
Tablo 6 S/Y Mikroemülsiyon ön formülasyon çalışmaları için denenen farklı iç faz çözeltileri	40
Tablo 7 Sirküler dikroizm için hazırlanan iç faz örnekleri	44
Tablo 8 Sirküler dikroizm için hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarının iç faz oranları	45
Tablo 9 0,2, 0,8 ve 5 IU/mL insülin çözeltileri ile HPLC için elde edilen doğruluk ve geri elde edilebilirlik bulguları	51
Tablo 10 İnsülinin 0,8 IU/mL çözeltisi ile HPLC için elde edilen tekrar edilebilirlik bulguları	52
Tablo 11 Tekrar Elde Edilebilirlik Bulguları.....	53
Tablo 12 İnsülin çözeltisinin (2 IU/mL) 0. ve 24. saat stabilite bulguları.....	53
Tablo 13 Farklı İNS:KZ:TPP oranları için iç faza ait partikül büyüklüğü ölçüm değerleri	56
Tablo 14 Farklı İNS:KZ:TPP oranları için mikroemülsiyon formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ölçüm değerleri	56
Tablo 15 Farklı İNS:KZ:TPP oranları için iç faza ait zeta potansiyel ölçüm değerleri.....	57
Tablo 16 Farklı İNS:KZ:TPP oranları için mikroemülsiyon formülasyonlarına ait zeta potansiyel ölçüm değerleri	57
Tablo 17 F1-F4 formülasyonları için ölçülen viskozite değerleri	60
Tablo 18 F1-F4 formülasyonları için ölçülen pH değerleri.....	61
Tablo 19 F1-F4 formülasyonları için ölçülen elektriksel iletkenlik değerleri.....	61
Tablo 20 F1-F4 formülasyonları için ölçülen refraktif indeks değerleri	61
Tablo 21 İn-vivo çalışma için belirlenen gruplarda 0-24 saat arasında elde edilen plazma glukoz seviyesindeki % değişim verileri.....	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 İnsülin molekülü (hekzamer)	7
Şekil 2 İnsan insülininin yapısı ve farklı etki süreli insülin analogları	8
Şekil 3 Biyomolekül üretiminde varyasyona neden olan değişim kaynakları	9
Şekil 4 Transport mekanizmasının şematik gösterimi.....	16
Şekil 5 Kitin ve kitozanın moleküler yapıları	26
Şekil 6 Sodyum tripolifosfat yapısı	28
Şekil 7: İnsülin SDS-PAGE ile elektroforetik teşhis sonuçları.....	49
Şekil 8 İnsülinin 272 nm dalga boyunda pH 7,4 PBS ile elde edilen kalibrasyon eğrisi	50
Şekil 9 Özgünlük, seçicilik bulguları.....	54
Şekil 10 Mikroemülsiyon formülasyonuna ait faz diyagramı	55
Şekil 11 pH 1,2 PBS'de F2-F5 için elde edilen insülin salım profilleri	58
Şekil 12 pH 1,2 PBS'de F2, F12-F14 için elde edilen insülin salım profilleri	59
Şekil 13 pH 6,8 için insülin salım profilleri İNS:CS oranı 5:5 (h/h).....	60
Şekil 14 A1-A12 kodlu iç faz örneklerine ait sirküler dikroizm spektrumları	63
Şekil 15 A1-A12 kodlu iç faz örneklerine ait sirküler dikroizm spektrumlarının toplu gösterimi	64
Şekil 16 B1-B11 kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarına ait sirküler dikroizm spektrumlarının toplu gösterimi	64
Şekil 17 B1-B11 kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarına ait sirküler dikroizm spektrumları	65
Şekil 18 F1 kodlu formülasyona ait sitotoksisite bulguları.....	66
Şekil 19 F2 kodlu formülasyona ait sitotoksisite bulguları.....	67
Şekil 20 F3 kodlu formülasyona ait sitotoksisite bulguları.....	67
Şekil 21 F4 kodlu formülasyona ait sitotoksisite bulguları.....	68
Şekil 22 F5 kodlu formülasyona ait sitotoksisite bulguları.....	68
Şekil 23 F1-F5 kodlu formülasyonlara ait sitotoksisite bulgularının toplu gösterimi	69
Şekil 24 İn-vivo çalışma için belirlenen gruplarda 0-24 saat arasında elde edilen plazma glukoz seviyesindeki % değişimi gösteren grafik	71

KULLANILAN KISALTMALAR

DM	Diabetes Mellitus
KZ	Kitozan
TPP	Sodyum tripolifosfat
INS	İnsülin
Rh-ins	Rekombinant insan insülini
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamt Jel Elektroforezi
Sür/Kos	Sürfaktan/Kosürfaktan
XTT	Sodium3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4- tetrazolium]bis(4-methoxy-6- nitro)benzenesulfonicacid.
ME	Mikroemülsiyon
Y/S	Yağ/Su
S/Y	Su/Yağ
HLB	Hidrofil-Lipofil Denge
UP su	Ultra saf su
dH ₂ O	Distile su
T80	Tween 80
EtOH	Etanol
(h/h) veya (h:h)	Hacim/Hacim oranını temsil etmektedir
(a/a) veya (a:a)	Ağırlık/Ağırlık oranını temsil etmektedir
IU	İnternasyonal ünite
PDI	Polidispersite İndeksi
Da	Dalton
kDa	Kilo Dalton
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
ACN	Asetonitril
TFA	Trifloro asetik asit

I. GİRİŞ ve AMAÇ

Rekombinant DNA teknolojilerinde ve Farmasötik Biyoteknoloji Bilimindeki ilerlemeler ile protein ve peptit yapıdaki ilaçların geliştirilmesi ve formülasyonu eczacılık alanının yeni hedefleri arasına girmiştir. 2013 yılı verilerine göre yüzden fazla hastalığı hedef alan dokuz yüzden fazla protein ve peptit yapıdaki ilaç araştırma geliştirme aşamasındadır (1).

Geleneksel olarak protein ve peptit yapıdaki terapötikler intravenöz, subkütanöz ve inramüsküler olarak kullanılmaktadır. Uygulama kolaylığı sağlayan ve hasta uyuncunu arttıran oral aktarım sistemlerinin protein ve peptit ilaçlar için uygulanması günümüzün popüler araştırma konularından birini oluşturmaktadır. Bu ilaçların oral aktarımının sağlanmasında birçok engel mevcuttur. Makromolekülün gastrointestinal sistemdeki degradesyondan korunarak intestinal bariyerlerden permeasyonunun sağlanması ve molekülün sirküler dolaşıma katılmasıyla peptit ve proteinlerin biyoyararlanımı temin edilebilir.

Uluslararası Diyabet Federasyonunun 2013 yılı verilerine göre tüm dünyada 382 milyon kişi diyabet hastasıdır ve her sene dünya sağlık harcamalarının 548 milyon dolarlık kısmı diyabete harcanmaktadır. İnsüline bağımlı diyabet hastaları her gün tekrarlayan dozlarda enjeksiyon uygulamasına maruz kalmaktadır. Pulmoner insülin formülasyonu geliştirilse de kullanımı istenilen düzeye ulaşamamıştır. Ayrıca, klinik olarak uygulanabilir bir oral insülin formülasyonu piyasada mevcut değildir(2).

Tez konusu olarak, ilk rekombinant insan proteini onayı alan insülinin oral yolla verilisinin geliştirilmesi amacı ile S/Y mikroemülsiyon sisteminin hazırlanması seçilmiştir. Geliştirilen

sistemin karakterizasyonu yapılarak salım özellikleri belirlenmiştir. Hücre kültürü denemeleriyle hazırlanan formülasyona ait toksisite çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra *in vivo* hayvan denemeleri ile formülasyonun biyoyararlanımı saptanmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

1. Peptit ve Proteinler Hakkında Genel Bilgiler

Protein ve peptitler hidrolize uğradıklarında iki ya da daha çok aminoasit oluşturan biyopolimerlerdir. Proteinler binlerce aminoasitten oluşabilirler. Bununla birlikte protein ve polipeptit terimleri birbirinin yerine kullanılabilir. Ancak genel anlamıyla moleküler ağırlığı 1000 Dalton (Da)'un altında olanlar polipeptit, üzerinde olanlar protein olarak adlandırılmaktadırlar. Geleneksel farmasötiklere göre proteinlerin moleküler büyüklüğü daha büyüktür ve ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıya sahiptirler. Bu özellik onları fiziksel ve kimyasal degradasyona daha duyarlı hale getirir. 1922 yılında insülin'in keşfi ile beraber proteinlerin tanımlanması ile potansiyel protein ve peptit ilaçların ticari ürüne dönüştürülmesinin önü açılmıştır. Bazı protein ve peptit yapıdaki ilaç örnekleri Tablo 1'de verilmiştir (1).

Tablo 1 Piyasada bulunan bazı peptit ve protein yapıdaki ilaçların listesi

İlaç	Kimyasal Formülasyonu	Molekül Ağırlığı (g/mol)
Peg-interferon α -2a	C ₈₆₀ H ₁₃₅₃ N ₂₂₇ O ₂₅₅ S ₉	19241
Peg-interferon α -2b	C ₈₆₀ H ₁₃₅₃ N ₂₂₉ O ₂₅₅ S ₉	19269.1
Pegfilgrastim	C ₈₄₅ H ₁₃₄₃ N ₂₂₃ O ₂₄₃ S ₉	18802.8
Doksorubisin	C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₁	543.52
İnsülin	C ₂₅₇ H ₃₈₃ N ₆₅ O ₇₇ S ₆	5801.6
Eksenatid	C ₁₈₄ H ₂₈₂ N ₅₀ O ₆₀ S	4186.6

2. Peptid ve Protein İçeren İlaç Taşıyıcı Sistemler Hakkında Genel Bilgiler

Biyoteknolojideki gelişmeler birçok proteinin terapötik amaçlı kullanımının önünü açmıştır. Günümüzde biyoterapi çok sayıda kronik hastalığın ve ayrıca kanser, AIDS, otoimmün hastalıklar gibi birçok malign hastalığın potansiyel tedavisi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca proteinler teşhiste ve hatta aşı formülasyonları ile koruyucu tedavide kullanılmaktadırlar (3).

Rekombinant protein üretim teknolojilerinin geliştirilmesi ile yüksek ölçekte üretimleri sağlandıktan sonra protein bazlı tedaviler daha da gelişmiştir. 1977 yılında Genentech tarafından üretilen Somatostatin fabrikasyon ile üretilen ilk rekombinant insan proteinidir. Yine Genentech tarafından 1996 yılında markete sunulan rekombinant insan insülin analogu, alanında ilktir (4).

2.1. Peptit ve Protein İçeren İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Uygulama Yolları

2.1.1. Parantral Yol

Yakın geçmişe kadar terapötik protein ve peptitler çoğunlukla sübkütanöz, intramüsküler ve intravenöz enjeksiyon ile uygulanmaktaydı. Ancak protein uygulanmasında enjeksiyon kullanılması, acıya neden olma, hastalar tarafından toleransının düşük olması ve alerjik reaksiyonlara yol açma gibi problemlere neden olmaktadır. Bununla birlikte terapötik proteinlerin kandan hızlıca uzaklaşması hastalara toksik doza kadar ulaşabilecek tekrarlayan ve yüksek dozlarda enjeksiyon yapma zorunluluğu doğurmaktaydı. Sonuç olarak araştırmacılar daha efektif, kolay, güvenli ve non-invasiv protein ve peptit uygulama yolları araştırmaya odaklanmışlardır (3).

2.1.2. Non-invasiv Uygulama Yolları

İlacın uygulama yolu ile terapötik etkisi arasında büyük bir korelasyon vardır. Günümüzde temel olarak nasal yol, oral yol,

pulmoner yol, oküler yol ve rektal yol kullanılarak protein ilaç uygulaması ile ilgili araştırmalar mevcuttur.

Oral yol, ilaç uygulama yolları arasında en çok tercih edilenidir. Marketlerdeki geleneksel küçük molekülü ilaçların %60'ından fazlası oral yol ile uygulanmaktadır. Ancak bu durum protein ve peptit yapıdaki ilaçlar için geçerli değildir. Desmopressin, Siklosporin A gibi polipeptit ilaçların oral şekli marketlerde yerini alsa da oral yol ile etkili peptit ve protein aktarımı hala tam olarak başari lamamıştır (5). Hasta uyumu, uygulama kolaylığı, düşük toksisite, düşük maliyet gibi birçok avantaja sahip olan oral yol ile uygulama sağlayabilmek oldukça zordur. İlgili peptit ve proteinin kimyasal özelliklerinin (moleküler ağırlık, pH stabilitesi, hidrofobisite, moleküler büyüklük, iyonizasyon katsayısı vb.) iyi bilinmesi, gastrointestinal transport mekanizmalarının ve protein absorpsiyon bariyerlerinin anlaşılması ve oral biyoyararlanımı arttırıcı formülasyon stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

3. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM), insülinin salınımı, insülin etkisi veya bu faktörlerin her ikisinde de bozukluk olması sonucunda ortaya çıkan hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır (6).

Uluslararası Diyabet Federasyonunun 2013 yılı verilerine göre tüm dünyada 382 milyon kişi diyabet hastasıdır ve her sene dünya sağılık harcamalarının 548 milyon dolarlık kısmı diyabete harcanmaktadır (7).

Diyabet tek bir hastalık değildir. Görece veya mutlak insülin eksikliği nedeniyle kan şekerinin yükselmesi ile karakterize çeşitli sendromlardan oluşur.

3.1. Diyabet Tipleri

3.1.1. Tip 1 Diyabet (İnsüline Bağımlı DM)

İnsüline bağımlı DM genellikle gençlerde görülse de tüm yaşlarda görülebilir. Hastalık pankreas β hücrelerinin ileri derecede nekrozuna bağlı olarak insülinin mutlak yetersizliği ile karakterizedir. β hücrelerinin işlev kaybı genellikle β hücrelerine karşı gelişen otoimmün aracılı süreçlere bağlıdır ve bu virüs invazyonu ya da kimyasal bir toksin ile tetiklenebilir. Bu hücrelerin harabiyetine bağlı olarak pankreasın glukoz yanıtı gerçekleşmez ve tip 1 diyabetli olan hastalarda insülin eksikliğinin tipik bulguları görülür. Hiperglisemi ve hayati tehlikesi olan ketoasidozdan kaynaklanan katabolik durumları önlemek için tip 1 diyabetli hastaların dışarıdan insülin almaları gerekir.

Normal bireylerde emilimden sonraki dönemde β hücreleri sabit salgısı ile dolaşımdaki düşük bazal insülin düzeyleri korunur. Bu da lipolizi, proteolizi ve glikojenolizi baskılar. Dolaşımda glukoz ve aminoasit düzeylerindeki geçici artışa yanıt olarak yemek alımından sonraki iki dakika içinde insülin salgılanması hızla artar. Bu on,on beş dakika devam eder ve sonrasında postprandial insülin salınımı takip eder. Ancak tip 1 diyabetli hastaların işlevsel β Hücreleri olmadığı için bazal insülin salgısını sürdüremedikleri gibi dolaşımdaki besinlere yanıt olarak da insülin salgılayamazlar.

3.1.2. Tip 2 Diyabet (İnsüline Bağımlı Olmayan DM)

Bu hastalık virüsler veya otoimmün antikorlardan çok genetik faktörler, yaş, obezite ve periferik insülin direnci gibi nedenlerden gelişir. Oluşan metabolik değişiklikler tip 1 DM'a göre daha hafiftir. Pankreasın β hücrelerinin bir kısmı işlevlerini korurlar ancak glukoz homeostazını korumak için salınan insülin yetersizdir (8).

3.1.3. Gestasyonel Diyabet

Gebeliğe bağı insülin intoleransı olarak tanımlanır. Gebelik süresinde kan şekerinin normal düzeyde tutulması çok önemlidir çünkü hiperglisemi, fetüste konjenital anomalilere yol açabilir (9).

3.2. İnsülin Tedavi Protokolleri

Tip 1 diyabetlilerde, diyet ile kontrol altına alınamayan gebelik diyabetinde ve endojen insülin rezervi azalmış tip 2 diyabetlilerde uygulanmaktadır.

Çoklu doz insülin enjeksiyonları:

- Günde 3 kez öğün öncesi hızlı/kısa etkili (bolus) insülin + günde 1 kez (tercihen gece) orta/uzun etkili (bazal) insülin
- Günde 3 kez öğün öncesi hızlı/kısa etkili (bolus) insülin + günde 2 kez orta/uzun etkili(bazal) insülin
- Bazal-bolus insülin tedavisini 2 farklı insülin preparatı ile uygulamakta zorluk çeken bazı tip 2 diyabetli kişilerde günde 3 doz analog karışım insülin seçeneğı düşünülebilir.

Sürekli cilt altı insülin infüzyonu

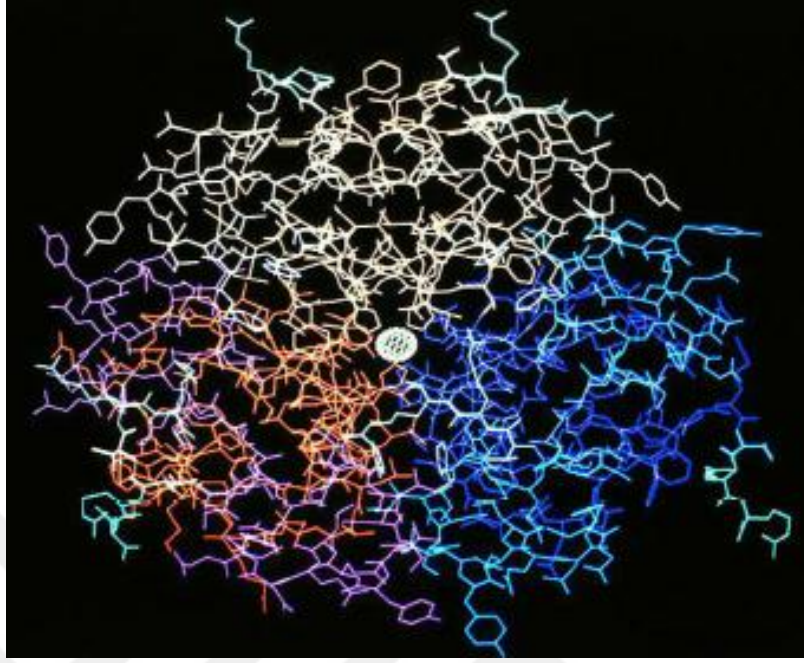
- İnsülin pompası ile bazal, bolus ve düzeltme dozlar (9).

Farklı insülin tipleri ile ilgili bilgi, ilerleyen kısımlarda anlatılacaktır.

4. İnsülin

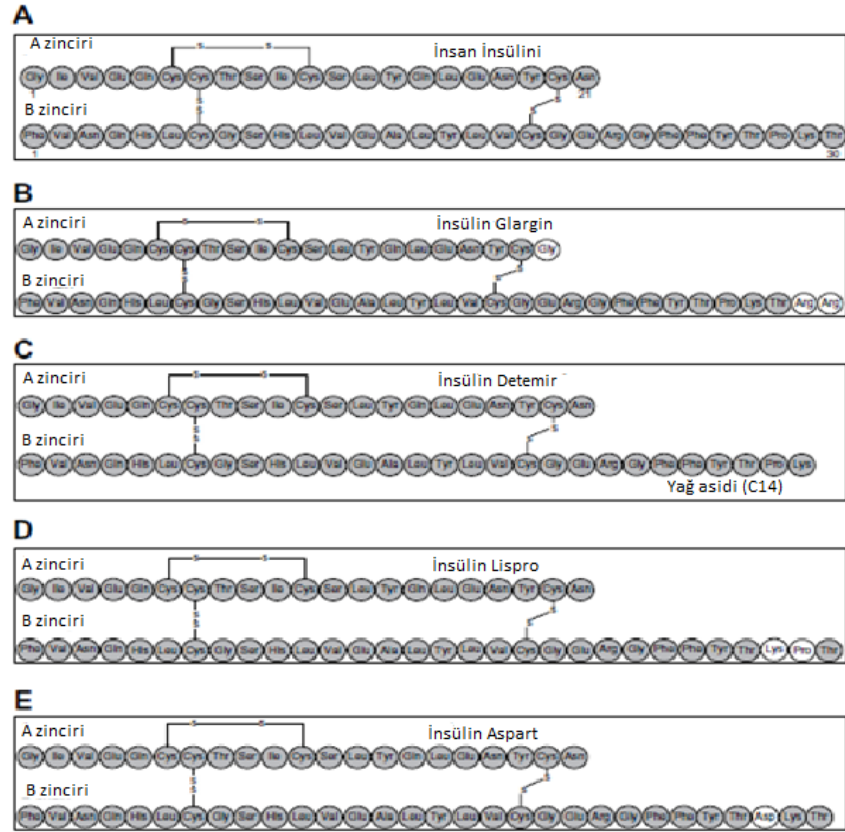
4.1. İnsülin Hakkında Genel Bilgiler

İnsan insülini biyolojik aktivitesi için gerekli olan primer, sekonder ve tersiyer yapıya sahip kompleks bir moleküldür (Şekil1)(10). İnsülin birbirine disülfid bağları ile bağı A zinciri 21, B zinciri 30 aminoasit içeren polipeptit bir hormondur (moleküler ağırlığı 5808 Da) (8,11,12). İnsülin salgılanması sadece kan glukoz düzeyiyle değil bazı aminoasitler, diğer hormonlar ve otonomik mediyatörler tarafından da kontrol edilir. Salınım en sık olarak, glukoz taşıyıcıları aracılığı ile pankreasın β hücrelerine alınan yüksek kan glukozu ile başlatılır.



Şekil 1 İnsülin molekülü (hekzamer) (9)

Endojen olarak salgılanan insülinin biyolojik-kinetik etkileri ile rekombinant insan insülininin etkileri birebir aynı değildir. Ayrıca, doğal insülinin aminoasit sekansında yapılan değişiklikler insülinin etkisinin uzamasına ya da ksalmasına neden olur. Bu değişikliklerden yola çıkarak insülinin uzun etki süreli insülin analogları; glargin, detemir ve degludek ve kısa etki süreli insülin analogları; lispro, aspart ve glulisin oluşturulmuştur. Örneğin Şekil 2’de görüldüğü gibi, insülin glargin B zincirinin C terminaline iki arginin rezidüsü eklenmesi ve A21 pozisyonundaki glisin aspargin ile yer değiştirmesi ile oluşmuştur (11).



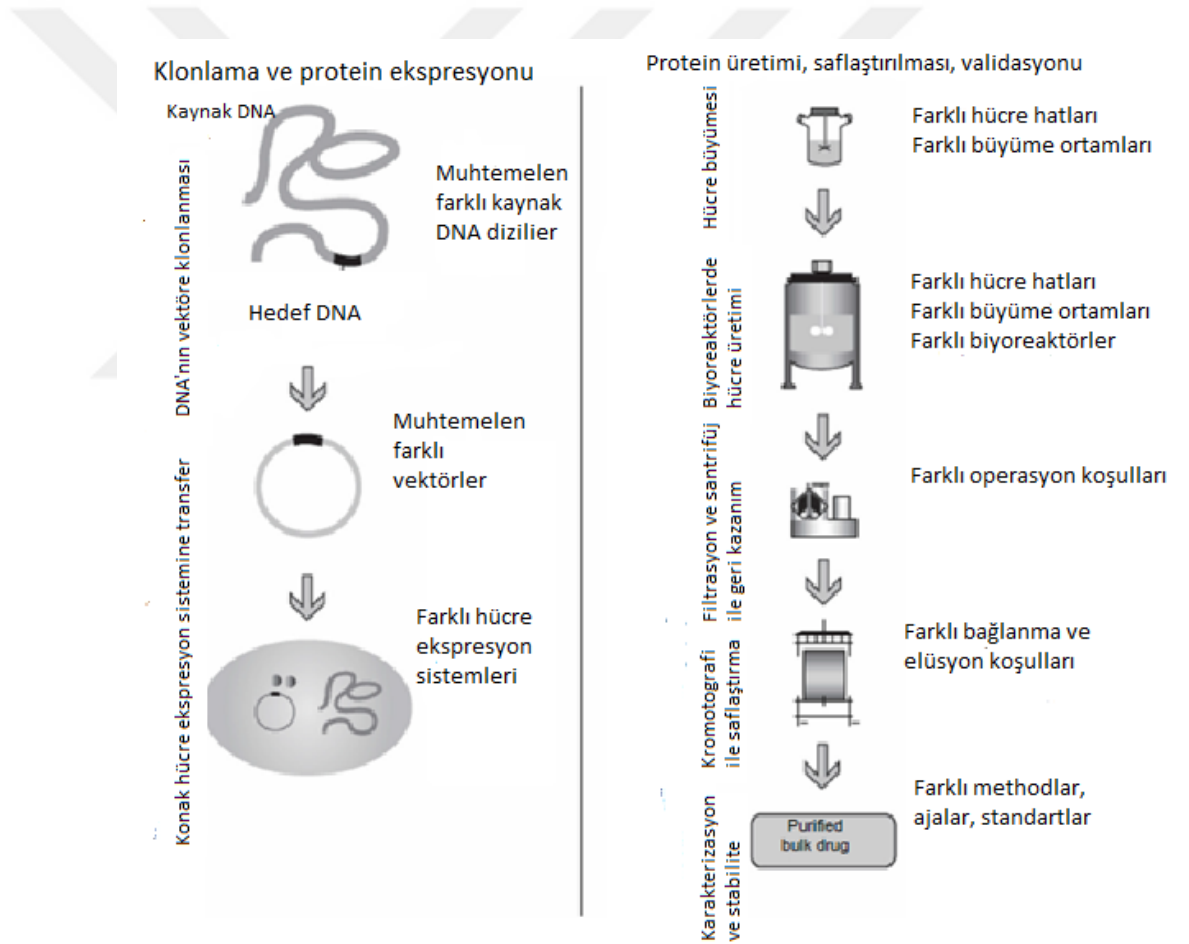
Şekil 2 İnsan insülininin yapısı ve farklı etki süreli insülin analogları
 *(A)insan insülini, (B) insülin glargin, (C) insülin detemir, (D) insülin lispro, (E) insülin aspart(11)

4.2. İnsulin Kaynakları ve Rekombinant İnsülin Üretimi

Banting ve Best tarafından 1921-22 yıllarında Toronto Üniversitesinde keşfedildiği yıllardan itibaren insülin DM tedavisinde kullanılmıştır (13). İlk zamanlarda sığır ve domuz pankreaslarından izolasyon yolu ile elde edilen insülinin yerini, rekombinant DNA teknolojilerinin gelişmesi ile ileri teknoloji ile üretilen rekombinant insan insülinleri (Rh-ins) almıştır.

Terapötik biyomoleküllerin üretimi, kompleks, çok basamaklı ve üretim aşamalarının tamamının ancak üretici tarafından bilindiği

bir işlemdir. Üretim aşamalarındaki her basamak üretilen biyomolekülün özelliklerini ve kalitesini etkiler. Bu aşamalarda değişime yol açan kaynaklar Şekil 3'te verilen üretim şemasında gösterilmiştir (11). Bu nedenle insülin dahil biyomoleküllerin üretim aşamalarında; uygun vektör seçimi, üretimin gerçekleşeceği uygun konak hücrenin seçimi (bakteri, maya vs.), protein üretim, pürifikasyon, izolasyon metodları üretilecek son ürüne göre spesifik olarak seçilmelidir. Örneğin pürifikasyon; santrifüj, filtrasyon, kromatografi gibi birçok farklı teknikle gerçekleştirilebilir.



Şekil 3 Biyomolekül üretiminde varyasyona neden olan değişim kaynakları (11)

Özellikle insülin ve insülin analogları için üretim süreci geliştirilirken birçok anahtar basamak vardır. Üretimin gerçekleştirileceği konak hücre, genellikle bakteri (*Escherichia coli*) ya da maya (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*) seçilmelidir. Farklı üretici firmaların insülin üretiminde kullandıkları farklı konak hücre sistemleri Tablo 2’ de gösterilmiştir (11).

Tablo 2 İnsülin üretiminde kullanılan konak hücreler

Organizma	Üretici	İnsülin (müstahzar)
<i>Escherichia coli</i> (<i>E.Coli</i>)	Eli Lilly and Company, Indinapolis, Amerika	İnsan İnsülini (Huminsülin®)
<i>E.Coli</i>	Eli Lilly and Company	İnsülin lispro (Humalog 100®/Liprolog)
<i>E.Coli</i>	Sanofi	İnsülin glargin (Lantus®)
<i>E.Coli</i>	Berlin-Chemie, Berlin, Almanya	İnsan İnsülini (Berlinsülin®)
<i>Pichia pastoris</i>	Biocon, Bangalore, Hindistan	İnsülin glargin (Basalog®)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Novo Nordisk, Bagsvaerd, Danimarka	İnsülin aspart (NovoRapid®)

4.3. İnsulin İçeren Farmasötik Şekiller

Non-invasiv yol ile insülin aktarımı araştırmacılar için ulaşılmak istenen bir hedef haline gelmiştir. Bu amaçla pulmoner, oral, transdermal, nasal, rektal ve oküler yol dahil birçok çalışma yapılmıştır. Her uygulama yolunun avantaj ve dezavantajları vardır. Bu farklı uygulama yollarından bazılarına ait ayrıntılı bilgi Tablo 3'te verildiği gibidir (14).

Tablo 3 İnsülin aktarımı için non-invasiv yollar (14)

Uygulama Yolu	Avantaj	Dezavantaj
Pulmoner	-yüksek permeabilite -geniş yüzey alanı -yüksek vaskülerite -immünotolerans	-biyoyararlanım subkütanöze göre %9-22 -çok miktarda insülin gerektir -yaş, solunum özellikleri, sigara kullanımına göre absorpsiyon değişir -pahalı
Oral	-kolay ve uygun -yüksek hasta uyumu -uygulama kolaylığı	-düşük biyoyararlanım -gastrointestinal sistemde proteolitik degradasyon -yüksek intestinal bariyerler
Transdermal	-geniş yüzey alanı -mikroiğne, iyontoforez, sonoforez ile permeabilite artırılabilir	-deri insülin gibi büyük hidrofilik moleküllere düşük permeabilite gösterir -dozlama zordur
Nazal	-geniş absorpsiyon alanı -yüksek vaskülerite	-düşük biyoyararlanım (%8-15) -proteolitik enzimler -nasal iritasyon -mukosiliyer klerens
Rektal	-enzimatik degradasyon yoktur -lenfatik sistem ile sistemik sirkülasyona katılım	-lokal advers reaksiyon -düşük ve farklı absorpsiyon dozları -lokal iritasyon
Oküler	-sistemik absorpsiyon enjeksiyon kadar hızlıdır -ilk geçiş etkisine uğramaz	-düşük biyoyararlanım -lokal iritasyon

4.3.1. Pulmoner İnsülin Uygulanması

Hasta uyuncunu arttıracak subkütanöz yola alternatif uygulama yolları uzun yıllardır araştırılmaktadır. Pulmoner uygulama yolu bu yollardan bir tanesidir. Aerosolize insülinin pulmoner uygulamada kan glukoz düzeyini düşürdüğü ilk olarak 1920'lerde gösterilmiştir. Ancak, insülinin bu yolla biyoyararlanımının çok düşük olduğu bilinmektedir. Yıllar içinde geliştirilen çalışmalarda pulmoner insülinin; nasal, rektal, bukkal, konjonktival uygulamalara göre yararlanımı 4 ila 40 kez arttırdığı bilinmektedir. Pulmoner taşımada partikül büyüklüğü önemli bir kısıtlayıcı faktördür. Partikül büyüklüğü ancak 1-3 µm olarak ayarlandığında insülinin pulmoner yol ile kan dolaşımına geçmesi mümkündür. Ayrıca, inhale insülinin etkinliği solunumsal faktörlere, solunum eforuna, tidal volümüne göre de değişmektedir. Pulmoner insülin formülasyonu olarak piyasaya çıkan ilk ilaç 2007 yılında Pfizer tarafından piyasaya sürülen Exubera'dır. Daha sonra da farklı firmalar tarafından piyasaya sunulan pulmoner insülinler; yüksek maliyetleri, istenilen satış seviyesine yükselememeleri, istenilen dozun alınması için tekrarlayan inhalasyon gerektirmeleri ve doz ayarlamamanın zor olması nedeniyle piyasadan çekilmişlerdir. Günümüzde piyasada bulunan tek pulmoner insülin formülasyonu 2014 temmuz ayında FDA tarafından onaylanan ve MannKind tarafından piyasaya sunulan AFREZZA'dır (2).

4.3.2. Bukkal İnsülin Uygulanması

Bukkal mukozadan insülin absorpsiyonunu hedefleyen çalışmalar ilk olarak 1925 yılında gerçekleştirilmiştir. Oral mukozada bulunan farklı alanların farklı geçirgenlik özelliği göstermeleri nedeniyle bukkal yol ile insülin aktarımı oldukça zordur. Bukkal insülin formülasyonu olarak piyasaya çıkan tek ilaç Oral-Iyn (Generex, Kanada)'dir. Bu ilaç, ağız içine sprey şeklinde uygulanan insülin aerosolünden oluşur. Her spreyleme dozu 10 IU

insülin içerir ancak bunun %10'u yani ancak 1 IU'si kan dolaşımına geçebilmektedir(13,15).

4.3.3. Nasal İnsülin Uygulanması

Diğer uygulama yolları kadar eski olmamakla beraber intranasal insülin uygulaması 25 yıldır araştırılmaktadır. Nasal absorpsiyon hızlıdır ancak intravenöz enjeksiyona göre biyoyararlanım % 8,3 civarındadır.

Nasal yol ile uygulama insülinin kan beyin bariyerini geçerek beyine ulaşmasını sağlar. Hipoglisemik etki göstermesinin yanısıra son yıllarda yapılan araştırmaların şaşırtıcı sonuçlarına göre intranasal insülin Alzheimer hastalığında umut vaat etmektedir. Bu yol ile uygulanan insülinin, nöronal enerji metabolizmasını arttırdığı, nörotransmitter regülasyonunu sağladığı ve bilişsel işlevlerin iyileştirilmesine katkıda bulunduğuna yönelik araştırmalar mevcuttur (16,17).

4.3.4. Oral İnsülin Uygulanması

İnsülin bulunduktan hemen sonra 1922 yılında oral insülin formülasyonu geliştirme çalışmaları başlamıştır (15). Oral uygulanan insülin bağırsaktan direkt olarak emilerek portal sirkülasyon yoluyla hepatik glukoz üretimini inhibe edeceği karaciğere ulaştırılır. Diğer yollardan farklı olarak bağırsak, absorbe edilen maddenin direkt olarak kan dolaşımına girmesini sağlayan doğal yoldur. Ayrıca bağırsağın potansiyel uygulama yolları arasında en büyük absorpsiyon alanına sahip olması, oral yola daha iyi bir etkinlik kazandırır.

Protein yapısındaki bir ilaç korunmadığı sürece mide ve bağırsaktaki proteaz etkinlikleri, midedeki asidik pH, mukus, proteaz içeren mikrovilluslar gibi fiziksel bariyerler nedeniyle oral biyoyararlanımı %1-2 'den daha düşüktür. Özet olarak, etkin oral

protein aktarımının sağlanması için aşağıdaki özelliklerin sağlanması gerekir,

- ilacı mide pH'ından koruyacak ve bağırsak pH'ında salımını sağlayacak pH duyarlı özellik kazandırılması

- seçimli ve geridönüşümlü olarak bağırsakta bulunan çapraz kavşakların açılmasının sağlanması

- salım sonucunda kanda fizyolojik insülin konsantrasyonunun sağlanabilmesi

- formülasyon için kullanılan maddelerin biyoyoumlu olması (18).

Oral insülin formülasyonlarının piyasada yer bulmasıyla ilgili ilk ciddi çalışma Emisphere (İngiltere) firması tarafından yapılmıştır. 2006 yılında Faz 2 denemelerine kadar ilerlenmiş ancak ileri denemelere geçilmemiştir. Günümüzde Emisphere ve Novo Nordisk (Danimarka) firmaları oral insülin için geliştirdikleri formülasyonun preklinik çalışmalarını yapmaktadırlar.

Hindistan'da bulunan biyoteknoloji firması Biocon, IN 105 projesi ile marketlerde yerini alacak ilk oral insülin preparatını yapmayı hedeflemektedir. Tüm olumsuzluklara rağmen IN-105 Hindistan'da Faz 3 denemeleri aşamasındadır (15).

5. Gastrointestinal Sistem

Mide sindirim sisteminin en geniş yeridir. Normal olarak kapasitesi 1500 mililitre (mL)'dir, bu miktar zorlandığı zaman 5000 mL'ye kadar çıkabilir. Kas tabakalarında içte halka şeklinde, dışta uzunlamasına olan düz kas lifleri midenin peristaltik hareketini sağlar. Midenin iç yüzü mukoza tabakası ile kaplıdır ve burada özel mide salgısı yapan bezler bulunur. Salgılanan mide özsuğu miktarı 8-15 mL'dir, şiddetli asit reaksiyon gösterir, pH'ı 0,9-1,5 arasındadır; su, mukus, tuzlar, hidroklorik asit ve enzimler içerir.

İnce bağırsak sistemin absorpsiyon bölgesidir, ortalama 5 m uzunluğundadır ve birbirinin devamı olan üç bölümden oluşur;

duodenum, jejunum ve ileum. Duodenum ince bağırsağın en kısa bölümüdür, 25 santimetre (cm) boyundadır ve hareketsizdir. Pankreas dış salgısı ve safra duodenuma boşalır. Jejunum ve ileum ise ince bağırsağın hareketli olan bölümleridir. Jejunum ortalama 2 metre (m), ileum 2,5 m uzunluğundadır, ikisi arasında belirli bir sınır yoktur. Jejunum damarca daha zengindir. İnce bağırsağın peristaltik hareketlerini periton tabakası altındaki düz kaslar gerçekleştirir. İç yüzeyi kaplayan mukoza kıvrım ve çıkıntılara sahiptir, bunlar sayesinde yüzey alanı çok genişler. 100-200 metrekare (m²) arasında olabilir ve absorpsiyon artar. Mukoza epitelinde bulunan bez hücreleri mukus ve ince bağırsak sindirim salgısını verir.

Kalın bağırsak 1,5-2 m uzunluğundadır, ince bağırsakları bir çerçeve gibi sarmıştır. Esas görevi içindeki maddelerin suyunu emmektir. Mukozasında çıkıntılar bulunmaz. Rektum ile sonuçlanır.

Oral sistemlerin etkili olabilmesinde çeşitli fizyolojik faktörler rol oynar. Bunların başında pH, sindirim sisteminden geçiş süresi, sindirim sistemi hastalıkları, ilacın absorplandığı bölge, mukoza ve karaciğerden geçişte metabolize olma oranı gelir.

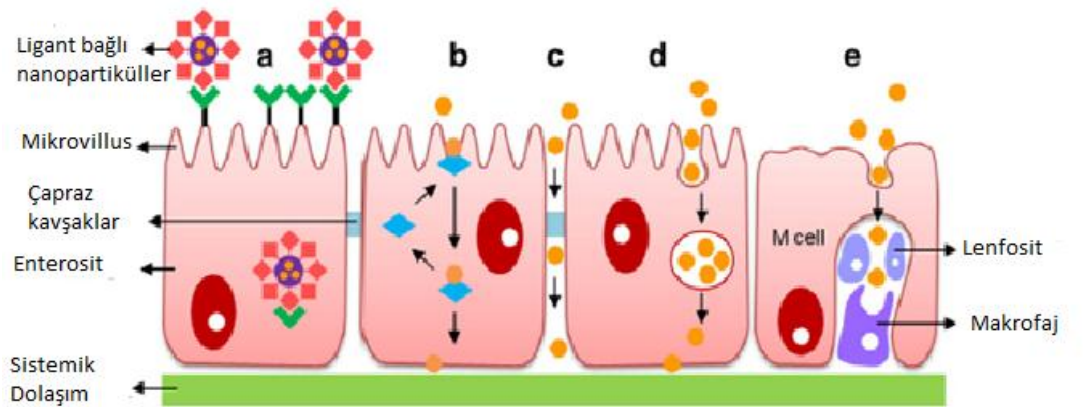
Mide pH'ı yiyeceklerle değişir ve pH 6'ya kadar çıkabilir. Preparatın midede kalış süresi midenin dolu olup olmamasına, preparatın yemekten önce, sonra veya yemekle birlikte alınmasına bağlı olarak değişebilir. Mide dolu iken pilordan geçebilen partiküllerin maksimum boyutu 7 milimetre (mm) kadardır. Dolayısı ile ağır bir yemekten sonra alınan tek birimli sistemler midede çok uzun süre kalır (10 saat ve daha fazla). Ancak mide boşaldıktan sonra ortaya çıkan şiddetli kasılmalar sonucu bağırsağa geçebilirler. Midenin esas görevi içeriğini karıştırmak ve kimyasal yolla belli oranda sindirmektir. Etkin maddenin çoğu için iyi bir absorpsiyon bölgesi değildir.

İnce bağırsaklar ise geniş yüzeye sahip bir absorpsiyon bölgesidir. İnce bağırsak geçiş hızı oldukça sabittir, ortalama 3 ± 1 saat sürer, yiyecek ve preparat şeklinden etkilenmez.

Sindirim sisteminden toplam geçiş süresi 24 saat civarındadır, fakat bu süre çok değişebilir, hatta sağlıklı genç erkeklerde 6-8 saate kadar kısalabilir. Bağırsağın son bölgelerinin absorpsiyon kapasitesi az olduğu için absorpsiyon için geçen süre daha kısadır, genellikle kontrollü salım sistemleri etkin maddeyi 8-12 saat süresince belli hızda açığa çıkaracak şekilde tasarlanır. Preparatın absorpsiyon bölgesinde daha uzun süre kalabilecek şekilde tasarlanması halinde bu süre daha da uzayabilir (19).

5.1. Gastrointestinal Sistemden Transport Mekanizmaları

Moleküllerin hücre membranını geçebilmeleri için dört temel mekanizma vardır. Bunlar; paraselüler, transselüler, taşıyıcı aracılı ve reseptör aracılı transporttur. Her yol için absorpsiyon, molekülün fiziksel özelliklerine ve gastrointestinal sistemden protein absorpsiyonunu kısıtlayan biyolojik bariyerlere bağlıdır. Bu nedenle oral protein taşıyıcı sistem geliştirilmesi için tüm bu mekanizmaların anlaşılması önemlidir.



Şekil 4 Transport mekanizmasının şematik gösterimi

*(a) reseptör-aracılı transport, (b) taşıyıcı aracılı transport, (c) paraselüler transport, (d) transselüler transport, (e) M hücre aracılı transport (M hücreleri tarafından fagositoz) (20)

5.1.1. Paraselüler Transport

Paraselüler transport maddenin epitel hücreler arasındaki interselüler boşluklardan geçişini ifade eder. Paraselüler transport difüzyon ile ortaya çıkan pasif bir taşınmadır (20). Paraselüler yol, komşu hücreler (enterositler) arasındaki alan boyunca uzanan sulu bir ortam olarak da tanımlanmaktadır. Sulu bir ortam olması nedeniyle suda çözünmüş besin, iyon gibi küçük maddelerin pasif difüzyon aracılığı ile geçişi kolaylaşmaktadır. Paraselüler permeabilite esas olarak hücrelerin apikal yüzeylerinde yer alan sıkı kavşaklar tarafından düzenlenmektedir. Bu sıkı kavşaklar absorpsiyon için hız sınırlayıcı bariyerler olarak değerlendirilmektedir. Ancak sıkı kavşakların hareketli yapısı özellikle hidrofilik ilaçların absorpsiyonunun artmasına yardımcı olur. Bu bağlantı kavşakları, paraselüler yoldan iyon ve suda çözünen küçük moleküllerin pasif difüzyonunu kontrol eder. Bu yol ile permeabilitenin arttırılması, ilaç absorpsiyonunun arttırılmasında bir çözüm olarak düşünülmektedir. Bunun gerçekleştirilmesi için sıkı kavşakların yapısının anlaşılması ve düzenlenmesi gerekmektedir (21). Sıkı kavşaklara penetrasyonu arttıracak ve bu yapılardan geçişi sağlayacak şekilde sistemler geliştirilmesi oral protein aktarımı için ilk hedeflerden bir tanesidir (22).

5.1.2. Transselüler Transport

Transselüler taşınma intestinal epitelyal hücreler aracılığı ile gerçekleşen pasif ya da aktif olabilen transport şeklidir. Enterositler ve M hücreleri transellüler transportta birincil olarak görevli hücrelerdir (22).

5.1.3. Taşıyıcı Aracılı Transport

Maddenin hücre membranı ya da tüm hücre boyunca taşınıp enterosit bazal yüzeyinden sirkülasyona geçmesidir. Bu süreç küçük hidrofilik moleküllerin taşınması için uygundur. Aktif bir absorpsiyon şeklidir ve spesifik moleküllerin enerji bağımlı bir şekilde taşınmasına olanak verir. Taşıyıcılar hedef molekülleri

membran reseptörleri ile tanirlar ve onlari membran boyunca konsantrasyona bagli olmaksizin tasirlar (20).

5.1.4. Reseptör Aracılı Transport

Bu tasima genel olarak endositoz olarak bilinmektedir. Pinositoz, fagositoz, reseptör aracılı endositoz ve reseptör aracılı fagositozu icerir. Bu surecte ilk asama ligandin spesifik hücre yüzey resptörüne baglanmasidir. Daha sonra madde etrafında vezikül olusturularak maddenin endozomal asidik komportmana alımı saglanır. Protein yapıdaki ilaçlar reseptör spesifik ligandlar ile beraber kullanılacak sekilde modifiye edilerek proteinin biyoyararlanımı arttırılabilir (20).

6. Proteinlerin İntestinal Absorpsiyonundaki Bariyerler

Terapötik proteinlerin oral tasınması düşünöldüğünde bu yolda karşılaşılan bariyerlerin bilinmesi önemlidir. Bunlar temel olarak dört başlık altında incelenebilir.

- Denatürasyona neden olan midenin asidik ortamı
- Proteinleri parçalayan mide ve bağırsaktaki proteolitik enzimler
- Musin bariyeri
- Makromolekül yapıdaki maddelerin bağırsak duvarından geçişlerinin zor olması

Yukarıda listelendiği şekilde terapötik proteinlerin oral aktarımında ilk engel enzimatik bariyerdir. Midede bulunan majör proteolitik enzim pepsin; bağırsakta bulunan proteolitik enzimler tripsin, kimotripsin ve karboksipeptidazlardır. Peptit ilaçların enzimatik degradasyonu biyoyararlanımı düşüren ana unsurlardandır.

Bir sonraki temel bariyer müsın tabakasıdır. Goblet hücrelerinden salgılanan mukus, oral uygulanan ilaçların absorpsiyonu ve biyoyararlanımında önemli rol oynar. Proteazların aksine müsın tabakası fiziksel bir bariyerdir.

İlaç münin bariyerini aştıktan sonra sıradaki fiziksel bariyer, bağırsak duvarından geğıştir. Gastrointestinal sistemlerden geğış mekanizmaları bölüm 5.1' de anlatılmıştır (22).

7. Peptit ve Protein Taşıyıcı Sistemlerin Oral Biyoyararlanımını Arttırmak İçin Kullanılan Formölasyon Stratejileri

7.1. Penetrasyon Arttırıcılar

Penetrasyon arttırıcılar, taşınan molekülün mukozal membrandan geğışini kolaylaştırıcı maddeler olarak tanımlanabilirler. Penetrasyon arttırıcılar çok çeşitlidirler ve beş ana kategoriye ayrılabilirler.

- Şelatörler; EDTA, sitrik asit, salisilatlar, kolajen vb.

- Sümfaktanlar; sodyum lauril sülfat, polioksietilen-9-lauril eter, polioksietilen-20-setil eter vb.

- Safra tuzları; sodyum deoksikolat, sodyum glikolat, sodyum torokolat ve deriveleri

- Yağ asitleri; oleik asit, kaprilik asit ve deriveleri

- Sümfaktan olmayan maddeler; satüre olmayan siklik üre vb.

Penetrasyon arttırıcıların etki mekanizması net olmamakla birlikte üç temel mekanizma belirtilmiştir.

- Mukozal membranın yapısal özelliklerini değıştirerek bariyer fonksiyonunu azaltmak

- Protein ve peptitlerin termodinamik aktivitesini değıştirmek

- Protein ve peptitleri proteolitik aktiviteden korumak (2).

7.2. Enzim İnhibitörleri

Enzim inhibitörlerinin formölasyona ilavesi enzimatik bariyeri engelleyerek, protein ve peptitleri gastrointestinal sistemdeki değıredasyondan koruyarak intestinal absorpsiyonlarını kolaylaştırır. Aprotinin, amastatin, bestatin, promisin bu amaçla çokça kullanılmış enzim inhibitörlerindendir (2,4).

7.3. Polimer Konjugasyonu ile Protein Yapı Modifikasyonu

Proteinlerin kan dolaşımından hızlı eliminasyonu ve degradasyonu onların ilaç olarak rutin kullanımını engellemektedir. Hızlı protein eliminasyonu 40 kilodalton (kDa)' dan düşük moleküler ağırlığa sahip olan proteinlerin hızlı renal klirensinden kaynaklanabilir. Bununla beraber bu terapötik moleküllerin molekül ağırlıkları 40 kDa' u geçecek şekilde suda çözünebilir polimerler ile konjuge hale getirilmesi renal klirensi etkili bir şekilde yavaşlatarak ilacın kan akışında kalım süresini uzatır (23).

7.4. Protein Enkapsülasyonu: Taşıyıcı Sistemler

Biyoteknolojideki gelişmeler çok sayıda terapötik ve antijenik proteinin bulunmasına yol açmıştır. 2001 yılında 100' den fazla fazla peptit ve protein yapıdaki ilaç klinik araştırma basamağındaydı ve otuzdan fazlası FDA tarafından onay almıştı (24). Her sene yeni terapötik proteinler ilaç pazarında yerlerini almaktadırlar. Bu nedenle oral protein taşıyıcı sistemler geliştirmek önemli bir hedef haline gelmiştir. Proteinlerin mukozal membranı ve intestinal bariyerleri geçmesini sağlayacak taşıyıcı sistemler geliştirmek farmasötik biyoteknolojinin çalışma alanlarından birini oluşturmaktadır (25).

Bugüne kadar birçok ilaç taşıyıcı sistem protein ve peptit yapıdaki maddelerin oral yol ile aktarım çalışmaları için kullanılmıştır. Bu sistemler proteini enkapsülasyon yolu ile proteolitik enzimlere karşı korumak, proteinin vücutta serbest hale geçeceği yer ve zamanı belirlemek ve yan etkileri azaltmak gibi avantajlara sahiptir. Bu amaçla kullanılan ilaç taşıyıcı sistemlerin başlıcaları; lipozomlar, katı lipit nanopartiküller ve mikroemülsiyonlardır.

7.4.1. Lipozomlar

Kolloidal taşıyıcı sistemlerden biri olan lipozomlar yaklaşık 0,02-3,5 µm çapındaki küresel veziküllerdir. Lipit çift tabaka ve

sulu faz olmak üzere iki kısımdan oluşurlar. Lipit çift tabaka tek veya çok sayıda olabilir (19).

Lipozomlar protein taşıyıcı sistemler olarak çokça çalışılmışlardır (26). Bu aktarım sistemleri, biyouyumlu, biyolojik olarak inert, düşük immunojenite ve toksisiteye sahip olması yanında büyüklükleri ve sahip oldukları aköz iç fazları nedeniyle peptit ve protein taşınmasında kullanılırlar (27).

7.4.2. Katı Lipit Nanopartiküller

Katı lipit nanopartiküller ilk kez Müller ve arkadaşları tarafından 1991 yılında geliştirilmişlerdir (28). Mevcut kolloidal sistemlere alternatif bir taşıyıcı sistem olarak ortaya atılan, yağ/su emülsiyonundaki sıvı yağın katı lipitle değiştirilmesi ile oluşan katı nanopartiküllerdir (19). Katı lipit nanopartiküllere farklı yöntemler ile protein yüklemek mümkündür. Bunlardan bazıları;

- yüksek basınçlı homojenizasyon ile
- solvan difüzyon metodu ile
- çözücü emülsifikasyon-evaporasyon yöntemleridir (2).

7.4.3. Mikroemülsiyonlar

Mikroemülsiyonları anlamak için genel olarak emülsiyon sistemlerini anlamak gerekir. En basit tanımı ile emülsiyonlar birbiri ile karışmayan en az iki sıvının, birbiri içinde damlacıklar halinde dağıldığı heterojen sistemlerdir. Bu sistemleri bir hidrofililik bir de lipofilik iki fazdan oluşurlar. Bu iki faz emülsiyonun iç ve dış fazı olarak anılırlar. Dış faz, sürekli faz olarak isimlendirilir ve iç fazı damlacıklar halinde taşır. Birbiri ile karışmayan iki fazın kararlı olarak birlikte bulunması ise ancak emülsiyon yapıcı maddenin varlığı ile mümkün olabilir. Emülsiyon formülasyonunun sağlıklı olarak gerçekleştirilebilmesi için en az üç bileşene (yağlı faz, sulu faz, emülsiyon yapıcı) gereksinim olsa da formülasyona farklı maddeler ilave edilebilir.

Basit veya klasik emülsiyonlar olarak adlandırılan sistemlerde en az iki faz bulunur. Eğer, yağlı fazın damlacıkları sulu faz içinde dağılırsa bu emülsiyona yağ/su(y/s); sulu fazın damlacıkları yağlı faz içinde dağılırsa bu emülsiyona su/yağ(s/y) tipi sistemler denir. Emülsiyon tipinin hangisi olacağına, sistemdeki maddelerin miktarı, emülsiyon yapıcı maddenin yapısı ve üretim işlemleri etki eder.

Emülsiyon iç fazını oluşturan damlacıkların polidispersliği değişkendir. Damlacıkların ortalama boyutu ise emülsiyonların sınıflandırılması açısından önemlidir. Ortalama çapı 10 nanometre(nm)'den ufak olan sistemler miseller emülsiyon; 10-100 nm olan sistemler mikroemülsiyon; bundan büyük çapa sahip sistemler makroemülsiyon olarak adlandırılırlar (19).

Mikroemülsiyonların; ilaç taşınmasındaki kullanımları termodinamik stabilitelerine, ilaçları enzimlere karşı koruyabilme kapasitelerine, hazırlama kolaylıklarına, enkapsülasyon yeteneklerine, birçok farklı yollar uygulanabilmelerine bağlıdır (29). Bu taşıyıcı sistemler ile insülinin biyoyararlanımının artması; mikroemülsiyonların proteinleri gastrik enzimlerden koruduğunun, midede uzun süre dayanıklılık sağladığının ve gastrointestinal mukozaya karşı yüksek penetrasyon yeteneğine sahip olduklarının göstergesidir (30,31).

Sahip olduğu tüm bu özelliklerden ötürü tezimizde ilaç taşıyıcı sistem olarak mikroemülsiyon seçilmiştir.

7.4.3.1. Mikroemülsiyonların Genel Tanımı

Mikroemülsiyonlar, termodinamik olarak kararlı, optik olarak berrak, birbiri ile karışmayan ikisi sıvının oluşturduğu izotropik dispers sistemlerdir (32). En başlıca özellikleri berrak olmalarıdır. Damlacık boyutlarının ufak olması nedeniyle berrak görünüme sahip olan mikroemülsiyonlar beyaz ışığı kırarak geçirirler. Tindal etkisi sonucu mavimsi görünen mikroemülsiyonlarda dispersiyon çok iyi demektir.

Mikroemülsiyonların viskoziteleri, genellikle psödoplastik akış gösteren makroemülsiyonların aksine, Newton akış modeline uyum gösterir. Jelleşme sağlayarak, mikroemülsiyonların viskozitesini değiştirmek olasıdır.

Mikroemülsiyon sistemlerinde yer alan etkin madde, lipofilik özelliğine bağlı olarak, sulu veya yağlı faz arasında dağılacaktır. Etkin maddenin dağılım katsayısı salım hızı üzerine büyük oranda etki eder. Bunun yanı sıra, faz hacimlerinin oranı, dağılmış fazın damlacık boyutu, taşıyıcı sistem ile etkin madde etkileşmesi ve etkin maddenin sulu ve yağlı fazdaki difüzyonu salım hızını etkiler.

Mikroemülsiyonların üretim işlem değişkenliklerinin sistem kararlılığında çok fazla etkili olmaması ve üretimde kullanılan enerjinin düşük olması bu sistemleri üstün kılmaktadır. Mikroemülsiyonlar teorik olarak kararlıdır. Dışarıdan enerji gereksinimleri olmadan spontan oluşmalarına karşın, noniyonik tip yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde karışımı ile hazırlanmaları sıcaklığa bağlıdır (19).

7.4.3.2. Mikroemülsiyonların Bileşenleri

Mikroemülsiyon sistemleri; su, yağ, noniyonik veya iyonik yüzey etken madde ve kısa veya orta zincirli alkol, poliol veya organik asit gibi yardımcı bir yüzey etken maddeden oluşmaktadır. Maddelerin birbirine oranı ve yapıları sürekli fazın yağ veya su olması ile yakından ilgilidir.

Mikroemülsiyonların sulu fazı yalnızca sudan ibaret olmayabilir. Suda çözünen veya su ile karışabilen gliserin, sorbitol, glikol çözeltisi, tampon çözelti, koruyucu maddeler ve polipeptitler bu fazda yer alabilir.

Yağlı fazın seçimi ise, kullanılacak yüzey etkin maddenin iyonik veya noniyonik olması açısından önem taşır. Doğal yağlar, hidrokarbonlar, esterler veya trigliseritler yağlı faz olarak kullanılabilirler.

Farmasötik olarak kullanılacak yüzey etkin maddelerin biyolojik uyumluluğu dikkat edilmesi gereken bir konudur. Polioksietilen sorbitan esterleri, poliglikol C8-C10 gliseritleri, şeker esterleri ve polietilen glikol eter veya esterlerinin yüzey etkin madde olarak kullanıldığı farmasötik mikroemülsiyon sistemlerinde, yardımcı yüzey etkin madde olarak da benzil alkol, alifatik polioller, diglikol esterleri, gliserin, sorbitol, etilen glikol veya propilen glikol ve esterleri kullanılabilir. Yardımcı yüzey etkin madde olarak kullanılan alkolün moleküler yapısı mikroemülsiyon oluşumunda önem taşır. Yüzey etkin maddenin yardımcı yüzey etkin maddeye oranı 1:1 ve 1:9 arasında değişebilir(19,33)

7.4.3.3. Mikroemülsiyonların Hazırlanması

Emülsiyon yapıcıların seçimi için Hidrofilik-Lipofilik Balans sistemini kullanarak yüzey etkin maddelerin belirlenmesine ilişkin yaklaşım makroemülsiyonlardakinin aksine mikroemülsiyonlar için pek kullanışlı değildir ve dolayısıyla mikroemülsiyon formülasyonu ampirik bir iştir.

Mikroemülsiyon ilaç taşıyıcı sistemlerinin formülasyonlarında en önemli işlem üçgen faz diyagramlarının çizilmesidir. Çizilen diyagramda en uygun mikroemülsiyon oluşum alanı belirlendikten sonra formülasyondaki bileşenler saptanabilir. Bileşenlerin çözünürlüğü ile yakından ilişkili olan faz diyagramlarının çizilmesi için en yaygın ve kolay yöntem titrasyondur. Çok sayıda karışımın kısa sürede incelenmesine olanak sağlayan titrasyon yönteminde, örneğin, belli miktardaki yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde karışımı yağla karıştırılarak tek fazlı bir çözelti oluşturulur. Daha sonra, sabit sıcaklık ve karıştırma hızı kullanılarak su ile titrasyon yapılır ve her su eklenmesinde sistem berraklık, akış özellikleri ve kararlılık açısından incelenir (34).

7.4.3.4. Mikroemülsiyonların Karakterizasyonları

Mikroemülsiyonların karakterizasyon çalışmaları, sahip oldukları fiziksel özelliklere bağlı olarak gerçekleştirilmektedir. Berraklık, izotropi, sıvı hal yani Newton tipi akış modeli olarak kısaca belirtilebilecek bu özelliklerden yola çıkıldığında, karakterizasyon çalışmalarında, mikroskobik inceleme, viskozite ve iletkenlik ölçümleri ve damlacık boyut analizi yapılır (19).

7.4.3.5 Mikroemülsiyonların Kullanılışları

Mikroemülsiyonlar bugüne kadar nasal, paranteral, oküler, rektal, pulmoner, oral taşıyıcı sistem olarak birçok defa araştırma konusu olmuşlardır. Bunun yanı sıra mikro ve nanopartiküllerin elde edilmesinde ara basamak oluşturmaktadırlar.

Mikroemülsiyon sistemlerin oral kullanımına yönelik çalışmalar oldukça yoğundur. Hem suda az çözünen maddelerin etkinliğini arttırmaları, hem peptit ve protein yapısındaki maddelerin enzimatik parçalanmasını engellemeleri açılarından oral olarak denenmektedir(22,29,32,35).

7.5. Protein Enkapsülasyonu: Üretim Sistemleri

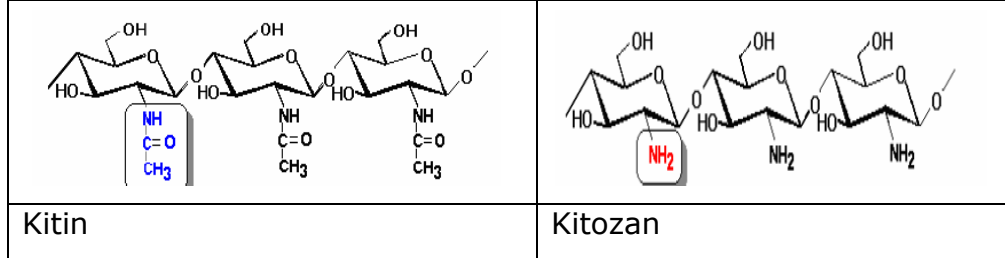
Farmasötik taşıyıcı sistemlere ilave olarak; püskürterek kurutma, koaservasyon metodu, elektropüskürtme yöntemi, çok tabakalı kaplama yöntemi de farmasötik proteinlerin enkapsülasyonu için kullanılan sistemlerdendir (2).

8. Kitozan Hakkında Genel Bilgiler

8.1. Kitozanın Yapısı ve Elde Edilme Yöntemleri

Kitozan (KZ), farmasötik endüstride çok kullanılan bir nötral bir polisakkarittir. Biyouyumlu, mukoadesif, immunojenik olmayan, toksik olmayan ve biyoparçalanabilir yapısından dolayı geniş bir uygulama alanına sahiptir (18). Doğada en çok bulunan ikinci doğal polimer olan kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilir. Kitinin kabuklu eklembacaklılar (yengeç, ıstakoz vs.), böcekler ve mantarlardan elde edilmesini takiben büyük ölçekte

üretilebilmektedir (36). Kitin ve KZ'ın yapısı Şekil 5' de gösterildiği şekildedir (37).



Şekil 5 Kitin ve kitozanın moleküler yapıları (37)

8.2. Fizikokimyasal Özellikleri

Kitozanın moleküler ağırlığı $3,8 \times 10^3$ ile 2000×10^3 arasında değişir. Asetilasyon derecesi %66-99,8 arasındadır. Kitozan suda eser miktarda çözünür, etanolde ve diğer organik solvanlarda çözünmez. Birçok organik asidin seyreltik ve derişik çözeltilerinde kolayca çözünür. Kitozan için en iyi çözücü %0,02-100'lük formik asidin sulu çözeltileri olarak bulunmuştur. En çok kullanılan çözücü ise %1'lik asetik asidin sulu çözeltilisidir. Ayrıca %1'lik hidroklorik asit, seyreltik nitrik asit de kullanılabilir.

Kitozanının viskozitesi, artan kitozan konstantasyonu, azalan sıcaklık, artan asetilasyon derecesi ile artar.

Oral ve diğer farmasötik şekillerde, aynı zamanda kozmetikte de kullanımı uygundur(29,37).

8.3. Eczacılıkta Kullanımı

Kitozanın sahip olduğu özelliklere bağlı olarak farmasötik endüstride kullanımı Tablo 4'te özetlenmiştir (18).

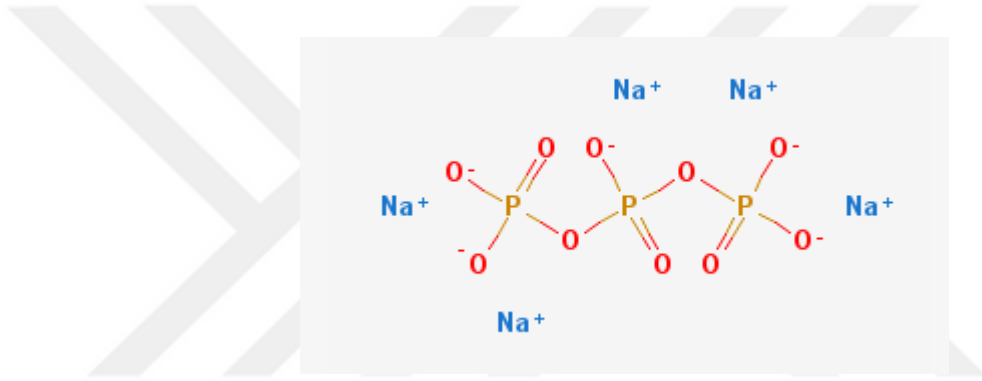
Tablo 4 Kitozanın farmasötik endüstride kullanılma nedenleri (18)

Kitozanın Karakteristik Özelliği	Kullanıma Etkisi
Nötral polimer	Uygun maliyet
Yüksek nitrojen içerikli sabit D-glukozamine yapısı	Stabil nanoformülasyon oluşumu
İntermoleküler hidrojen bağları jelleşme ve yüksek viskoziteye uygun	İlaç moleküllerinin jel sistemlerde taşınması
Zayıf baz (aminogruplarındaki deprotonasyon ile yüksek nükleofil özellik)	DNA, protein yapıdaki ilaçların deprotone amino gruplarına bağlanması
Su ve organik solvanlarda düşük çözünme, dilüe asit solüsyonlarında çözünme	Toksik organik çözücü kullanmadan formülasyon geliştirme
Kitozan yapısındaki birçok reaktif gruplar	Yapıda modifikasyona olanak sağlaması
Yüksek yük yoğunluğuna sahip katyonik biyopolimer	Pozitif yük, negatif yüklü biyomoleküller ile bağlanma sağlar, ilaç yükleme kapasitesini ve absorpsiyonu artırır
Biyotolere edilebilir polimer, vücutta bulunan kitozenaz enzimi ile kolayca parçalanabilir	Güvenli kullanım
Antimikrobiyal aktivitesi, antitümöral, antiülser özellikler	DNA ve proteinlerin taşınmasında herhangi bir hastalığa sebep olmaz
Biyoadesif polimer	Yapısındaki pozitif yük, bağırsaktaki negatif yüklü mukus tabakaya bağlanmayı ve bağırsak yapısında bulunan çapraz kavşakları geçerek ilaç aktarımını artırır

9. Sodyum Tripolifosfat Hakkında Genel Bilgiler

9.1. Sodyum Tripolifosfatın Yapısı ve Elde Edilme Yöntemleri

Sodyum tripolifosfat (pentasodyum trifosfat, pentasodyum tripolifosfat, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$)(TPP), uzun zincirli bir fosforik asit derivativesidir. Endüstriyel sentez yolu ile büyük ölçekte üretilir (38).



Şekil 6 Sodyum tripolifosfat yapısı (39)

9.2. Fizikokimyasal Özellikleri

Molekül ağırlığı 367.86 g/mol' dür. Suda çözünebilir özelliktedir (39).

9.3. Eczacılıkta Kullanımı

Farmasötik teknolojide nano ve mikropartikül sistemlerin gelişimi ile kitozan yanında TPP kullanılması önem kazanmıştır. 1989 yılında Bodmeier ve arkadaşları pozitif yüklü kitozan ile polianyonik TPP arasında gerçekleşen iyonotropik jelasyon ile ilk ilaç enkapsülasyonu gerçekleştirmişlerdir. Bu metod kolay oluşumu,

toksik olmaması, oda sıcaklığında gelişmesi ve organik solvan kullanımına gerek göstermemesi açısından oldukça kullanışlıdır (38).

10. Diğer Formülasyon Bileşenleri

10.1. Plurol Oleik (Poligliseril-3 oleat)

Suda çözünmez özellikteki bir maddedir. Emülsiyon ve mikroemülsiyonlarda dispersiyona katkıda bulunur. Biyoyararlanımı arttırıcı etkisi gösterilmiştir. Bu etki potansiyelinin, yapısında bulunan uzun yağ asitlerinden kaynaklanması muhtemeldir. Hepatik ilk geçiş etkisini azaltmakta ve selektif absorpsiyona neden olmaktadır.

Oral ve topikal uygulamalar, mikroemülsiyon ve emülsiyon sistemler, jelatin kapsüller, tabletler, saşeler için uygundur (40).

10.2. Lesitin

Lesitin temel olarak glikolipidler, trigliseridler ve fosfolipidlerden oluşan bir fosfolipit karışımdır. Soya, yumurta ve beyinde yüksek oranda bulunur. Biyouyumlu bir sürfaktan ve emülsifiye edici ajandır. Emülsifiye ve stabilize edici ajan olarak, yiyecek, farmasötik ve kozmetik sektörlerinde kullanılır. Herhangi bir toksik etkisine rastlanmamıştır (41).

II. MATERYAL ve METOD

1. Tez Çalışmasında Kullanılan Materyaller

1.1. Kullanılan Biyolojik ve Kimyasal Maddeler

Rekombinant İnsan İnsülini	Lilly USA, LLC, Indianapolis, ABD
Kitozan	Sigma-Aldrich Co, Inc, Steinheim, Almanya
Sodyum Tripolifosfat	Sigma-Aldrich Co, Inc, Steinheim, Almanya
Plurol Oleik	Gattefosse, Cedex, Fransa
Peceol	Gattefosse, Cedex, Fransa
Labrafac PG	Gattefosse, Cedex, Fransa
Labrafac Lipofil WL 1349	Gattefosse, Cedex, Fransa
Lauroglolikol FCC	Gattefosse, Cedex, Fransa
Lauroglolikol 90	Gattefosse, Cedex, Fransa
Labrafil M 2125CS	Gattefosse, Cedex, Fransa
Kapriyol PGMC	Gattefosse, Cedex, Fransa
Tween 80	Sigma-Aldrich Co, Inc, Steinheim, Almanya
Etanol	Sigma-Aldrich Co, Inc, Steinheim, Almanya
Soya lesitini (%90 fosfatidil kolin)	Applichem GmbH, Darmstadt, Almanya
Glasiyel asetik asit	Merck Co, Inc, New Jersey, ABD
Referans protein Karışımı (Protein Ladder)	Thermo Scientific, Massachusetts, ABD
Fosfat tampon çözeltisi(PBS) tabletleri (pH 7.4) (1tablet/200mL)	Applichem GmbH, Darmstadt, Almanya
XTT cell proliferation Kit	Biological Industries Ltd., Beit-Haemek, İsrail
Metanol	Merck Co, Inc, New Jersey, ABD
Glisin	Sigma-Aldrich Co, Inc, Steinheim, Almanya
Asetonitril	Sigma-Aldrich Co, Inc, Steinheim, Almanya
Trifloro asetik asit	Merck Co, Inc, New Jersey, ABD
Tetrametilendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Co, Inc, Steinheim, Almanya
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich Co, Inc, Steinheim, Almanya
Akrilamit, N,N'-metilen bisakrilamit	Sigma-Aldrich Co, Inc, Steinheim, Almanya
Bromfenol Mavisi	Merck Co, Inc, New Jersey, ABD

Kullanılan Biyolojik ve Kimyasal Maddeler (Devam)

Amonyum persülfat	Applichem GmbH, Darmstadt, Almanya
Tris bazı	Sigma-Aldrich Co, Inc, Steinheim, Almanya

1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Hassas Terazı - BP121S ve BL600	Sartorius Biotech GmbH, Goettingen, Almanya
Dıgital Su Banyosu	Vwr, Pennsylvania, ABD
Vorteks - MS1 Minishaker	Ika - Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Almanya
Derin Dondurucu (-20 °C) - Biomedical Freezer	Sanyo, San Diego, ABD
Buzdolabı	Regal, Manisa, Türkiye
UV Görüntüleme sistemi	Vilber Lourmat, Cedex, Fransa
Çalkalayıcı - KS501 D	Ika - Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Almanya
Santrifüj - EBA 12	Hettich, Kirchleugern, Almanya
Ultra Turrax - T8.01	Ika- Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Almanya
pH metre- iletkenlik ölçer	Seven Go Duo SG 23, Mettler Toledo, Schwerzenbach, İsviçre
Ultrasantrifüj - Optima -Max XP	Beckman Coulter, Inc., Kraemer Boulevard, ABD
Laminar air flow - Sınıf II	Thermo, Massachusetts, ABD
CO ² İnkübatör	Thermo, Massachusetts, ABD
Zeta sizer MALVERN- Nano ZS	Malvern Instruments Ltd., Worchestershire, İngiltere
Saf su üretim cihazı	Millipore, Billerica, ABD
Isıtmalı manyetik karıştırıcı - Labortechnik RCT basic	Ika - Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Almanya
Mikrodalga fırın - MW211W	Ariston, İtalya

Kullanılan Araç ve Gereçler (Devam)

Elektroforez güç kaynağı - EC-250-90	Thermo, New York, ABD
Mikropipet	Thermo, New York, ABD
Viskozimetre	SV-10, Brookfield Engineering Laboratories inc., Massachusetts, ABD
Refraktometre	DR301-95, Krüss, A. Krüss Optronic, Hamburg, Almanya
SDS-PAGE sistemi	Bio-Rad Laboratories, California, ABD
HPLC kolonu	Nükleosil 100-5 C18, Machery Nagel, Leiden, Hollanda
Kan glukoz ölçüm cihazı	PLUSmed Accuro pM1-300, PLUSmed GmbH, Frankfurt, Almanya

1.3. Kullanılan Hücre Kültürleri

L929 fare fibroblast hücreleri

1.4. Kullanılan Deney Hayvanları

İn vivo hayvan çalışmaları Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 28.05.2014 tarihli ve 2014-048 numaralı onay dahilinde gerçekleştirilmiştir. 24 adet 200-300 gram ağırlığında, erişkin erkek Wistar Albino sıçan kullanılmıştır. Kullanılan deney hayvanları Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilmiştir. Çalışmalar Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme & Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi Faz Öncesi Araştırmalar biriminde yapılmıştır.

1.5. Tampon ve Çözeltiler

Fosfat Tamponu (pH 7.4): PBS tabletlerin 200 mL UPSu/tablet olacak şekilde çözündürülmesi ile hazırlanmıştır.

Fosfat Tamponu (pH 1.2): pH 7,4 olacak şekilde hazırlanan fosfat tamponunun 1 M HCl çözeltisi ile pH'nın 1,2 'ye ayarlanması ile hazırlanmıştır.

SDS Çözeltisi (%10'luk): 10 g SDS 80 mL bidistile suda çözündürülmüştür. Distile su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır.

5 N HCl Çözeltisi: 41,44 mL %37'lik hidroklorik asit, distile su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır.

Bromfenol Mavisi Çözeltisi (%1'lik): 10 mg bromfenol mavisi 1 mL metanolde çözündürülmüştür.

1,5 M Tris Tamponu Çözeltisi (pH 8,8): 18,2 g tris bazı tartılıp üzerine 60 mL distile su ilave edilmiştir. 6N HCl ile pH ayarı yapıldıktan sonra distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

1 M Tris Tamponu Çözeltisi (pH 6,8): 12,1 g tris bazı tartılıp üzerine 60 mL distile su ilave edilmiştir. 6 N HCl ile pH ayarı yapıldıktan sonra 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Ayırma Jel Çözeltisi (%8'lik): 2,7 mL akrilamid-N,N metilen bisakrilamid çözeltisi, 4,6 mL distile su, 2,5 ml 1,5 M (pH 8.8) tris tamponu çözeltisi 0,1 mL %10'luk SDS çözeltisi, 0,1 mL %10' luk amonyum persülfat çözeltisi ve 6 µL TEMED karıştırılmıştır.

Yükleme Jel Çözeltisi : 0,33 mL akrilamid-N,N metilen bisakrilamid çözeltisi, 1,4 mL distile su, 0,25 mL 1 M (pH 6,8) tris tamponu çözeltisi, 20 µL %10'luk SDS çözeltisi, 20 µL %10 amonyum persülfat çözeltisi ve 2 µL TEMED karıştırılmıştır.

Tris-Glisin Elektroforez Tamponu: 3 g tris bazı, 18,8 g glisin belli bir hacim distile suda çözündürülmüştür, 10 mL (%10) SDS çözeltisi eklenmiştir ve hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

Örnek Yükleme Tamponu: 2,5 mL 1 M tris HCl çözeltisi (pH 6,8), 2 mL gliserol, 1 mL %1'lik bromfenol çözeltisi, 4,5 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır (42).

Jel Boyama Çözeltisi: 0,25 g coomassie mavisi, 90 mL metanol:distile su karışımı (1:1), 10 mL glasiyal asetik asit karıştırılarak hazırlanmıştır. No1 filtreden geçirilmiştir.

Arındırma Çözeltisi: 300 mL metanol, 100 mL glasiyal asetik asit ve 700 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

2. Deneysel Çalışmalar

2.1. İnsülinin Teşhisi

İnsülin (İNS)' in teşhisinde elektroforetik ve kromatografik yöntemler kullanılmıştır.

2.1.1. İnsülinin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroferezi (SDS-PAGE) ile Elektroforetik Teşhisi

Kullanılan tampon ve çözeltiler Bölüm 1.5.' te anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Referans protein karışımı için molekül ağırlıkları 10 kDa - 170 kDa arasında değişen 10 protein içeren marker kullanılmıştır.

İnsülin örnek çözeltilerinin hazırlanması; insülin çözeltileri PBS (pH=7,4) ile 100, 75, 50, 25, 12,5, 7,5, 5, 2,5, 1 internasyonal ünite (IU)/mL İNS içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler dokuz farklı cebe yüklenmiştir.

Jel aparatının hazırlanması; tamponlar ve çözeltiler kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanan ayırma jel çözeltisi öncelikle cam plakalar arasına ilave edilmiştir. Ayırma jel çözeltisinin donmasını takiben yükleme jel çözeltisi ilave edilmiştir. Hemen ardından üzerine plastik tarak yerleştirilmiştir. Yükleme jelinin oluşmasını takiben tarak çıkartılarak cepler elde edilmiştir. Kasetin üst ve alt bölümüne tris glisin elektroforez tamponu ilave edilmiştir.

Örneklerin yüklemeye hazır hale getirilmesi; 25 µL İNS örnek çözeltisi ve 15 µL örnek yükleme tamponu karıştırılmıştır. Her bir

kuyucuğa 20 µL olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Referans protein karışımı (marker) ilgili işlemlere tabi olmaksızın 5 µL olacak şekilde yüklenmiştir.

Elektroforez işlemi; örnekler 100 volt (V) akım altında 2 saat yürütülmüştür.

Elde edilen jelin boyanması; işlem sonunda elde edilen jel plakalardan ayrılarak boya çözeltisi içerisinde gece boyu bekletilmiştir.

Elde edilen jelin arındırılması; boyama çözeltisinden alınan jel, arındırılma çözeltisi içerisinde konulmuştur ve bekletilmiştir. Boyanın uzaklaşması amacıyla bu işlem arındırılma çözeltisi değiştirilerek beş kez tekrar edilmiştir.

Elde edilen jelin fotoğrafının çekilmesi; jelde oluşan protein bantlarının resimleri çekilmiştir ve kayıt edilmiştir.

2.1.2. İnsülinin Moleküler Eleme Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi(HPLC) ile Kantitatif Teşhisi

2.1.2.1. HPLC ile Standart Eğri Çizimi

UV dedektörlü HPLC sistemi ve Nükleosil 100-5 C18 kolon kullanılmıştır. Mobil faz olarak asetonitril (ACN) ve %0,1 trifloroasetik asit (TFA)'in sudaki çözeltisi 28:72 (h/h) oranında kullanılmıştır. Akış hızı 1500 µL/dakika, enjeksiyon hacmi 10 µL olarak ayarlanmıştır. Dalga boyu aralığı 200-400 nm arasında taranarak en uygun dalga boyu olarak 272 nm saptanmıştır. 100 IU/ml İNS ana stoğu pH 7,4 PBS ile seyreltilerek 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8, 10 U/mL olacak şekilde on farklı konsantrasyonda örnek hazırlanmıştır. Her bir örnek için üç paralel çalışılmıştır. Her enjeksiyondan sonra bulunan alan değerleri konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Doğrunun denklemi ve r^2 değeri hesaplanmıştır (43-45).

2.1.2.2. HPLC Yönteminin Validasyonu

2.1.2.2.1. Doğrusallık

Örnekteki maddenin belli sınırlar içindeki derişimi ile elde edilen yanıtın orantılı olduğunun göstergesidir. 100 IU/mL rekombinant insan insülini ana stoğu pH 7,4 PBS ile seyreltilerek 0,1, 0,25, 0,50, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8, 10 IU/mL olacak şekilde on farklı konsantrasyonda örnek hazırlanmıştır. Her konsantrasyon ve karşılık gelen alan değerleri yardımıyla standart doğrunun denklemi bulunmuştur.

2.1.2.2.2. Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik

Saptanan değerin gerçeğe yakınlığıdır. Yöntemin doğruluğu geri alma yüzdesine bağlıdır. 0,25, 0,8 ve 5 IU/mL olacak şekilde üç farklı derişimde üç paralel olarak çalışılan örneklerin verdiği alan değerleri ölçülmüştür. Bu alan değerlerine karşılık gelen konsantrasyon miktarları bulunmuştur. Buradan yola çıkarak yüzde geri kazanım miktarları hesaplanmıştır.

2.1.2.2.3. Kesinlik

Kesinlik, bir yöntemin tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik derecelerinin ölçüsüdür.

2.1.2.2.3.1. Tekrar Edilebilirlik

Doğruluk ve geri elde edilebilirlik için hazırlanan çözeltilerden bir konsantrasyon (0,8 IU/mL) seçilmiştir. Bu çözelti HPLC' ye dokuz kez ardı ardına enjekte edilmiştir. Alan değerine karşılık gelen konsantrasyonların ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayıları hesaplanmıştır. Varyasyon katsayısının %2' den az olması yöntemin tekrar edilebilirliğinin göstergesidir.

2.1.2.2.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik için aynı stoktan hareketle hazırlanan 6 adet aynı konsantrasyondaki çözeltinin alan değerleri ölçülerek ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Bulunan varyasyon katsayısının %2'den küçük olması gerekir.

2.1.2.2.4. Örnek Çözeltinin Stabilitesi

Etken madde varlığında çözeltinin stabilitesi değerlendirilmiştir. Salım denemeleri süresince otomatik örnek alan HPLC sayesinde gece boyu devam eden çalışmalar yapılmıştır. Bu süreçte test sonuçlanana kadar laboratuvar ortamına maruz kalan örneklerin stabilitesini değerlendirmek amacıyla aynı örnek 24 saat sonra tekrar okutulmuştur. Varyasyon katsayısının 2'den küçük olması beklenmiştir.

2.1.2.2.5. Özgünlük, Seçicilik

Salım sonucunda bulunan alan değerlerinin etkin maddeye ait olduğunu kanıtlamak için boş formülasyon ile salım çalışması yapılarak alanların çakışıp çakışmadığı kontrol edilmiştir.

2.2. İnsülin İçeren Mikroemülsiyonların Hazırlanması

2.2.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

İNS taşıyıcı S/Y mikroemülsiyon formülasyonlarının oluşturulması için farklı oranlarda çeşitli yağ, sürfaktan, kosürfaktan karışımları su fazı olarak kullanılan UP su ile titrasyona tabi tutularak en yüksek su alma kapasitesine sahip, stabilitesi en yüksek formülasyon elde edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla yağ fazı olarak; Peceol, Plurol oleik, Labrafac PG, Labrafac Lipofil WL1349, sürfaktan olarak; Lauroglikol FCC, Lauroglikol 90, Capriyol PGMC, Labrafil M 2125 CS, Lesitin, Tween 80, Span 80, kosürfaktan olarak; etanol, 1-propanol maddeleri denenmiştir.

İlgili yağ, sürfaktan ve kosürfaktanların farklı oranlardaki karışımları sistemin HLB değeri S/Y mikroemülsiyon oluşturulmasına elverecek şekilde ayarlanarak denenmiştir. Bu karışımlar hazırlanarak sabit sıcaklık ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$) ve karıştırma hızında (300 devir/dakika) UP su ile titre edilerek her bir formülasyon denemesi için bulandığı noktalar saptanmıştır. UP su eklenmesi 20 μL ' lik miktarlarla gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde

formülasyonların içerisinde barındırabildikleri maksimum su miktarları hesaplanmıştır.

2.2.2. Mikroemülsiyon Formülasyonu ve Faz Diyagramının Hazırlanması

Ön formülasyon çalışmaları sonucunda HLB değeri 6,37 olan ve yağ fazı olarak; plurol oleik, sürfaktan olarak; Lesitin ve Tween 80, kosürfaktan olarak etanol kullanılan sistem seçilmiştir. Yapılan ön formülasyon denemeleri sonucunda en stabil ve iç fazında en fazla su tutabilen bu ana formülasyondaki birleşenlerin oranları; Lesitin/Tween 80 oranı 3:1 ve sürfaktan:kosürfaktan(Lesitin+ Tween 80: etanol) oranı ise 1:1 olacak şekilde belirlenmiştir.

Belirlenen ana formülasyon bileşenleri için faz diyagramı farklı oranlarda yağ içeren (%30, 40, 50, 60, 70, 80) altı ana formülasyonun UP su'ya karşı titre edilmesiyle çizilmiştir. Bu amaçla 10 mL lik flakon içinde Lesitin ve etanol tartılarak karıştırılmıştır, üzerine Plurol Oleik ve Tween 80 ilave edilmiştir. Manyetik karıştırıcıda 300 devir/dakika hızda karıştırılarak üzerine bulanıklık oluşana kadar UP su ilave edilmiştir ve harcanan su miktarları bulunmuştur. Daha sonra bulgular faz diyagramına geçirilmiştir.

2.2.3. İnsülin İçeren Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Hazırlanması

Üçgen faz diyagramında S/Y mikroemülsiyon oluşum alanından stabil olarak en fazla su fazı içeren (%16) formülasyon seçilmiştir. Daha sonra faz diyagramı oluşumu sırasında su fazı olarak kullanılan UP su ile İNS çözeltisi (Humulin R, Lilly) yer değiştirilerek insülin içeren S/Y mikroemülsiyonlar oluşturulmuştur. Elde edilen bu mikroemülsiyon formülasyonundaki insülin miktarı 16 IU/mL'dir.

2.2.4. Mikroemülsiyon Formülasyonunda Yapılan Modifikasyonlar

Hazırlanan İNS taşıyıcı mikroemülsiyon sistemini daha kararlı, stabil, mide asidite ve enzimlerinden koruyucu ve bağırsaktan İNS emilimini arttıracak şekle getirebilmek için hazırlanan formülasyonun iç faz yüzdesi aynı tutularak kitozan ve sodyum tripolifosfat çözeltileri ilave edilmiştir.

2.2.4.1. İç Faza Kitozan İlavesi

İntestinal çapraz bağları açıcı ve biyoadhezyonu arttırıcı etkisi bilinen KZ'ın %0,3'lük asetik asit içeren UPSu içerisindeki (h/h), %0,3'lük çözeltisi (a/h) iç faza farklı oranlarda ilave edilerek formülasyona etkisi denenmiştir. Bu amaçla iç fazda İNS:KZ çözelti oranları 5:5, 5:4, 5:3, 5:2 ve 5:1 (h/h) olacak şekilde farklı oranlar denenmiştir (46-48).

2.2.4.2. İç Faza Sodyum Tripolifosfat İlavesi

İNS ve KZ arasında oluşan bağı güçlendirmek ve koruyuculuğu arttırmak için iç faza TPP'in UP su içerisindeki %0,1' lik (a/h) çözeltisi ilave edilmiştir. Oluşturulan formülasyonlarda 6:1 ve 12:1 olacak şekilde iki farklı KZ:TPP (a/a) oranı denenmiştir. Bu formülasyonlar oluşturulurken Tablo 6'da belirlenen miktarlarda İNS çözeltisi ve KZ çözeltisi karıştırılarak, üzerine TPP çözeltisi ilave edilmiştir. 30 dakika +4 °C' de iyonik jelasyona tabi tutulmuştur. Tablo 5'te belirtildiği gibi 0,56 g Plurol Oleik; 0,42 g Lesitin; 0,14 g Tween 80 ve 0,56 g etanol tartılarak 300 devir/dakika hızda manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak üzerine Tablo 6'da belirtilen iç fazlardan 320 µL ilave edilmiştir. F1 numaralı formülasyona (boş mikroemülsiyon) iç faz olarak 320 µL pH 7,4 PBS ilave edilmiştir.

Tablo 5 Mikroemülsiyon formülasyonunda kullanılan madde ve miktarları

Kullanılan Madde	Miktarı
Plurol Oleik	0,56 g
Lesitin	0,42 g
Tween 80	0,14 g
Etanol	0,56 g
İç faz	320 µL

Tablo 6 S/Y Mikroemülsiyon ön formülasyon çalışmaları için denenen farklı iç faz çözeltileri

Formül Kodu	İnsülin Çözeltisi (100IU/mL)(µL)	Kitozan Çözeltisi %0,3 (a/h)(µL)	TPP Çözeltisi %0,3(a/h)(µL)
F1*	0	0	0
F2	500	0	0
F3	500	500	0
F4	500	500	250
F5	500	500	125
F6	500	400	0
F7	500	400	200
F8	500	400	100
F9	500	300	0
F10	500	300	150
F11	500	300	75
F12	500	200	0
F13	500	200	100
F14	500	200	50
F15	500	100	0
F16	500	100	50
F17	500	100	25

*F1 numaralı boş mikroemülsiyon formülasyonuna iç faz olarak pH 7,4 PBS ilave edilmiştir.

2.3. Hazırlanan Mikroemülsiyon Formülasyonlarının ve İç Fazlarının Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyellerinin Belirlenmesi

Mikroemülsiyon iç fazına farklı oranlarda ilave edilen KZ ve TPP çözeltilerinin formülasyon iç fazının ve mikroemülsiyon sisteminin partikül boyutuna ve zeta potansiyeline etkisini gözlemleyebilmek için partikül büyüklükleri ve zeta potansiyelleri Malvern Zeta Sizer Nano ZS cihazı ile ölçülmüştür. Formülasyonların dış fazı yağ olduğu için formülasyonlara ait zeta potansiyel ölçümleri formülasyonların 1mM NaCl çözeltisi içerisinde 1:10 oranında seyreltilmesiyle gerçekleştirilmiştir (31).

2.4. İnsülin Yüklü Formülasyonlardan *İn vitro* Salım Çalışmaları

2.4.1. İnsülin Yüklü Formülasyonlardan pH 1,2' de Gerçekleştirilen Salım Çalışmaları

Salım çalışmaları Tablo 6 'da F2-F5, F12-F14 kodlarıyla belirtilen formülasyonlar için mide asidik ortamını taklit etmesi bakımından pH 1,2 PBS ile gerçekleştirilmiştir. 2 mL mikroemülsiyon örnekleri cam flakonlar içerisinde konulmuştur. Üzerine PBS (pH 1,2) eklenerek toplam hacim 10 mL' ye tamamlanmıştır. Bu flakonlar, içinden 37 °C' lik su geçen ceketlere yerleştirilmiştir. Fizyolojik gastrik kondüsyonun simülasyonunu sağlamak amacıyla manyetik karıştırıcıda 300 devir/dakika hızda karıştırılmıştır. Oluşturulan bu sistemlerden farklı zaman aralıklarında 200 µL örnek alınmıştır. Üzerlerine %80'lik 200 µL metanol:UPsu (h:h) çözeltisi ilave edildikten sonra 12,000 devir/dakika' da 12 dakika santrifüj edilmiştir. Böylece sulu fazın suda az çözünen maddelerden ayrılması sağlanmıştır. İşlem sonucunda elde edilen sulu süpernatant içeriğinde bulunan insülin miktarları HPLC ile saptanmıştır. Ortam şartlarının insülin üzerine

etkisini ortaya koymak için aynı çalışma formülasyona ilave edilmemiş çıplak insülin ile de gerçekleştirilmiştir (31,49,50). Salım çalışmaları üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

2.4.2. İnsülin Yüklü Formülasyonlardan pH 6,8’de Gerçekleştirilen Salım Çalışmaları

Salım çalışmaları Tablo 6’da F2-F5 kodlarıyla belirtilen formülasyonlar için bağırsak ortamını taklit etmesi bakımından pH’ ı 6,8 olan PBS ile gerçekleştirilmiştir. 2 mL mikroemülsiyon örnekleri cam flakonlar içerisine konulmuştur. Üzerine PBS (pH 6,8) eklenerek 10 mL’ye tamamlanmıştır. Bu flakonlar, içinden 37 °C’ lik su geçen ceketlere yerleştirilmiştir. Fizyolojik kondüsyonun simülasyonunu sağlamak amacıyla manyetik karıştırıcıda 300 devir/dakika hızda karıştırılmıştır. Oluşturulan bu sistemlerden farklı zaman aralıklarında 200 µL örnek alınmıştır. Üzerlerine %80’ lik 200 µL metanol:UPH₂O (h:h) çözeltisi ilave edildikten sonra 12,000 g’ de 12 dakika santrifüj edilmiştir. Böylece sulu fazın suda az çözünen maddelerden ayrılması sağlanmıştır. İşlem sonucunda elde edilen sulu süpernatant içeriğinde bulunan insülin miktarları HPLC yöntemi ile saptanmıştır. Ortam şartlarının insülin üzerine etkisini ortaya koymak için aynı çalışma formülasyona ilave edilmemiş çıplak insülin ile de gerçekleştirilmiştir(31,49,50). Salım çalışmaları üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

2.5. Seçilen Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Hazırlanan ve ileriki çalışmalar için uygun bulunan formülasyonların özelliklerini aydınlatabilmek için farklı analizler yapılmıştır. Bunlar viskozite ölçümü, pH ölçümü, elektriksel iletkenlik ölçümü ve kırılma indisi ölçümüdür.

2.5.1. Viskozite Ölçümü

Seçilen mikroemülsiyonların vizkozitesi $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ de viskozimetre (SV-10, Brookfield) kullanılarak ölçülmüştür. Örnekler cihaza ait olan hazneye konulmuştur ve viskoziteleri ölçülmüştür.

2.5.2. pH Ölçümü

Mikroemülsiyonların pH'ları oda sıcaklığında pH metre (Seven Go Duo SG 23, Mettler Toledo) kullanılarak ölçülmüştür.

2.5.3. Elektriksel İletkenlik Ölçümü

Mikroemülsiyonların elektriksel iletkenliği, iletkenlik ölçer (Seven Go Duo SG 23, Mettler Toledo) kullanılarak $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de ölçülmüştür.

2.5.4. Refraktif indeks ölçümü

Mikroemülsiyonların refraktif indeks ölçümü refraktometre (DR301-95, Krüss) ile $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de yapılmıştır.

2.6. Stabilité Çalışmaları

2.6.1. İnsülinin Konformasyonel Stabilitesi

İNS çözeltisinin KZ ve TPP çözeltileri ilavesi ve ayrıca mikroemülsiyon hazırlaması aşamalarında oluşan koşullara karşı konformasyonel stabilitesini gösterebilmek amacıyla sirküler dikroizm spektroskopisi kullanılmıştır. Farklı İNS:KZ (5:5,5:4,5:2, h/h) ve farklı KZ:TPP (6:1,12:1, a/a) oranlarında oluşturulan iç faz ve mikroemülsiyon örneklerinin sirküler dikroizm spektrumları çıkarılmıştır. Tablo 7'de gösterilen A kodlu örnekler, mikroemülsiyon iç fazlarından oluşan çözeltilerdir. Her bir örnek 25 IU/mL insülin içermektedir. A 1 numaralı örnek insülin standardıdır. A11 numaralı örnek sadece KZ, A12 numaralı örnek sadece TPP, A13 numaralı örnek 100 IU/mL insülin stoğu içermektedir. A kodlu örneklerin sirküler dikroizm ile yapılan analizlerinde ek bir muamele uygulanmamıştır (51).

Tablo 7 Sirküler Dikroizm için hazırlanan iç faz örnekleri

	İnsülin Çözeltisi (100 IU/mL)	Kitozan Çözeltisi %0,3 (a/h)	TPP Çözeltisi %0,3(a/h)	HCl sol. (pH=1)	Toplam
A1	300	0	0	900	1200
A2	300	300	0	600	1200
A3	300	300	150	450	1200
A4	300	300	75	525	1200
A5	300	240	0	660	1200
A6	300	240	120	540	1200
A7	300	240	60	600	1200
A8	300	120	0	780	1200
A9	300	120	60	720	1200
A10	300	120	30	750	1200
A11	0	1200	0	0	1200
A12	0	0	1200	0	1200
A13	0	1200	0	0	1200

*Miktarlar µL cinsinden verilmiştir.

Hazırlanan B kodlu örnekler ise her birinin aynı miktarda İNS içermesini sağlamak adına Tablo 5’te gösterildiği şekilde tartılan mikroemülsiyon formülasyonundaki dış fazlara (1,68 g), Tablo 8’de belirtilen oranlarda hazırlanan çözeltilerden 320 µL iç faz ilavesiyle hazırlanmıştır. Mikroemülsiyonların İNS konsantrasyonu her biri için 6,4 IU/ mL dir.

B11 kodlu formülasyon iç fazda insülin içermediği için boş mikroemülsiyonu temsil etmektedir.

Tablo 8 Sirküler dikroizm için hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonlarının iç faz oranları

	İnsülin Çözeltisi (100IU/mL)	Kitozan Çözeltisi %0,3 (a/h)	TPP Çözeltisi %0,3(a/h)	PBS pH 7,4	Toplam
B1	200	0	0	300	500
B2	200	200	0	100	500
B3	200	200	100	0	500
B4	200	200	50	50	500
B5	200	160	0	140	500
B6	200	160	80	60	500
B7	200	160	40	100	500
B8	200	80	0	220	500
B9	200	80	40	180	500
B10	200	80	20	200	500
B11	0	0	0	500	500

*Miktarlar µL cinsinden verilmiştir.

B kodlu örnekler mikroemülsiyon şeklinde olduğu için analizden önce mikroemülsiyon sistemi bozularak, içeriğindeki İNS serbest hale getirilmiştir. 1 mL mikroemülsiyon formülasyonu üzerine 4 mL metanol ve 5 mL HCl çözeltisi (pH 1) ilave edilmiştir. 10 mL hacme ulaşan örnek 16000 g devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu şekilde formülasyon içeriğindeki insülinin süpernatanta geçmesi sağlanmıştır. Supernatanta geçen insülinin analizi yapılmıştır (52). Bu uygulamalarda HCl çözeltisi (pH 1) ilave edilmesinin sebebi insülin stabilitesini arttırmak ve İNS'in ölçüm boyunca stabil kalmasını sağlamaktır (53).

Sirküler dikroizm çalışmaları için tarama aralığı 190-280 nm, çalışma sıcaklığı 20°C' dir.

2.6.2. Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Stabilitesi

Tablo 6' ya uygun olarak hazırlanan F1-F17 kodlu 17 mikroemülsiyon stabilitelerinin incelenmesi amacıyla +4°C'de altı ay boyunca saklanmıştır. Formülasyonlar fiziksel görünüm, bulanıklık, faz ayrışması özellikleri bakımından altı ay boyunca haftada bir kez incelenmiştir.

2.7. Toksisite Çalışmaları

Uygun şekilde kültürü yapılmış L-929 fare fibroblast hücrelerinin 6000 hücre/kuyucuk yoğunlukta olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekimleri yapılmıştır. Daha sonra 24 saat 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edilip hücrelerin kuyucuk tabanına tutunmaları sağlanmıştır. 24 saatin sonunda mikroskop altında incelenen hücrelerin %90 üzeri konfluentliğe ulaştığı görüldükten sonra formülasyon toksisite çalışmalarına geçilmiştir. Bu amaçla hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılmıştır. Tablo 6'da F1-F5 olarak belirtilen formülasyonlar kuyucuklara 5, 7, 10, 15, 20 µL olacak şekilde taze besiyeri (MEM-Eagle) ile seyreltilerek uygulanmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra hücreler üzerindeki ortam alınarak PBS ile 1 defa yıkanmış, besi yeri değiştirilmiş ve aktif hale getirilen XTT solüsyonu her kuyucuğa 50 µL olacak şekilde eklenmiştir. 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 2,5 saat inkübe edilmiştir. Absorbans değerleri multiplaka okuyucu vasıtasıyla ölçülmüştür. Her deneme üç defa tekrarlanmıştır. Kontrol olarak formülasyon uygulanmamış L-929 hücreleri kullanılmıştır. Mikroemülsiyonların uygulandığı hücrelerin verdiği absorbans değeri kontrol hücrelerinin verdiği absorbans değeri ile karşılaştırılarak % canlılık değerleri hesaplanmış ve grafiğe geçirilmiştir. % canlılığı hesaplamak için Formül 1 kullanılmıştır.

$$\% \text{Canlılık} = \frac{A_F - A_{k\ddot{o}r}}{A_{100} - A_{k\ddot{o}r}} \times 100$$

Formül 1

* A_F formülasyonların uygulandığı hücrelerden okunan absorbens değerini, $A_{k\ddot{o}r}$ hücre olmayan ve sadece besiyeri içeren kuyucuklardan okunan absorbens değerini, A_{100} ise formülasyon uygulanmamış ve canlılığı % 100 kabul edilen hücrelerin verdiği absorbens değerini belirtmektedir.

2.8. *İn vivo* Çalışma

İn vivo hayvan çalışmaları Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 28.05.2014 tarihli ve 2014-048 numaralı onay dahilinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 24 adet 200-300 g ağırlığında, erişkin erkek Wistar Albino sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlarda 55 mg/kg streptozotosin'in (0,1 M, pH 4,2 sitrat tamponunda) intraperitoneal enjeksiyonunu takiben bir hafta beklenerek diyabet modeli oluşturulmuştur. Bir hafta sonunda kuyruk veninden alınan kan glukoz konsantrasyonları ölçülerek, kan glukoz düzeyleri 300 mg/dL ve üzerinde olan hayvanlar diyabet kabul edilerek *in vivo* deneye geçilmiştir.

Gruplar aşağıda belirtildiği şekilde uygulama yapılmıştır.

1. Grup: İNS solüsyonu- Subkutan enjeksiyon (1 IU/kg)
2. Grup: İNS solüsyonu- İntragastrik (50 IU/kg)
3. Grup: İNS içeren mikroemülsiyon –İntragastrik (50 IU/kg)
4. Grup: İNS, KZ, TPP içeren mikroemülsiyon- İntragastrik (50 IU/kg)

1.Grup ve 2. Gruplar için n=4, 3.Grup ve 4. Gruplar için n=8 sayıda hayvan ile *in vivo* denemeler gerçekleştirilmiştir.

Uygulama öncesinde ve uygulamadan sonra 30. dakika, 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7, 8. ve 24. saatlerde kuyruk veninden alınan örneklerdeki kan glukoz düzeyleri ölçülerek formülasyonun etkinlik değerlendirilmesi yapılmıştır. Deney boyunca kan glukoz düzey ölçümü ticari olarak satılan glukometre ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışma sonrasında sıçanlar 100 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazinin intraperitoneal uygulaması ile ötenazi edilmiştir (52,54,55).

2.8.1. İstatistiksel değerlendirme

İn vivo çalışma sonrasında elde edilen değerler Two Way-ANOVA'yı takiben Tukey çoklu karşılaştırma testi ile GraphPad Prism 6.0 programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

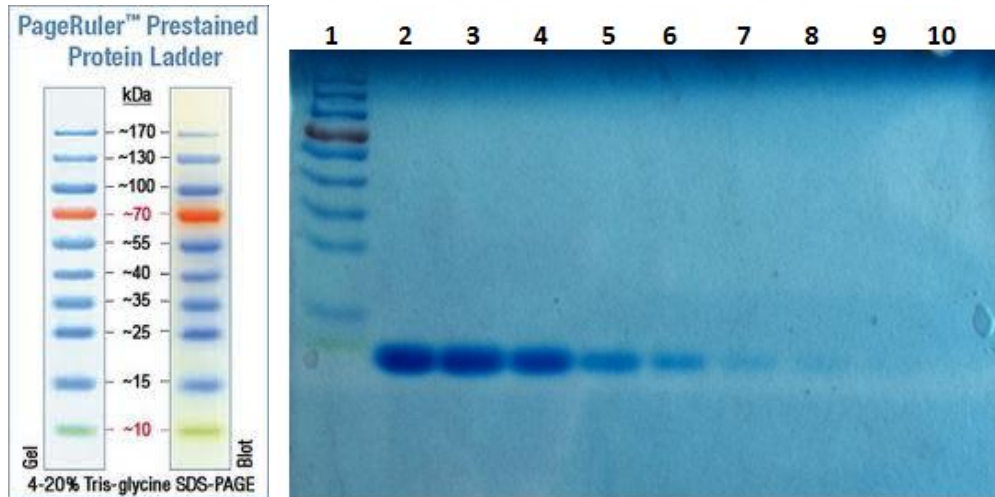
III. BULGULAR

1. İnsülinin Teşhis Çalışmaları

1.1. İnsülin'in Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroferezi (SDS-PAGE) ile Elektroforetik Teşhisi

Teşhis çalışması bölüm 2.1.1. 'in altında anlatıldığı şekilde yapılmıştır. İNS'in elektroforetik incelenmesine ait jel fotoğrafı Şekil 7' de gösterilmiştir. Avrupa Farmakopesinde İNS için verilen molekül ağırlığı 5.6 kDa'dur (56).

Elde edilen protein bantları incelendiğinde İNS örnek çözeltilisine ait protein bantlarının, 10 kDa molekül ağırlığına sahip referans proteinin altında yer aldığı ve bant yoğunluklarının konsantrasyon azalması ile birlikte azaldığı görülmüştür. Elde edilen protein bantlarının jel üzerindeki konumları değerlendirildiğinde molekül ağırlıkları insülinin belirlenmiş molekül ağırlığına uygunluk göstermiştir.



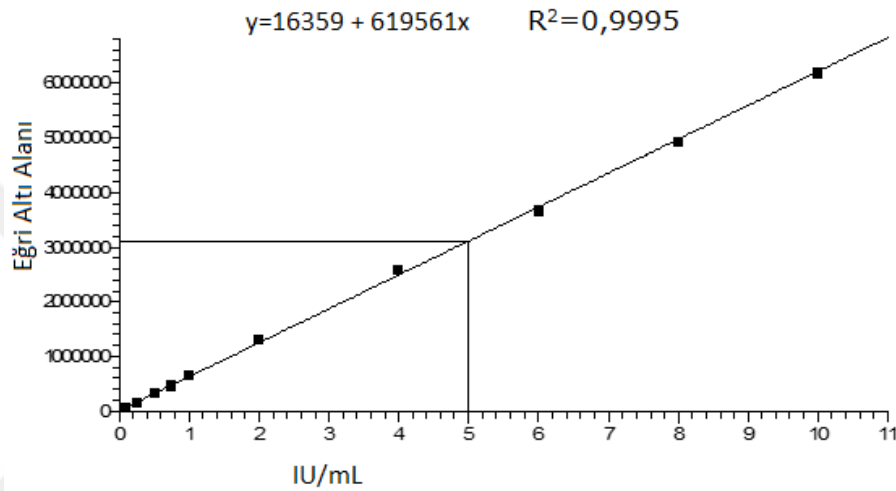
Şekil 7: İnsülin SDS-PAGE ile elektroforetik teşhis sonuçları

*1:Referans protein standardı (Fermentas), 2-10: 100,75, 50, 25, 12,5, 7,5, 5, 2,5 ve 1 IU/mL İNS çözeltileri (PBS pH7,4)

1.2. İnsülinin Moleküler Eleme Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi ile Kantitatif Teşhisi

1.2.1. HPLC ile Standart Eğri Çizimi

İnsülinin 272 nm dalga boyunda PBS pH 7,4'te elde edilen kalibrasyon eğrisi bölüm 2.1.2.'de anlatıldığı şekilde çizilmiştir. İlgili kalibrasyon eğrisinin grafiği Şekil 8 'de gösterilmiştir. Grafiğe ait doğru denklemi ve R^2 değeri grafik üzerinde verilmiştir.



Şekil 8 İnsülinin 272 nm dalga boyunda pH 7,4 PBS ile elde edilen kalibrasyon eğrisi

1.2.2. Yöntemin Validasyonuna Ait Bulgular

1.2.2.1. Doğrusallık

Bölüm 2.1.2.2.1.'de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Sonuçlara göre çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 8' de gösterilmiştir. R^2 değeri 0,9995 olarak bulunmuştur.

1.2.2.2. Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik

Bölüm 2.1.2.2.2'de anlatıldığı gibi 0,25, 0,8 ve 5 IU/mL olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda üç paralel olarak çalışılan örneklerin verdiği alan değerleri ölçülmüştür. Bu alan değerlerine karşılık gelen konsantrasyon miktarları bulunmuştur. Buradan yola

çıkarak hesaplanan ortalama yüzde geri kazanım farkı $\pm$ %10 dan düşüktür (Tablo 9).

Tablo 9 0,2, 0,8 ve 5 IU/mL insülin çözeltileri ile HPLC için elde edilen doğruluk ve geri elde edilebilirlik bulguları

Konsantrasyon (IU/mL)	Okunan Konsantrasyon (IU/mL)	%Geri Kazanım
0,2	0,192	96
0,2	0,212	106
0,2	0,196	98
	ORT	100
	SP	5,292
	%VK	5,292
0,8	0,802	100,25
0,8	0,798	99,75
0,8	0,801	100,12
	ORT	100,04
	SP	0,259
	%VK	0,259
5	4,989	99,78
5	5,008	100,16
5	4,990	99,8
	ORT	99,913
	SP	0,214
	%VK	0,214

1.2.2.3. Kesinlik

1.2.2.3.1. Tekrar Edilebilirlik

0,8 IU/mL İNS çözeltisi HPLC' ye dokuz kez ardı ardına enjekte edilerek okunduğunda elde edilen konsantrasyonların ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayıları Tablo 10' da

gösterilmiştir. Varyasyon katsayısının %2' den az olması yöntemin tekrar edilebilirliğinin göstergesidir.

Tablo 10 İnsülinin 0,8 IU/mL çözeltisi ile HPLC için elde edilen tekrar edilebilirlik bulguları

Örnek No	Konsantrasyon (IU/mL)	Okunan Konsantrasyon (IU/mL)
1	0,8	0,808
2	0,8	0,798
3	0,8	0,797
4	0,8	0,802
5	0,8	0,800
6	0,8	0,798
7	0,8	0,800
8	0,8	0,797
9	0,8	0,797
ORT		0,799
SP		0,004
%VK		0,447

1.2.2.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik için aynı stoktan hareketle hazırlanan 6 adet aynı konsantrasyondaki (1,5 IU/mL) 6 ayrı çözeltinin alan değerleri ölçülerek ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Varyasyon katsayısının %2'den küçük olduğu bulunmuştur (Tablo 11).

Tablo 11 Tekrar Elde Edilebilirlik Bulguları

Örnek No	Konsantrasyon (IU/mL)	Okunan Konsantrasyon (IU/mL)
1	1,5	1,467
2	1,5	1,506
3	1,5	1,531
4	1,5	1,492
5	1,5	1,542
6	1,5	1,536
ORT		1,512
SP		0,029
%VK		1,938

1.2.2.4. Örnek Solüsyonun Stabilitesi

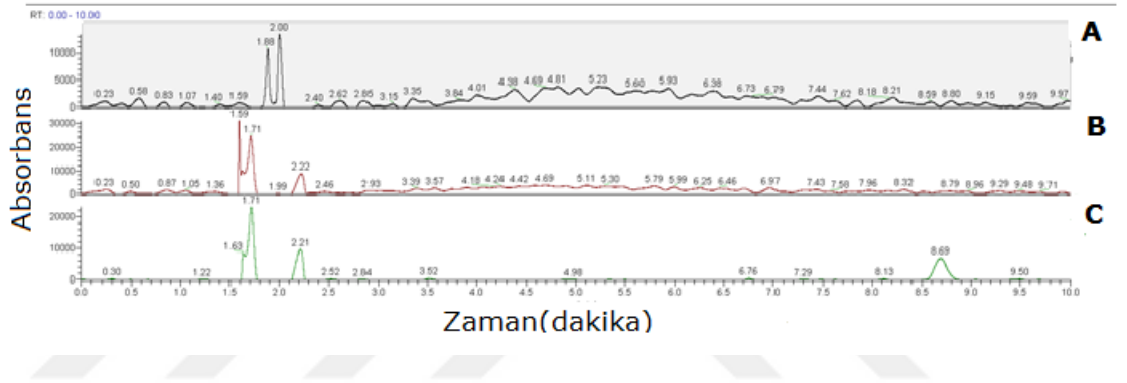
Bölüm 2.1.2.2.4’de anlatıldığı şekilde 2 IU/mL konsantrasyonda hazırlanan çözelti 0. ve 24. saatlerde HPLC yöntemiyle okutulmuştur. Varyasyon katsayısının 2’den küçük olduğu bulunmuştur (Tablo 12).

Tablo 12 İnsülin çözeltisinin (2 IU/mL) 0. ve 24. saat stabilite bulguları

1. Ölçüm (0. Saat)	2,006 IU/mL
2. Ölçüm (24. Saat)	2,004 IU/mL
ORT	2,005
SP	0,001
VK	0,0705

1.2.2.5. Özgünlük, Seçicilik Bulguları

Salım sonucunda bulunan alan değerlerinin etkin maddeye ait olduğunu kanıtlamak için boş formülasyon ile salım çalışması yapılarak mobil faza ve yardımcı maddelere ait olan piklerin insüline ait olan alan ile çakışma yapıp yapmadığı kontrol edilmiştir. Şekil 9’da gösterildiği gibi kullanılan maddeler arasında girişime neden olacak bir madde bulunmamıştır.



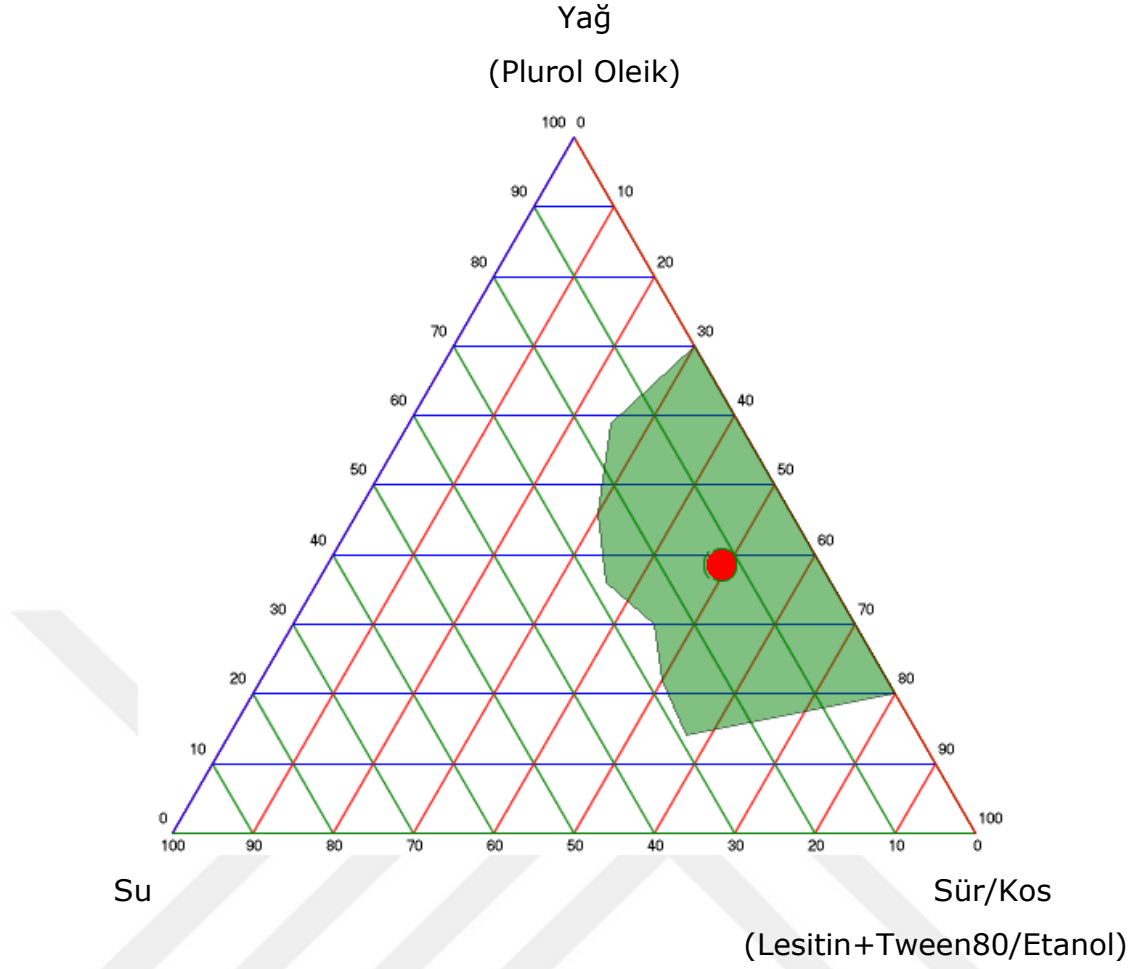
Şekil 9 Özgünlük, seçicilik bulguları

*Asetonitril(A), tampon (B) ve insülin standardı(C) için kromatogramların karşılaştırılması

2. Mikroemülsiyon Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

2.1. Mikroemülsiyon Formülasyonuna Ait Faz Diyagramı

Bölüm 2.2.2’de belirtildiği gibi yağ fazı olarak; Plurol Oleik, sürfaktan olarak; Lesitin ve Tween 80, kosürfaktan olarak etanol kullanılmıştır. Lesitin:Tween80 oranı 3:1 (a/a) ve Sür:Kos (Lesitin+Tween80:etanol) oranı 1:1 (a/a) olacak şekilde tartılan yağ, sürfaktan, kosürfaktan karışımlarının distile suyla titrasyonu sonucu elde edilen faz diyagramı Şekil 10’ da görüldüğü gibidir.



Şekil 10 Mikroemülsiyon formülasyonuna ait faz diyagramı

*Gri alan S/Y mikroemülsiyon oluşum alanını temsil etmektedir.

3. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Bulguları

Bölüm 2.3.'de anlatıldığı şekilde farklı İNS, KZ ve TPP çözelti oranlarına göre değişen iç faz ve mikroemülsiyon sistemlerine ait partikül boyutu ve zeta potansiyel bulguları Tablo13-16'da verildiği gibidir. Ölçümler üç tekrar halinde yapılmış ve ortalama değerler verilmiştir.

Tablo 13 Farklı İNS:KZ:TPP oranları için iç faza ait partikül büyüklüğü ölçüm değerleri

İNS:KZ (h:h)	KZ		KZ:TPP(12:1)		KZ:TPP (6:1)	
	Kod	PB (nm)	Kod	PB (nm)	Kod	PB (nm)
5:5	F3	308,6	F5	401,8	F4	356,5
5:4	F6	80,8	F8	331,2	F7	171,9
5:3	F9	131,5	F11	342,6	F10	250,0
5:2	F12	85,1	F14	191,5	F13	149,1
5:1	F15	70,3	F17	61,3	F16	76,7

*Değerler nm cinsinden ortalama değer olarak verilmiştir. PB – partikül büyüklüğü (nm).

Tablo 14 Farklı İNS:KZ:TPP oranları için mikroemülsiyon formülasyonalarına ait partikül büyüklüğü ölçüm değerleri

İNS:KZ (h:h)	KZ		KZ:TPP(12:1)		KZ:TPP (6:1)	
	Kod	PB (nm)	Kod	PB (nm)	Kod	PB (nm)
5:5	F3	8,8	F5	15,8	F4	56,4
5:4	F6	37,7	F8	74,7	F7	99,1
5:3	F9	62,4	F11	35,2	F10	71,4
5:2	F12	89,8	F14	136,1	F13	141,9
5:1	F15	186,5	F17	178,9	F16	279,5

*Değerler nm cinsinden ortalama değer olarak verilmiştir. PB - partikül büyüklüğü (nm).

Tablo 15 Farklı İNS:KZ:TPP oranları için iç faza ait zeta potansiyel ölçüm değerleri

İNS:KZ (h:h)	KZ		KZ:TPP(12:1)		KZ:TPP (6:1)	
	Kod	ZP(mv)	Kod	ZP(mv)	Kod	ZP(mv)
5:5	F3	50,3	F5	46,7	F4	46,5
5:4	F6	51,0	F8	44,0	F7	38,1
5:3	F9	50,4	F11	48,0	F10	43,4
5:2	F12	47,0	F14	46,8	F13	41,7
5:1	F15	42,8	F17	43,9	F16	44,5

*Değerler milivolt cinsinden ortalama değer olarak verilmiştir. ZP- zeta potansiyet (mV)

Tablo 16 Farklı İNS:KZ:TPP oranları için mikroemülsiyon formülasyonalarına ait zeta potansiyel ölçüm değerleri

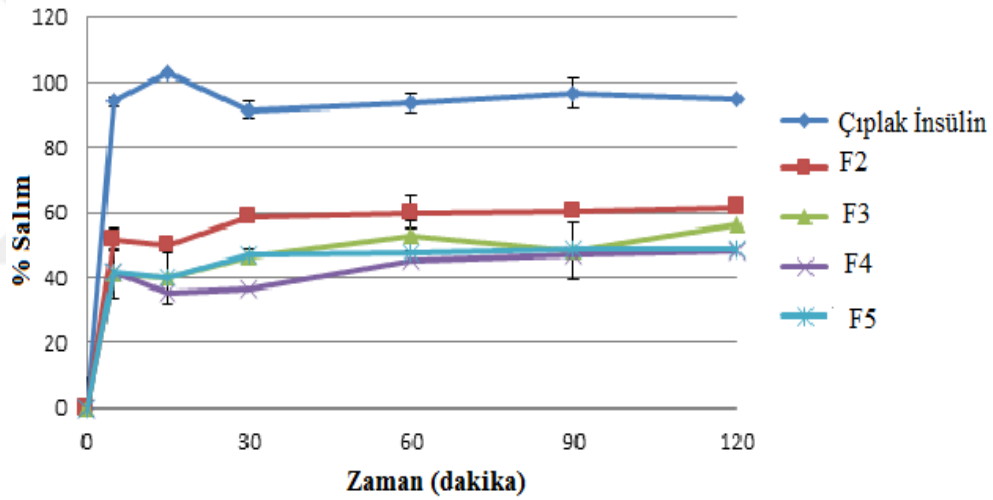
İNS:KZ (h:h)	KZ		KZ:TPP(12:1)		KZ:TPP (6:1)	
	Kod	ZP(mv)	Kod	ZP(mv)	Kod	ZP(mv)
5:5	F3	31,2	F5	27,4	F4	13,1
5:4	F6	33,9	F8	21,2	F7	1,2
5:3	F9	24,7	F11	21,5	F10	8,2
5:2	F12	23,7	F14	16,9	F13	5,8
5:1	F15	11,5	F17	4,1	F16	3,8

*Değerler milivolt cinsinden ortalama değer olarak verilmiştir. ZP- zeta potansiyet (mV)

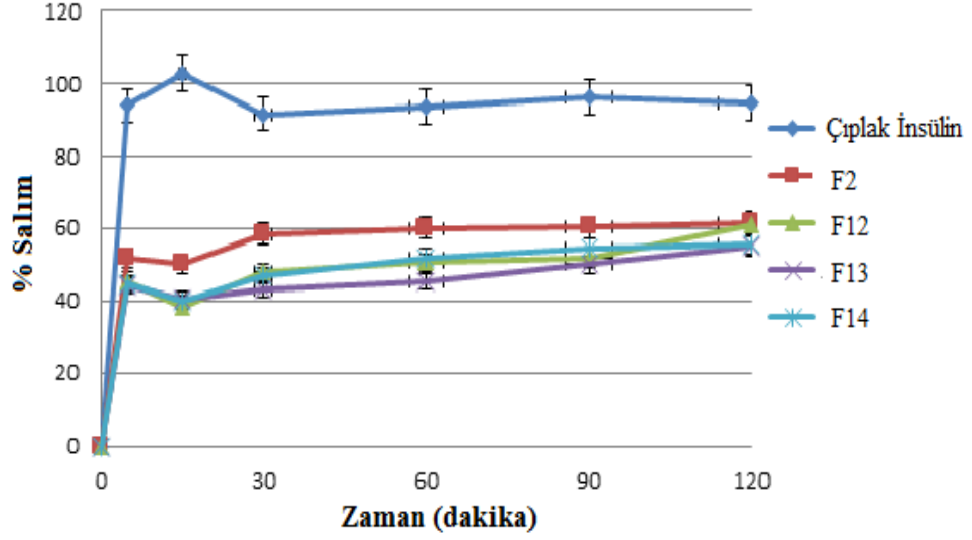
4. İnsülin Yüklü Formülasyonlardan *İn vitro* Salım Çalışmaları

4.1. İnsülin Yüklü Formülasyonlar ile pH 1,2' de Gerçekleştirilen Salım Çalışmaları

Bölüm 2.4.1.'de anlatıldığı şekilde üç tekrar halinde İNS:KZ oranı 5:5 ve 5:2, KZ:TPP oranı 6:1 ve 12:1 sahip farklı formülasyonlar için (F2-F5, F12-F14) pH 1,2 PBS'de gerçekleştirilen salım çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular Şekil 11,12'de gösterildiği gibidir.



Şekil 11 pH 1,2 PBS'de F2-F5 için elde edilen insülin salım profilleri
*İNS:KZ oranı 5:5 (h/h)

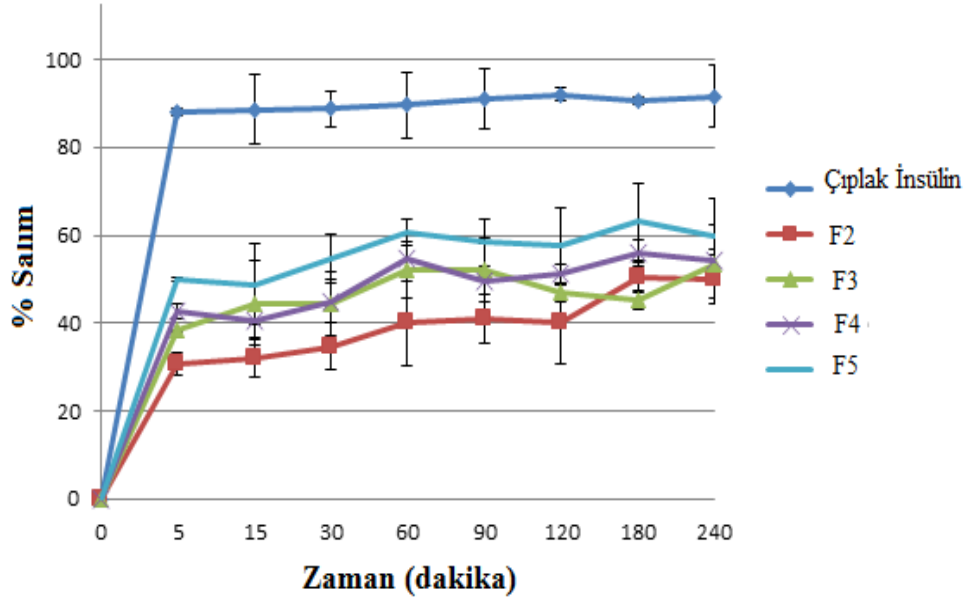


Şekil 12 pH 1,2 PBS'de F2, F12-F14 için elde edilen insülin salım profilleri
 *İNS:KZ oranı 5:2 (h/h)

4.2. İnsülin Yüklü Formülasyonlar ile pH 6,8' de Gerçekleştirilen Salım Çalışmaları

Bölüm 2.4.2.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen pH 1,2 salım çalışmaları sonucu INS:KZ oranı 5:5 olan formülasyonların sahip olduğu insülini daha yüksek oranda koruduğu sonucu elde edilmiş ve bundan sonraki çalışmalara bu formülasyon serisi üzerinden devam edilmiştir.

Buradan yola çıkarak, F2-F5 formülasyonları için pH 6,8 PBS'de gerçekleştirilen salım çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular Şekil 13'te gösterildiği gibidir.



Şekil 13 pH 6,8 için insülin salım profilleri İNS:KZ oranı 5:5 (h/h)
*İNS:KZ oranı 5:5 (h/h)

5. Seçilen Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular

F1-F4 kodlu formülasyonlar için elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

5.1. Viskozite Ölçümüne Ait Bulgular

SV-10, Brookfield ile $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de ölçülen vizkozitesi değerleri Tablo 17'de gösterildiği gibidir.

Tablo 17 F1-F4 formülasyonları için ölçülen viskozite değerleri

	F1	F2	F3	F4
Viskozite (cp, sentipua)	49,4	56,6	62,8	65,3

5.2. pH Ölçümüne Ait Bulgular

F1-F4 formülasyonları için ölçülen pH değerleri Tablo 18’de gösterildiği gibidir.

Tablo 18 F1-F4 formülasyonları için ölçülen pH değerleri

	F1	F2	F3	F4
pH	6,09	6,55	6,53	6,51

5.3. Elektriksel İletkenlik Ölçümüne Ait Bulgular

F1-F4 formülasyonları için ölçülen elektriksel iletkenlik değerleri Tablo 19’da gösterildiği gibidir.

Tablo 19 F1-F4 formülasyonları için ölçülen elektriksel iletkenlik değerleri

	F1	F2	F3	F4
Elektriksel iletkenlik (mS/cm)	150,80	15,99	10,49	10,46

5.4. Refraktif indeks ölçüm bulguları

F1-F4 formülasyonları için ölçülen refraktif indeks değerleri Tablo 20’de gösterildiği gibidir.

Tablo 20 F1-F4 formülasyonları için ölçülen refraktif indeks değerleri

	F1	F2	F3	F4
Refraktif İndeks (nD)	1,43	1,43	1,43	1,43

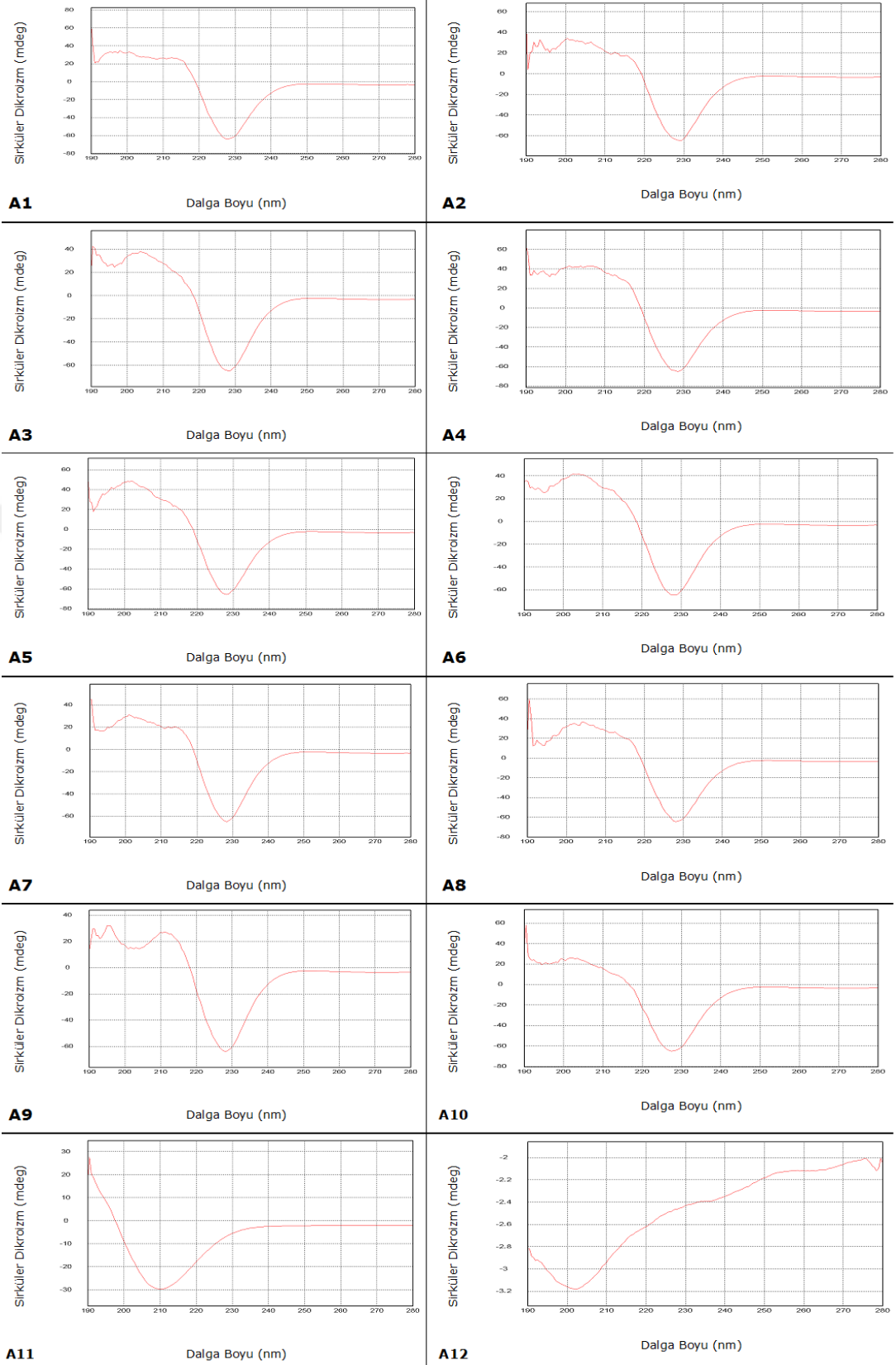
6. Stabilite Çalışmaları

6.1. İnsülinin Konformasyonel Stabilitesi

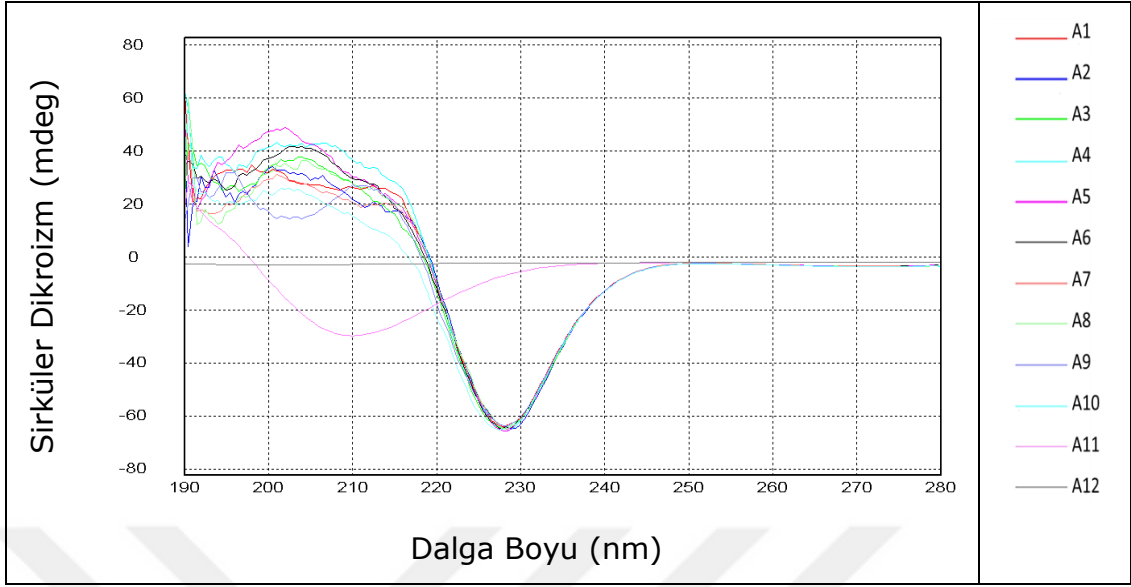
Bölüm 2.6.1’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen sirküler dikroizm çalışmaları sonucunda A kodlu iç faz örnekleri için en düşük pik değeri 220-230 nm aralığında, B kodlu mikroemülsiyon formülasyon örnekleri için en düşük pik değerleri 200-210 nm aralığında bulunmuştur.

Elde edilen bulgularda Şekil 14’te görüldüğü üzere A1-A10 kodlu iç faz örneklerine ait spektrumlar 220-230 nm dalga boyunda, A11 numaralı sadece kitozan içeren örneğe ait spektrum 200-220 nm dalga boyunda gözlenmiş, A12 kodlu sadece TPP içeren örnekte ise spektrum gözlenmemiştir.

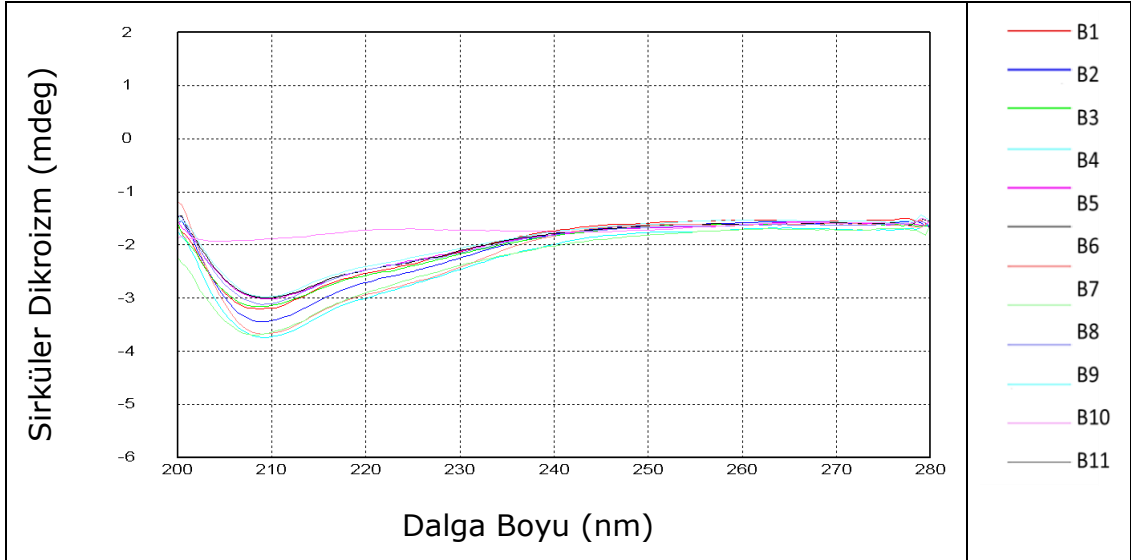
B kodlu mikroemülsiyonlara ait örneklerde ise Şekil 17’de gösterildiği gibi B1-B10 mikroemülsiyon örneklerine ait spektrumlar 200-210 nm dalga boyunda elde edilmiş, B11 kodlu boş mikroemülsiyonda ise pik gözlenmemiştir.



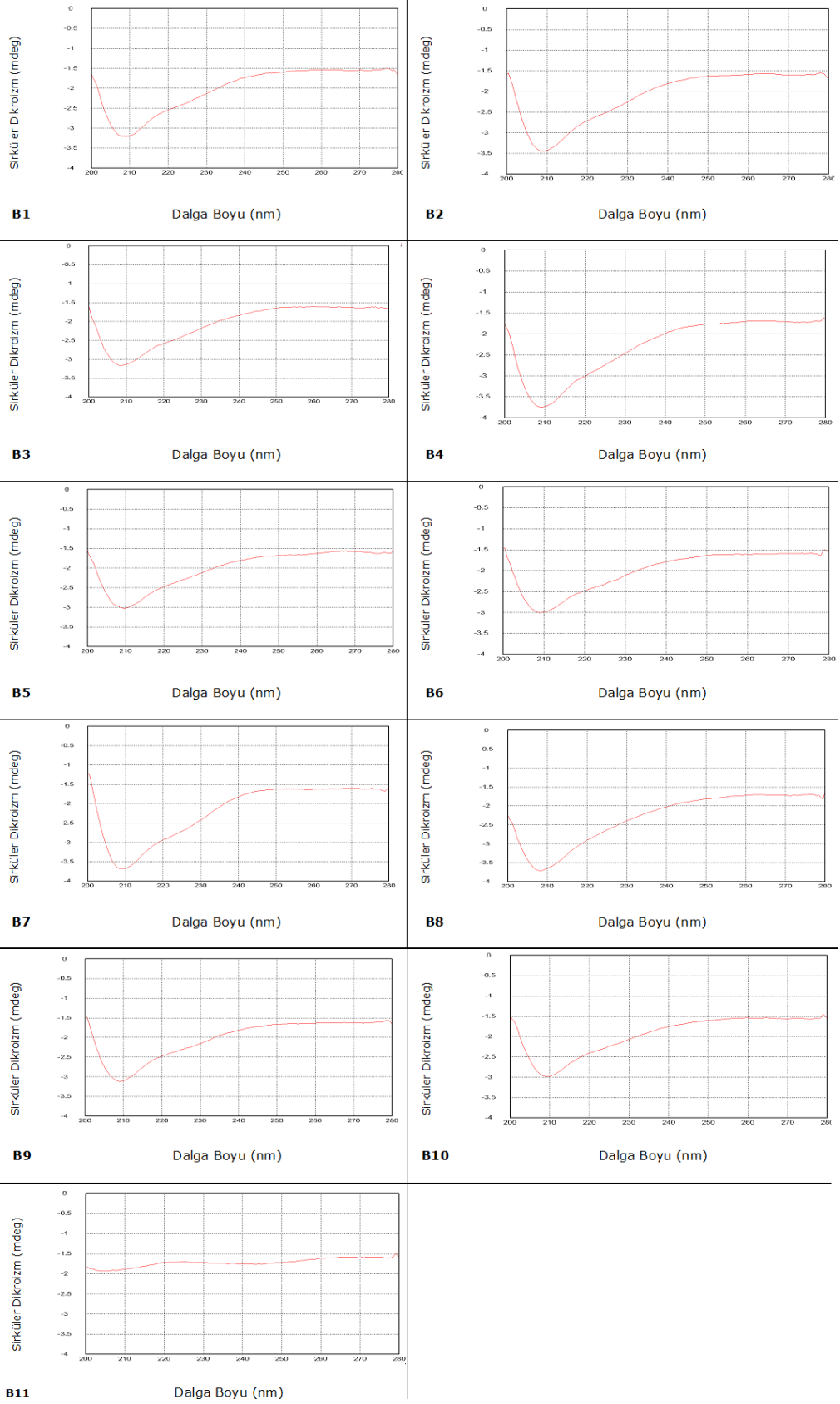
Şekil 14 A1-A12 kodlu iç faz örneklerine ait sirküler dikroizm spektrumları



Şekil 15 A1-A12 kodlu iç faz örneklerine ait sirküler dikroizm spektrumlarının toplu gösterimi



Şekil 16 B1-B11 kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarına ait sirküler dikroizm spektrumlarının toplu gösterimi



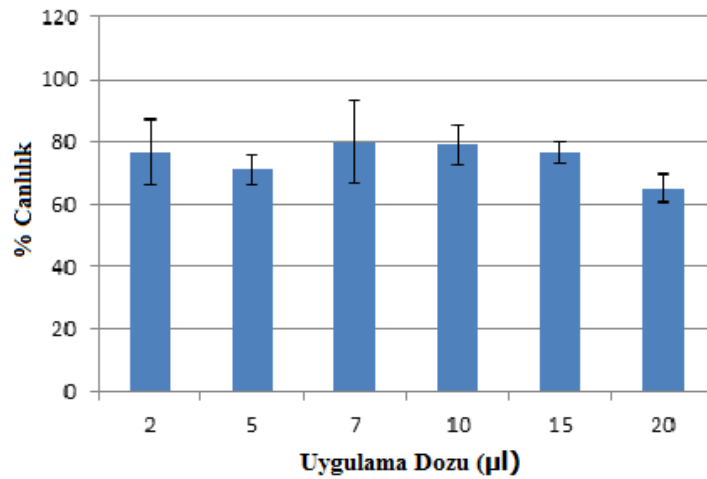
Şekil 17 B1-B11 kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarına ait sirküler dikroizm spektrumları

6.2. Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Stabilitesi

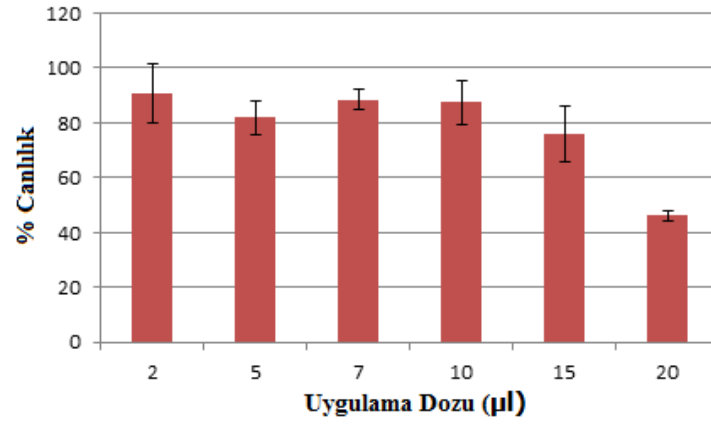
F1-F17 kodlu mikroemülsiyonlar +4 °C’de altı ay bekletilmiştir. Formülasyonlar her hafta fiziksel görünüm, bulanıklık, faz ayrışması gibi özellikleri bakımından incelenmiştir. Formülasyonlarda incelenen özellikler bakımından bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir.

7. Toksisite Çalışmalarına Ait Bulgular

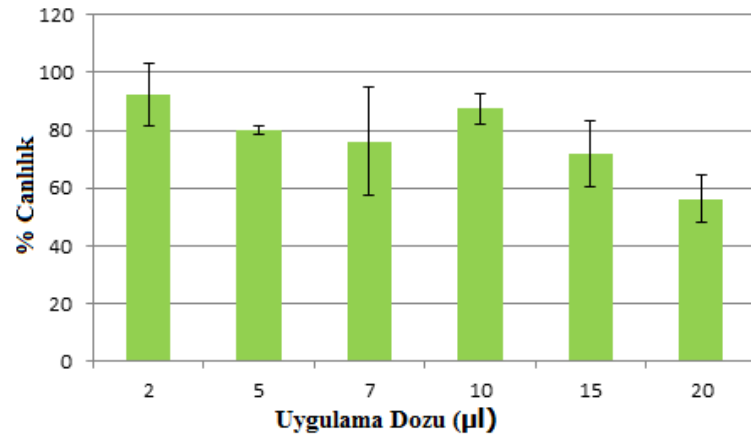
Formülasyonun sitotoksitesini saptamak için Bölüm 2.7’de anlatıldığı şekilde L929 fare fibroblast hücreleri ile sitotoksite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Buna göre F1-F5 formülasyonları için elde edilen sonuçlar Şekil 18-23’te gösterildiği gibidir. F1-F4 formülasyonları için 2, 5, 7, 10, 15 µL dozlarda canlılık %70’in üzerindedir. F5 formülasyonu için canlılık 15 µL’ye kadar %70’ in üzerindedir.



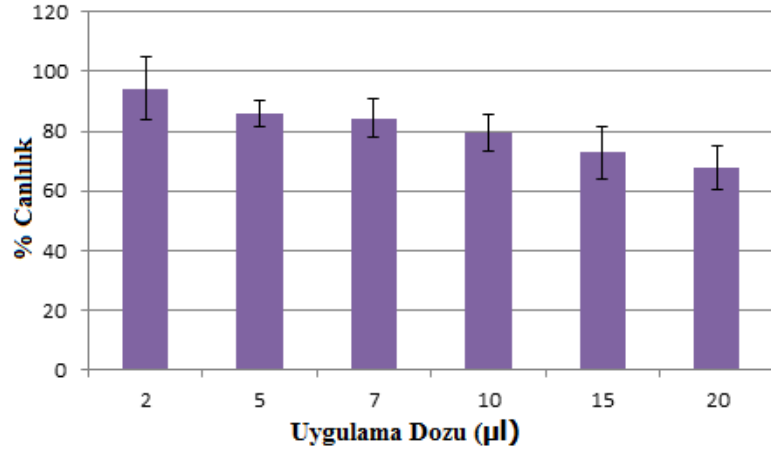
Şekil 18 F1 kodlu formülasyona ait sitotoksite bulguları



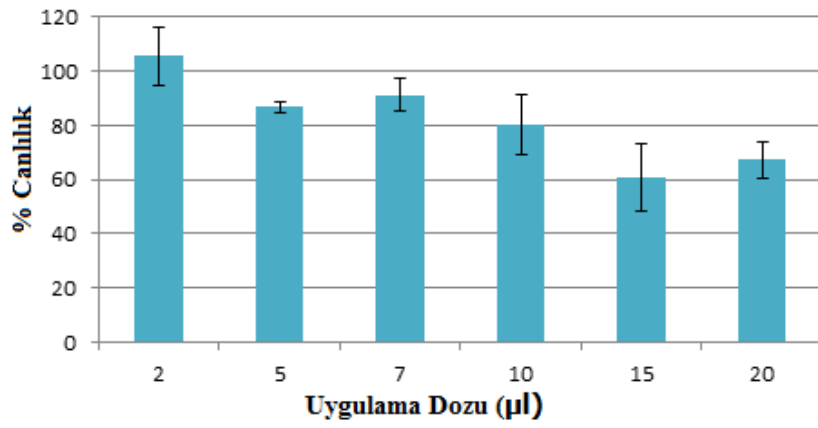
Şekil 19 F2 kodlu formülasyona ait sitotoksosite bulguları



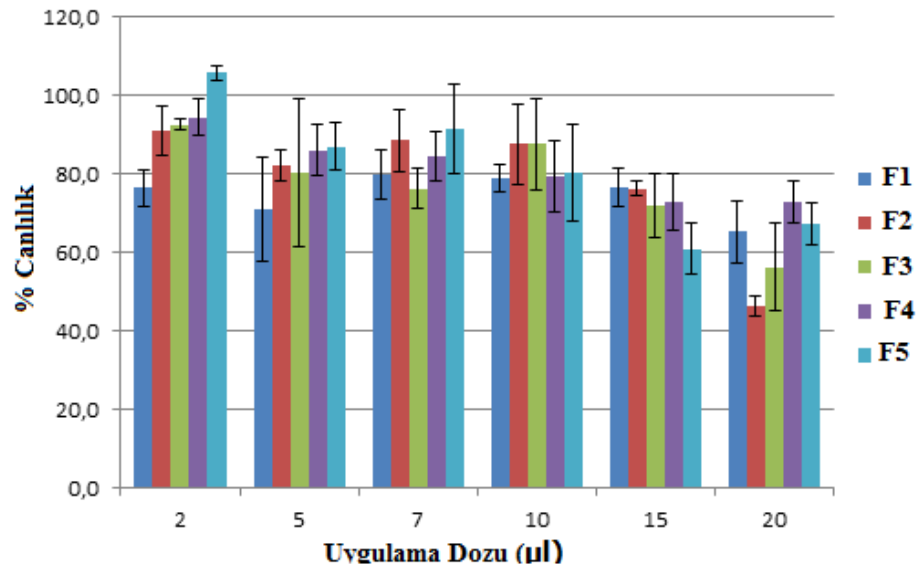
Şekil 20 F3 kodlu formülasyona ait sitotoksosite bulguları



Şekil 21 F4 kodlu formülasyona ait sitotoksiste bulguları



Şekil 22 F5 kodlu formülasyona ait sitotoksiste bulguları



Şekil 23 F1-F5 kodlu formülasyonlara ait sitotoksisite bulgularının toplu gösterimi

8. *İn vivo* Çalışma Bulguları

İn vivo çalışma sonucunda elde edilen bulgular Tablo 21 ve Şekil 24’ te gösterilmiştir. Subkutan insülin uygulanması hızlı ve kısa süreli bir kan glukoz düzeyi düşüşüne neden olmuştur. Subkutan uygulamayı takiben 2 saat sonunda kan glukoz düzeyinde başlangıç düzeyinde geri dönüş başlamış ve uzun süreli bir etki gözlenmemiştir.

İnsülin solüsyonunun serbest halde i.g. uygulanmasında ise kan glukoz düzeyindeki en düşük değer % 89 olarak saptanmıştır. Uygulamayı takiben 8. saatte ölçülen kan glukoz düzeyi %97,5 olarak ölçülmüştür.

İnsülin solüsyonu mikroemülsiyon sistemine yüklendikten sonra i.g. uygulama yapıldığında ise insülin mikroemülsiyon formülasyonu için ölçülen en düşük değer 3. Saatin sonunda %76,5

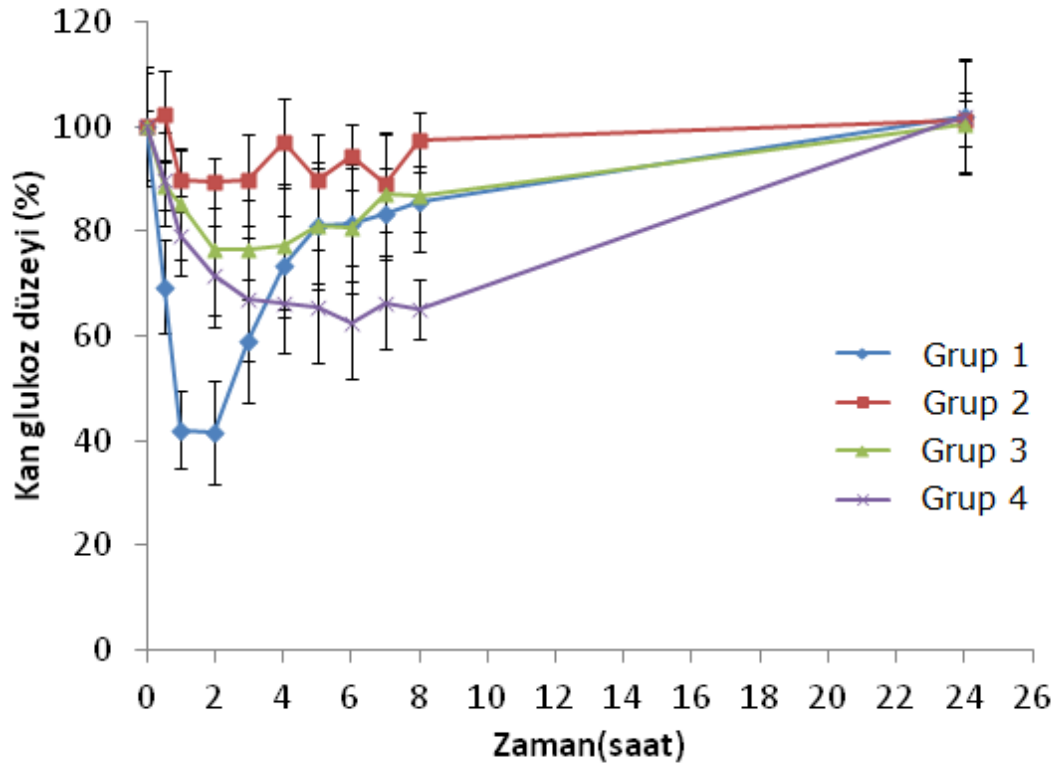
olarak bulunmuştur. 8. saatte ölçülen kan glukoz değeri ise %86,7'dir.

İnsülinin solüsyonu yanında KZ ve TPP de içeren mikroemülsiyon sistemi (F4) sıçanlara i.g. olarak verildiğinde bu formülasyon için ölçülen en düşük değer 6. saatin sonunda % 62,6 olarak belirlenmiştir. 8. saatin sonunda yapılan ölçümde % kan glukoz düzeyi düşük olmaya devam ederek %65,2 olarak bulunmuştur.

Tablo 21 *İn vivo* çalışma için belirlenen gruplarda 0-24 saat arasında elde edilen plazma glukoz seviyesindeki % değişim verileri

Zaman (saat)	1. Grup		2. Grup		3. Grup		4. Grup	
	PGS	SD	PGS	SD	PGS	SD	PGS	SD
0 *	100	11,9	100	3,1	100	10,3	100	11,5
0,5	69,5	8,1	102,2	8,5	88,7	4,6	90	9,1
1	42,1	19,5	89,8	6,2	85,1	10,5	79,2	7,5
2	41,6	18,1	89,3	4,8	76,7	12,7	71,4	9,7
3	59,2	18,6	89,8	8,7	76,5	9,4	66,9	11,8
4	73,3	14,9	96,9	8,6	77,2	11,9	66,4	9,6
5	81,1	7,5	89,8	8,6	81,2	12,2	65,7	11
6	81,3	8	94,2	6,2	80,6	12,4	62,6	10,9
7	83,3	11,2	89,2	9,2	87,3	11,8	66,4	8,8
8	85,7	10,3	97,5	5,2	86,7	10,6	65,2	5,6
24	102	4,8	101,3	5,1	100,6	4,4	101,8	10,8

PGS – Plazma glukoz seviyesi (%). *Deney başlangıcındaki plazma glukoz düzeyi %100 kabul edilmiştir.



Şekil 24 *In vivo* çalışma için belirlenen gruplarda 0-24 saat arasında elde edilen plazma glukoz seviyesindeki % değişimi gösteren grafik

9. *In vivo* Çalışmanın İstatistiksel Değerlendirilmesi

Dört farklı çalışma grubu için elde edilen bulgular grup içi ve gruplar arası olarak Two way-ANOVA'yı takiben Tukey çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

S.c. İNS uygulamasından sonra saatlere göre elde edilen kan glukoz seviyeleri arasında gerçekleştirilen grup içi istatistiksel değerlendirmeye göre kan glukoz düzeylerindeki düşüş uygulamadan itibaren 4. saatin sonuna kadar anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). 5. saatten itibaren ise 0. saat glukoz düzeyine göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

Grup 2 için 0. saat ve ilerleyen saatlerde elde edilen kan glukoz seviyeleri karşılaştırıldığında başlangıca göre anlamlı bir düşüş gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Grup 3 için farklı saatlerde elde edilen kan glukoz düzeyleri başlangıç düzeyi ile karşılaştırıldığında 2. saate kadar anlamlı bir kan glukoz düzeyi düşüşü gözlenmezken ($p>0,05$), 2. saatten 6. saate kadar elde edilen veriler 0. saate göre anlamlı derecede düşüktür ($p<0,05$).

Grup 4 için ölçülen kan glukoz değerleri 0. saate göre grup içi karşılaştırıldığında 1. saatte elde edilen anlamlı kan glukoz düzeyi düşüşünün 8. saatte de devam ettiği görülmektedir ($p<0,05$).

Her grup için elde edilen 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 24. saat değerlerinin birbirleri ile karşılaştırıldığı gruplar arası istatistiksel değerlendirme sonuçlarına göre 1. Grup diğer üç gruba göre 1. ve 2. saat kan glukoz düzeyinde anlamlı bir düşüşe neden olmuştur ($p<0,05$).

3. saat sonuçlarına göre 1. Grup ile 4. Grup kan glukoz düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$).

6. saatte ve 8. saatte 4. Grupta gözlenen kan glukoz düzeyi düşüşü diğer tüm gruplara göre de anlamlıdır ($p<0,05$). 24 saatin sonunda her grup için kan glukoz düzeylerinin başlangıç düzeylerine döndüğü saptanmıştır.

IV. TARTIŞMA

Tez kapsamında İNS'in oral uygulanabilirliğini sağlamak amacıyla onu mide ve bağırsak vasatındaki enzimatik ve degrade edici ortamlardan koruyan, bağırsağa kadar parçalanmadan ulaşmasını sağlayabilen, bağırsak membranına permeasyon ile İNS'in dolaşıma geçmesine olanak veren mikroemülsiyon yapıda bir taşıyıcı sistem geliştirilmesi planlanmıştır.

Bu amaçla ilk olarak İNS teşhis çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 5,6 kDa ağırlığında protein yapısında bir biyomolekül olan İNS'in SDS-PAGE ile elektroforetik teşhisi yapılmıştır. Şekil 7'de gösterildiği gibi elde edilen protein bantları referans protein bantlarına göre incelendiğinde, standart İNS'e ait bantların 10kDa'luk protein referansına göre jelde daha aşağıda yani 5,6 kDa'luk kısımlarda bulunduğu gözlenmiştir. Ayrıca, İNS 100, 75, 50, 25, 12,5, 7,5, 5, 2,5 ve 1 IU/mL olacak şekilde kuyucuklara seyrelen miktarlarda yüklendiği için sonuç olarak elde edilen bant yoğunlukları da konsantrasyon değerlerine uygun olarak elde edilmiştir (43).

İnsülinin HPLC ile kantitatif teşhisi yapılmıştır. Bu amaçla belirlenen farklı dalga boyları ve mobil fazlar denenmiştir (45,46). Çalışma 272 nm dalga boyunda, mobil faz olarak ACN ve %0,1 TFA'in sudaki çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan ACN:TFA çözeltileri oranı 28:72 (h/h)'dir. İlgili kalibrasyon eğrisi Şekil 8'de gösterildiği gibi çizilmiştir. Sistemin doğru, kesin ve beklenen sonucu verdiğini ispatlamak için yöntemin validasyon çalışmaları Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH)'nın Q2 (R1) kılavuzuna göre yapılmıştır(57). Analitik yöntem validasyonu için doğrusallık, doğruluk ve geri elde edilebilirlik, kesinlik, tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik, özgünlük, seçicilik deneyleri yapılmıştır. Uzun süreli analizler sırasında İNS'in stabil kaldığının gösterilmesi için hazırlanan örnek İNS çözeltisinin 0. ve 24.

saatlerde HPLC ile konsantrasyonu okunmuş ve varyasyon katsayısı 2'den küçük bulunarak çözeltinin analiz boyunca stabil kaldığı sonucuna varılmıştır (58).

Mikroemülsiyon formülasyon çalışmalarında faz diyagramı oluşturulması önemli bir basamaktır. İnsülini degradesyondan korumak ve bağırsak penetrasyonunu arttırmak amacı ile İNS çözeltisini iç fazda içeren S/Y mikroemülsiyon sistemi hazırlanması amaçlanmıştır. Farklı yağlar, sürfaktanlar ve kosürfaktanlar HLB değeri S/Y mikroemülsiyon oluşumuna uygun olacak şekilde hesaplanarak formülasyona eklenmiştir. Bu karışımlara bulanıklık oluşana kadar damla damla UP su ilave edilmiştir. Sistemin ilk bulandığı an tespit edilmiştir. Buna göre HLB değeri 6,37 olan, berrak, iç fazında en yüksek oranda su barındırabilen, en stabil formülasyon daha sonraki çalışmalar için seçilmiştir. Seçilen formülasyonlarda; yağ fazı olarak Plurol Oleik, sürfaktan olarak Lesitin ve Tween 80, ko-sürfaktan olarak etanol kullanılmıştır. Mikroemülsiyon titrasyon yöntemi ile elde edilen ve S/Y mikroemülsiyon oluşum bölgesini gösteren faz diyagramı Şekil 10'da gösterilmiştir.

Ana formülasyon olarak seçilen bu formülasyonda dış faz olarak kullanılan Plurol Oleik'in bağırsaktan selektif absorpsiyonu ve biyoyararlanımı arttırıcı etkisi bilinmektedir(40). Sürfaktan olarak kullanılan Lesitin ve Tween 80'in emülsifiye ve stabilize edici etkileri daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir(41). Ko-sürfaktan olarak oral formülasyonlarda çokça kullanılan etanolün ise maliyeti ve toksik etkisi düşük, su tutma kapasitesi yüksektir.

Formülasyon belirleme çalışmalarında iç faz olarak kullanılan UP su yerine daha sonra rekombinant İNS çözeltisi (100 IU/mL) kullanılmıştır (55).

Mikroemülsiyon formülasyonu hazırlandıktan sonra İNS için koruyucu etkiyi ve bağırsaktan penetrasyonu arttırmak için

sistemde bazı değişiklikler yapılmıştır. Bu amaçla formölasyonun iç fazına farklı oranlarda, KZ'ın %0,3'lük çözeltisi ilave edilmiştir (Tablo 6). KZ'ın yapısında sahip olduğu pozitif yükler ile İNS'in yapısında sahip olduğu negatif yüklerin birbirleri ile etkileşime girmesi sonucu İNS için koruyucu bir etki oluşturulması amaçlanmıştır. KZ'ın mikroemölasyon formölasyonlarında ilaç yükleme kapasitesini arttırdığı bilinmektedir. Bunun yanında KZ ilavesi ile artan viskozitenin ve nitrojen içerikli rijit D-glukozamine yapısının stabil formölasyon oluşumlarına katkı yaptığı da daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (19). Bu amaçla İNS:KZ oranları (h/h) 5:5, 5:4, 5:3, 5:2, 5:1 olacak şekilde INS ve KZ çözeltileri formölasyona ilave edilmeden önce oda sıcaklığında karıştırılarak konjugasyona girmeleri sağlanmış, daha sonra mikroemölasyon iç fazı olarak formölasyona ilave edilmiştir.

Formölasyona KZ ilavesi ile elde edilmeye çalışılan koruyucu yapıyı sağlamlaştırmak için ayrıca TPP ilavesi denenmiştir. Katyonik yüklü KZ ile polianyonik TPP arasında iyonik jelasyon tepkimesi ile bağlanma gerçekleştiği önceki çalışmalarda belirtilmiştir(58). Bu etkiyi İNS içeren mikroemölasyon sisteminde sağlamak için İNS:KZ çözeltilerinin karışımları üzerine KZ:TPP oranları 6:1 ve 12:1 (a/a) olacak şekilde %1'lik TPP çözeltisi (UPsu ile) ilave edilmiştir. Bunu takiben, iyonik jelasyon tepkimesi gerçekleşmesi için otuz dakika beklenmiştir. Elde edilen karışımlar mikroemölasyon formölasyonlarına iç faz olarak damla damla ilave edilerek Tablo 6'da belirtilen oranlarda İNS, KZ ve TPP içeren mikroemölasyonlar elde edilmiştir. Literatürde proteinlerin oral aktarımını sağlamak amacıyla KZ ve TPP içeren çeşitli dozaj şekilleri mevcuttur(59). Ancak bu tez kapsamında uyguladığımız şekilde uyguladığımız şekilde protein, KZ ve TPP'ı iç sulu fazda içeren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Oluşturulan iç faz ve mikroemülsiyon formülasyonlarının zeta potansiyelleri ve partikül boyutları ölçülerek karakterizasyonları yapılmıştır. Partikül büyüklüğü değerlendirme sonuçlarına göre iç faz partikül boyutu genel olarak azalan KZ miktarı ile birlikte azalma eğilimindedir (Tablo 13). Tablo 6’da belirtilen iç fazlar mikroemülsiyona yüklendiğinde ise azalan KZ miktarı ile mikroemülsiyon partikül boyutunun artma eğilimine girdiği görülmektedir. Ayrıca mikroemülsiyonlara TPP ilave edilmesi ile de formülasyon partikül boyutu artmaktadır (Tablo 14). Bunun nedeninin, formülasyon içerisindeki KZ miktarının azalması ile “+” (pozitif) yükün azalması ve buna bağlı olarak damlacıklar arası birbirini itme kuvvetinde meydana gelen azalma olduğu düşünülmektedir. Ayrıca TPP ilavesi ile formülasyon içinde bulunan “-” (negatif) yükün KZ’ın “+” yükünü azalttığı bu nedenle damlacık boyutunu arttığı varsayılmaktadır.

Zeta potansiyel ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde hem iç fazlar hem mikroemülsiyonlar için artan KZ miktarı ile zeta potansiyel değerlerinin arttığı görülmüştür (Tablo15,16). TPP ilavesi ile F3 formülasyonuna ait +31,2 mV olan zeta potansiyel değerinin +13,2 mV’a düşmesinin nedeninin TPP’nin yapısında sahip olduğu negatif yükü KZ’ın ortama verdiği pozitif yükün azalması olduğu düşünülmektedir. Sonuçta, yine sistemin sahip olduğu pozitif zeta potansiyel değerlerinin bağırsak vasatındaki mukus tabakaya bağlanmayı ve bağırsak yapısında bulunan çapraz kavşakları geçerek İNS aktarımını arttıracakı düşünülmüştür.

Rh-ins çözeltisi ile KZ ve TPP çözeltilerinin beraber kullanılmasının ve mikroemülsiyon oluşturulurken uygulanan hazırlama koşullarının İNS’in konformasyonel stabilitesine olan etkisinin araştırılması için sirküler dikroizm çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda incelenen iç faz örnekleri için Şekil 14’te görüldüğü üzere A1 kodlu sadece İNS içeren çözelti ile A2-A10 kodlu

İNS:KZ:TPP çözeltilerini farklı oranlarda içeren çözeltilere ait elde edilen pikler 220-230 nm dalga boyunda gözlenmiştir. Elde edilen piklerin birbirleri ile çakıştıkları saptandığından İNS çözeltisi üzerine ilave edilen KZ ve TPP çözeltilerinin İNS'in konformasyonel stabilitesini etkilemediği bulunmuştur. KZ ve TPP ilaveleri sonrası elde edilen piklerin gerçekten İNS çözeltisine ait olduğunun gösterilmesi amacıyla sadece KZ (A11) ve sadece TPP (A12) çözeltilerine ait sirküler dikroizm pikleri de incelenmiştir. A11 numaralı sadece KZ çözeltisi içeren örneğe ait pik 200-220 nm dalga boyunda gözlenmiştir. A12 kodlu sadece TPP çözeltisi içeren örnekte ise spektrum gözlenmemiştir. Böylece 220-230 nm dalga boyunda gözlenen piklerin gerçekten İNS çözeltisine ait olduğu doğrulanmıştır (Şekil 14,15).

Şekil 17'de görüldüğü üzere farklı oranlarda İNS:KZ:TPP içeren mikroemülsiyonlar için yapılan sirküler dikroizm çalışmalarında ise 200-210 nm aralığında pik gözlenmiştir. B1 numaralı sadece İNS içeren mikroemülsiyon ile B2-B9 numaralı İNS:KZ:TPP içeren mikroemülsiyonlar için elde edilen piklerin Şekil 16'da gösterildiği üzere çakıştıkları saptanmıştır. B11 kodlu PBS içeren boş mikroemülsiyon formülasyonunda ise pik gözlenmemiştir. Böylece 200-210 nm dalga boyunda gözlenen piklerin gerçekten İNS'e ait olduğu doğrulanmıştır. İç fazlara ait sirküler dikroizm çalışmalarında 220-230 nm dalga boyunda gözlenen İNS'e ait piklerin mikroemülsiyonlara ait sirküler dikroizm çalışmalarında 200-210 nm de gözlenmesi B kodlu örneklerin mikroemülsiyon formülasyonu şeklinde olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. B kodlu örneklerin analizi için mikroemülsiyon sisteminin bozularak iç fazda bulunan İNS'in serbest hale geçmesi gerekmektedir. Bu amaçla formülasyona çeşitli işlemler uygulanmaktadır. Sirküler dikroizm sonuçlarında İNS'e ait pikin gözleendiği dalga boyunun bir miktar kaymasının

nedeninin uygulanan işlemler sonucunda olduğu düşünülmektedir. Sadece İNS içeren B1 kodlu mikroemülsiyon ile farklı oranlarda İNS:KZ:TPP içeren B2-B10 kodlu mikroemülsiyonlara ait pikler Şekil 16'da görüldüğü gibi üst üste çakışmıştır. Bu nedenle, 200-210 nm dalga boyunda gözlenen pikin İNS'e ait olduğunu doğrulanmaktadır. B kodlu örneklerin pik şiddetlerinin A kodlu örneklerle göre düşük olmasının nedeni örneklerdeki konsantrasyon farkından kaynaklanmaktadır. A kodlu örnekler 25 IU/mL, B kodlu örnekler 6,4 IU/mL konsantrasyonda İNS içermektedirler.

İnsülin yüklü formülasyonlara ait yapılan salım çalışmalarında midenin asidik ortamını taklit etmesi bakımından pH 1,2'lik PBS kullanılmıştır (50,51). Hazırlanan formülasyonlar arasından en yüksek oranda KZ içeren F3-F5 kodlu formülasyonlar ile daha düşük oranda KZ içeren ve İNS:KZ oranı 5:2 olan F12-F14 kodlu formülasyonlar için salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, sonuçların karşılaştırılması amacı ile sadece İNS içeren mikroemülsiyon (F2) ile de deney gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak, deney koşullarının İNS üzerindeki etkisini gözlemleyebilmek için çıplak İNS çözeltisi ile de salım çalışması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre çıplak İNS'in deney ortamında bozunmadan kaldığı saptanmıştır. Şekil 11'de görüldüğü gibi çıplak İNS'in 5. dakika konsantrasyonu 93,9 iken 120. dakika konsantrasyonu 94,5 'dir. Formülasyonlara ait pH 1,2 salım sonuçlarına göre formülasyona KZ ilavesi ile İNS'in salım miktarının azaldığı görülmüştür. Formülasyonun içerdiği KZ miktarı ile salınan İNS miktarı ters orantılıdır, yani KZ miktarı arttıkça zamana bağlı salım azalmıştır. Yine aynı şekilde TPP ilavesinin de salım miktarını azalttığı görülmüştür. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, formülasyona eklenen KZ ve TPP çözeltilerinin İNS'in midede salımını azalttığı ve İNS 'in korunmasını arttırdığı görülmüştür. pH 1,2 salım denemeleri sonuçlarına göre en yüksek koruyucu etki F4 kodlu formülasyonda

gözlenmiştir (Şekil 11,12). Bu nedenle bağırsak vasatını taklit edecek pH 6,8 PBS ile gerçekleştirilen çalışmalar F2-F4 kodlu formülasyonlar ile yapılmıştır. Şekil 13’de görüldüğü üzere, pH 6,8 salım çalışmasına göre en az İNS salımı gösteren formülasyon sadece İNS içeren F2 kodlu formülasyon olmuştur. Bununla beraber, formülasyona KZ ve TPP çözeltilerinin ilavesi ile pH 6,8’de İNS’in salımında artış gözlenmiştir. Sonuç olarak, pH 1,2 ve 6,8 salım çalışmalarına göre İNS ve KZ ilavesinin mide vasatındaki koruyucu etkiyi arttırması yanında bağırsak vasatında ise İNS ’in salımında artış sağladığı görülmüştür.

Stabilite çalışması için Tablo 6’da belirtilen 17 adet formülasyon +4 °C’de 6 ay boyunca incelenerek, fiziksel görünüm, bulanıklık ve faz ayrışması yönünden her hafta değerlendirilmiştir. Formülasyonlarda belirlenen süre boyunca gözle görülür bir değişiklik gözlenmediği ve İNS yüklü mikroemülsiyon formülasyonlarının 6 ay boyunca stabil kaldığı saptanmıştır.

Sitotoksosite çalışmaları L-929 fare fibroblast hücreleri ile gerçekleştirilmiştir. Uygulama yapılan F1-F5 formülasyonlarından F5 formülasyonu haricinde tüm formülasyonlar için 15 µL’ye kadar olan dozlar %70’in üzerinde canlılık göstererek bu doza kadar olan uygulamalar için toksik bulunmamışlardır. F5 formülasyonu ise 15 µL dozda % 60 canlılık gösterdiği için, uygulanan bu doz ve üstü için toksik olarak değerlendirilmiştir (Şekil 18-Şekil 23).

Formülasyon ile ilgili karakterizasyon, salım, sitotoksitie ve stabilite çalışmaları tamamlandıktan sonra *in vivo* hayvan denemelerine geçilmiştir. *İn vivo* hayvan denemeleri Wistar Albino sıçanlarda dört grup halinde gerçekleştirilmiştir. 1. gruba İNS solüsyonu s.c. enjeksiyon(1 IU/kg) halinde, 2. gruba çıplak İNS solüsyonu- i.g. (50 IU/kg) olarak, 3. gruba İNS içeren mikroemülsiyon (F2) i.g. (50 IU/kg) olarak ve 4. gruba İNS, KZ,

TPP içeren mikroemülsiyon (F4) i.g. (50 IU/kg) olarak uygulanmıştır.

İn vivo hayvan deneyi sonuçlarına göre, s.c. uygulama yapılan grubun başlangıç kan glukoz düzeylerinde 30. dakikadan itibaren ve 4. saatin sonuna kadar anlamlı olarak düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$). Bunun nedeni s.c. uygulanan İNS'in hemen sirküler dolaşıma katılması ve ardından eliminasyona uğrayarak 4 saatin sonunda etkinliğini yitirmesidir. Çıplak İNS solüsyonunun i.g. olarak uygulandığı 2 numaralı grupta 24 saate kadar alınan 11 ölçümde kan glukoz düzeyleri 0. saate göre karşılaştırıldığında anlamlı bir düşüş elde edilmemiştir ($p>0,05$). Bunun nedeninin, gastrointestinal sistem koşullarına karşı koruyucu bir sisteme yüklenmemiş olan İNS'in mide asiditesi ve enzimlerinden etkilenerek degradasyona uğraması olduğu düşünülmektedir. İNS içeren mikroemülsiyon sisteminin i.g. olarak uygulandığı 3. grup için farklı saatlerde elde edilen kan glukoz düzeyleri başlangıç düzeyi ile karşılaştırılmıştır ve 2. saatten 6. saate kadar elde edilen verilerin 0. saate göre anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Optimum formülasyon kabul edilen F4'ün i.g. uygulanmasında elde edilen veriler 0. saate göre grup içi karşılaştırıldığında 1. saatte elde edilen anlamlı kan glukoz düzeyi düşüşünün 8. saatte de devam ettiği görülmektedir ($p<0,05$). Buna göre mikroemülsiyon sisteminin İNS'i asidik ve enzimatik koşullardan koruduğu ve etkinliğinin 1. saatte başladığı gözlenmiştir. Uygulamayı takiben 3. Grup, 6 saate kadar düşük kan glukoz seviyesi sağlarken, 4. Grup verilerinde 8. Saatin sonunda dahi anlamlı ve düşük kan glukoz seviyesi elde edilmiştir ($p<0,05$) (Tablo21,Şekil 24).

Ayrıca, her grup için elde edilen 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 24. saat değerlerinin birbirleri ile karşılaştırıldığı gruplar arası

istatistiksel değerlendirme de yapılmıştır. Buna göre s.c. İNS uygulanan 1. Grup için diğer üç gruba göre 1. ve 2. saatlerde kan glukoz düzeyinde anlamlı bir düşüş ($p<0,05$) gözlenmiştir. Buna karşın, 3. saat sonunda optimal formlasyonun uygulandığı 4. Grup bu düşük kan glukoz düzeyini yakalamıştır. 4. grup için gözlenen kan glukoz düzeyi düşüşü ise 6. saatte ve 8. saatte diğer tüm gruplara göre de anlamlı olarak farklıdır ($p<0,05$). Buradan yola çıkarak formlasyona ilave edilen KZ ve TPP'nin İNS'in konformasyonel stabilitesini bozmadan, İNS zerindeki koruyuculuğu arttırdığı ve bağırsakta daha uzun süreli salıma yol açtığı tez kapsamında gösterilmiştir.

V. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda Rh-ins'in oral yol ile kullanımını sağlamak amacıyla S/Y mikroemülsiyon formülasyonları geliştirilmiştir. Geliştirilen formülasyonun İNS'in mide vasatındaki koruyuculuğunu arttırılarak, bağırsakta salımı sağlamak için iç fazına KZ ve TPP ilave edilmiştir. *İn vitro* salım denemeleri sonucunda KZ ve TPP ilavesinin İNS'i mide asiditesinden koruduğu ve bağırsakta daha yüksek oranda salım sağladığı gösterilmiştir.

Altı aylık stabilite çalışmaları ve sitotoksisite denemelerine göre formülasyon *in vivo* deneyler için uygun bulunmuştur.

İn vivo hayvan deneylerinde, 50 IU/kg dozunda oral olarak uygulanan optimum formülasyonun 8 saate kadar ve etkin bir kan glukoz düzeyi düşüşü sağladığı gözlenmektedir.

Geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonu stabil olması, uygun damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyele sahip olması, sitotoksisitesinin düşük olması, istenilen salım özelliklerini sağlaması ve *in vivo* denemelerde de uzun süreli ve etkin bir kan glukoz düzeyi düşüşü sağladığı için uygun bir oral İNS taşıyıcı sistem olarak önerilebilir.

VI. KAYNAKÇA

1. Choonara BF, Choonara YE, Kumar P, Bijukumar D, Toit LC, Pillay V. A review of advanced oral drug delivery technologies failitating the protection and absorption of protein and peptide molecules. *Biotechnology Advances* 2014;32:1269-82.
2. Kumria R, Goomber G. Emerging trends in insulin delivery: Buccal route. *Journal of Diabetology* 2011;2:1-9.
3. Gupta H, Sharma A. Recent trends in protein and peptide drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutics* 2009;3:69-75.
4. Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Administration strategies for proteins and peptides. *International Journal of Pharmaceutics* 2014;477:578-89.
5. Owerton TW. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Disvovery Today* 2014;19:509-601.
6. Renukuntla J, Vadlapudi AD, Patel A, Boddu SHS, Mitra AK. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *International Journal of Pharmaceutics* 2013;447:75-93.
7. Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi. Türkiye Diyabet Vakfı. 2013 ; ISBN 978-975-98038-2-7.
8. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas 6th ed. Brussels : International Diabetes Federation, 2013.
9. Howland RD, Mycek MJ. Lippincott's Illustrated Reviews. Baltimore; 2006.
10. Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı Tedavi ve İzlem Kılavuzu. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. Ankara; 2013

11. Hilgenfeld R, Seipke G, berchtold H, Owens DR. The evolution of insulin glargine and its continuing contrubution to diabetes care. *Drugs* 2014;74:911-27.
12. Kuhlmann MK, Schmidt A. Production and manufactring of biosimilar insulins: implications for patients, physicians and health care systems. *Biosimilars* 2014;4:45-58.
13. Maroni A, Zema L, Curto MDD, Foppoli A, Gazzaniga A. Oral colon delivery of insulin with the aid of functional adjuvants. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012;64:540-56.
14. Ahmad K. Insulin sources and types: a review of insulin in terms of its mode on diabetes mellitus. *Journal of Traditional Chinese Medicine* 2013;34:234-7.
15. Cavaiola TS, Edelman S. Inhaled insulin:A breath of fresh air? A Review of Inhaled Insülin. *Clinical Therapeutics* 2014;8:1275-89.
16. Heinemann L, Jacques Y. Oral insulin and buccal insulin: A critical reappraisal. *Journal of Diabetes Science and Technology* 2009;3:568-84.
17. Henkin RI. Inhaled insulin—intrapulmonary, intranasal, and other routes of administration: Mechanisms of action. *Nutrition* 2010;26:33-9.
18. Hölscher C. First clinical data of the neuroprotective effects of nasal insulin application in patients with Alzheimer's disease. *Alzheimer's&Dementia* 2014;10:33-7.
19. Mukhopadhyay P, Mishra R, Rana D, Kundu PP. Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review. *Progress in Polymeric Science* 2012;37:1457-75.

20. Gürsoy AZ. Kontrollü Salım Sistemleri. İstanbul : Kontrollü Salım Sistemleri Derneği; 2002.
21. Yun Y, Cho YW, Park K. Nanoparticles for oral delivery: Targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2013;65:822-32.
22. Ateş M, Kaynak MS, Şahin S. İntestinal absorpsiyonu artırmak amacıyla kullanılan penetrasyon arttırıcı ajanlar. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 2013;33:117-46.
23. Rekha MR, Sharma CP. Oral delivery of therapeutic protein/peptide for diabetes-future perspectives. *International Journal Of Pharmaceutics* 2012;440:48-62.
24. Veronese FM, Mero A. The impact of PEGylation on biological therapies. *Biopharmaceutical Gene Therapy* 2008;22:315-25.
25. Burke SWM, Walmsley S. Biopharmaceuticals: A new era of discovery in the biotechnology revolution. London: PJB publications; 2001.
26. Carino GP, Jacob JS, Mathiowitz E. Nanosphere based oral insulin delivery. *Journal of Controlled Released* 2000;65:261-9.
27. Swaminathan J, Ehrhardt C. Liposomal delivery of proteins and peptides. *Expert Opinion Drug Delivery* 2012;9:1489-1503.
28. Lee KY, Yuk SH. Polymeric protein delivery systems. *Progress Polymer Science* 2007;32:669-97.
29. Müller RH, Mader K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles for controlled drug delivery - A review of the state of art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2000;50:161-77.
30. Sharma G, Wilson K, Walle CF, Sattar N, Petrie JR, Kumar R. Microemulsions for oral delivery of insulin: Design, development

and evaluation in streptozotoci induced diabetic rats. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutic 2010;76:159-69.

31. Bhardwaj V, Hariharan S, Bala I, Kumar N, Kumar MNVR. Pharmaceutical aspects of polymeric nanoparticles for oral delivery. Journal of Biomedical Nanotechnology 2005;1:235-58.

32. Graf A, Rades T, Hook SM. Oral insulin delivery using nanoparticles based on microemulsions with different structure-types: Optimisation and in vivo evaluation. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2009;37:53-61.

33. Klier J, Tucker CJ, Kalanthar TH, Green DP. Properties and applications of microemulsions. Advanced Materials 2000;12:1751-57.

34. Seiller M, Martini MC. Interet de vehicules microemulsionnes. Formes Pharmaceutiques Pour Application Locale, 1996;412-440.

35. Attwood D. "Microemulsions" Colloidal Drug Delivery Systems. New york; 1994.

36. Çilek A, Çelebi N, Tırnaksız F, Tay A. A lecithin-based microemulsion of rh-insulin with aprotinin for oral administration: Investigation of hypoglycemic effects in non-diabetic and STZ induces diabetic rats. International Journal of Pharmaceutics 2005; 298:176-85.

37. Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update. Journal of Pharmacy and Pharmacology 2000;53:1047-67.

38. Shaji J, Jain V, Lodha S. Chitosan: A novel pharamaceutical excipient. International Journal of Applied Sciences 2010;1:11-27.

39. Oliveira RP, Oliveira AP, Gaspar C, Silvestre S, Oliveira JM, Amaral MH, Breitenfeld L. Sodium tripolyphosphate: An excipient with intrinsic in vitro anti-Candida activity. *International Journal of Pharmaceutics* 2011;421:130-4.
40. PubChem, Open Chemistry Database (Internet). Information, National Center of Biotechnology. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
41. Gattefosse Web site (Internet). Available from: <http://www.gattefosse.com/node.php?articleid=166?veterinary>.
42. Lecithin, Review of Natural Products. Wolters Kluwer Health, Inc, 2005.
43. Tippavajhala VK, Yamsani M. Electrophoretic estimation of insulin: A novel approach to an older technique. *International Journal of Current Pharmaceutical Research* 2010;2:19-23.
44. Moussa BAM, Farouk F, Azazzy HME. A validated RP-HPLC method for the determination of recombinant human insulin in bulk and pharmaceutical dosage form. *Journal of Chemistry* 2010;7:449-57.
45. Yilmaz B, Kadioğlu Y. Development and validation of HPLC method for determination of human insulin in pharmaceutical preparation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 2010;2:40-4.
46. Munsick C, Murray R, Dziubla T, Lowman AM, Joseph JI, Torjman MC. Quantitation of humalog insulin by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Diabetes Science and Technology* 2007;1:603-7.

47. Jose S, Fanguiero JF, Smitha J, Cinu TA, Chacko AJ, Premaletha K et al. Cross-linked chitosan microspheres for oral delivery of insulin: Taguchi design and in vivo testing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2012;92:175-9.
48. Pillail CKS, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 2009;34:641-78.
49. Giovino C, Aytensu I, Tetteh J, Boateng JS. Development and characterisation of chitosan films impregnated with insulin loaded PEG-b-PLA nanoparticles(NPs): A potential approach for buccal delivery of macromolecules. *International Journal of Pharmaceutics* 2012;428:143-51.
50. Watnasirichaikul S, Rades T, Tucker IG, Davies NM. In-vitro release and oral bioactivity of insulin in diabetic rats using nanocapsules dispersed in biocompatible microemulsion. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2001;54:473-80.
51. Li X, Qi J, Xie Y, Zhang X, Hu S, Xu Y et al. Nanoemulsions coated with alginate/chitosan as oral insulin delivery systems: preparation, characterization and hypoglycemic effect in rats. *International Journal of Nanomedicine* 2013;8:23-32.
52. Elsayed A, Al-Rimawi M, Maghrabi I, Hamaidi M, Jaber N. Development of insulin loaded mesoporous silica injectable particles layered by chitosan as a controlled release delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* 2014;461:448-55.
53. Li X, Qi J, Xie Y, Zhang X, Hu S, Xu Y, Wu W. Nanoemulsions coated with alginate/chitosan as oral insulin delivery systems. Preparation, characterization, and hypoglycemic effect in rats. *International Journal of Nanomedicine* 2013;8:23-7.

54. AbuHeshmeh N, Sallam A, Mater Y, Alawi M. A new method for determination of human insulin in aqueous injections. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2013;4:429-34.
55. Reix N, Parat A, Seyfritz E, Van Der Werf R, Epure V, Ebel N et al. In vitro uptake evaluation in Caco-2 cells and in vivo results in diabetic rats of insulin-loaded PLGA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2012;437:213-20.
56. Ho RJY, Gibaldi M. *Biotechnology and biopharmaceuticals-transforming proteins and genes into drugs*. Seattle, Washington : Wiley-Liss; 2003.
57. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*. 2005.
58. Fàbregasa A, Miñarro M, García-Montoya M, Pérez-Lozano P, Carrillo C. Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2013;446:199-204.
59. Martins AF, Oliveira DM, Pereira AGB, Rubira AF, Muniz AC. Chitosan/TPP microparticles obtained by microemulsion method applied in controlled release of heparin. *International Journal of Biological Macromolecules* 2012;51:1127-33.

EGE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2014-048
KONU: Onay

28.05.2014

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda **“ORAL UYGULAMA AMACIYLA İNSULİN TAŞIYICI SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI KARAKTERİZASYONU VE SALIM ÇALIŞMALARI”** isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: Prof. Dr. A. Gülten KANTARCI, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Araş. Gör. Gülşah EREL, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Proje, başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Rasih YILMAZ
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)

Prof. Dr. Gülcihan Mehtap KÖKSAL *Kohlma*

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL *Kohlma*

Prof. Dr. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK *Lokman*

Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN

Prof. Dr. Figen KIRKPINAR *Figen*

Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Sumru SÖZER KARADAĞLI *AS*

Özcan NALBANTOĞLU *Özcan*

Tingiz ÖZCAN *Tingiz*

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında İzmir’de doğdum. İlköğrenimimi İzmir Özel Tevfik Fikret İlköğretim Okulunda tamamladım. 2006 yılında Bornova Anadolu Lisesi Fransızca bölümünden mezun oldum. Aynı yıl, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde okumaya hak kazandım. Bir yıl boyunca Ege Üniversitesi Yabancı Diller Meslek Yüksekokulunda İngilizce eğitimi aldım. 2007 yılında Eczacılık Lisans eğitimime başladım. 2008-2009 öğrenim yılının bir dönemimi Erasmus programı dahilinde Paris-Sud Üniversitesinde geçirdim. 2012 yılında bitirme tezimi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalında “Manyetik Nanopartikül Yoluyla DNA Aktarımı” konusunda sunarak eczacılık lisans diploması almaya hak kazandım. Ardından Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım. Aynı yıl Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı kapsamında İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalına araştırma görevlisi olarak atandım. Çalışmalarına Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalında devam etmekteyim.