



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ORAL İNSÜLİN VERİLİŞİ İÇİN POLİMERİK
NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Büşra ARPAÇ

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK BİYOTEKNOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Burcu DEVRİM

ANKARA

2019

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ORAL İNSÜLİN VERİLİŞİ İÇİN POLİMERİK
NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Büşra ARPAÇ

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK BİYOTEKNOLOJİ PROGRAMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Burcu DEVRİM

Bu Araştırma TÜBİTAK 3001 projeleri kapsamında 117S586 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
2019

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Oral İnsülin Verilişi İçin Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan hazırlanmıştır. Tezimin hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Büşra Arpaç

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında

Büşra ARPAÇ tarafından hazırlanan “Oral İnsülin Verilişi İçin Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEKLİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

28.08.2019

Prof.Dr.Nurten ÖZDEMİR
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. İmran VURAL
Hacettepe Üniversitesi

Doç. Dr. Burcu DEVRİM
Ankara Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Mehmet AKAN

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul Ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler Ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Diyabetes Mellitus	1
1.1.1. DM'nin Tanı Kriterleri	2
1.1.2. DM'nin Sınıflandırılması	3
1.1.2.1. Tip 1 DM	3
1.1.2.2. Tip 2 DM	3
1.1.2.3. Gestasyonel DM	4
1.1.2.4. Diğer Nedenlere Bağlı Özel DM Tipleri	4
1.1.3. Tip 1 ve Tip 2 DM için Tedavi Yolları	5
1.1.3.1. Farmakolojik Olmayan Tedavi	5
1.1.3.2. Farmakolojik Tedavi	6
1.2. İnsülin	8
1.2.1. İnsülinin Fizikokimyasal Özellikleri	8
1.2.2. İnsülin Tipleri	10
1.2.3. İnsülinin Etki Mekanizması	11
1.2.4. İnsülin Uygulama Yolları	13
1.2.4.1. Parenteral Yol	14
1.2.4.2. Transdermal Yol	15
1.2.4.3. Pulmoner Yol	16
1.2.4.4. İntranazal Yol	17
1.2.4.5. Oküler Yol	18
1.2.4.6. Vajinal Yol	18
1.2.4.7. Rektal Yol	19
1.2.4.8. Oral Yol	20
1.3. Nanopartiküler Sistemler	24
1.3.1. Nanopartiküllerin Avantajları ve Dezavantajları	29
1.3.2. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	29
1.4. Polielektrolit Kompleksleri	31
1.4.1. Polielektrolit Komplekslerinin Avantajları	32
1.4.2. Polielektrolit Komplekslerin Hazırlanma Yöntemleri	33
1.4.2.1. Layer-by-layer Tekniği	34
1.4.2.2. Jet Karıştırma Tekniği	34
1.4.2.3. İyonotropik Jelasyon Tekniği	34
1.4.2.4. İyonik Çapraz Bağlama Yöntemi (Polielektrolit Titrasyonu)	35
1.4.3. Polielektrolit Komplekslerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler	35
1.4.3.1. Doğal Polimerler Arasında Oluşturulan Polielektrolit Kompleksleri	35

1.4.3.2. Doğal ve Sentetik Polimerler Arasında Oluşturulan Polielektrolit Kompleksleri	37
1.4.3.3. Sentetik Polimerler Arasında Oluşturulan Polielektrolit Kompleksleri	38
1.4.3.4. Polielektrolit ve Sürfaktanlar Arasında Oluşturulan Polielektrolit Kompleksleri	38
1.4.3.5. Protein-Polielektrolit Arasında Oluşturulan Polielektrolit Kompleksleri	39
1.4.4. Protamin	41
1.4.4.1. Protamin Hakkında Genel Bilgiler	41
1.4.4.2. Protamin Esaslı Partiküler Sistemler	42
1.4.4.3. Protaminin İnsülin Formülasyonlarında Kullanımı	43
1.4.5. Sodyum Aljinat	44
1.4.5.1. Sodyum Aljinat Hakkında Genel Bilgiler	44
1.4.5.2. Sodyum Aljinatın Etkin Madde Verilişinde Kullanımı	45
1.4.6. Kondroitin Sülfat	47
1.4.6.1. Kondroitin Sülfat Hakkında Genel Bilgiler	47
1.4.6.2. Kondroitin Sülfatın Etkin Madde Verilişinde Kullanımı	48
1.5. Deney Tasarımı ve Taguchi Metodu	49
2. GEREÇ VE YÖNTEM	53
2.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Materyaller	53
2.1.1. Kullanılan Biyolojik ve Kimyasal Maddeler	53
2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	54
2.1.3. Kullanılan Deney Hayvanları	55
2.1.4. Çalışmalarda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	55
2.2. Yöntemler	58
2.2.1. Mikrobikininik Asit (MikroBCA) Analiz Yöntemi Kullanılarak Etkin Maddenin Standart Doğru Denklemine Hazırlanması	58
2.2.2. MikroBCA Analiz Yönteminin Validasyonu	59
2.2.2.1. Doğrusallık ve Aralığı	59
2.2.2.2. Doğruluk ve Geri Elde	60
2.2.2.3. Kesinlik	60
2.2.2.4. Teşhis ve Tayin Sınırları	61
2.2.2.5. Seçicilik	62
2.2.3. Nanopartiküllerin Hazırlanması	63
2.2.4. Çalışılan Nanopartikül Formülasyonları	64
2.2.5. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu	67
2.2.5.1. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Yüzey Yüklerinin Belirlenmesi	67
2.2.5.2. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini	68
2.2.5.3. İmalat Verimi Tayini	69
2.2.5.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi	69
2.2.5.5. X-Işını Difraktometre (XRD) Analizi	69
2.2.5.6. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	69
2.2.5.7. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizi	70
2.2.5.8. Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) Analizi	70
2.2.5.9. Çözünme Hızı Tayini	70
2.2.5.10. Çözünme Hızı Verilerinin Kinetik Değerlendirilmesi	71
2.2.5.11. Native-PAGE Analizi	71

2.2.5.12. Sirküler Dikroizm (CD) Analizi	72
2.2.5.13. Nanopartiküllerin Stabilitelerinin Belirlenmesi	73
2.2.6. Nanopartikül İçeren Enterik Kaplı Kapsüllerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Optimizasyonu	73
2.2.7. In Vivo Çalışmalar	75
2.2.7. İstatistiksel Değerlendirme	77
3. BULGULAR	78
3.1. Etkin Maddenin MikroBCA Analiz Yöntemiyle Kalibrasyonuna Ait Bulgular	78
3.2. Etkin Maddenin MikroBCA Analiz Yöntemiyle Kalibrasyonunun Validasyonuna Ait Bulgular	79
3.2.1. Doğrusallık ve Aralığı	79
3.2.2. Doğruluk ve Geri Elde	83
3.2.3. Kesinlik	85
3.2.3.1. Tekrarlanabilirlik	85
3.2.3.2. Ara Kesinlik	86
3.2.4. Teşhis ve Tayin Sınırları	88
3.2.5. Seçicilik	89
3.3. Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular	89
3.3.1. Sodyum Aljinat ile Hazırlanan Formülasyonlara Ait Bulgular	89
3.3.2. Kondroitin Sülfat İle Hazırlanan Formülasyonlara Ait Bulgular	90
3.3.3. Taguchi Deney Tasarımı ile Hazırlanan Nanopartiküllere Ait Bulgular	91
3.3.4. Nanopartiküllere Ait İmalat Verimi Bulguları	92
3.3.5. İstatistiksel Analiz	93
3.3.6. Optimum Nanopartikül Formülasyonuna Ait Bulgular	97
3.3.7. FTIR Analizine Ait Bulgular	97
3.3.8. XRD Analizine Ait Bulgular	99
3.3.9. DSC Analizine Ait Bulgular	100
3.3.10. Nanopartiküllerin Morfolojik Özelliklerine Ait Bulgular	101
3.3.10.1. TEM Analizine Ait Bulgular	101
3.3.10.2. AFM Analizine Ait Bulgular	102
3.3.11. Çözünme Hızı	102
3.3.12. Çözünme Hızı Kinetikleri	103
3.3.13. Native-PAGE Analizine Ait Bulgular	104
3.3.14. CD Analizine Ait Bulgular	105
3.3.15. Nanopartiküllerin Stabilitelerinin Belirlenmesi	106
3.4. Nanopartikül İçeren Enterik Kaplı Sert Jelatin Kapsüllerin Karakterizasyonu	106
3.4.1. Enterik Kaplı Sert Jelatin Kapsüllerin Dağılıma Testi	106
3.4.2. Enterik Kaplı Sert Jelatin Kapsüllerin Çözünme Hızı Testi	107
3.5. In Vivo Çalışmalara Ait Bulguları	108
3.5.1. İnsülin İçeren Formülasyonlara Ait İn Vivo Bulgular	108
3.5.2. Floresan İşaretli Formülasyonlara Ait İn Vivo Dağılım Bulguları	109
4. TARTIŞMA	110
4.1. Etkin Maddenin MikroBCA Analiz Yöntemiyle Kalibrasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi	111
4.1.1. Etkin Maddenin Çeşitli Ortamlardaki MikroBCA ile Analizi	111
4.1.2. Etkin Maddenin MikroBCA Analiz Yöntemi ile Kalibrasyonunun	

Validasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi	111
4.1.2.1. Doğrusallık ve Aralığı	112
4.1.2.2. Doğruluk ve Geri Elde	112
4.1.2.3. Kesinlik	112
4.1.2.4. Teşhis ve Tayin Sınırları	113
4.1.2.5. Seçicilik	113
4.2. Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	115
4.2.1. Formülasyon Geliştirme Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	115
4.2.1.1. Sodyum Aljinat ve Protamin ile Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonları	115
4.2.1.2. Kondroitin Sülfat ve Protamin ile Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonları	117
4.2.2. Taguchi Deney Tasarımı Kullanılarak Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonları	118
4.2.3. Nanopartiküllere Ait İmalat Verimi Bulgularının Değerlendirilmesi	119
4.2.4. İstatistiksel Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi	120
4.2.5. Optimum Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	122
4.2.6. FTIR Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	123
4.2.7. XRD Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	123
4.2.8. DSC Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	124
4.2.9. Nanopartiküllerin Morfolojik Özelliklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	125
4.2.10. Çözünme Hızı Verilerinin Değerlendirilmesi	125
4.2.11. Native-PAGE Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	126
4.2.12. CD Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	127
4.2.13. Nanopartiküllerin Stabilitelerinin Değerlendirilmesi	127
4.3. Enterik Kaplı Kapsüller Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi	128
4.4. İn Vivo Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi	129
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	132
ÖZET	134
SUMMARY	135
KAYNAKLAR	136
EKLER	160
Ek-1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı	160
ÖZGEÇMİŞ	162

ÖNSÖZ

Bu çalışmada Tip-1 Diabetes Mellitus tedavisi için oral yolla uygulanmak üzere iyonik çapraz bağlama yöntemi kullanılarak insülin yüklü polimerik nanopartiküller üretilmiş ve gastrik yıkımdan korumak amacıyla sert jelatin kapsüllere yerleştirilerek enterik olarak kaplanmıştır ve bu sistem değerlendirilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince zamanını, bilgisini, desteğini ve güler yüzünü esirgemeyen canım öğretmenim ve danışmanım Doç. Dr. Burcu DEVRİM'e,

Proje danışmanımız ve Farmasötik Biyoteknoloji programı sorumlusu saygıdeğer hocam Prof. Dr. Asuman BOZKIR'a, ders ve tez dönemlerimde gösterdiği destek, rehberliği ve sağladığı tüm laboratuvar imkanları için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmama başladığım günden itibaren karşılaştığım her zorlukta yanımda olan ve yön gösteren sevgili öğretmenim Dr. Ecz. Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN'e,

Yüksek lisans tez çalışmamı 117S586 no'lu araştırma projesi kapsamında destekleyen TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı'na çok teşekkür ederim.

Çalışma süreci boyunca sağladıkları imkandan dolayı Farmasötik Teknoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Nurten ÖZDEMİR'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL'e, Prof. Dr. Ayşegül KARATAŞ'a, Prof. Dr. Tansel ÇOMOĞLU'na, Prof. Dr. Canan HASÇİÇEK'e, Doç. Dr. Müge KILIÇARSLAN'a, Doç. Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL TÜRK'e, Doç. Dr. Ulya BADILLI'ya, Doç. Dr. Zerrin BAYINDIR'a, Dr. Öğr. Üyesi Özge İNAL'a, Dr. Öğr. Üyesi Ongun Mehmet SAKA'ya teşekkür ederim.

İn vivo çalışmalar sırasında emeğini ve desteğini esirgemeyen Dr.Öğr.Üyesi Işıl ÖZAKÇAY'a ve Native-PAGE çalışmalarındaki yardımları için Merve DEMİR BÜĞEN-ÖZ'e,

Laboratuvarında geçirdiğim süre boyunca güleryüzlerini ve hoşsohbetlerini esirgemeyen Dr. Ecz. Umut Can ÖZ'e, Dr.Ecz Gülin AMASYA'ya, Dr.Ecz. Aslıhan Hilal ALGAN'a, Dr. Ecz. Ahmet Doğan ERGİN'e, Dr. Ecz. Tuğba EREN BÖNCÜ'ye, Uzm. Ecz. Rüya TOPAL'a, Ecz. Miray İLHAN'a, Ecz. Özge GÜN EŞİM'e, Ecz. Sema ARISOY'a,

Yükseklisans eğitimim boyunca yanımda olarak manevi desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen çok sevgili ev arkadaşlarım Gülşen Tuğçe AYTEKİN ve Esra TOPAL'a,

Hayatım boyunca yanımda olan sevgilerini ve desteklerini her an hissettiğim annem Hacer ARPAÇ'a, babam Erdoğan ARPAÇ'a ve abim Ömer Can ARPAÇ'a her şey için çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%BSS	%Bağıl Standart Sapma
%EE	% Enkapsülasyon Etkinliği
%YE	% Yükleme Etkinliği
ADA	Amerikan Diyabet Derneği (American Diabetes Association)
DLS	Dinamik Işık Saçılımı (Dynamic Light Scattering)
CD	Sirküler Dikroizm (Circular Dichroism)
CPP	Penetrasyon Arttırıcı Peptit (Cell Penetrating Peptide)
DM	Diyabetes Mellitus
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (Differential Scanning Calorimetry)
EMA	Avrupa İlaç Ajansı (European Medicine Agency)
FDA	Amerikan İlaç ve Gıda Kurumu
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography)
LOD	Teşhis Sınırları (Limit of Detection)
LOQ	Tayin Sınırları (Limit of Quantification)
MA	Molekül Ağırlığı
MikroBCA	Mikro Bikinkoninik Asit
PDI	Polidispersite İndeksi
PEG	Polietilen Glikol
r^2	Determinasyon Katsayısı
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
XRD	X Işını Difraktometrisi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	İnsan insülin geninin transkripsiyonu, translasyonu ve preproinsülin yapısından insülin oluşum süreci	9
Şekil 1.2.	İnsülinin yapısı	10
Şekil 1.3.	İnsülinin uygulama yolları	13
Şekil 1.4.	Oral yolla etkin madde verilisinde karşılaşılan fiziksel bariyerler	21
Şekil 1.5.	Polielektrolit kompleks oluşum aşamaları	33
Şekil 1.6.	Sürfaktan ve polielektrolit kompleksleşmesi sonucu oluşabilecek muhtemel yapılar.	39
Şekil 1.7.	Aljinatın yapısındaki G-bloğu, M-bloğu ve aljinik asidin yapısı ve ardışık bloğun kimyasal yapısı	44
Şekil 1.8.	Kondroitin sülfatın kimyasal yapısı	47
Şekil 1.9.	Taguchi metodunun üretim sürecinde kullanımı	51
Şekil 2.1.	Nanopartikül hazırlanışının şematik olarak gösterimi	63
Şekil 2.2.	Ishikawa diyagramı	65
Şekil 2.3.	Kapsüllerin doldurulmasının şematik olarak gösterimi	74
Şekil 2.4.	Oral dozlama enjektörünün kullanımı	76
Şekil 3.1.	İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisindeki kalibrasyon grafiği	78
Şekil 3.2.	İnsülinin pH 4,0 asetat tamponundaki kalibrasyon grafiği	78
Şekil 3.3.	İnsülinin %0,01 (a/h) SDS içeren pH 6.8 fosfat tamponundaki kalibrasyon grafiği	79
Şekil 3.4.	İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi için doğrusallık grafiği	80
Şekil 3.5.	İnsülinin pH 4,0 asetat tamponu için doğrusallık grafiği	81
Şekil 3.6.	İnsülinin % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponu için doğrusallık grafiği.	82
Şekil 3.7.	Üretim parametrelerinin (A:sodyum aljinat konsantrasyonu, B:sodyum aljinat:protamin oranı, C:insülin miktarı) nanopartiküllerin partikül büyüklüğü üzerine etkisi	94
Şekil 3.8.	Üretim parametrelerinin (A:sodyum aljinat konsantrasyonu, B:sodyum aljinat:protamin oranı, C:insülin miktarı) nanopartiküllerin PDI değeri üzerine etkisi	95

Şekil 3.9.	Üretim parametrelerinin (A:sodyum aljinat konsantrasyonu, B:sodyum aljinat:protamin oranı, C:insülin miktarı) nanopartiküllerin zeta potansiyeli üzerine etkisi	95
Şekil 3.10.	Üretim parametrelerinin (A:sodyum aljinat konsantrasyonu, B:sodyum aljinat:protamin oranı, C:insülin miktarı) nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi	96
Şekil 3.11.	Üretim parametrelerinin nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi	96
Şekil 3.12.	İnsüline (A), sodyum aljinata (B), protamine (C) ve optimum nanopartikül formülasyonuna (D) ait FTIR spektrumları	97
Şekil 3.13.	İnsüline (A), sodyum aljinata (B), protamine (C) ve insülin yüklü polielektrolit kompleks nanopartiküllerine (D) ait XRD spektrumları	99
Şekil 3.14.	İnsüline, sodyum aljinata, protamine ve optimum nanopartikül formülasyonuna ait DSC termogramları	101
Şekil 3.15.	İnsülin yüklü polielektrolit kompleks nanopartiküllerine ait TEM görüntüsü	101
Şekil 3.16.	İnsülin yüklü polielektrolit kompleks nanopartiküllerine ait AFM görüntüsü	102
Şekil 3.17.	Optimum nanopartikül formülasyonuna ait çözünme hızı grafiği	103
Şekil 3.18.	İnsülinin Native-PAGE ile elektroforetik analiz sonuçları.	105
Şekil 3.19.	İnsülin çözeltisine ve nanopartiküllerden salınan insüline ait CD spektrumları	105
Şekil 3.20.	Eudragit L100-55 ile kaplanmış sert jelatin kapsüllerin A) başlangıç, B) 2 saat sonraki görüntüsü	107
Şekil 3.21.	Eudragit L100-55 ile kaplanmış sert jelatin kapsüllere ait çözünme hızı grafiği	107
Şekil 3.22.	İn vivo çalışma gruplarında 0-8 saat arasında elde edilen kan glukoz düzeylerindeki % değişimi gösteren grafik	109
Şekil 3.23.	Floresan işaretli polielektrolit kompleks nanopartiküllerinin gastrointestinal kanaldaki in vivo dağılımı	109

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	DM ve glukoz metabolizmasının diğer bozukluklarında tanı kriterleri	2
Çizelge 1.2.	Oral antidiyabetik etkin maddelerin sınıflandırılması ve etki mekanizmaları	7
Çizelge 1.3.	İnsülin tipleri ve etki profilleri	11
Çizelge 1.4.	Etkin madde verilışı ve tanı/teşhis amacıyla kullanılan nano boyutlu sistemler ve genel özellikleri	25
Çizelge 1.5.	Doğal polimer yapılı polielektrolit kompleksleri ve uygulamaları	36
Çizelge 1.6.	Doğal-sentetik polimer yapılı polielektrolit kompleksleri ve uygulamaları	37
Çizelge 1.7.	Polielektrolit kompleksleşmesi için kullanılan sentetik polianyon ve polikasyonlar	38
Çizelge 2.1.	Farklı konsantrasyonlarda sodyum aljinat ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları	64
Çizelge 2.2.	Kondroitin sülfat içeren nanopartikül formülasyonları	65
Çizelge 2.3.	Taguchi deney tasarımına ait faktörler ve seviyeleri	66
Çizelge 2.4.	İnsülin içeren nanopartikül formülasyonlarının bileşimleri	67
Çizelge 3.1.	İnsülinin mikroBCA ile elde edilen kalibrasyon doğrularına ait parametreler.	79
Çizelge 3.2.	İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi içindeki miktar tayini yöntemine ait doğrusallık parametreleri	80
Çizelge 3.3.	İnsülinin pH 4,0 asetat tamponu içindeki miktar tayini yöntemine ait doğrusallık parametreleri	81
Çizelge 3.4.	İnsülinin % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponu içindeki miktar tayini yöntemine ait doğrusallık parametreleri	82
Çizelge 3.5.	% 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi için elde edilen doğruluk ve geri elde bulguları	83
Çizelge 3.6.	pH 4,0 asetat tamponu için elde edilen doğruluk ve geri elde bulguları	84
Çizelge 3.7.	% 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponu için elde edilen doğruluk ve geri elde bulguları	84

Çizelge 3.8.	İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl tamponundaki tekrarlanabilirlik bulguları	85
Çizelge 3.9.	İnsülinin pH 4,0 asetat tamponundaki tekrarlanabilirlik bulguları	86
Çizelge 3.10.	İnsülinin % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponundaki tekrarlanabilirlik bulguları	86
Çizelge 3.11.	% 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi için elde edilen ara kesinlik bulguları	87
Çizelge 3.12.	pH 4,0 asetat tamponu için elde edilen ara kesinlik bulguları	87
Çizelge 3.13.	% 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponu için elde edilen ara kesinlik bulguları	88
Çizelge 3.14.	MikroBCA yöntemi ile belirlenen teşhis (LOD) ve tayin (LOQ) sınırı bulguları	88
Çizelge 3.15.	Farklı konsantrasyonlarda sodyum aljinat ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve %EE bulguları	90
Çizelge 3.16.	Kondroitin sülfat ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve %EE bulguları	90
Çizelge 3.17.	Taguchi deney tasarımına göre hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği bulguları	91
Çizelge 3.18.	İnsülin içeren nanopartikül formülasyonlarına ait imalat verimi bulguları	93
Çizelge 3.19.	Optimum nanopartikül formülasyona ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği değerleri	97
Çizelge 3.20.	Optimum nanopartikül formülasyonuna ait in vitro salım kinetikleri	104
Çizelge 3.21.	+4°C ve +25°C'de bekletilen nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli değerleri	106
Çizelge 3.22.	Belirli zaman aralıklarında ölçülen plazma glukoz düzeyleri	108

1. GİRİŞ

1.1. Diyabetes Mellitus

Diyabetes mellitus (DM), pankreasta yer alan beta hücrelerinden insülin hormonunun yetersiz olarak salgılanması ya da periferik etkisizliği sonucu ortaya çıkan ve yağ, protein ve karbonhidrat metabolizmasında bozukluk, kronik hiperglisemi, kapiller membran değişiklikleri ve hızlanmış ateroskleroz ile seyreden, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlara sebep olan metabolik bir hastalıktır. Hastalık sırasında ortaya çıkabilecek akut komplikasyonları önlemek ve kronik komplikasyonları azaltmak için sürekli destek, tıbbi bakım ve diyabetlinin öz bakımını gerektiren, sağlık bakımının sağlanması gerekmektedir (Olgun ve ark., 2011).

DM, yüksek görülme sıklığı ve sekonder etkileri nedeniyle yılda yaklaşık üç milyon insanın ölümüne sebep olmaktadır. Tip 1 DM ortalama yaşam süresinin 20 yıldan daha fazla azalmasına sebep olurken tip 2 DM için bu süre yaklaşık 10 yıldır (Fonte ve ark., 2015). Diyabetin görülme sıklığı yaşlanma ve yaşam tarzındaki hızlı değişimle birlikte artış göstermiştir ve gelişmekte olan toplumların tümünde hızla yükselmektedir. Uluslararası Diyabet Fedarasyonu'nun (IDF) verilerine göre 2015 yılında diyabetli birey sayısı 415 milyon ve görülme sıklığı % 8,8 iken bu sayının 2040 yılında 642 milyon ve görülme sıklığının %10,4 civarında olacağı öngörülmektedir. Nüfusun hızla arttığı ve yaşlı nüfusa sahip toplumlarda ise bu oranın daha yüksek olacağı tahmin edilmektedir. Bu toplumlarda, hastalık ve özellikle komplikasyonlarının tedavi maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle sağlık harcamalarının artacağı, üretkenliğin azalacağı ve bu durumun ülke ekonomilerine olumsuz etki edeceği öngörülmektedir. Dünya genelinde diyabetlilerin %30-50'sinin henüz tanı konulmamış vakalar oldukları düşünülmektedir. Diyabetin kişiye ve topluma yükünü azaltmak için hastalığın olabildiğince erken dönemde tanınması ve uygun tedaviye başlanması şarttır (Satman, 2007).

1.1.1. DM'nin Tanı Kriterleri

Amerika Diyabet Derneği (ADA) 1997 yılında DM için tanı ve sınıflama kriterlerini yayınlamış, ardından 1999 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yayınlanan tanı kriterlerini küçük revizyonlarla kabul etmiştir. 2003 yılında ADA, bozulmuş açlık glisemisi (IFG) tanımını ekleyerek DM tanımında revizyona gitmiştir. Günümüzde DM tanımlaması için geçerli olan bu düzenlemedir. DM için tanı kriterleri Çizelge 1.1'de gösterilmiştir (Dinççağ, 2011).

Çizelge 1.1. DM ve glukoz metabolizmasının diğer bozukluklarında tanı kriterleri*

	Aşık DM (mg/dl)	İzole IFG** (mg/dl)	İzole IGT (mg/dl)	IFG+IGT	DM riski yüksek
APG (≥ 8 saat açlıkta)	≥ 126	100-125	< 100	100-125	-
OGTT 2. st PG (75 g glukoz ile)	≥ 200	< 140	140-199	140-199	-
Rastgele PG	≥ 200 + Diyabet semptomlar ¹	-	-	-	-
A1C***	≥ %6.5 (≥ 48 mmol/mol)	-	-	-	%5.7-6.4

*Glisemi venöz plazmada glukoz oksidaz yöntemiyle mg/dl olarak ölçülür.

**2006 yılı WHO/IDF raporunda normal APG kesim noktasının 110 mg/dl ve IFG: 110-125 mg/dl olarak korunması benimsenmiştir.

***Standardize yöntemlerle ölçülmelidir.

DM: Diabetes Mellitus, APG: Açlık plazma glukozu, 2. St PG: İkinci saat tokluk plazma glukozu, OGTT: Oral glukoz tolerans testi, A1C: Glukozillenmiş hemoglobin A1C, IFG: Bozulmuş açlık glukozu (Impaired Fasting Glucose), IGT: Bozulmuş glukoz toleransı (Impaired Glucose Tolerance).

1.1.2. DM'nin Sınıflandırılması

DM dört sınıfa ayrılır:

1.1.2.1. Tip 1 DM

Tip 1 DM, diğerk adıyla otoimmün diyabet, pankreatik β hücrelerinin kaybı nedeniyle insülin yetersizliğinin ve hipergliseminin yaşandığı kronik bir hastalıktır. Semptomlar genellikle çocukluk ve gençlik çağında görülmeye başlasa da bazı hastalarda semptomlar daha geç de ortaya çıkabilir (Katsarau ve ark., 2017). Günümüzde dünya çapında 20 milyon insanın tip 1 DM'tan etkilendiğı ve vakaların % 40'ının 30 yaşından sonra ortaya çıktığı belirtilmektedir (Chetan ve ark., 2019).

Tip 1 DM etiyolojik kriterlere göre tip 1 A (otoimmün) ve tip 1 B (idiyopatik) olmak üzere 2 ana başlıkta incelenebilir. Hastalığın erken safhasında adacık antijenlerine karşı otoantikörlerin bulunması ve pankreatik β hücresi yıkımı otoimmün mekanizmaları içeren vakalar "otoimmün" tip 1 DM olarak adlandırılırken otoantikörlerin bulunmadığı insülin-bağımlı vakalar ise "idiyopatik" tip 1 DM olarak adlandırılır (Seino ve ark., 2010).

Tip1 DM'un tedavisi günümüzde mevcut değildir ve hastalar hayatları boyunca insülin enjeksiyonu yapmalıdır aksi takdirde insülin eksikliği hiperglisemi, ketoasidoz, açlık ve ölüme yol açabilir (Gregory ve ark., 2013).

1.1.2.2. Tip 2 DM

Tip 2 DM en yaygın görülen metabolizma hastalığıdır. Gelişmiş ülkelerde toplumun %5-10'u tip 2 DM'ludur. Tüm dünyada tanı konulan DM vakalarının %90-95'ini tip 2 DM oluşturmaktadır (Satman, 2007).

Tip 2 DM pankreas β hücre fonksiyonlarının ilerleyici kaybı ve kas, yağ ve karaciğerk gibi organlarda insüline direnç gelişmesi ile karakterize bir bozukluktur. Tip 2 DM'su olan hastalarda en sık ölüm nedeni kardiyovasküler hastalıklardır. Yıllar içinde yapılan çalışmalar hipergliseminin makrovasküler hastalık ve mortalite için önemli bir risk faktörü olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu nedenlerle tedavisinde

hastalığa bağlı gelişen mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonları önlemek amaçlanır (Eray ve Balcı, 2005).

1.1.2.3. Gestasyonel Diyabet

Gestasyonel DM (GDM) ilk defa gebelikle birlikte teşhis edilen glukoz tolerans bozukluğudur. GDM'nin zamanında teşhis edilmesi anne ve fetus sağlığının korunması açısından önem taşımaktadır. GDM'nin gebelerdeki tarama işlemi için ideal dönem gebeliğin 24-28. haftalarıdır ancak diyabet şüphesi uyandıran önemli semptom ve bulguların görüldüğü durumlarda ilk prenatal vizitede tarama yapılabilir. Glukoz tolerans testi, tarama için en sık kullanılan yöntemdir. Bu testte 50 g glukoz oral olarak uygulanmaktadır. Yükleme sonrası 1. saat glukoz düzeyini 130 mg/dl almak testin duyarlılığını arttırmaktadır. Taramada pozitif çıkan olgulara günümüzde sıklıkla 100 g glukoz tolerans testi uygulanmaktadır. 100 g glukoz yüklemesi sırasında; açlık >95 mg/dl, birinci saat >180 mg/dl, ikinci saat >155 mg/dl, üçüncü saat >140 mg/dl serum glukoz koşullarından iki veya daha fazlasının sağlanması durumunda GDM tanısı konabilir (Sönmez ve Kutlu, 2010).

1.1.2.4. Diğer Nedenlere Bağlı Özel DM Tipleri

Diğer nedenlerden kaynaklanan diyabet tipleri şu şekilde sınıflandırılabilir (Uçkun ve Çalikoğlu, 2003);

- β -hücresi işlevindeki genetik defektler (Ör; MODY)
- İnsülin etkisinde genetik defektler (lipoatrofik DM)
- Ekzokrin pankreas hastalıkları (Ör; kistik fibrozis)
- Endokrinopatiler (Ör; Cushing sendromu)
- İlaç ya da kimyasal nedenli (Ör; glukokortikoidler)

- Enfeksiyonlar (Ör; rubella)
- Sık görülmeyen immün kökenli DM tipleri
- Bazen DM ile diğer genetik sendromlar

1.1.3. Tip 1 ve Tip 2 DM için Tedavi Yolları

DM tedavisindeki amaç; hastanın günlük yaşamında glisemik kontrolünün sağlanarak akut komplikasyon gelişim riskinin en alt seviyeye çekilmesi, mikrovasküler ve makrovasküler kronik komplikasyonların önlenmesi, eşlik eden diğer sorunların düzeltilmesi ve böylelikle yaşam kalitesinin iyileştirilmesidir. Etkin bir tedavi sağlamanın ön şartı ise hastalığı doğru tanıma ve sınıflandırmadır (Dinççağ, 2011).

1.1.3.1. Farmakolojik Olmayan Tedavi

DM'lu hastalar yaşamları boyunca kan şekerini kontrol altında tutabilmek için beslenme alışkanlıklarını ve yaşam tarzlarını hastalığa uygun olarak düzenlemek zorundadır. Hastalığın doğası gereği, uyulması gereken diyet listeleri, yasaklanan yiyecekler ve kronik bir hastalık olması gibi etkenler hastalarda anksiyeteye neden olmakta, zihinsel meşguliyetin yiyecekler ve kilo kontrolüne odaklanmasına yol açmaktadır. Tüm bu nedenlerle hastaların yeme tutum ve davranışlarında bozulmalar görülmektedir (Çobanoğlu ve ark., 2008).

Tip 1 DM'a sahip hastalarda sağlıklı vücut ağırlığının sağlanması ve korunması için insülin uygulamasının dengeli beslenme ile beraber sürdürülmesine odaklanılmıştır. Tip 2 DM'a sahip hastalarda ise kilo kaybını sağlamak için kalori alımının kısıtlanması gerekmektedir. Aerobik egzersiz çoğu hastada insülin direncini ve glisemik kontrolü artırırken kardiyovasküler risk faktörlerini azaltıp kilo kaybını ya da kilonun korunmasını sağlar. Sedanter yaşam tarzına sahip hastalarda egzersize yavaş tempoda başlanmalıdır. Aterosklerotik hastalığa sahip yaşlı hastalarda ise egzersize başlamadan kardiyovasküler değerlendirme yapılmalıdır (Well ve ark., 2014).

1.1.3.2. Farmakolojik Tedavi

DM'ta farmakolojik tedavi oral antidiyabetikler ve insülin ile sağlanır. Oral antidiyabetik ilaçlar, insüline bağımlı olmayan diyabetlilerde ve kan şekerleri sadece diyet değişikliğiyle kontrol edilemeyen hastalarda kullanılır. Oral antidiyabetik ilaçlarla en etkin tedavi DM'un 40 yaşından sonra geliştiği ve 5 yıldan kısa süreli DM'lu hastalardır. Daha uzun süredir DM'lu olanların kan şekeri kontrolünü sağlayabilmek için insülin ve oral antidiyabetik ilaçlar birlikte kullanılmalıdır. Oral antidiyabetik etkin maddeler ve etki mekanizmaları Çizelge 1.2'de verilmiştir. Oral antidiyabetik ilaçlar tip 1 DM'un tedavisinde kullanılmamaktadır (Çubuk ve İnce, 2015).

Çizelge 1.2. Oral antidiyabetik etkin maddelerin sınıflandırılması ve etki mekanizmaları (Lorenzati ve ark., 2010)

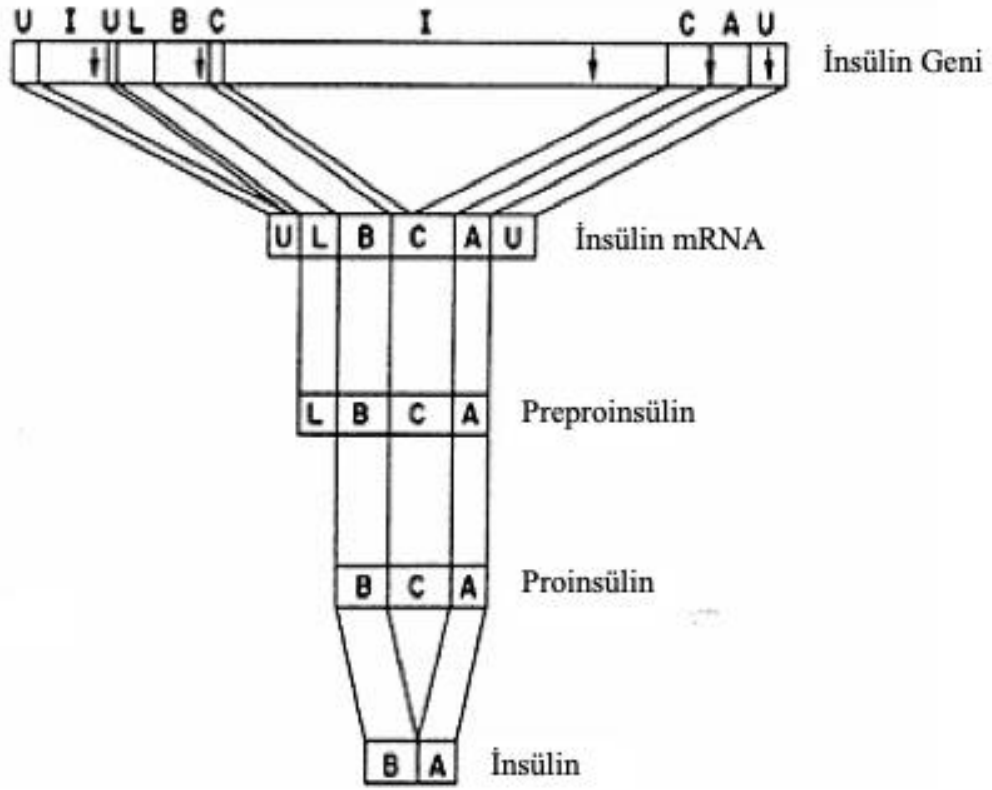
Etkin Madde Sınıfı	Etkin Madde	Etki Mekanizması
Biguanidinler	Metformin	Hepatik glukoz salgısını azaltarak insülin duyarlılığını arttırlar.
Sülfonilüreler	Asetoheksamit Klorpropamit Tolazamit Tolbutamit Glibenklamit/Gliburit Glipizit Glimepirit Gliklazit	Pankreasta yer alan β hücrelerinden insülin salımını uyarırlar.
Meglitinidler	Repaglinit Nateglinit	Pankreatik β hücrelerinde yer alan ATP-bağımlı potasyum kanallarını düzenleyerek insülin salımını arttırlar.
Tiazolidindionlar	Rosiglitazon Pioglitazon	Glukozun periferik dokularda alımını artırarak insülin direncini azaltırlar.
α -Glukozidaz İnhibitörleri	Akarboz Miglitol	İnce bağırsakta yer alan α -glukozidaz enzimini inhibe ederek glukoz absorpsiyonunu geciktirirler.
İnkretin Agonistleri	Eksanatit Liraglutit	İnkretin hormonları taklit ederek ve ya degradasyonlarını inhibe ederek pankreastaki adacıklardan insülin salımını arttırlar.
DPP-4 İnhibitörleri	Sitagliptin Vildagliptin Saksagliptin	Glukagon salımını inhibe ederek, β hücrelerini apoptoza karşı koruyarak ve insülin salımını uyararak etki gösterirler.

1.2. İnsülin

İnsülin 1921 yılında Banting ve Best tarafından Toronto Üniversitesi'nde keşfedilmiştir. İnsülinin keşfinden kısa süre sonra domuz ve sığır pankreasından ekstraksiyonu için üretim yöntemi geliştirilmiştir. 1921'den 1980'e kadarki süreçte insülinin saflığının artırılması ve farklı formülasyonlarla etki süresinin kontrollü hale getirilmesi için çalışılmıştır. Saflaştırma ekstraksiyon ve üretim şartlarının kromatografik yöntemler uygulanarak, genel safsızlıkların ve insüline bağlı safsızlıkların giderilmesine bağlı optimizasyonu ile ileri seviyeye taşınmıştır. Formülasyon geliştirme çalışmaları ise farklı seviyelerde çinko ve protamin kullanarak kimyasal modifikasyonların yapılması ve zaman-etki profilinin değiştirilmesine odaklanmıştır (Crommelin ve ark., 2013).

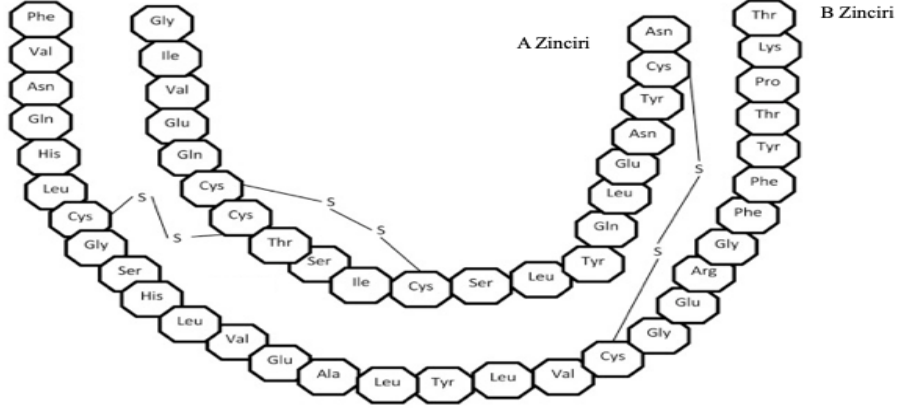
1.2.1. İnsülinin Fizikokimyasal Özellikleri

İnsan insülini granüllü endoplazmik retikulumda 110 amino asitten oluşan preproinsülin (12 kDa) olarak sentezlenir. İlk 24 amino asidin (sinyal peptidi) uzaklaştırılması sonucu proinsülin yapısı meydana gelir. Oluşan proinsülin golgi aygıtına taşınır. Taşınan proinsülinin aktif insülin ve C-peptide dönüşümü ise proinsülin konvertaz 1, proinsülin konvertaz 2 ve karboksipeptidaz H ile sağlanır (Matteuci ve ark., 2015; Weiss ve ark., 2014). İnsan insülin geninin transkripsiyonu, translasyonu ve preproinsülin yapısından insülin oluşum süreci Şekil 1.1'de verilmiştir.



Şekil 1.1. İnsan insülin geninin transkripsiyonu, translasyonu ve preproinsülin yapısından insülin oluşum süreci

İnsülin 51 amino asitten oluşan bir proteindir. Bu yapı iki polipeptit zincirinden meydana gelir ve zincirler A ve B zincirleri olarak adlandırılır. A zincirinde 21, B zincirinde 30 amino asit bulunur. A zincirinin 7. konumundaki aminoasitle B zincirinin 7. konumundaki amino asit arasında ve A zincirinin 20. konumundaki aminoasitle B zincirinin 19. konumundaki amino asit arasında disülfid bağları bulunur. Bu bağlar zincirler arası bağ olarak adlandırılır. Yapıdaki üçüncü disülfid bağı ise A zincirinin 6. konumundaki amino asiti ve 11. konumdaki amino asiti arasında yer alır. Bu bağ zincir içi disülfid bağı olarak adlandırılır (Crommelin ve ark., 2013).



Şekil 1.2. İnsülinin yapısı

İnsülinin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 5.8 kDa'dur. İzoelektrik noktası 5.3-5.4 arasındadır. İnsülin de çoğu protein gibi nötral pH'da stabildir. Gastrointestinal yolda asidik mideden ve bazik ince bağırsaktan geçen insülin büyük pH farklılıklarına maruz kalır. Degradasyon midede pepsinle başlar ve ince bağırsakta pankreatik enzimlerle devam eder. Sonuç olarak insülin fırçamsı yüzey membranında bulunan absorplayıcı hücrelerin sitoplazmasında bulunan peptidaz ile %92 oranında parçalanır (Damge ve ark., 2008).

1.2.2. İnsülin Tipleri

Subkutan olarak enjekte edilen çeşitli insülin türevleri ve farmakokinetik profilleri Çizelge 1.3'de verilmiştir (Wells ve ark., 2014).

Çizelge 1.3. İnsülin tipleri ve etki profilleri

İnsülin Türü	Etki Başlangıcı	Pik (Saat)	Etki süresi (Saat)	Maksimum Etki Süresi (Saat)	Görünüm
Hızlı Etkili İnsülin					
Aspart (Novolog)	15-30 dakika	1-2	3-5	5-6	Şeffaf
Lispro (Humalog)	15-30 dakika	1-2	3-4	4-6	Şeffaf
Glulisin (Apidra)	15-30 dakika	1-2	3-4	5-6	Şeffaf
Kısa Etkili İnsülin Regüler	30-60 dakika	2-3	3-6	6-8	Şeffaf
Orta Etkili İnsülin NPH	2-4 saat	4-6	8-12	14-18	Bulanık
Uzun Etkili İnsülin					
Glargine (Lantus)	4-5 saat	-	22-24	24	Şeffaf
Detemir (Levemir)	2 saat	6-9	14-24	24	Şeffaf

1.2.3. İnsülinin Etki Mekanizması

Tüketilen besinlerin intestinal absorpsiyonu sonucu kan glukozunda artış meydana gelir ve bu artış pankreastaki Langerhans adacıklarının β hücrelerinden insülin salımını uyarır (Hedekov, 1980). Salınan insülin etkisini spesifik reseptörlere bağlanarak gösterir. Hücre membranında yer alan bu reseptörler birbirine disülfid bağlarıyla bağlı 2 ekstraselüler α ve 2 transmembran β alt ünitelerinden oluşmaktadır.

İnsülinin α alt ünitesine bağlanması β alt ünitelerinin tirozin kinaz aktivitesini başlatır. Bunun sonucunda da fosforilasyon ve defosforilasyon yolları insülinin metabolik aktivitelere dahil olan enzimlerin stimülasyonunu ya da inhibisyonunu sağlar (Chouhan ve ark., 2017).

İnsülinin en önemli görevi kas ve yağ dokularında glukozun alımının artırılıp sonrasında dokunun enerji ihtiyacının karşılanması için glikojen ve trigliserit olarak depolanmasını sağlamaktır (Tokarz ve ark., 2018). İnsülinin kas ve yağ dokularına etkileri şu şekilde sayılabilir (Dimitriadis ve ark., 2011);

Karbonhidrat metabolizması:

- Kas ve yağ dokusundaki hücrelerin membranından glukoz geçişini artırır.
- Heksokinaz ve 6-fosfofruktokinaz aktivitesini aktive ederek kas ve yağ dokusunda glikoliz oranını artırır.
- Kas, yağ dokularında ve karaciğerde glikojen sentezini uyarırken kas dokusu ve karaciğerde glikojen yıkımını azaltır.

Lipit metabolizması:

- Yağ dokuda lipolizi azaltır ve böylece plazmadaki yağ asidi seviyesinde düşüş sağlar.
- Dokularda yağ asidi ve triaçilgliserol sentezini uyarır.
- Karaciğerde çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) oluşumunu artırır.
- Kandan yağ ve kas dokularına trigliserit geçişini artırır.
- Kaslarda ve karaciğerde yağ asidi oksidasyonu oranını düşürür.
- Karaciğerde kolesterol sentezi oranını artırır.

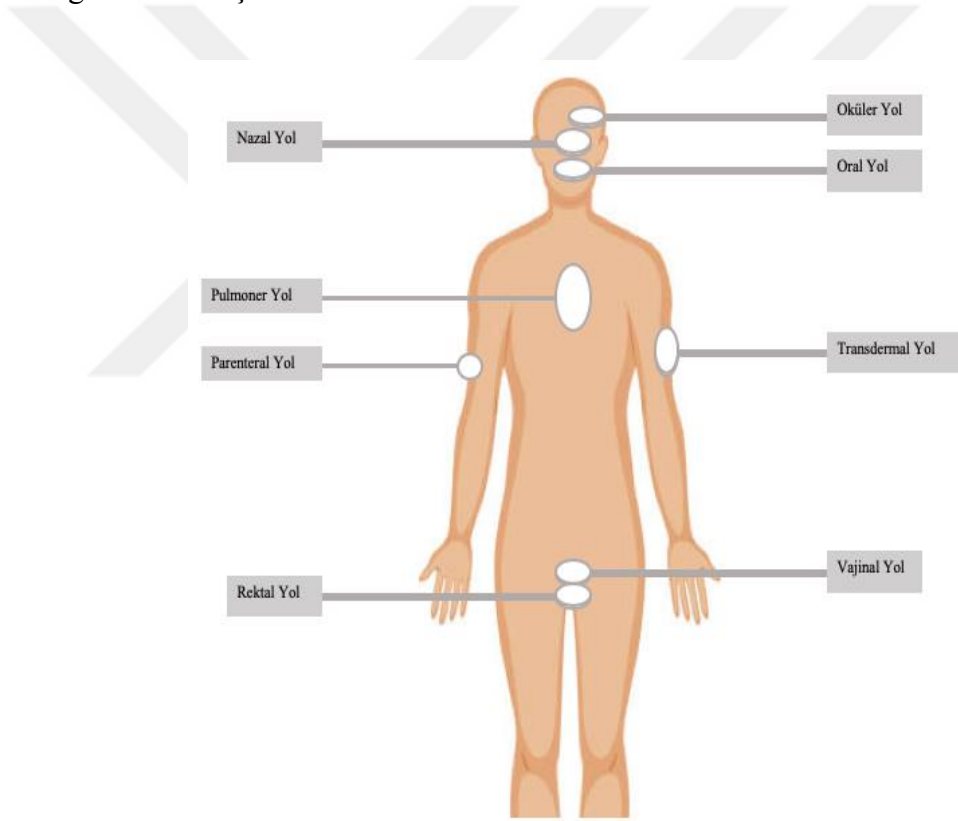
Protein metabolizması:

- Bazı aminoasitlerin dokulara geçişini artırır.
- Kas, yağ dokularında, karaciğerde ve diğer dokularda protein sentezi oranını artırır.
- Kaslarda protein yıkımını azaltır.

- Üre oluşum oranını artırır.
- İnsülin karbonhidrat, yağ ve protein sentezini uyardığı için anabolik bir hormon olarak kabul edilmektedir.

1.2.4. İnsülin Uygulama Yolları

İnsülin için başlıca uygulama yolu parenteral yoldur. Bununla birlikte oral, bukkal, rektal, oküler, transdermal, intravajinal, pulmoner ve nazal uygulama yolları insülin için alternatif uygulama yolu olarak araştırmacılar tarafından değerlendirilmiştir.



Şekil 1.3. İnsülinin uygulama yolları

1.2.4.1. Parenteral Yol

Tip 2 DM'li hastaların bir kısmı ve tip 1 DM'li hastaların tamamının kan glukoz seviyesini hedef aralıkta tutmak için insülin kullanımı gerekmektedir. Günümüzde intramusküler ve intravenöz uygulamanın kişinin profesyonel yardım almaksızın uygulamasına uygun olmaması sebebiyle en yaygın insülin veriliş yolu subkutan yoldur. Subkutan yol en çok kullanılan yol olmasına rağmen enjeksiyon bölgesinde ağrıya sebep olma, iğne korkusu, lipodistrofi ve periferik hiperinsülinemiye yol açma gibi dezavantajları vardır.

İnsülinin subkutan kullanımı için yıllar içinde çeşitli sistemler geliştirilmiştir. İnsülinin keşfinden 2 sene sonra Becton Dickinson (BD) firması tarafından cam ve metal şırıngalar üretilmiştir. Sonrasında bu şırıngaların tekrar tekrar kullanımından kaynaklanan enfeksiyonlar tek kullanımlık cam şırıngalar geliştirilmesini teşvik etmiştir (Shah ve ark., 2016). 1985 yılında Novo Nordisk firmasının NovoPen® adı verilen ilk insülin kalemini piyasaya sürmesi ile DM tedavisinde yeni bir dönem başlamıştır. Novapen®, insülin kartuşu, kısa bir iğne ve 'tıklama başına bir ünite' adı verilen bir sisteme sahiptir ve bu sistemi kısa bir süre sonra gerekli tam dozu ayarlayabilme özelliğine sahip NovoPen2® gibi insülin kalemleri takip etmiştir. Bu sistemler benzer temel özelliklere sahip olmakla beraber, iğnelerin keskinleştirilmesi ve kayganlaştırıcıyla kaplanması gibi uygulama kolaylığı sağlayan ekstra özelliklere de sahiptir (Fry, 2012). Kartuşlu kalemlerden sonra geliştirilen tek kullanımlık kalemler ve jet enjektörlerle insülin kullanımı daha pratik bir hale gelmiştir. Tek kullanımlık insülin kalemlerinde farklı olarak kartuş ve rezervuar yer almamaktadır. İnsülin kalemleri sadece kısa ve orta etkili insülinlere spesifik olarak kullanılmaktadır (Çakır, 2016). Kullanım kolaylığı sağlaması ve yüksek hasta uyuncuna sebep olması nedeniyle bu kalemler günümüzde en çok tercih edilen insülin enjeksiyon yöntemidir (Lijf ve DeVries, 2010).

1.2.4.2. Transdermal Yol

Deri yapı olarak epidermis, dermis ve subkutan yağ tabakalarından meydana gelmiştir. Bu tabakalar yabancı maddelere karşı fiziksel ve kimyasal bir bariyer vazifesi görmekle birlikte aktif bir immün organ gibi de fonksiyon gösterir (Matteucci ve ark., 2015). Peptit ve proteinlerin bu katmanlardan pasif olarak geçişi makromoleküler ve hidrofilik yapıları nedeniyle sağlanamamaktadır. Bu yüzden geçişi sağlamak için lipozomal taşıyıcı sistemlerin ve permeasyon artırıcı maddelerin kullanımı gibi formülasyonu geliştirmeye yönelik ve mikroporasyon, iyontofrez ve sonofrez gibi fiziksel uyaranların kullanımı gibi çeşitli teknikler üzerine çalışılmıştır (Herwadkar ve Banga, 2011).

Klasik lipozomların nano boyutta lipit yapıda taşıyıcılar olmaları nedeniyle epidermal bariyere penetre olarak etkin maddeler için rezervuar özelliği göstereceği düşünülmüştür. Ancak son yapılan çalışmalarda bu taşıyıcı sistemlerin stratum korneumun üst tabakalarında kaldığı ve epidermisin iç tabakalarına geçişte bir artış sağlamadığı gözlenmiştir (Hua, 2015). Kim ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2004) ise gen verilişi için kullanılan lipit yapıları daha yeni taşıyıcı sistemlerin in vivo uygulamada plazmid DNA'sının transfeksiyon etkinliğini arttırdığı gözlenmiştir. Elektrik akımı yardımıyla etkin maddeyi yüklü hale getirip deriden geçişini kolaylaştırmaya dayalı bir yöntem olan iyontofrez kullanılarak insülin, kalsitonin, siklosporin ve vazopressin gibi moleküllerin deriden geçişinin arttırıldığı gözlenmiştir (Herwadkar ve Banga, 2011). Başka bir çalışmada ise uygulanan akım şiddetinin ve süresinin uzatılmasıyla insülinin deriden geçiş oranında artış gözlemlendiği belirtilmiştir (Pillai ve ark., 2004). Derideki bariyerleri geçmek için mikroignelerin kullanıldığı Macroflux® teknolojisinin kullanılarak desmopressinin transdermal verilişini hedefleyerek yapılan bir çalışmada ise biyoyararlanımın %85 civarında olduğu, yamanın hayvan derisinde iyi tolere edildiği ve halihazırda kullanılan yöntemlere bir alternatif oluşturduğu belirtilmiştir (Cormier ve ark., 2004).

1.2.4.3. Pulmoner Yol

Etkin maddelerin sistemik verilifi için invazif olmayan yollardan biri olan pulmoner yola olan ilgi, bronş ve bronşiyollerin geniş yüzey alanına (~ 100 m²), çok ince emici mukozal membrana, yüksek damarlanmaya, düşük enzimatik aktiviteye sahip olması ve dolaşıma hızlı bir şekilde geçişi sağlaması nedeniyle günümüzde giderek artmaktadır (Huang ve Wang, 2006, Devrim ve ark., 2011). Yapılan çalışmalarda peptit ve proteinlerin diğ er non-invazif yollara göre akciğ erden daha fazla absorbe edildiğ i saptanmıştır. Örneğ in subkutan yola kıyasla insülin, akciğ erlerden %30 oranında absorbe edilirken bu oran oral, sublingual, nazal ve transdermal yolda %1 civarındadır (Koussoroplis ve Vanbever, 2013). Ancak diğ er verilif yollarında olduğu gibi pulmoner yolda da optimal etkin madde verilifini engelleyen mukosilyer klirens, makrofaj aktivitesi ve elastaz, kolajenaz, kimotripsin ve aminopeptidaz gibi enzimlerin aktivitesi gibi sınırlamalarla karşılaşılmaktadır (Kwok ve Chan, 2011).

Peptit ve proteinlerin pulmoner yolla verilifi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bunlara Huang ve Wang'ın (2006) pulmoner insülin verilifi için geliştirdiğ i kolesterol bazlı lipozomal sistemler örnek olarak gösterilebilir. Floresan işaretli lipozomların alveollerde homojen olarak dağıldığı, insülinin akciğ erde tutulum süresini arttırdığı ve kan glukoz seviyesinde 6 saate kadar azalmaya yol açtığı gözlenmiştir.

İnsülinin pulmoner yolla verilifi için 2006 yılında Pfizer firması tarafından kuru toz inhaler formülasyonu olan 'Exubera' piyasaya sürülmüş ancak uzun süreli kullanımda pulmoner fonksiyonlarda bozulma meydana getirmesi, inhaler cihazın tam anlamıyla uygulama kolaylığı sağlamaması ve üretim maliyetinin çok olması gibi sebeplerle 2007 yılında piyasadan çekilmiştir (Soares ve ark., 2012).

1.2.4.4. İntranazal Yol

Nazal kavite absorpsiyon için geniş bir yüzey alanına sahiptir ve nazal mukozanın yüksek vaskülaritesi, bileşiklerin hızlı bir şekilde absorbe edilmesini sağlar. Zengin kan damarlarıyla absorbe edilen etkin maddeler doğrudan sistemik dolaşıma geçer ve böylece hepato-gastrointestinal ilk geçiş etkisinden kaçınılmış olur. Ancak nazal kavitedeki mukosilyer klirens, etkin maddenin epitelden geçişini zorlaştıran mukus tabakası ve enzimatik degradasyon gibi kısıtlayıcı etkenlerle karşılaşılır (Hinchliffe ve Illum, 1999). Nazal mukozadan absorpsiyonun artırılması için formülasyonda penetrasyon arttırıcılar, proteolitik enzim inhibitörleri ve mukoadezif polimerlerin kullanımı ya da protein yapısında kimyasal modifikasyonların gerçekleştirilmesi gibi yaklaşımlarda bulunulmuştur (Özsoy ve ark., 2009).

Wang ve arkadaşlarının (2006) absorpsiyon arttırıcıların etkisini gözlemlemek için jelatin ve amine edilmiş jelatin kullanarak oluşturduğu insülin yüklü mikrokürelerle yapılan çalışmada, mikroküreler kuru toz ve fosfat tamponu içinde süspansiyon olarak ratlara nazal yoldan verilmiştir. Uygulamadan 60 dakika sonra kuru toz halinde verilen jelatin ve amine edilmiş jelatin mikrokürelerin sırayla plazma glukoz seviyesinde %9,3 ve 13,8 oranında düşüş sağladığı ve bu oranın mikroküre süspansiyonu için sadece %2,7 olduğu belirtilmiştir.

İntranazal yol sistemik etkinin yanısıra nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde de beyine etkin madde hedeflemede kullanılmaktadır. Floresan boyayla işaretlenmiş insülin çözeltisi ve poli(N-vinil piroolidon) bazlı nanojel formülasyonları ratlara intranazal yolla verilmiş ve nanojellerin beyinde insülin birikimini arttırdığı gözlenmiştir (Picone ve ark., 2018).

1.2.4.5. Oküler Yol

Peptit ve proteinler göze genellikle lokal oküler bozuklukların tedavisi için uygulanmaktadır. Yüksek moleküler ağırlıkları, hidrofilik yapıları nedeniyle düşük geçiş oranına sahip olmaları ve plazmin, kollajenaz, ekzopeptidaz ve aminopeptidaz tarafından enzimatik yıkıma uğramaları sebebiyle sistemik peptit ve protein verilmesi için tercih edilen bir yol olmamasına rağmen bu alanda birçok çalışma yapılmıştır (Vyas ve ark., 2011). Bu çalışmalarda absorpsiyonu arttırmak için insülin monomerlerinden dimer ya da heksamer oluşumunun engellenmesi, insülin ve permeasyon arttırıcı arasında misel oluşumunun sağlanması, enzimatik degradasyonun engellenmesiyle uygulama alanında kalışın uzatılması, uygulama alanının polaritesinin değiştirilmesi ve klirens oranının azaltılması gibi yöntemlere başvurulmuştur (Lee ve ark., 2002).

Oküler insülin verilmesinde permeasyon arttırıcıların etkisinin incelendiği bir çalışmada (Morgan, 1995) saponin, BL-9 ve Brij-78 kullanımının kedilerde oküler insülin absorpsiyonunu arttırdığı ancak biyoyararlanımın subkutan yola oranla çok daha düşük olduğu (%10-30) ve saponin kullanımının oküler iritasyona yol açtığı belirtilmiştir. Absorpsiyon arttırıcı ajan kullanılmadan üretilen absorbe edilebilir jelatin taşıyıcı sistemlerin tavşanlarda iritasyona yol açmadan 8 saat boyunca kan glukoz seviyesinde düşüş sağladığı gözlenmiştir (Lee ve Yalkowsky, 1999).

1.2.4.6. Vajinal Yol

Vajinal yol; geniş ve yüksek damarlanma gösteren absorpsiyon alanına sahip olma, etkin maddenin hepatik ilk geçiş etkisine maruz kalmaması ve düşük enzimatik aktivitenin görülmesi gibi avantajlara sahiptir (Dobaria ve ark., 2007). Lizofosfatidilkolinin (LPC) insülinin absorpsiyonunda meydana getirdiği artışın incelendiği bir çalışmada (Richardson ve ark., 1992), insülin çözeltisi ve nişasta bazlı liyofilize insülin mikroküreleri koyunlara vajinal yoldan verilmiştir. Nişasta bazlı mikrokürelerin insülinin yavaş ve kontrollü salımını sağladığı, her iki formülasyona

da LPC eklenmesinin insülinin absorpsiyonunu ve hipoglisemik etkisini arttırdığı ancak absorpsiyon oranının menstrüel sıklusa bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir.

Vajinal geçirgenliğin menstrüel sıklusa bağlı olarak değişmesi, sadece kadınlarda kullanılabilir bir yol olması ve düşük hasta uyuncu gibi problemler bu yolun başlıca dezavantajlarıdır (Acartürk F., 2009).

1.2.4.7. Rektal Yol

Rektal yol; peptit ve düşük molekül ağırlığına sahip proteinlerin verilisinde düşük seviyede proteolitik enzim içermesi, absorpsiyon için geniş yüzey alanı sağlaması, etkin maddenin hepatik ilk geçiş etkisine maruz kalmadan sistemik dolaşıma geçmesini sağlaması ve büyük hacimde (10-25 ml) formülasyonun uygulanmasına müsait olması gibi avantajlara sahiptir (Shah ve ark., 2011).

Kitozan bazlı, penetrasyon artırıcı olarak dimetil- β -siklodekstrin (DM- β CD) veya sodyum taurokolatın (Tau) kullanıldığı jel formülasyonlar tavşanlara rektal yoldan uygulanmıştır. DM- β CD ve sodyum taurokolatın degradasyona karşı insülini koruyarak, protein agregatlarının dağılmasını sağlayarak ve sıkı bağlantı noktalarını açarak paraselüler yoldan insülin absorpsiyonunu arttırdığı gözlenmiştir (Değim ve ark., 2005). Diyabetik ratlara insülin yüklü hidroksipropil metil selüloz-ko-poliakrilamid-ko-metakrilik asit (HPMC-co-PAM-co-PMAA) hidrojelilerin rektal suppozituar olarak uygulandığı bir çalışmada (Shi ve ark., 2019) ise jellerin HPMC-co-PAM-co-PMAA'nın yapısındaki -COOH grupları sayesinde rektumda şişerek kontrollü insülin salımını sağladığı ve bariz bir hipoglisemik etkiye yol açtığı gözlenmiştir. Ancak rektal yol; düşük sıvı içeriğine sahip olması dolayısıyla çözünmenin yavaş gerçekleşmesi, rektumun fizyolojik koşullarına göre düzensiz etkin madde emilimi görülebilmesi ve düşük hasta uyuncu sebebiyle sistemik etkin madde verilisi için genellikle tercih edilmemektedir (Shah ve ark., 2011).

1.2.4.8. Oral Yol

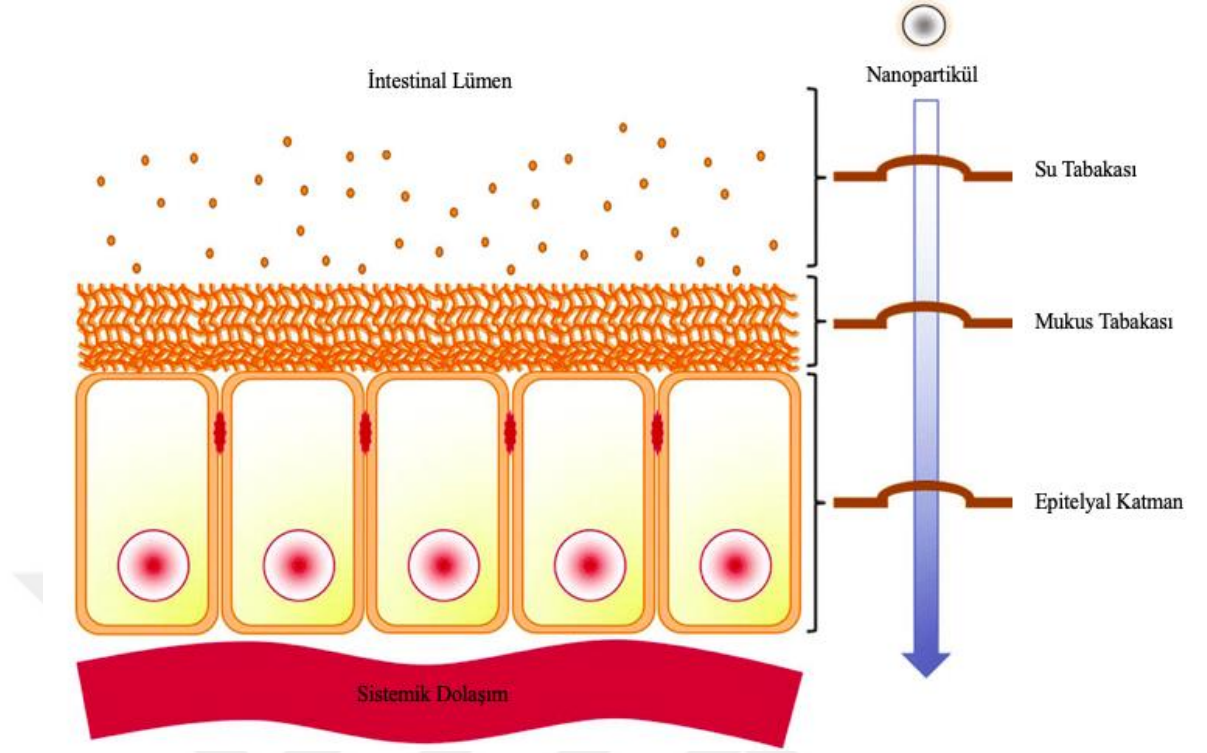
İnsülinin farklı uygulama yolları arasında oral yol, insülinin fizyolojik yolağını taklit etmesi ve böylece yan etkileri potansiyel bir şekilde azaltması nedeniyle en güvenli ve doğal uygulama yolu olarak kabul edilmektedir (Aguirre ve ark., 2016; Fonte ve ark., 2013). İnsülinin Banting ve Best tarafından keşfedilmesinden bugüne oral yoldan verilmesi, enjeksiyon kaynaklı ağrının, anksiyetenin ve muhtemel enfeksiyonların giderilmesi gibi avantajlara sahip olması nedeniyle bir hedef haline gelmiştir (Ansari, 2015). Subkutan yol ile uygulanan insülinin yalnızca %25'i karaciğere ulaşabilirken, oral yol ile uygulanan insülin gastrointestinal absorpsiyondan sonra fizyolojik yolağa benzer şekilde doğrudan karaciğere geçmektedir. Böylece subkutan enjeksiyon ile uygulanan insülinde çok daha yüksek miktarlarda insülinin karaciğere ulaşması mümkündür (Patel, 2013).

İnsülinin oral yol ile uygulanması pek çok avantaj sağlamakla birlikte, oral olarak uygulanmasını sınırlayan fiziksel ve kimyasal bariyerler bulunmaktadır.

Oral yol ile uygulanan insülinin karşılaştığı bariyerler şu şekilde özetlenebilir:

Fiziksel bariyerler;

- Bağırsak epitel hücrelerini kaplayan su ve mukustan oluşan karışmamış su tabakası,
- Enterositler, goblet hücreleri, endokrin hücreler ve Paneth hücrelerinden oluşan fosfolipit yapıdaki intestinal epitel,
- Büyük moleküllerin interselüler geçişini engelleyen sıkı bağlantı noktaları,
- Hücre içindeki maddelerin intestinal boşluğa tekrar verilmesini sağlayan effluks pompaları (Hamman ve ark., 2005).



Şekil 1.4. Oral yolla etkin madde verilisinde karşılaşılan fiziksel bariyerler

Kimyasal bariyerler (Chen ve ark., 2011);

- Oral yolla alınan peptit ve proteinlerin midede pepsine ve ince bağırsakta tripsin, kimotripsin, elastaz ve karboksipeptidaz gibi proteaz enzimlere maruz kalması,
- Midede yüksek asidik ortama (pH 1,2-3) ve bağırsakta hafif bazik ortama (pH 6,5-8) maruz kalması dolayısıyla pH'a bağımlı oksidasyon, deamidasyon ve hidrolize uğraması.

İnsülinin fiziksel ve kimyasal bariyerlerle karşılaşmasının yanı sıra hidrofilik yapısı, düşük partiyon katsayısı ve yüksek moleküler ağırlık gibi özelliklere sahip olması hücrelere girişini zorlaştırır ve bu durum oral yol ile uygulanan insülin için düşük biyoyararlanım elde edilmesine neden olur (Matteucci E. ve ark., 2015).

Oral yol ile uygulanan insülinin biyoyararlanımının artırılması için pek çok strateji uygulanmıştır. Kullanılan bu stratejiler şu şekilde sınıflandırılabilir (Gedawy ve ark., 2017):

Kimyasal modifikasyon

Pegilasyon, bir protein molekülünün polietilen glikol (PEG) molekülüne kovalent olarak bağlanması işlemidir. Pegilasyon protein yapılı etkin maddelerin dolaşımında kalış süresini ve biyoyararlanımını molekülün çözünürlük, stabilite, immünojenisite gibi özelliklerini iyileştirerek, proteolizle yıkım ve agregasyonunu azaltarak sağlar (Keser, 2015). Pegile edilmiş insülin ile yapılan bir çalışmada (Clement ve ark., 2002) çözünürlüğün, absorpsiyonun ve enzimatik degradasyona karşı stabilitenin arttığı gözlenmiştir.

Reseptöre hedefleme

Reseptör aracılı endositoz (Receptor mediated endocytosis, RME); ökaryotik hücrelerin peptit hormonlarını, büyüme faktörlerini, sitokinleri, plazma glikoproteinlerini, lizozomal enzimleri, toksinleri ve virüsleri hücre yüzeyindeki reseptörleriyle birlikte içselleştirdiği genel bir mekanizmadır. Reseptör aracılı hedeflendirmenin peptit ve protein yapılı etkin maddelerin verilişi için umut vaat ettiği düşünülmektedir (Sato ve ark., 1996). Bunun yanında makromoleküler yapıdaki etkin maddelerin intestinal mukozadan geçişinin artırılmasında HIV-1Tat, oligoarjinin ve penetratin gibi hücreye penetre edici peptitler (CPP) de kullanılabilir. CPP'ler çeşitli çalışmalarda protein, DNA, oligonükleotit ve nanopartiküler sistemlerin hücre içine alınımının artırılması amacıyla kullanılmıştır (Khafagy ve Morishita, 2012). Oral insülin verilişi için yapılan bir çalışmada (Kamei ve ark., 2008) insülin çözeltisinin tek başına intestinal boşluktan absorbe olmadığı ve CPP olarak oligoarjininin kullanıldığı formülasyonda absorpsiyonun arttığı gözlenmiştir.

Formülasyona ait stratejiler

İnsülinin oral yolla verilmesinde biyoyararlanımının artırılması için uygulanan stratejilerden biri enzim inhibitörü kullanımudur. Formülasyona proteaz inhibitörlerinin eklenmesi insülini gastrointestinal kanalda gerçekleşen enzimatik degradasyona karşı korur ve absorpsiyonunu artırır. Aprotinin, basitrasin ve sodyum glikokolat gibi proteaz inhibitörlerinin formülasyonda kullanılmasının insülinin hipoglisemik etkisini arttırdığı gözlenmiştir (Ansari, 2015).

Absorpsiyon arttırıcı maddeler ise etkilerini sıkı bağlantı noktalarından ya da transselüler yoldan geçişi arttırarak gösterirler. İnsülin verilmesi için yapılan çalışmalarda yağ asitleri ve safra tuzlarının absorpsiyon artışını sağladığı gözlenmiştir. Ancak absorpsiyon arttırıcı maddeler uzun süreli kullanımda biyomembrana hasar vermesi ve bölgesel enflamasyona sebep olması nedeniyle tercih edilmemektedir (Muheem ve ark., 2016).

Mukoadezif taşıyıcı sistemler, doğal ya da sentetik kaynaklı mukoadezif polimerler kullanılarak oluşturulan ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Mukoadezif polimerler mukozal epiteldeki mükün tabakasına bağlanarak intestinal kanalda formülasyonun daha uzun süre kalmasını ve böylece absorpsiyonun ve dolayısıyla biyoyararlanımın artmasını sağlarlar. Bu sistemler mukus tabakasına adhere olunca su alıp şişer ve etkin maddenin salımını sağlarlar (Myrthi ve ark., 2011). Banerjee ve arkadaşlarının (2016) oral insülin verilmesi için Eudragit, pektin ve CMC kullanarak oluşturduğu mukoadezif sistemin subkutan insülin uygulamasına göre kan glukoz seviyesini daha kontrollü bir şekilde düşürdüğü gözlenmiştir.

İnsülinin oral yolla verilmesi için emülsiyon, lipozom, mikroküre ve nanopartikül gibi taşıyıcı sistemler proteinik yapıyı gastrointestinal kanalın düşük pH'ından ve enzimatik degradasyondan korumak için sıkça kullanılmaktadır. Bu partiküler sistemler etkin maddenin epitelyal mukozadan geçişini arttırırken kontrollü salımını ve hedeflendirilmesini de sağlarlar (Park ve ark., 2010).

1.3. Nanopartiküler Sistemler

Nanopartiküller; partikül büyüklükleri 10-1000 nm arasında değişen, çözünmüş, hapsedilmiş veya adsorbe haldeki etkin maddenin salımını kontrollü bir şekilde sağlayan, doğal veya sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan katı kolloidal polimerik partiküler sistemlerdir. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, uygulanan hazırlama yöntemine bağlı olarak kendi içinde “nanoküreler” ve “nanokapsüller” olarak ikiye ayrılırlar. Nanoküreler, etkin maddenin polimerik matriks yapı içinde çözüldüğü, disperse olduğu ya da kısmen adsorbe edildiği sistemler iken nanokapsüller etkin maddenin polimerik bir membran tarafından çevrelenmiş sulu veya yağlı bir çekirdek içinde bulunduğu veziküler sistemlerdir ve rezervuar sistem olarak da tanımlanmaktadır (Şengel-Türk ve Hasçiçek, 2009). Nanopartiküler sistemler sağlık alanında teşhis, görüntüleme ve farklı hastalıkların tedavisinde ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilir (McNeil, 2011). Günümüzde etkin madde verilisi ve tanı/teşhis amacıyla başlıca kullanılan nano boyutlu sistemler Çizelge 1.4’de özetlenmiştir (Bakry ve ark., 2007; Bhatia, 2016; Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014; Patan ve ark., 2013; Sultana ve ark., 2013; Zırh-Gürsoy, 2014).

Çizelge 1.4. Etkin madde verilışı ve tanı/teşhis amacıyla kullanılan nano boyutlu sistemler ve genel özellikleri

Nanotaşıyıcı Tipi	Büyükük (nm)	Genel Özellikleri	Uygulama Alanları
Nanopartiküller (Polimerik nanoküreler, nanokapsüller, seramik nanopartiküller, nanosüngerler, metalik nanopartiküller)	10-1000	Doğal veya sentetik polimerlerden, seramik veya inorganik elementlerden hazırlanan katı kolloidal taşıyıcı sistemlerdir.	Etkin maddelerin biyoyararlanımının artırılması, yan etkilerinin azaltılması, aktif ve pasif hedeflendirme ve etkin maddenin kontrollü salımını sağlama
Dendrimerler	<10	Birbirini tekrarlayan monomerlerin basamaklar halinde eklenmesiyle sentezlenen küresel makromoleküllerdir.	Yüzeylerindeki fonksiyonel grupların değiştirilebilmesi sayesinde molekül sensör, katalizör, kimyasal aktivatör, etkin madde taşınması ve medikal tanıda kullanılabilir.
Nanolipozomlar	50-100	Küresel şekilli, bir ya da birden fazla lipit çifte tabakadan oluşan orta iç kısmında ve tabakalar arasında sulu faz bulunduran kapalı veziküllerdir.	Hem sulu hem de lipid faz içermesi sebebiyle hem hidrofilik hem de lipofilik etkin maddelerin verilışinde kullanılabilirler.

Çizelge 1.4. Devam

Niozomlar	Küçük tek tabakalı: 10-100 Büyük tek tabakalı: 100-3000	Nanoniozomlar, non iyonik yüzey etkin maddelerin sulu ortamlarda meydana getirdiği kapalı çift tabakalı ve nanometre boyutlarında yapılardır. Hazırlanma yöntemlerine göre tok ya da çok tabakalı olabilirler.	Çesitli yollarla uygulanabilen bu sistemlerin özellikle karaciğer, dalak ve kemik iliği gibi dokularda birikimi bu dokularda makrofajlara bağlanmayı, özel amaçlarla üretilen niozomlar (manyeto-niozom gibi) ise farklı dokulara hedeflemeyi sağlamaktadır.
Katı-Lipid Nanopartiküller	50-1000	Bu yapılar genel olarak katı lipit, yüzey etkin madde ve su fazından, nano-yapılı lipit taşıyıcılar (KLN) ise katı lipit, sıvı yağ, yüzey etkin madde ve su fazından meydana gelmektedir.	Yapıları sayesinde lipofilik ve hidrofilik etkin maddelerin yüklenebildiği bu sistemler etkin madde dayanıklılığını artırır, kontrollü salımını ve hedeflendirilmesini sağlar.
Nanojeller	20-200	Yüksek yükleme kapasitesine ve stabiliteye sahip bu yapılar, spesifik polianyonlarla katyonik polimerlerin bağlanmasıyla oluşan, şişme özelliğine sahip ağsı yapıda ilaç taşıyıcı sistemlerdir.	Oral, topikal ve pulmoner yollarla uygulanan bu sistemler hidrofilik ve hidrofobik etkin madde verilmesi ve hedeflendirilmesi, gen tedavisi ve aşılarında taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır.
Nanoemülsiyonlar	20-200	Birbiriyle karışmayan su ve yağ fazının yüzey etkin madde ve/veya yardımcı yüzey etkin madde varlığında oluşturulduğu ve dağılan fazın nanometre boyutundaki damlalar halinde bulunduğu sistemlerdir.	Sudaki çözünürlüğü az olan etkin maddeler ya da yapıların çözünürlüğünü ve emilimini arttıran bu sistemler ayrıca şeffaf/yarı-şeffaf yapıları sayesinde estetik bir ayrıcalık sağlar ve krem, köpük, parfüm gibi formülasyonların hazırlanmasında kullanılır.

Çizelge 1.4. Devam

Miseller	5-100	Miseller hidrofobik yapıda bir çekirdek ve hidrofilik özellikteki kabuktan oluşmaktadır.	Çekirdek kısmı hidrofob ilaçların çözünebildiği bir depo özelliği gösterirken kabuk kısmı hidrofilik özellik sağlar. Etkin madde taşınmasında, tanı amaçlı görüntüleme ve etkin madde hedeflendirilmesinde kullanılırlar.
Nanokristaller	2-9.5	Etkin maddenin kristal yapısının korunduğu ve neredeyse tamamen etkin maddeden oluşan yapılardır.	Çözünürlüğü düşük etkin maddelerin doygunluk çözünürlüğünün, çözünme hızının ve biyoyararlanımının artırılması
Karbon Nanotüp	2-100 (çap) 5-550 (uzunluk)	Karbon tabakalarının yuvarlanmasından oluşan silindirik yapılardır.	DNA ve protein biyosensörlerinin hazırlanmasında, etkin madde ve aşı veriliş sistemlerinde kullanılırlar.
Fulleren	~1	Karbon atomları arasında 2sp ortaklaşması gösteren bu sistemler beşgen ve altıgenlerden oluşan küre şeklindeki yapılardır.	Yakıt hücrelerinde, yer altı sularının kalitesinin iyileştirilmesinde, kozmetik ve ilaç etkin maddelerinin taşınmasında ve tanı amaçlı görüntüleme kullanılırlar.
Nanolif	50-1000	Karbon, titanyum dioksit, silikon dioksit, zirkonyum dioksit, platin ve benzeri elementler kullanılarak üretilen lif yapılardır.	Tıp alanında ve yapay organ geliştirilmesinde, etkin madde verilişinde kullanılmaktadır.

Çizelge 1.4. Devam

Nanokafesler	10-100	İnorganik maddelerden yapılmış nanokafesler poröz ve içi boş altın nanoparçacıklardan hazırlanmaktadır.	Etkin madde taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde, tomografide kontrast ajan kullanılarak erken evrede kanser olaylarının teşhisinde kullanılabilir.
--------------	--------	---	---

1.3.1. Nanopartiküllerin Avantajları ve Dezavantajları

Nanopartiküler sistemlerin avantajları (Derman ve Kızılbey, 2013);

- Partikül büyüklükleri sayesinde kapilerlerden geçerek hücre içine alınıp hedef bölgede etkin madde birikimini sağlamak ve böylece diğer organ ve dokulardaki birikimi ve sistemik toksisiteyi azaltmak,
- Hedef dokuda kontrollü etkin madde salımını sağlamak,
- Etkin maddelerin yüklendiği nanopartiküllerin hedef bölgedeki reseptörlere bağlanacak ligandlarla modifiye edilmesi ile etkin bir şekilde hedeflendirilmesini sağlamak,
- Etkin maddenin katı matriks içine hapsedilmesi ile etkin maddeyi parçalanmaktan koruyarak istenen bölgeye ulaşım olasılığını arttırmak,
- Basit ve kolay bir üretim yöntemine sahip olmak.

Nanopartiküler sistemlerin dezavantajları;

- Nanopartiküler sistemler partikül büyüklükleri, kimyasal bileşimleri, yüzey özellikleri, çözünürlükleri, şekilleri ve buldukları ortamın pH'sı, sıcaklığı, oksijen varlığı gibi değişkenlere bağlı olarak toksik ve istenmeyen etkiye yol açabilirler (Vass ve ark., 2015).
- Çeşitli nanopartiküler sistemlerle yapılan çalışmalarda pulmoner enflamasyona yol açma, alerjenlere karşı oluşan immün yanıtta değişikliğe sebep olma, platelet agregasyonunu uyarma, makrofajların fagositik aktivitesini inhibe etme, kardiyak fonksiyonlarda ve vasküler homeostazı olumsuz yönde etkileme ve oksidatif strese neden olma gibi istenmeyen etkilere sahip olabildikleri gösterilmiştir (Jong ve ark., 2008).
- Nanopartiküller geniş yüzey alanları sebebiyle sahip oldukları yüksek yüzey enerjisini düşürmek için aglomerat oluşturma eğilimindedir. Bu durum stabilite problemlerine, oluşturulan sistemlerin hedeflenen dokuya ulaşamamasına ve parenteral yolla verilişte kan damarlarında tıkanmaya yol açabilmektedir (Wu ve ark., 2011).

- Bazı yöntemlerde uygulanan yüksek basınç ve sıcaklığın etkin maddenin ve taşıyıcı sistemin yapısında bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir (Ekambaram ve ark., 2012).

1.3.2. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Nanopartiküllerin hazırlanma yöntemleri temel olarak şu şekilde sınıflandırılabilir (Jatariu ve ark., 2010):

I. Kimyasal yöntemler

1. Monomer polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyonu

Süspansiyon polimerizasyonu

Polikondensasyon

2. Polimerler kullanılarak hazırlama

Kovalan çapraz bağlama yöntemi

İyonik çapraz bağlama yöntemi

Şelasyon

II. Fiziksel yöntemler

Çözücü buharlaştırma yöntemi

Püskürterek kurutma yöntemi

Püskürterek kaplama yöntemi

Püskürterek dondurma yöntemi

Dondurarak kurutma yöntemi

Koaservasyon yöntemi

Polimerik nanopartiküller, taşınacak olan etkin maddenin hidrofilik ya da hidrofobik özellikte oluşu dikkate alınarak farklı hazırlama yöntemleri ile hazırlanabilirler. Peptit ve proteinler gibi suda çözünen etkin maddeler için en çok kullanılan hazırlama yöntemlerinden birisi su/yağ/su tipi emülsifikasyon çözücü

buharlaştırma yöntemidir (Devrim ve ark., 2011; Devrim ve ark., 2013; Devrim ve Bozkır, 2015; Zhang ve ark., 2014). Bu yöntemde polimer, su ile karışmayan organik bir çözücüde (diklorometan, etil asetat, kloroform gibi) çözülür. Hazırlanan polimer çözeltisi hidrofilik özellikteki etkin madde ve emülgatör içeren sulu faza eklenerek su/yağ tipi primer emülsiyon oluşturulur. Daha sonra primer emülsiyon stabilizer içeren ikinci sulu faza ilave edilerek karıştırılır ve su/yağ/su tipi sekonder emülsiyon oluşturulur. Organik çözücü buharlaştırılarak uzaklaştırılır ve nanopartikül oluşumu sağlanır (Dinarvand ve ark, 2011; Olivier, 2005).

Emülsifikasyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak peptit/protein gibi makromolekülleri içeren nanopartiküllerin hazırlanmasında karşılaşılan en önemli sorun, üretim aşamasında çeşitli stres koşullarına maruz kalmaları nedeniyle makromoleküllerin stabilitesinin korunamamasıdır. Özellikle peptit/proteinlerin su/yağ/su tipi emülsiyonların hazırlanması aşamasında sıvı-gaz ve sıvı-sıvı ara yüzeylere adsorpsiyonu denatürasyonları ile sonuçlanabileceği için biyolojik aktivite kaybına neden olacaktır. Ara yüzeylere maruziyeti artıran ve proteinlerde yapısal bozulmaya neden olabilecek faktörlerden birisi de karıştırma işlemidir. Emülsiyon oluşumunu sağlamak ve organik çözücüyü buharlaştırmak için uygulanan yüksek hızlardaki karıştırma ve/veya sonikasyon işlemleri protein yapısına zarar verebileceği gibi ara yüzeylere maruziyeti de artıracaktır (Mundargi ve ark., 2008; Yuan ve ark., 2009). Peptit/protein içeren nanopartiküllerin emülsifikasyon yöntemi ile hazırlanması sırasında karşılaşılabilecek diğer önemli bir sorun, polimeri çözmek için kullanılan organik çözücülerin (diklorometan ve kloroform gibi) protein denatürasyonuna neden olmasıdır. Bunun dışında işlem sırasında uygulanabilecek sıcaklık ve pH gibi parametreler de protein stabilitesini olumsuz yönde etkilebilecek işlem parametreleri arasında yer almaktadır (van der Walle ve ark., 2009).

Peptit-protein içeren nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan bir diğer yöntem, iyonik çapraz bağlama yöntemidir. İyonik çapraz bağlama yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllerde pozitif yüklü polimerler ile negatif yüklü polimerler arasında kompleks oluşumu sağlanmaktadır (Curcio ve ark., 2015; Dul ve ark., 2015). Bu yöntemde, diğer nanopartikül hazırlama yöntemlerinde uygulanan organik çözücü,

yüksek ısı ya da yüksek karıştırma hızı gibi peptit ve proteinlerin yapısını olumsuz yönde etkileyecek stres koşullarının uygulanmıyor olması önemli bir avantajdır.

İyonik çapraz bağlama yöntemi ile hazırlanan nanopartiküller genel olarak polielektrolit kompleks nanopartiküller olarak adlandırılmaktadır. Çalışmamızda insülin içeren nanopartiküller bu yöntem ile hazırlanmış ve elde edilen sistemler polielektrolit kompleks nanopartikülleri olarak adlandırılmıştır.

1.4. Polielektrolit Kompleksleri

IUPAC'a göre polielektrolitler, iyonik ve/veya iyonize olabilir grupları içeren makromoleküler yapılardır. Genellikle su gibi polar çözücülerde çözünürler ve elektrostatik etkileşimleri ve esneklikleri sayesinde kendilerine özgün özellikler gösterirler. Polielektrolitler kaynaklarına göre doğal (nükleik asitler, proteinler, polisakkaritler vb.), doğal kaynaklardan türetilmiş (selüloz türevleri vb.) ve sentetik (poliakrilik asit vb.) olabilir. İyonize olabilen grupları asidik (karboksilik asit ve fosfat grupları gibi) ya da bazik (amino grubu) olabilir. Bunun yanı sıra asidik ve bazik grupların birlikte bulunduğu yapılar poliamfolitler olarak adlandırılır. Polielektrolitlerin zayıf ve güçlü olarak sınıflandırılması, iyonize olabilen grupların uygun koşullar altında kısmen ya da tamamen çözünebilir olmasına bağlıdır. Ortam pH'sındaki değişiklikler güçlü polielektrolitlerin yüküne etki etmezken zayıf polielektrolitlerin çözünürlüğünde değişikliklere yol açar. Güçlü polielektrolitlere örnek olarak RNA ve DNA verilebilirken çoğu protein zayıf polielektrolittir. Polielektrolitler moleküler yapılarına göre lineer, dallanmış ve çapraz bağlı olarak sınıflandırılabilir. Yüklerin molekülün ana zincirine bağlı olduğu polielektrolitler integral olarak adlandırılırken yükün yan gruplarda bulunması durumunda pendant olarak adlandırılır. Küçük iyon ve monomerlerin tekrarladığı polielektrolitler homopolimer, iki veya daha fazla monomerden oluşan polielektrolitler ise kopolimer olarak adlandırılır (Bourganis ve ark., 2016).

Polielektrolit kompleksleri, zıt yüklü partiküllerin (örneğin polimer-polimer, polimer-etkin madde ve polimer-etkin madde-polimer) arasında oluşan

komplekslerdir. Zıt yüklü partiküllerin karıştırılması, kuvvetli ama tersine çevrilebilen elektrostatik bağların oluşması nedeniyle kendiliğinden birleşmelerine neden olur. Bu etkileşimin polimerik zincirler arasında gerçekleşmesi, polielektrolit kompleks ağlarının oluşumunu sağlar. Genel olarak, bu polimerik ağlar iyi tolere edilir, biyolojik olarak uyumludur ve çevre koşullarındaki değişikliklere daha duyarlıdır. Bu polielektrolit komplekslerinin oluşumu ve stabilitesi, karışıt yüklü polielektrolitlerden her birinin iyonizasyon derecesine, polielektrolitler üzerindeki yüklerin yoğunluğuna, polimerik zincirler üzerindeki yük dağılımına, polielektrolitlerin konsantrasyonuna, karıştırma oranı, karıştırma sırası, etkileşimin süresi, iyonik grupların yapısı, iyonik grupların polimerik zincirler üzerindeki konumu, polielektrolitlerin moleköl ağırlığı, polimer zincirinin esnekliğı ve ayrıca sıcaklık, iyonik kuvvet ve reaksiyon ortamının pH'sı gibi çevresel faktörlere bağlıdır (Hamman, 2010).

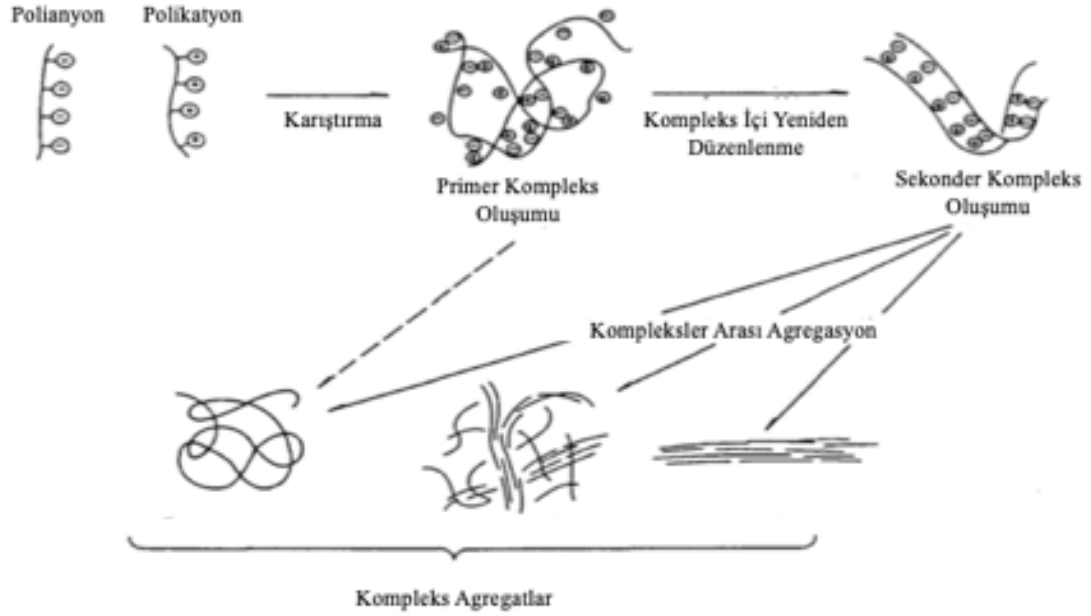
1.4.1. Polielektrolit Komplekslerinin Avantajları

Polielektrolit komplekslerinin avantajları şu şekilde sayılabilir (Patwekar ve ark., 2016):

- En az iki polielektrolit bileşenin olumlu özelliklerinden aynı anda yararlanma imkânı sağlaması,
- Organik çözücüler yüzünden meydana gelen protein denatürasyonundan ve toksisite ile ilgili olumsuzlukların elimine edildiğı kolay bir üretim sürecine sahip olması,
- Oda sıcaklığında gerçekleşen kompleks oluşumu için özel bir ekipmana ihtiyaç duyulmaması nedeniyle üretim maliyetinin düşük olması,
- Partiköl büyüklüğü ve yüzey yükü gibi fizikokimyasal özelliklerinin ayarlanabilir olması,
- Belirli biyolojik bariyerlerden geçişi ve hücre alımını kolaylaştıran nano ölçekli boyutlarda olmaları,
- Makromoleküller ile birleşme becerisine sahip olmaları,
- Etkin maddenin uyarı tarafından tetiklenerek salımını sağlamalarıdır.

1.4.2. Polielektrolit Komplekslerinin Hazırlanma Yöntemleri

Polielektrolit komplekslerinin oluşumu 3 adımda meydana gelmektedir. Bunlar primer kompleks oluşumu, kompleks içi yeniden düzenleme ve kompleksler arası agregasyon oluşumudur (Tsuchida, 2008).



Şekil 1.5. Polielektrolit kompleks oluşum aşamaları

Primer kompleksler, zıt yüklü polielektrolitlerin 10^{-1} mol/l'den yüksek konsantrasyonlarındaki çözeltilerinin karıştırılması sonucu Coulomb kuvvetinin etkisiyle hızlı ve düzensiz bir şekilde meydana gelir. Kompleks içi yeniden düzenleme ilk aşamaya göre daha uzun sürer ve yeni bağların oluşmasını ve/veya polimer zincirlerinin bozulmalarının düzeltilmesini içerir. Son aşamada ise oluşan kompleksler hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve dipol etkileşimleri sayesinde çapraz bağlayıcı kullanmaksızın rastgele, ağsı ve fibril şekillerde interpolimer komplekslerini oluştururlar. Oluşan kompleksler stokiyometrik ve stokiyometrik olmayan kompleksler olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Stokiyometrik kompleksler zıt yüklü polielektrolitlerin ekimolar olarak karıştırılması sonucu elde edilir. Stokiyometrik olmayan kompleksler ise bir polielektrolitin diğerine göre daha fazla kullanılmasıyla elde edilir. Zıt yüklerden birinin daha fazla kullanılması genellikle kompleksi daha hidrofilik ve çözünür hale getirir (Ankerfors, 2008; de Robertis ve ark., 2015; Schatz ve ark., 2004; Tsuchida, 2008).

Polielektrolit komplekslerinin oluşturulması için günümüzde başlıca kullanılan yöntemler şunlardır:

1.4.2.1. Layer-by-layer Tekniği

Elektrostatik kendiliğinden birleşim olarak da adlandırılan Layer-by-layer tekniği genellikle katı partiküllerin yüklü yüzeylerinde katyonik ya da anyonik polielektrolitlerin biriktirilmesi ile polielektrolit katmanlarının oluşturulması için kullanılır (Bourganis ve ark., 2017).

1.4.2.2. Jet Karıştırma Tekniği

Jet karıştırma (mikrokarıştırma) tekniğinde, polielektrolit kompleksi oluşumu confined impinging jet (CIJ) cihazıyla gerçekleştirilir. Bu sistemde zıt yüklü polielektrolitler karışımın gerçekleşeceği hazneye iki ayrı noktadan verilir ve burada milisaniyeler içinde polielektrolit komplekslerinin oluşumu gerçekleşir (Ankerfors, 2008).

1.4.2.3. İyonotropik Jelasyon Tekniği

İyonotropik jelasyon; polielektrolitlerin, jelisferler olarak da adlandırılan hidrojel tanecikleri oluşturmak için karşı iyonların varlığında çapraz bağlanma yeteneğine dayanır. Jelisferler, yoğun jelasyon yeteneğine sahip küresel çapraz bağlı hidrofilik polimerik yapılardır. Bu yapılar, etkin madde yüklü polimerik bir çözeltinin, çok değerlikli (polivalan) katyonların sulu çözeltisine manyetik karıştırıcı altında damla damla eklenmesiyle üretilir. Katyonlar, etkin madde yüklü polimerik yapılara difüze olur ve iyonik olarak çapraz bağlı üç boyutlu bir yapı oluşturur. Biyomoleküller üç boyutlu yapısını korumak için hafif şartlar altında bu jelisferlere yüklenebilir (Patil ve ark., 2012; Smrdel ve ark., 2008).

1.4.2.4. İyonik Çapraz Bağlama Yöntemi (Polielektrolit Titrasyonu)

İyonik çapraz bağlama yöntemi diğer bir adıyla polielektrolit titrasyonu, zıt yüklü polielektrolit çözeltilerinin karıştırılması sonucu kompleks oluşumuna dayanan ve günümüzde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde polielektrolit çözeltisi manyetik karıştırıcı ile yavaşça karıştırılmakta olan zıt yüklü bir polielektrolit çözeltisine eklenir. Polielektrolitlerin çözeltideki konsantrasyonları kompleks oluşumu ile zamanla azalır. Ortamdan kompleksleşmeyen polielektrolitlerin uzaklaştırılması ve polielektrolit komplekslerinin saflaştırılması için çözelti santrifüjlenir ve yeniden disperse edilir (Bourganis ve ark., 2017).

1.4.3. Polielektrolit Komplekslerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Polielektrolit kompleksleri üretiminde kullanılan polimer tiplerine göre şu şekilde sınıflandırılabilir (Dumitriu ve Chornet, 1998):

1.4.3.1. Doğal Polimerler Arasında Oluşturulan Polielektrolit Kompleksleri

Doğal polimerler, biyouyumluluk ve biyobozunabilirlik gibi özelliklere sahip olmaları nedeniyle doku mühendisliği ve etkin madde verilmesi için formülasyon geliştirmede sıkça kullanılmaktadır (Aravamudhan ve ark., 2014; Mustafa ve ark., 2016). Nükleik asitler, karragenan, aljinat türevleri, hyaluronik asit, pektin, kondroitin sülfat, dekstran sülfat ve karboksimetil selüloz kullanılan polianiyonlara; poli(L-lisin), kitozan türevleri, protamin ve spermin ise polikatyonlara örnek olarak verilebilir. Polikatyonların DNA, RNA ve proteinler gibi biyoaktif moleküllerle arasında gerçekleşen elektrostatik etkileşim polikatyonların ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmasını sağlamaktadır (Dul ve ark., 2015; Kabanov ve Kabanov, 1994; Kim ve ark., 2016). Kitozan günümüzde kontrollü salım ve kolona hedeflemeyi sağlaması,

mukoadezif özelliğe sahip olması, pH'ya bağlı olarak jelleşebilmesi, negatif yüklü yüzeylerden permeasyonu artırıcı ve efluks pompasını inhibe edici özelliklere sahip olması nedeniyle etkin maddelerin çeşitli veriliş yollarına göre yapılan çalışmalarda sıkça kullanılmıştır (Bernkop-Schnürch ve Dünnhaupt, 2012). Doğal polimer yapılı polielektrolit komplekslerine ait örnekler Çizelge 1.5'de verilmiştir.

Çizelge 1.5. Doğal polimer yapılı polielektrolit kompleksleri ve uygulamaları

Polianyon	Polikasyon	Uygulama
Aljinat	Kitozan	Antimikrobiyal ajanların P. acnes tedavisinde kullanımı (Friedman ve ark., 2013)
DNA	Kitozan	Gen tedavisi için non-viral vektörlerin geliştirilmesi (Janes ve ark., 2001)
Heparin/Hyaluronan	Kitozan	Doku mühendisliği uygulamaları için nanoyapıların oluşturulması (Boddohi ve ark., 2009)
Kondroitin	Protamin	Peptid verilişi için kondroitin bazlı nanopartiküllerin geliştirilmesi (Umerska ve ark., 2015)
Hyaluronik asit	Poliarjinin	Poliarjinin ve HA bazlı taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve karakterizasyonu (Oyarzun-Ampuero ve ark., 2011)
Karragenan	Protamin	Etkin madde verilişi için karragenan ve protamin bazlı nanopartiküllerin üretimi ve karakterizasyonu (Dul ve ark., 2015)
Sodyum Aljinat	Kasyonize Jelatin	Kurkumin verilişi için kasyonize jelatin ve sodyum aljinat bazlı nanopartiküler sistemlerin hazırlanışı (Sarika ve James, 2016)

1.4.3.2. Doğal ve Sentetik Polimerler Arasında Oluşturulan Polielektrolit Kompleksleri

Günümüzde poli-ε-kaprolakton (PCL), poli(l-glutamik asit) (PGA), polilaktik asit (PLA) ve kopolimerleri gibi sentetik polimerler etkin madde verilişi için kitozan,

dekstran, aljinat, selüloz, karragenan, hyaluronik asit ve pektin gibi doğal polimerlerle birlikte sıkça kullanılmaktadır (Fang ve ark., 2013; Hu ve ark., 2002; Prokop ve ark., 1998). Doğal ve sentetik polimerlerin oluşturduğu polielektrolit kompleksler ve uygulamalarına ait örnekler Çizelge 1.6’da verilmiştir.

Çizelge 1.6. Doğal-sentetik polimer yapılı polielektrolit kompleksleri ve uygulamaları

Doğal Polimer	Sentetik Polimer	Uygulama
Kitozan	Poli(akrilik asit) (PAA)	Hidrofilik etkin maddelerin verilışı için PAA ve kitozan bazlı nanopartiküllerin hazırlanması ve karakterizasyonu (Hu ve ark., 2002)
Kitozan	Polivinil alkol	Transdermal yolla insülin verilışı için hidrojel hazırlanması ve karakterizasyonu (Zu ve ark., 2011)
Dekstran	Poli(Allilaminhidroklorit)	Ibuprofenin yüklenmesi ve salımı için ameliyat iplikleri üzerinde polimerik mikrojel filmlerin oluşturulması (Wang ve ark., 2009)
Kitozan	Poli(L-glutamik asit)	Kıkırdak rejenerasyonu için kondrosit yüklü poröz PLGA/kitozan mikrokürelerinin hazırlanması (Fang ve ark., 2013)
Karragenan	Eudragit E	H. pylori tedavisi için amoksisilin ve metronidazolün uzatılmış salımını sağlayan matriks tabletlerin hazırlanması (Bani-Jaber ve ark., 2011)
Aljinat	Polietilenimin	Furosemidin simüle intestinal sıvı içinde uzatılmış salımını sağlayan aljinat kaplı aljinat/polietilenimin bazlı taşıyıcı sistemlerin hazırlanması (Mallikarjuna Setty ve ark., 2005)

1.4.3.3. Sentetik Polimerler Arasında Oluşturulan Polielektrolit Kompleksleri

Sentetik polielektrolitlerle yapılan çalışmalarda genel olarak kondüktometrik, potansiyometrik ve turbidimetrik titrasyon yöntemleri kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan anyonik ve katyonik polimerlere bazı örnekler Çizelge 1.7’de verilmiştir.

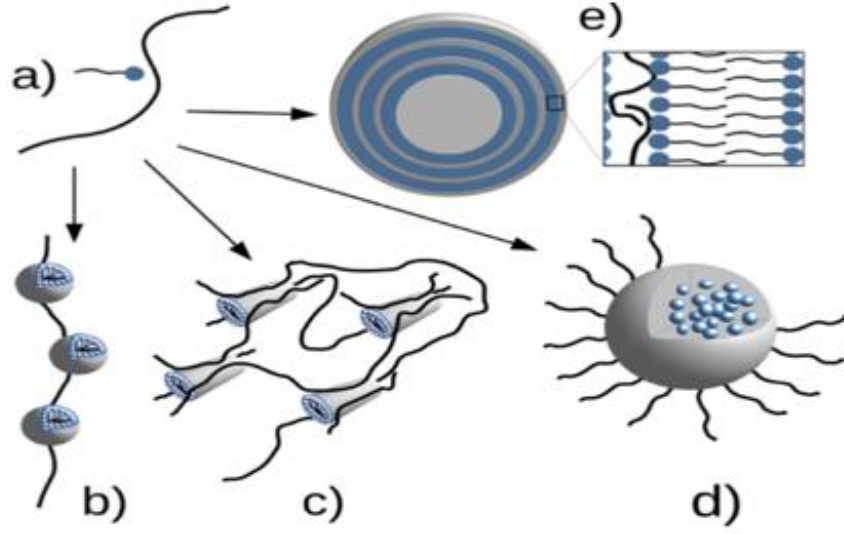
Çizelge 1.7. Polielektrolit kompleksleşmesi için kullanılan sentetik polianyon ve polikatyonlar

Polianyon	Polikasyon
Na-poliakrilat	Poli(4-vinil-N-bütilpiridinyum) bromit
Na-polistiren sülfonat	Poli(4-vinil-N-bütilpiridinyum) bromit
K-poli(vinilalkol)	Poli(vinilamin)hidroklorit sülfat
Na-polistiren sülfonat	Poli(vinilbenziltrimetil)amonyum
Polistiren sülfonik asit	bromit
Poliakrilik asit	Poli(vinilbenziltrimetil)amonyum
K-Polivinil sülfat	hidroksit
K-Poli(vinil alkol)	Çeşitli kuarternize polikasyonlar
	Poli(dimetildialkil)amonyum klorit
	Dallanmış poli(etilen imin) sülfat

1.4.3.4. Polielektrolit ve Sürfaktanlar Arasında Oluşan Polielektrolit Kompleksleri

Sürfaktan-polielektrolit kompleksleri, zıt yüklü polielektrolitlerle sürfaktanların hidrofobik ve elektrostatik etkileşimlerle bir araya gelmesiyle oluşur. Bu karışımlar günümüzde gıda, kozmetik, deterjan, boya endüstrilerinde ve eczacılıkta formülasyonların kaplanması, enkapsülasyonu, gen tedavisi için taşıyıcı sistem geliştirilmesinde sıkça kullanılmaktadır. Kullanılan polimer formülasyonun reolojik özelliklerini belirlerken sürfaktanlar ise ıslanabilirlik gibi yüzey özelliklerinden sorumludur (Langevin, 2009).

İyonik sürfaktan kullanımında, kritik misel konsantrasyonunun (CMC) üzerinde yüklü misel ve poliyon arasında Coulombic çekimler sayesinde kompleksasyon meydana gelir. Oluşan kompleksin yapısı kullanılan polielektrolitin zincir yapısı, yük dağılımı ve moleküler ağırlığı gibi parametrelere; sürfaktanın agregat tipini belirleyen topaklanma parametresine ve baş grubunun tipine göre değişir. Sürfaktan ve polielektrolitler arasında oluşabilecek muhtemel yapılar Şekil 1.6'da gösterilmiştir (Gradzielski ve Hoffman, 2018).



Şekil 1.6. Sürfaktan ve polielektrolit kompleksleşmesi sonucu oluşabilecek muhtemel yapılar. Sürfaktanlar düşük konsantrasyonlarda polielektrolitlere teker teker bağlanırlar (a). Ortama daha fazla sürfaktan eklenmesi polielektrolitlere bağlanan çeşitli şekillerde agregatların oluşumunu sağlar. Bu şekiller küresel misellerin polielektrolit üzerinde sıralı bir şekilde dizilmesi (b), polielektrolit ağının çubuk şeklindeki misellerle bir arada tutulması (c), yoğun bir miseller çekirdek içeren polielektrolit kümesi (d) veya çok katmanlı veziküller (e) olabilir.

1.4.3.5. Protein-Polielektrolit Arasında Oluşturulan Polielektrolit Kompleksleri

İlk rekombinant protein olan insülinin başarılı bir şekilde üretilmesi ve piyasaya sürülmesinin ardından pek çok peptit ve protein yapılı etkin madde geliştirilmiş ve onay almıştır. Günümüzde ise kanser ve çeşitli metabolik, immünolojik, hormonal, genetik, enfeksiyöz ve kardiyak hastalıkların tedavisinde çeşitli proteinik etkin maddeler kullanılabilmektedir.

Peptitler küçük kimyasal moleküllere göre membran proteinleriyle etkileşime daha yatkındır ve bu sayede daha yüksek etkinlik, seçicilik ve özgüllük gösterme gibi avantajlara ve bu avantajların yanında fiziksel ve kimyasal olarak daha düşük stabilite, vücuda verilmişlerinde düşük yarılanma süresi, biyoyararlanım, çözünürlük, membran permeabilitesi, agregat oluşturma ve immünojenik yanıtı sebep olma gibi

dezavantajlara sahiptir (Agyei ve ark., 2017). Bu problemler peptit yapılı etkin maddelerin parenteral yol haricindeki uygulamalarını zorlaştırmaktadır ve bu sorunu aşmak için yapıda PEGilasyon, hiperglikozilasyon ve mannozilasyon gibi kimyasal değişiklikler meydana getirilebileceği gibi polielektrolit kompleksleri gibi partiküler sistemler de kullanılabilir (Mitragotri ve ark., 2014).

Peptit ve proteinler amfoterik yapıları nedeniyle çevre koşullarına göre pozitif ya da negatif olarak yüklenebilir. Bu sayede proteinlerin, polielektrolitlerle titrasyonu sonucu kolaylıkla konjugasyonu sağlanabilir. Proteinlerin polielektrolit kompleksleri ile konjugasyonu, proteinin kompleks oluşturmadan önce aynı yüklü polielektrolitle karıştırılması ve sonrasında zıt yüklü polielektrolitle karıştırılması veya önceden oluşturulmuş polielektrolit kompleksinin yüzeyine adsorpsiyonu ile sağlanabilir (Bourganis ve ark., 2016). Polielektrolit komplekslerinin bu şekilde kendiliğinden oluşumu, konvansiyonel nanopartiküler sistemlerin üretiminde kullanılan toksik organik çözücülerin, yüksek sıcaklığın, kuvvetli çalkalama etkisinin ve kimyasalların peptitlerde meydana getirdiği stabilite ve biyoyumluluk problemlerinin elimine edilmesini sağlar (Thompson ve Cheng, 2011) ve bu oluşumda; polielektrolitin molekül ağırlığı, esnekliği, fonksiyonel gruplarının yapısı, yük yoğunluğu, hidrofilik-hidrofobik dengesi ve biyoyumluluğu gibi kimyasal özelliklerinin yanı sıra, reaksiyon ortamının pH'sı, iyonik kuvveti, bileşenlerin konsantrasyonları, karışımdaki molar oranları ve sıcaklık gibi birçok parametre etkilidir (Mansuroğlu ve ark., 2011).

1.4.4. Protamin

1.4.4.1. Protamin Hakkında Genel Bilgiler

Protamin, ortalama molekül ağırlığı 6-10 kDa arasında olan arjinince zengin katyonik doğal bir peptittir (Liu ve ark., 2011; Qi ve ark., 2012; Vighi ve ark., 2013; Ahmad ve ark., 2015; Liu ve ark., 2015). Çeşitli balık türlerinin sperminden elde edilir (Scheicher ve ark., 2015). Protamin nontoksik bir peptittir ve heparin antikoagülasyonu için antidot olarak parenteral yolla kullanımı FDA'den onay almıştır (Kim ve ark., 2013; Pali-Schöll ve ark., 2013; Shukla ve ark., 2013; Wang ve ark.,

2014). Protaminin yapısındaki amino asitlerin yaklaşık %90'ı arjininden oluşmaktadır. Arjinin intestinal bir proteaz olan tripsinin parçalama bölgelerinden birisidir. Bu nedenle, insülin gibi tripsin tarafından parçalanan proteinler protamin ile birlikte uygulandığında enzimatik yıkımlarının belirgin bir şekilde baskılandığı görülmüştür (Zhang ve ark., 2008).

Protamin, arjinince zengin viral proteinlere benzer şekilde membran translokasyon aktivitesine sahiptir ve bu özelliği sayesinde hücreye penetre olabilmektedir (Scheicher ve ark., 2015; Umerska ve ark., 2015). Non-toksik bir CPP olan protaminin kendisi hücre membranlarından geçebildiği gibi bağlandığı proteinik yapıların da hemen hemen tüm hücre tiplerinden geçişlerine izin vermiştir (Chang ve ark., 2001a; 2001b). Hücre kültürü ve hayvan çalışmaları protaminin TAT ile eşit hücre-internalizasyon potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (He ve ark., 2013). Deli'nin yaptığı çalışmada epitelyal tabakada yer alan sıkı bağlantı noktalarının açılmasını sağlayarak paraselüler geçişi arttırdığı gözlenmiştir (2009). Diğer katyonik lipidlerden ya da transfeksiyon ajanlarından farklı olarak, protamin non-immünojenik ve non-antijenik özelliğe sahiptir. Bu nedenle protaminin insülinin intestinal mukozal tabakadan geçişini iyileştirmek ve böylece sistemik biyoyararlanımını artırmak için etkili ve güvenli bir araç olarak kullanılabilceği düşünülmüştür (He ve ark., 2013).

1.4.4.2. Protamin Esaslı Partiküler Sistemler

Protaminin yukarıda bahsedilen özellikleri nedeniyle, etkin maddeler için etkili, güvenli ve ekonomik bir taşıyıcı olarak kullanımına olan ilgi giderek artmaktadır. Junghans ve arkadaşları (2000) 'proticle' adı verdikleri protamin-oligonükleotit nanopartiküllerini geliştirmiştir. Proticle'lar, 100-200 nm partikül büyüklüğü aralığında biyolojik olarak parçalanabilen nanopartiküllerdir ve antisens oligonükleotitler ve küçük peptitler gibi çeşitli aktif bileşiklerin taşınması için geliştirilip karakterize edilmişlerdir (Junghans ve ark., 2000; Lochmann ve ark., 2005; Weyermann ve ark., 2005; Wernig ve ark., 2008). Proticle'lar, protamin ve oligonükleotitler gibi zıt yüklü biyomoleküllerin sulu ortamda kendiliğinden bir araya

gelmesi ile oluşmaktadır. Pozitif yüklü protamin ile negatif yüklü DNA/RNA oligonükleotit iskeleti arasındaki güçlü iyonik etkileşmeler proticle oluşumunun temelini oluşturmaktadır (Junghans ve ark., 2000). İstenen özelliklere sahip nanopartiküllerin elde edilebilmesi, bileşenlerin kütle oranlarının optimizasyonu ile sağlanabilmektedir. Bileşenlerin konsantrasyonları nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, yükleme etkinliği, zeta potansiyeli ve transfeksiyon etkinliği gibi özelliklerini etkileyen en önemli parametredir. Bu yeni taşıyıcı sistemler enzimatik parçalanmaya karşı etkili koruma sağlamış, yüksek transfeksiyon hızı ve önemli derecede antisens etkinlik elde edilmiştir. Protamin, insanlarda non-toksik ve biyouyumlu olması nedeniyle gen transfeksiyonunu iyileştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Cao ve ark., 2013; Kim ve ark., 2013). Bir CPP olan protaminin yüksek arjinin içeriği nedeniyle hücre yüzeyindeki proteoglikanlara bağlanarak hücre alımı uyarmakla birlikte nükleer lokalizasyon sinyalleri oluşturması DNA'nın sitozolden çekirdeğe girişini artırmıştır. DNA ile kondanse olabilme özelliği, protaminin biyouyumlu doğal bir madde olarak gen taşıyıcı sistemlerde kullanımı için umut vaat edici olmuştur (Morán ve ark., 2015; Wang ve ark., 2015).

Protaminin oligonükleotitlerin yanısıra negatif yüklü heparin (Mori ve ark., 2010), hyaluronik asit (Umerska ve ark., 2014; Wang ve ark., 2015), sodyum aljinat (Kansal ve ark., 2013), kondroitin sülfat (Umerska ve ark., 2015) ve karragenan (Dul ve ark., 2015) gibi farklı makromoleküller ile kompleks nanopartikülleri oluşturma özelliğine sahip olduğu gösterilmiştir. Protamin ile hazırlanan nanopartiküller çapraz bağlayıcı ajan kullanımına ihtiyaç olmaksızın kendiliğinden oluşabilmektedir. Protaminin nanopartikül oluşumu için tek başına etkili bir çapraz bağlayıcı olarak rol aldığı düşünülmektedir. Tripolifosfat gibi bir çapraz bağlayıcının eklenmesi, protamin ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğünde ve stabilitesinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (González-Aramundiz ve ark., 2015).

Yapılan çalışmalar kolloidal sistemlerde protaminin stabilize edici etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Stabilitate çalışmaları sonucunda, protamin ile hazırlanan nanopartiküllerin +4°C'de en az 3 ay stabil oldukları belirlenmiştir. Protamin bazlı nanopartiküllerin fizyolojik koşullardaki stabiliteleri de incelenmiş ve en az 48 saat stabil oldukları görülmüştür (González-Aramundiz ve ark., 2015).

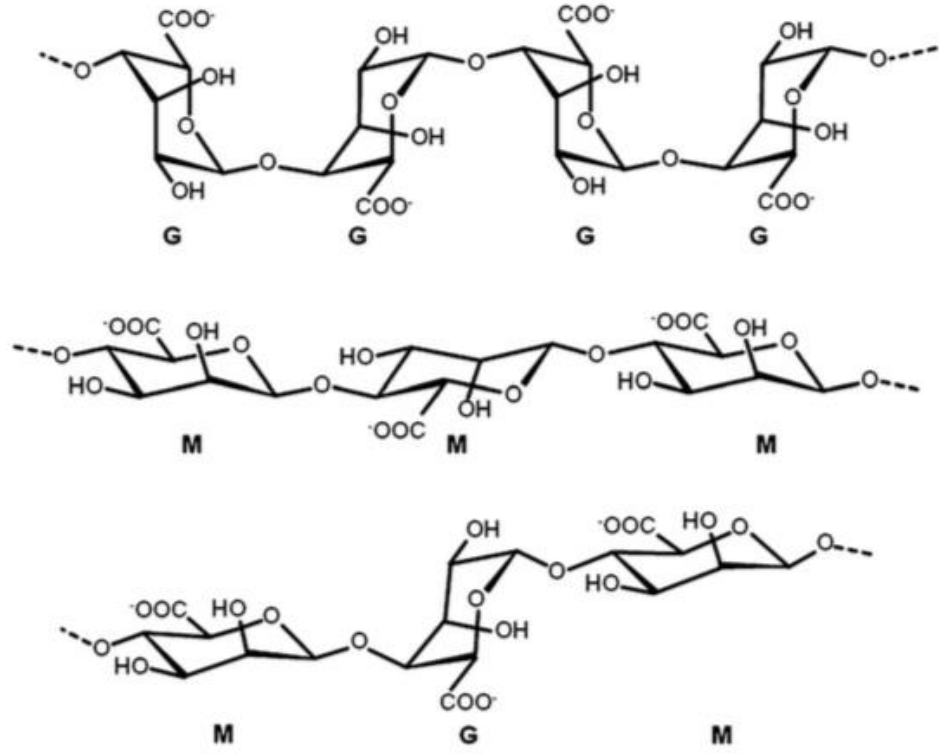
1.4.4.3. Protaminin İnsülin Formülasyonlarında Kullanımı

Protamin, insülin içeren formülasyonlarda halihazırda kullanılmaktadır. Protamin, protamin-çinko insülin ve NPH insülin oluşturmak üzere insülin ile kombine edilmiştir. Böylece daha uzun etkili insülin preparatları elde edilerek kan glukoz seviyesinde uzun süreli düşüş sağlanabilmiştir. Bu uzun etkili insülin preparatları subkutan enjeksiyon yolu ile uygulanmaktadır (Owens, 2011). Bununla birlikte, protaminin oral yol ile uygulanacak insülin formülasyonlarında kullanımına yönelik bugüne kadar yapılmış yalnızca iki çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların ilkinde, He ve arkadaşları (2013) insülinin gastrointestinal kanaldan absorpsiyonunu artırmak için düşük molekül ağırlıklı protamin ile konjugatlarını hazırlamışlardır. İnsülinin düşük molekül ağırlıklı protamin ile konjugatlarının hazırlanması gastrointestinal kanaldaki permeabilitesini önemli derecede artırmıştır. Sheng ve arkadaşları (2016) ise hazırladıkları insülin-protamin konjugatlarını PLGA nanopartiküllerine yüklemiştir. Serbest insülin ile karşılaştırıldığında, insülin-protamin konjugatlarının hazırlanması PLGA nanopartiküllerine yüklenen insülin miktarında önemli bir artışa neden olmamış, her iki durumda da yaklaşık %49 yükleme etkinliği elde edilmiştir. Bu durumun hidrofilik özellikteki insülin-protamin konjugatının hidrofobik özellikteki PLGA'ya olan düşük afinitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

1.4.5. Sodyum Aljinat

1.4.5.1. Sodyum Aljinat Hakkında Genel Bilgiler

Aljinatlar, genellikle *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* ve *Macrocystis pyrifera* türü kahverengi alglerden (Phaeophyceae) elde edilen doğal, β (1-4)-D-mannuronik asit (M) ve α -(1-4)-L-guluronik asitten (G) oluşan blok kopolimerlerdir.



Şekil 1.7. Aljinatın yapısındaki G-bloğu, M-bloğu ve aljinik asidin yapısı ve ardışık bloğun kimyasal yapısı

Aljinik asit, kahverengi alglerin seyreltik bazik bir çözelti ile ekstraksiyonuyla ve bakteriyel biyosentezle elde edilir. Bakteriyel biyosentezle elde edilen aljinatların yapısı, ekstraksiyonla elde edilen aljinatlara göre kimyasal ve fiziksel olarak daha iyi tanımlanmıştır. Bu durum aljinatların istenilen özelliklerde üretilmesini ve birçok biyomedikal uygulamada kullanılmasını sağlamaktadır (Lee ve Mooney, 2011).

Aljinik asitin sodyum bikarbonat, potasyum karbonat, magnezyum karbonat ve kalsiyum karbonat gibi değişik tuzlarla muamelesi sonucunda aljinat tuzları elde edilmektedir. Aljinatların molekül ağırlıkları 12-190 kDa arasında değişmektedir. Hazırlama yönteminin değiştirilmesiyle farklı molekül ağırlıklarına sahip aljinatlar elde edilmektedir. Sodyum aljinatla hazırlanan jel membranların iletkenlik, şişme kapasitesi ve viskoelastisitesi yapıdaki manuronik asit/guluronik asit oranına bağlı olarak değişir (Takka ve Acartürk, 1998; Tønnesen ve Karlsen, 2002). Aljinat ve türevleri biyolojik olarak parçalanabilen, biyouyumlu ve mukoadesif özelliklerinden dolayı etkin madde verilmesi, akut ve kronik yaraların kaplanması, iki ve üç boyutlu

memeli hücre kültürü modellerinin oluşturulması, kemik ve kırıldak rejenerasyonu ve doku mühendisliği gibi alanlarda günümüzde sıkça kullanılmaktadır (Lee ve Mooney, 2011; Nahar ve ark., 2017).

1.4.5.2. Sodyum Aljinatın Etkin Madde Verilişinde Kullanımı

Sodyum aljinat; çeşitli nazal, oral ve topikal yollarla etkin madde verilişinde kullanılmaktadır. Sodyum aljinat, mukoadezif özelliği sayesinde absorpsiyon arttırıcı ajan kullanmaksızın formülasyonun nazal kavitede kalış süresini arttırarak etkin maddelerin biyoyarlanımını arttırmaktadır (Farid ve ark., 2012; Nahar ve ark., 2017; Sarei ve ark., 2013). Sodyum aljinat krem ve jel gibi topikal formülasyonlarda viskozite arttırıcı ve süspande edici ajan olarak kullanılırken yağ/su tipi emülsiyonlarda stabilize edici ajan olarak kullanılır. Tablet formülasyonlarında, hem bağlayıcı hem de dağıtıcı olarak, kapsül formülasyonlarında ise seyreltici olarak kullanılmaktadır. Sodyum aljinat ayrıca sürekli salım sağlayan oral formülasyonların hazırlanmasında da etkin maddelerin tabletlerden, kapsüllerden ve sulu süspansiyonlardan salımını geciktirme amacıyla kullanılmaktadır (Cable, 2009).

Protein yapısındaki etkin maddelerin aljinat esaslı formüllere yapısını denatüre etmeyecek koşullar altında kolaylıkla yüklenebilmesi, aljinatın gastrik pH'da büzülüp enkapsüle olan etkin maddeyi salmaması, toksik olmaması, ucuz ve mukoadezif özellikte olması aljinatı oral yolla protein verilişi için uygun bir aday haline getirmiştir (Chavarri ve ark., 2010; Jeon ve Park, 2009; Mukhopadhyay ve ark., 2015; Nahar ve ark., 2017). Aljinat bazlı sistemler düşük enkapsülasyon etkinliği ve hızlı salım gösterir. Enkapsülasyon etkinliğini arttırmak ve kontrollü protein salımı sağlamak için kitozan, dekstran sülfat, pektin ve metil selüloz gibi polimerler formülasyonda aljinatla beraber kullanılmaktadır (Martins ve ark., 2007). Kitozan kaplı aljinat esaslı mikroküreler hemoglobini gastrik ortamda korumuş ve intestinal ortamda kontrollü salımını sağlamıştır (Ribeiro ve ark., 2005). Oral yolla probiyotik bakteri verilişinde ise aljinat mikrokapsüllerinin ve kitozan kaplı aljinat mikrokapsüllerinin probiyotik

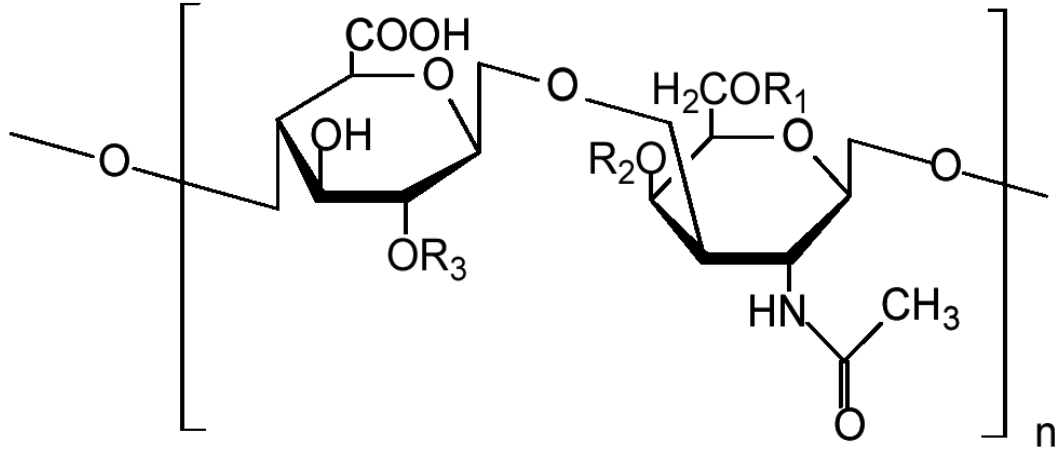
bakterilerin gastrik sıvıda hayatta kalma oranını arttırdığı ve intestinal ortamda salım hızını düşürdüğü gözlenmiştir (Cook ve ark., 2011).

İnsülinin oral yoldan verilmesi için hazırlanan aljinat bazlı mikrokürelere selüloz asetat ftalat (CAP), Eudragit® L100 (EL100), sodyum karboksimetilselüloz (Na-CMC), polifosfat (PP), dekstran sülfat (DS) ve selüloz sülfat (CS) gibi anyonik polimerler eklenmiş, yapı kitozanla kaplanmış, bu formülasyonlar üzerinde enkapsülasyon etkinliği ve gastrointestinal pH'da çözünme hızı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Formülasyona Na-CMC, PP, DS ve CS eklenmesinin enkapsülasyon etkinliğini arttırdığı, DS ve CS eklenmesinin gastrik pH'da insülin salımını engelleyip intestinal pH'da salımı sağladığı gözlenmiştir (Silva ve ark., 2006). Yapılan başka bir çalışmada (Sarmiento ve ark., 2007) ise aljinat ve kitozan esaslı nanopartiküler sistemlerin insülinin aktivite göstermesi için gerekli olan sekonder yapısını koruyarak biyoaktivitesini arttırdığı, sadece kitozandan oluşan insülin yüklü nanopartiküler sistemlere göre daha uzun süre hipoglisemik etki sağladığı belirtilmiştir. Woitiski ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2011) ise insülin yüklü sodyum aljinat+dekstran sülfat+poloksamer+kitozan yapısındaki albümin kaplı nanopartiküllerin intestinal epitelyal tabakayı taklit etmek amacıyla kullanılan Caco-2 ve Caco-2/HT29 kokültüründen serbest insüline göre daha çok insülin geçişi sağladığı gözlenmiştir. Bu durumun aljinat ve kitozanın mukoadezif özellikte olması, kitozanın enterositler arasındaki sıkı bağlantı noktalarını açarak permeasyonu arttırabilecek olması ve albümin katmanının insülini enzimatik degradasyondan korumasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

1.4.6. Kondroitin Sülfat

1.4.6.1. Kondroitin Sülfat Hakkında Genel Bilgiler

Kondroitin sülfat (KS), tekrarlayan 4- ya da 6- pozisyonlarından sülfatlanmış D-glukuronik asit ve N-asetil glukozamin disakkarit birimlerinden oluşan, glukozaminoglikan ailesinden bir polisakkarittir (Oprea ve ark., 2009).



Şekil 1.8. Kondroitin sülfatın kimyasal yapısı

Kondroitin sülfat başlıca sığır trakesi ve köpek balığı kıkırdağından elde edilse de tavuk omurga kıkırdağı gibi kaynaklar da kondroitin sülfat eldesi için kullanılmaktadır (Luo ve ark., 2002). Kondroitin sülfat, elde edildiği kaynağa bağlı olarak yapısında farklı sülfatlanmış ve sülfatlanmamış disakkaritler içerebilir. Kondroitin sülfat zincirleri hücre yüzeyinde ve ekstraselüler matrikste önemli biyolojik işlevler gösterir. Bu işlevlere büyüme faktörü sinyalinin düzenlenmesi, retinada nöronal yolakların düzenlenmesi, integrinin adeziv fonksiyonunun düzenlenmesi, B-hücrelerinin, monositlerin ve plazminojenin aktivasyonu örnek olarak verilebilir (Volpi, 2002; Yamada ve Sugahara, 2008). Kondroitin sülfat, yüksek viskoziteye sahip bir mukopolisakkarittir. Suda çözünür (100 mg/ml) ve molekül ağırlığı 50-100 kDa arasında değişir. Oral yolla alımda düşük molekül ağırlığına sahip formu, yüksek molekül ağırlığına sahip formuna göre daha yüksek absorpsiyon oranına sahiptir (Bishnoi ve ark., 2016).

Kondroitin sülfat, kondrosit metabolizmasını uyarak kolajen ve proteoglikan sentezini, sinoviyal hücrelerde hyaluronik asit üretimini ve dolayısıyla sinoviyal sıvı miktarını ve viskozitesini artırır. Bunlarla birlikte, kondroitin sülfatın kıkırdak yıkımını inhibe edip yapımını uyarması kıkırdak rejenerasyonunda kullanılabilecek bir polimer olduğunu göstermektedir (Kwon ve Han, 2016). Farmakolojik olarak anti-enflamatuvar etki göstermesi ve hasar görmüş kemikte rejenerasyon kapasitesini

arttırması nedeniyle kemik dolgusu formülasyonlarının geliştirilmesinde kullanılmıştır (Schneiders ve ark., 2007).

1.4.6.2. Kondroitin Sülfatın Etkin Madde Verilişinde Kullanımı

Kondrotin sülfatın etkin madde ve gen verilişinde kullanımı biyolojik olarak geçimli ve dağılıbilir olması sebebiyle gün geçtikçe artmaktadır. Yapısında karboksil ve hidroksil gibi grupların bulunması yapıda asetilasyon ya da histamin ve deoksikolik asit gibi hidrofobik grupların konjugasyonu ile hidrofilitiyi değiştirmeye yönelik değişiklikler yapmayı kolaylaştırmaktadır.

Kondrotin sülfatın belirli özellikleri etkin maddelerin istenilen bölgeye hedeflendirilmesini kolaylaştırmaktadır. Örneğin kolonik mikroflorada yıkıma uğraması kolona hedeflendirme yapılan sistemler üzerinde çalışılmasını, tümör hücrelerinin yüzeyinde sağlıklı hücrelere göre daha fazla bulunan CD4+ antijenine bağlanması sayesinde tümöre antineoplastik etkin maddelerin hedeflendirilmesini sağlayan sistemler üzerine çalışılmasını ve halihazırda ekstraselüler matriksin bir bileşeni olması sebebiyle eklem kıkırdağında etkin maddenin daha uzun süre tutulmasına imkan sağlamaktadır (Varghese ve ark., 2016; Zhao ve ark., 2015).

Kondroitin sülfat küçük moleküllü etkin maddelerin verilişinde kullanıldığı gibi peptit ve protein yapılı etkin maddelerin verilişinde de kullanılabilir. Umerska ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2015), anyonik yapıdaki kondroitin ve katyonik yapıdaki protamin arasında oluşan yüksek yükleme etkinliğine sahip ve kontrollü salım sağlayan nanopartiküler polielektrolit kompleksleri salmon kalsitonin verilişi için geliştirilmiştir. Oral insülin verilişi için yapılan çalışmada ise insülin yüklü kondroitin sülfat kaplı altın nanopartiküllerin diyabetik sıçanlarda kan glukoz seviyesini insülin çözeltisine göre daha fazla düşürdüğü ve plazmadaki seviyesinin 6 kat daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Cho ve ark., 2014).

1.5. Deney Tasarımı ve Taguchi Methodu

Deney tasarımı (Design of Experiments, DoE), denemelerden sağlanan verilerden etkili şekilde bilgi elde edilmesi için yapılacak denemeleri planlama stratejisi olarak tanımlanan, farklı faktörlerle (üretim aşaması parametreleri, formülasyon bileşenleri, bağımsız değişken vb.) bu faktörlerin etki ettiği cevap değişkenlerinin (yanıt değişkeni, çıktı, ürün kalite özelliği vb.) arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılan bir yöntemdir (Demir ve ark., 2017). Deney tasarımı konsepti, 1920'lerde istatistikçi Ronald Fisher tarafından ortaya konup tarım alanında kullanılmış ve 1950'li yıllarda sentetik kimya, biyoloji, genetik ve formülasyon geliştirme alanlarında kullanılmaya başlanmıştır (Hald, 1998; Rauf, 2015).

Deney tasarımları, her deneyde bir faktörün değiştirilip diğer faktörlerin sabit tutularak her bir faktörün etkisinin ayrı ayrı incelendiği konvansiyonel ve birden fazla faktörün aynı anda incelenebildiği istatistiksel deney tasarımları olarak iki başlıkta incelenebilir (Yerlikaya, 2013).

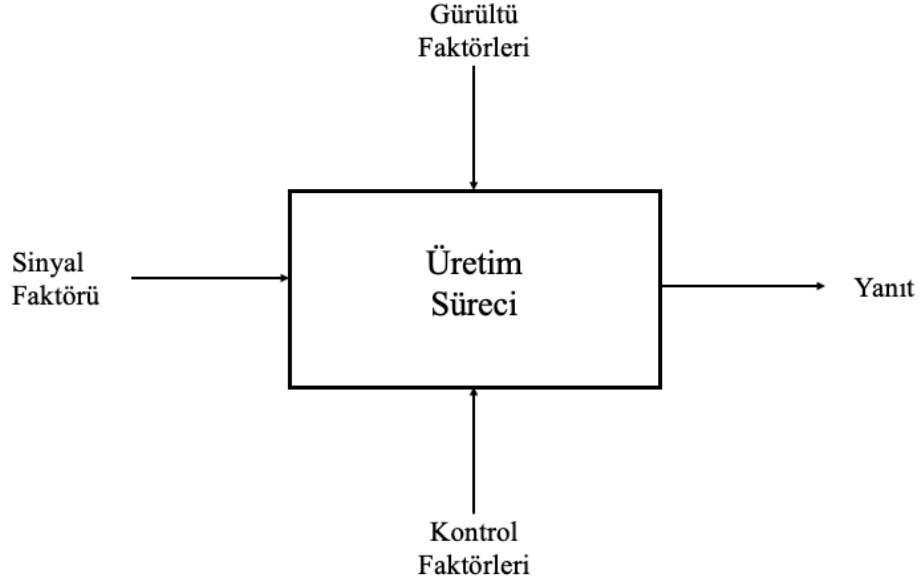
İstatistiksel deney tasarımı yöntemlerinin kullanımının avantajları şu şekilde sayılabilir (Politis ve ark., 2017);

- Minimum kaynak kullanımı ile proses bilgisini en üst düzeye çıkarmak,
- En etkili şekilde doğru bilgi eldesini sağlamak,
- Faktörler arası etkileşimi tanımlamak,
- Her faktörün göreceli önemini tanımlamak,
- Tasarım aralığı içinde sürecin gidişatını tahmin etme olanağı sağlamak,
- Kritik proses parametreleri (Critical Process Parameters, CPPs) ve kritik kalite özellikleri (Critical Quality Attributes, CQA) arasında sağlam bir sebep-sonuç ilişkisi kurmayı sağlamak,
- Uygun seçimle kritik kalite özelliklerinin optimizasyonunu sağlamak.

Taguchi Metodu

Bir formülasyonun partikül büyüklüğü, yükü, yükleme etkinliği, salım profili ve stabilitesi gibi karakteristik özelliklerinin kontrol edilebilir olması formülasyonun geliştirilmesinde kritik bir rol oynar. Bu nedenle formülasyon ve üretim sürecinde yer alan parametrelerin sistemik bir şekilde değerlendirilmesi, istenilen özelliklere sahip bir taşıyıcı sistemin geliştirilmesinde önem arz etmektedir. Günümüzde çeşitli deney tasarımı metodları farklı parametrelerin aynı anda değerlendirilmesi ve az sayıda deneyle maksimum bilginin elde edilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Yang ve ark., 2016).

Taguchi metodu, Genichi Taguchi tarafından geliştirilen istatistiksel yöntemlerle üretilen ürünlerin kalitesini arttırmakta ve günümüzde mühendislik, biyoteknoloji, pazarlama ve reklamcılık gibi alanlarda uygulanmaktadır. Taguchi metodunun temel amacı, kontrol edilemeyen koşullarda güvenilir olan sağlam sistemler tasarlamaktır. Metot, tasarım parametrelerini (kontrol faktörleri olarak bilinir) optimum seviyelere ayarlamayı amaçlar; böylece sistem kontrol edilmesi zor veya imkansız olan gürültü faktörlerine duyarsız yani sağlam olur (Karna ve Shai, 2012). Bu metot, diğer metotlara göre ürün kalitesinin iyileştirilmesini aynı anda birkaç parametrenin optimizasyonunu sağlayarak daha az sayıda deneme ile sağlama imkanı sağlar (Canıyılmaz ve Kutay, 2003; Pundir ve ark., 2018). Fraksiyonel faktöriyel tasarıma dayanan Taguchi metodu, bağımsız değişkenleri kontrol edilebilir (kontrol edilebilir) ve kontrol edilemez veya gürültü (gerçek koşullarda kolayca kontrol edilemez, ancak test koşullarında kontrol edilebilir) değişkenler olmak üzere iki gruba ayırır ve bu iki değişken grubunun ürünlerin kalitesi üzerindeki etkisini inceleyerek deneylerin optimal tasarımına basit, etkili ve sistematik bir yaklaşım sunar (Sadrjavadi ve ark., 2018).



Şekil 1.9. Taguchi metodunun üretim sürecinde kullanımı

Taguchi metodu ve klasik metodlar arasında bazı farklar bulunmaktadır. Bu farklardan birinci ve en önemlisi, Taguchi metodunda yapılan deneylerde ortogonal dizilişlerin etki parametrelerinin yeniden oluşturulması için kullanılmasıdır. Diğerleri ise çeşitli “signal to noise (S/N)” oranlarının bir Taguchi uygulamasında, hedeflenen performans etrafındaki değişkenliği ölçmek için kullanılmasıdır.

Taguchi yöntemi dört adımda uygulanmaktadır (Güral, 2003);

- 1) İlk olarak ürün/proses, önemli kalite özellikleri ve tasarım parametreleri ile ilgili bir beyin fırtınası yapılır.
- 2) Tasarım ve deney aşamasına geçilir.
- 3) En iyi durumu saptamak için sonuçlar analiz edilir.
- 4) Son olarak testi onaylamak için en iyi şartlar kullanılır.

Bu çalışmanın amacı, insülinin oral olarak uygulanabilmesi için, öncelikle protamin ve polianyonik polimerler ile insülin yüklü nanopartiküllerin hazırlanması ve böylelikle insülinin gastrointestinal kanaldaki enzimlerin neden olacağı degradasyona karşı koruyarak epitel hücrelerden geçişinin sağlanması, optimum özelliklere sahip olduğu belirlenen nanopartiküllerin bağırsağa hedeflendirilmesi

amacıyla sert jelatin kapsüller içine yerleştirilerek kapsüllerin enterik olarak kaplanması ve bu sayede enjeksiyon gerektirmeyen ve uygulama kolaylığı sağlayan etkin ve güvenilir bir diyabet tedavisi için oral yol ile uygulanabilir insülin formülasyonlarının geliştirilmesidir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez Çalışmasında Kullanılan Materyaller

2.1.1. Kullanılan Biyolojik ve Kimyasal Maddeler

Kullanılan Madde	Marka
Asetik asit	Sigma, Almanya
Asetonitril	Sigma, Almanya
Bakır(II) sülfat pentahidrat	Riedel-de Haen, Almanya
Bikininik asit (BCA)	Thermo Scientific, ABD
Brom fenol mavisi	Merck, Almanya
Eudragit L100-55	Evonik, Almanya
Fluorescein isothio-cyanate-dextran	Sigma, Almanya
Hidroklorik asit	Sigma, Almanya
Metanol	Carlo-Erba, Fransa
Potasyum dihidrojen fosfat	Carlo-Erba, Fransa
Protamin sülfat	Sigma, Almanya
Rekombinant insan insülini	SAFC, İsviçre
Sert jelatin kapsül	Capsugel, ABD
Sodyum aljinat (Düşük viskozite)	Sigma, Almanya
Sodyum asetat	Sigma, Almanya
Sodyum bikarbonat	Merck, Almanya
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma, Almanya
Sodyum hidroksit	Sigma, Almanya
Sodyum karbonat	Merck, Almanya
Sodyum tartarat	Sigma, Almanya
Streptozotosin	Sigma, Almanya
Tris bazı	Sigma, Almanya

2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

Kullanılan Alet ve Malzeme	Marka
----------------------------	-------

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)	ezAFM, Nanomagnetics Inst., İngiltere
Buzdolabı	Vestel, Türkiye
Cam malzeme	İldam, Türkiye
Çalkalamalı inkübatör	Jeio Tech, Kore
Derin dondurucu	Heto, Almanya
Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)	Shimadzu DSC-60, Japonya
Elektroforetik jel sistemi	Thermo Scientific, ABD
Etüv	Heraus, Almanya
Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR)	Agilent, Amerika
Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)	FEI Tecnai G2
Hassas terazi	Sartorius, Almanya
Kan glukoz ölçüm cihazı	Accu-Chek®, Almanya
Liyofilizatör	Christ Gamma 2-16 LSC, Kanada
Manyetik karıştırıcı	Daihan Scientific, Kore
Mikropipet (1-10 µl)	Eppendorf, Almanya
Mikropipet (10-100 µl)	Eppendorf, Almanya
Mikropipet (100-1000 µl)	Eppendorf, Almanya
Mikropipet ucu	Eppendorf, Almanya
Mikroplaka (96 kuyucuklu)	Carl-Roth, Almanya
Mikroplaka okuyucusu	MDS Spektra Max 190, ABD
pH metre	Mettler Toledo Seven2go, İsviçre
Partikül büyüklüğü ölçüm cihazı	Malvern Zetasizer Nano-ZS
Santrifüj	Sigma 2-16P, Almanya
Sirküler dikroizm (CD)	Jasco 815, Japonya
Ultrasonik banyo	Ultrasonic LC 30, Almanya
X-ışını difraktometresi (XRD)	Panalytical Expert Pro MDP, İngiltere
Vorteks karıştırıcı	Heidolph Reax Top, Almanya

2.1.3. Kullanılan Deney Hayvanları

In vivo hayvan çalışmaları Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 10.08.2016 tarihli ve 2016-17-158 numaralı onay dahilinde gerçekleştirilmiştir. 24 adet 350-450 gram ağırlığında, erişkin erkek Sprague Dawley

cinsi sıçan kullanılmıştır. Kullanılan deney hayvanları Bilkent Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edilmiştir. Çalışmalar Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

2.1.4. Çalışmalarda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

pH 4,0 Asetat Tamponu (EP 7)

0,1 M Asetik asit çözeltisi.....410 ml

0,1 M Sodyum asetat çözeltisi.....90 ml

pH 6,8 Fosfat Tamponu (EP 7)

0,2 M KH_2PO_4 çözeltisi.....250 ml

0,2 M NaOH çözeltisi.....112 ml

SDS.....100 mg

Distile su.....y.m.....1000 ml

pH 1,2 HCl Tamponu (USP 30)

0,2 M KCl çözeltisi.....250 ml

0,2 M HCl çözeltisi.....425 ml

SDS.....400 mg

Distile su.....y.m.....1000 ml

ph 6,8 Tris Tamponu (EP 7)

Tris.....12,1 g

Distile su.....100 ml

Çözeltinin pH'sı 6 N HCl çözeltisi kullanılarak 6.8'e ayarlanır.

Bromfenol Mavisi Çözeltisi (%1'lik)

Bromfenol Mavisi.....10 mg

Metanol.....1 ml

Yükleme Jel Çözeltisi

Akrilamid-N,N metilen bisakrilamid çözeltisi.....0,33 ml

1 M (pH 6,8) tris tamponu.....0,25 ml

%10 amonyum persülfat çözeltisi.....20 µL

TEMED.....2 µL

Distile su.....1,4 ml

Elektroforez Tamponu

Tris.....	3,2 g
Glisin.....	18,8 g
Distile su.....y.m.....	1000 ml

Örnek Yükleme Tamponu

1 M Tris çözeltisi (pH 6,8).....	2,5 ml
Gliserol.....	2 ml
% 1'lik Bromfenol mavisi.....	1 ml
Distile su.....	4,5 ml

Jel Boyama Çözeltisi

Coomassie mavisi.....	0,25g
Metanol.....	45 ml
Glasiyal asetik asit.....	10 ml
Distile su.....y.m.....	100 ml

Arındırma Çözeltisi

Metanol.....450 ml

Glasiyal asetik asit.....450 ml

Distile su.....100 ml

2.2. Yöntemler

2.2.1. Mikrobikinoninik Asit (MikroBCA) Analiz Yöntemi Kullanılarak Etkin Maddenin Standart Doğru Denklemine Hazırlanması

Gerekli re ajanlar:

Re ajan A

Sodyum karbonat.....8 g

Sodyum tartarat.....1,6 g

Distile su.....ym.....100 ml

Re ajan B

BCA'nın % 4'lük sulu çözeltisi

Re ajan C

Bakır-II sülfat pentahidratın % 4'lük sulu çözeltisi

İnsülinin mikroBCA ile analizi için stok çözeltiler % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi, pH 4,0 asetat tamponu ve %0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponu içerisinde 100 µg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden hareketle belli seyreltmeler yapılarak 4 – 48 µg/ml aralığında 9 farklı konsantrasyonda çözelti elde edilmiştir. Hazırlanan bu çözeltilerden 3 paralel olacak şekilde mikroplaktaki kuyucuklara 150'şer µl ilave edilmiştir. Daha sonra her bir kuyucuğa

150 µl reajan A, reajan B ve reajan C karışımından oluşan mikroBCA ajanı (25 kısım reajan A + 24 kısım reajan B ve 1 kısım reajan C) ilave edilmiş ve mikrolaka 60 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda plaka önce oda sıcaklığına soğutulmuş, daha sonra mikrolaka okuyucusunda 562 nm’de seyreltmelerin absorbansı ölçülmüştür. Her bir konsantrasyon ve bu konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri en küçük kareler yöntemine göre değerlendirilip standart doğru denklemleri hesaplanmıştır.

2.2.2. MikroBCA Analiz Yönteminin Validasyonu

İnsülinin mikroBCA analiz yöntemi ile gerçekleştirilen miktar tayininin validasyonunda ICH Q2(R1) kılavuzunda yer alan parametreler incelenmiştir.

2.2.2.1. Doğrusallık ve Aralığı

Doğrusallık, verilen aralıklarda, örnekteki madde konsantrasyonu ile test sonuçlarının doğru orantılı sonuçlar sağlayabilmesidir. Doğrusallığın saptanmasında en az 5 konsantrasyon gereklidir. Eğer doğrusal bir ilişki mevcutsa, analiz sonuçları, en küçük kareler yöntemiyle regresyon doğrusunun hesaplanması gibi uygun istatistiksel metodlarla değerlendirilebilmektedir. Korelasyon katsayısı, kesişim, regresyon doğrusunun eğimi ve artık kareler toplamı hesaplanmalıdır (ICH Q2(R1)).

İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi, pH 4,0 asetat tamponu ve % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponu içinde ayrı ayrı 100µg/ml konsantrasyonda hazırlanmış stok çözeltilerinden seyreltmeler yapılarak her bir ortam için 4 – 48 µg/ml konsantrasyon aralığında 9 farklı konsantrasyonda çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltilerin mikroBCA yöntemi ile okunan absorbans değerleri Graphpad Instat istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

2.2.2.2. Doğruluk ve Geri Elde

Kullanılacak yöntemle elde edilen sonuçların gerçek verilere yakınlığı, o analitik yöntemin doğruluğudur. Gerçeklik olarak da adlandırılır. Analiz edilen maddenin bilinen miktar tayini yöntemi ile % geri elde değerleri bulunarak hesaplanır. Doğruluk, belirli aralığı kapsayan en az üç konsantrasyon noktasında en az üçer kez hazırlanan numune miktarlarının yüzde geri eldelerinin belirlenmesiyle tayin edilmektedir (ICH Q2(R1)).

2.2.2.3. Kesinlik

Bir analitik işlemin kesinliği, aynı örnekten alınan numuneler için birbirini takip eden ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığı anlamına gelmektedir. Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik ile açıklanır (ICH Q2(R1)).

Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, kısa zaman aralığı içinde ve aynı çalışma koşullarındaki kesinliği ifade eder. Numune hazırlamadan gelebilecek hataları gösteren bir kesinlik parametresidir.

İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi, pH 4,0 asetat tamponu ve % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponu içerisindeki 100 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi kullanılarak 8 µg/ml, 20 µg/ml ve 40 µg/ml konsantrasyonda üç farklı çözeltisi hazırlanmıştır. Bu üç farklı konsantrasyon 6 kez okunarak numunelerin hesaplanan ve bulunan konsantrasyon, % geri elde değerleri ve % geri elde değerlerinin ortalama, standart sapma (SS) ve bağıl standart sapma (% BSS) değerleri hesaplanmıştır.

Ara kesinlik

Ara kesinlik laboratuvar içi deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik parametresidir. Farklı günlerde, farklı analistler ve farklı cihazlar kullanılarak saptanan kesinliktir. Deneyler arası veya günler arası kesinlik olarak da adlandırılır.

İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi, pH 4,0 asetat tamponu ve % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponu içerisindeki miktar tayini yönteminin ara kesinliğini belirlemek için, insülinin 100 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle 8 µg/ml, 20 µg/ml ve 40 µg/ml konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri, iki farklı günde 6 kez okunarak kalibrasyon denkleminde yerine konulmuştur. Bulunan konsantrasyonların ortalama, SS ve % BSS değerleri hesaplanmıştır.

2.2.2.4. Teşhis ve Tayin Sınırları

Bir analitik yöntemin teşhis sınırı, analizi yapılan etkin maddenin teşhis edilebilen ama tayin edilemeyen en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır (ICH Q2(R1)).

İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi, pH 4,0 asetat tamponu ve % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminin teşhis sınırını belirlemek amacıyla, 100 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle 9 farklı konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmış ve 3 paralel olacak şekilde ölçümleri yapılarak, konsantrasyonlara karşı elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrularının eğim ve kesişim değerlerinin ortalama ve SS değerleri bulunduktan sonra aşağıdaki denklem kullanılarak teşhis sınırları hesaplanmıştır.

$$LOD = 3,3 \sigma/s$$

σ : Regresyon doğrularının kesişim değerlerinin SS'ı

s : Kalibrasyon eğrisinin eğimi

Bir analitik yöntemin tayin sınırı, analizi yapılan etkin maddenin kabul edilebilir aralıktaki doğruluk ve kesinlikte, kantitatif olarak tayin edilebilen en düşük miktardır (ICH Q2(R1)).

İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi, pH 4,0 asetat tamponu ve % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminin tayin sınırını belirlemek amacıyla, 100 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle 9 farklı konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmış ve 3 paralel olacak şekilde ölçümleri yapılarak, konsantrasyonlara karşı elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrularının eğim ve kesişim değerlerinin ortalama ve SS değerleri bulunduğundan sonra aşağıdaki denklem kullanılarak tayin sınırları hesaplanmıştır.

$$LOQ = 10 \sigma/s$$

σ : Regresyon doğrularının kesişim değerlerinin SS'ı

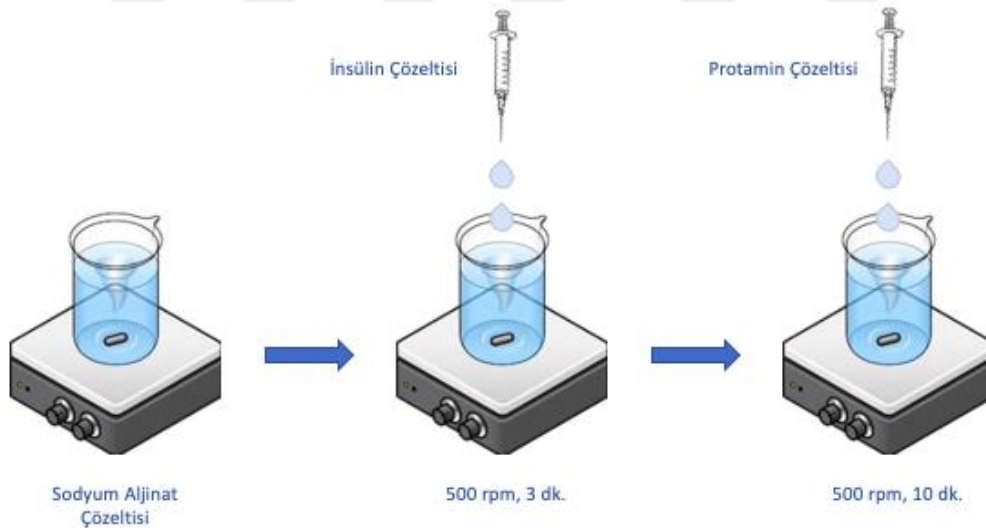
s : Kalibrasyon eğrisinin eğimi

2.2.2.5. Seçicilik

İn vitro deneylerde insülin miktar tayini yapılırken nanopartikül formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerin insülinin mikroBCA ile analizinde girişim yapıp yapmadığını belirlemek için her bir yardımcı madde için mikroBCA analizi yapılarak absorbans verip vermedikleri kontrol edilmiştir.

2.2.3. Nanopartiküllerin Hazırlanması

Rekombinant insan insülini içeren nanopartiküller, iyonik çapraz bağlama yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır (Umerska ve ark., 2014; Umerska ve ark., 2015; Wang ve ark., 2015). Bu amaçla, anyonik polimerlerin (sodyum aljinat veya kondroitin sülfat) pH 4,0 asetat tamponunda farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmıştır. Benzer şekilde, katyonik polimer olarak kullanılan protamin sülfatın da pH 4,0 asetat tamponu içerisinde belirli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmıştır. Protamin sülfat çözeltisi manyetik karıştırıcıda karışmakta olan anyonik polimer çözeltisine eklenerek 10 dakika boyunca karıştırılmıştır. Karıştırma oda sıcaklığında ($25\pm 3^{\circ}\text{C}$) gerçekleştirilmiştir. İnsülin içeren nanopartikül formülasyonlarında, insülin 0,1 N HCl çözeltisinde çözüldükten sonra anyonik polimer çözeltisine eklenmiştir. Elde edilen nanopartikül dispersiyonları Vivaspin 20 santrifüj tüpleri kullanılarak 4500 rpm'de 1 saat süre ile santrifüj edilmiştir. Elde edilen nanopartiküller daha sonra distile su ile yıkanıp -40°C 'de dondurularak 48 saat süreyle liyofilize edilmiştir.



Şekil 2.1. Nanopartikül hazırlanışının şematik olarak gösterimi

2.2.4. Çalışılan Nanopartikül Formülasyonları

İnsülin içeren nanopartiküllerin hazırlanması aşamasında, öncelikle nanopartiküllerimizi hazırlamak için kullanmayı planladığımız iyonik çapraz bağlama

yöntemi ile insülin içeren nanopartikülleri hazırlayıp hazırlayamayacağımızı belirlemek amacıyla anyonik polimer olarak sodyum aljinat ve katyonik polimer olarak protamin kullanarak ön denemeler yapılmıştır. Bu amaçla sodyum aljinatın % 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 ve 0,5 (a/h) olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda çözeltisi kullanılarak nanopartiküller hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının bileşimleri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Farklı konsantrasyonlarda sodyum aljinat ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları

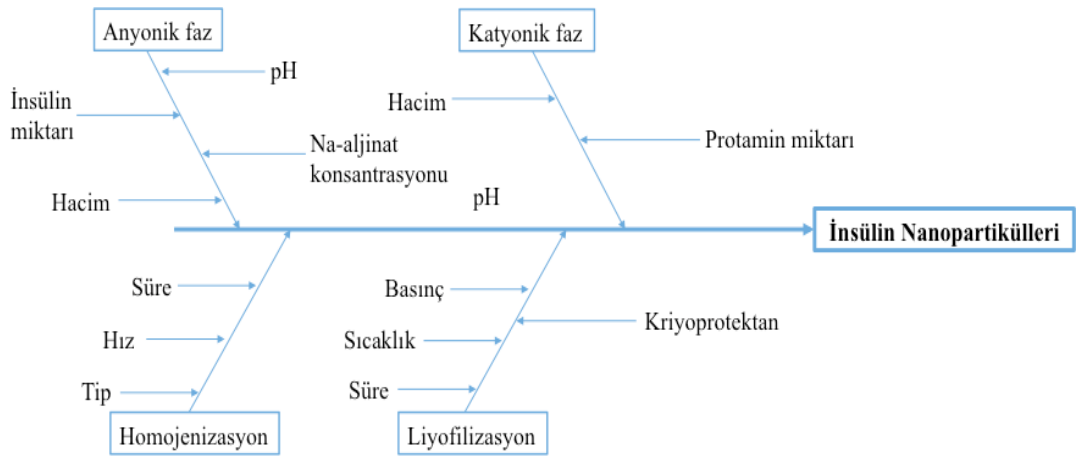
Formülasyon Kodu	Sodyum Aljinat Konsantrasyonu (% a/h)	Protamin Miktarı (mg/ml)	İnsülin Miktarı (mg/ml)
SA1	0,1	1	1
SA2	0,2	1	1
SA3	0,3	1	1
SA4	0,4	1	1
SA5	0,5	1	1

Çalışmamızda, bir diğer polianyon olan kondroitin sülfat ile de nanopartiküller hazırlanmıştır. Bu formülasyonlar sodyum aljinat içeren nanopartiküllerle benzer şekilde hazırlanmış ve in vitro karakterizasyonları yapılmıştır. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının bileşimleri Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Kondroitin sülfat içeren nanopartikül formülasyonları

Formülasyon Kodu	Kondroitin Sülfat Miktarı (mg/ml)	Protamin Miktarı (mg/ml)	İnsülin Miktarı (mg/ml)
CS1	3	1,2	1,5
CS2	3	1,2	3
CS3	3	1,2	4,5

Yapılan ön çalışmalar ile iyonik çapraz bağlama yöntemi kullanılarak insülin içeren nanopartikül formülasyonlarının hazırlanabildiği belirlendikten sonra, optimum özelliklere sahip nanopartikül formülasyonunun hazırlanabilmesi için Taguchi deney tasarımı kullanılmıştır. Bu amaçla, öncelikle insülin içeren nanopartiküllerin özelliklerini etkileyebilecek formülasyon ve proses parametrelerini belirlemek için Ishikawa diyagramı oluşturulmuştur (Şekil 2.1). Oluşturulan Ishikawa diyagramı üzerinde yapılan değerlendirme ve literatür incelemeleri sonucunda sodyum aljinat konsantrasyonunun (% a/h), sodyum aljinat/protamin oranının ve insülin miktarının nanopartiküllerin özelliklerini etkileyebileceği öngörülerek bu faktörlerin anlamlılığı Taguchi deney tasarımı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmeye çalışılmıştır.



Şekil 2.2. Ishikawa diyagramı

Doğru ve dengeli bir deney tasarımı için faktörlerin seviyeleri belirlenmiştir. Belirlenen seviyeler Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Taguchi deney tasarımına ait faktörler ve seviyeleri

Faktörler	Seviyeler		
	1	2	3
Sodyum aljinat konsantrasyonu (% a/h)	0,1	0,2	0,3
Sodyum aljinat/protamin oranı	3,1	4,2	6,3
İnsülin miktarı (mg)	1,5	3	4,5
Karıştırma hızı (rpm) (Sinyal faktörü)*	400	500	

Bu seviyeler belirlendikten sonra uygun ortogonal dizi olarak L9 dizisi seçilmiştir. L9 dizisi ve iki seviyeli sinyal faktörü dikkate alındığında hazırlanması gereken formül sayısı 18 olarak hesaplanmıştır. Bu tasarıma göre hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait bileşimler Çizelge 2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2.4. İnsülin içeren nanopartikül formülasyonlarının bileşimleri

Formülasyon Kodu	Sodyum aljinat konsantrasyonu (% a/h)	Sodyum aljinat/protamin oranı	İnsülin Miktarı (mg)	Karıştırma hızı (rpm)
T1	0,1	3,1	1,5	400
T2	0,1	3,1	1,5	500
T3	0,1	4,2	3	400
T4	0,1	4,2	3	500
T5	0,1	6,3	4,5	400
T6	0,1	6,3	4,5	500
T7	0,2	3,1	3	400
T8	0,2	3,1	3	500
T9	0,2	4,2	4,5	400
T10	0,2	4,2	4,5	500
T11	0,2	6,3	1,5	400
T12	0,2	6,3	1,5	500
T13	0,3	3,1	4,5	400
T14	0,3	3,1	4,5	500
T15	0,3	4,2	1,5	400
T16	0,3	4,2	1,5	500
T17	0,3	6,3	3	400
T18	0,3	6,3	3	500

2.2.5. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu

2.2.5.1. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Yüzey Yüklerinin Belirlenmesi

Hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonlarında partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (PDI) ölçümleri dinamik ışık saçılımı yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerde kullanılacak örnekler nanopartiküllerin ultra saf su içinde 1:500 oranında süspende edilmesi ile hazırlanmıştır. Ölçümler Malvern

Zetasizer Nano-ZS cihazı kullanılarak yapılmıştır. Her bir nanopartikül formülasyonu için ölçümler 3 kez tekrarlanmış ve elde edilen değerlerden hareketle ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değerleri hesaplanmıştır.

Nanopartikül formülasyonlarının yüzey yüklerinin belirlenmesi için zeta potansiyeli ölçümü gerçekleştirilmiştir. Ölçümler Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve her bir örnek için 3 kez tekrarlanmıştır.

2.2.5.2. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini

Nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği (%EE) değerleri indirekt yöntem ile belirlenmiştir (Liu ve ark., 2016). Bu amaçla öncelikle nanopartiküllere yüklenmemiş olan insülin miktarı hesaplanmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanma işlemi sırasında, nanopartikül dispersiyonunun Vivaspin 20 santrifüj tüpü ile santrifüj edilmesi ile ayrılan süpernetandaki insülin miktarı mikroBCA yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu amaçla insülinin pH 4,0 asetat tamponundaki kalibrasyon denklemi kullanılmıştır. Böylelikle nanopartiküllere yüklenmemiş olan insülin miktarı belirlenmiştir. Süpernetandaki insülin miktarının başlangıçta kullanılan insülin miktarından çıkarılması ile nanopartiküllere yüklenen insülin miktarı hesaplanmıştır. Daha sonra aşağıdaki formül kullanılarak nanopartiküllerde %EE tayin edilmiştir.

$$\%EE = \frac{\text{Nanopartiküllere yüklenen insülin miktarı}}{\text{Formülasyona eklenen toplam insülin miktarı}} \times 100$$

2.2.5.3. Üretim Verimi Tayini

Üretim verimi, üretim tamamlandıktan sonra elde edilen nanopartikül miktarının üretim sırasında kullanılan toplam katı madde miktarına oranlanması ile hesaplanmış ve yüzde olarak ifade edilmiştir.

$$\% \text{ üretim verimi} = \frac{\text{Üretilen edilen nanopartikül miktarı}}{\text{Üretim sırasında kullanılan toplam katı madde miktarı}} \times 100$$

2.2.5.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR) Analizi

İnsülinin, sodyum aljinatın, protaminin ve insülin yüklü polielektrolit kompleks nanopartiküllerin FTIR spektroskopisi ile tanımlanmasında Agilent FTIR cihazı kullanılmıştır. Cihaza toz halinde yerleştirilen örneklerin 4000 - 650 cm⁻¹ dalga boyları arasındaki spektrumları alınmıştır.

2.2.5.5. X-Işını Difraktometre (XRD) Analizi

İnsülinin, sodyum aljinatın, protaminin ve insülin yüklü polielektrolit kompleks nanopartiküllerin XRD analizleri için Cu anotlu difraktometre kullanılmıştır. Ölçümler 5-50° aralığında tarama yapılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.5.6. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

İnsülinin, sodyum aljinatın, protaminin ve insülin yüklü polielektrolit kompleks nanopartiküllerin termal özellikleri Shimadzu DSC-60 cihazı ile incelenmiştir. 3-5 mg ağırlığındaki örnekler alüminyum pana yerleştirilerek sıkıştırılmıştır. Azot gazı 50 ml/dak akış hızında kullanılarak, örnekler 30-350°C sıcaklık aralığında 5°C/dak lineer ısıtma hızında analiz edilmiştir. Boş pan kör olarak kullanılmıştır.

2.2.5.7. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizi

İnsülin yüklü polielektrolit kompleks nanopartikülleri distile su içinde disperse edildikten sonra 200 mesh bakır grid üzerine damlatılarak oda sıcaklığında kurutulduktan sonra FEI Tecnai G2 marka TEM (120 Kw) cihazı ile görüntülenmiştir.

2.2.5.8. Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) Analizi

AFM analizinde, insülin yüklü polielektrolit kompleks nanopartikülleri distile su içinde disperse edildikten sonra mika üzerine damlatılarak azot gazı altında kurutulmuştur. Daha sonra mika yüzeyi taranarak AFM cihazı (ezAFM, Nanomagnetics Inst., UK) ile görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

2.2.5.9. Çözünme Hızı Tayini

Nanopartiküllerin in vitro salım profilleri diyaliz yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Han ve ark., 2012; Alibolandi ve ark., 2016). Bu amaçla belirli miktarda insülin içeren nanopartiküller insülinin molekül ağırlığına uygun bir diyaliz membran (Cut-off 100 kDa) içinde çözünme hızı ortamına yerleştirilmiştir. Çözünme ortamı olarak 50 ml % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponu kullanılmıştır. Çalkalamalı inkübatörde $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ve 50 rpm'de karışmakta olan çözünme ortamlarından belirlenen zaman aralıklarında 0,5 ml örnek alınarak aynı miktarda taze ortam ilave edilmiştir. Alınan örneklerdeki insülin miktarı mikroBCA yöntemi ile belirlenmiştir. Deneyler 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiş, elde edilen % açığa çıkan insülin miktarlarının zamana karşı grafiğe geçirilmesi ile in vitro salım profilleri elde edilmiştir.

2.2.5.10. Çözünme Hızı Verilerinin Kinetik Değerlendirilmesi

Optimum formüle ait, diyaliz yöntemi ile elde edilen çözünme hızı verileri SPSS 20 bilgisayar programı kullanılarak sıfır derece, birinci derece, Hixson-Crowell ve Higuchi ($Q \sqrt{t}$), Weibull ve Peppas-Korsmeyer kinetikleri ile incelenmiştir. Hesaplanan r^2 ve artık kareler ortalaması (AKO) değerleri karşılaştırılarak sonuçları en iyi ifade eden kinetik tespit edilmeye çalışılmıştır.

2.2.5.11. Native-PAGE Analizi

Nanopartiküllerden salınan insülinin yapısal bütünlüğünü koruyup korumadığını belirlemek amacıyla poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yöntemi kullanılmıştır (Chi ve Huang, 2007). Analiz için kullanılan tampon ve çözeltiler Bölüm 2.1.4'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Referans protein karışımı için molekül ağırlıkları 1,060 kDa – 26,600 kDa arasında değişen proteinleri içeren molekül ağırlığı belirteci kullanılmıştır.

Standart insülin çözeltileri; % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponu ile 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,64 internasyonel ünite (IU)/ml insülin içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler altı farklı kuyucuğa yüklenmiştir.

Bölüm 2.1.4'de 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 örneklerin uygulanacağı kuyucuklar elde edilmiştir.

Örnekler, 25 µl insülin çözeltisi ve 15 µl örnek yükleme tamponunun karıştırılması ile hazırlanmıştır. Her bir kuyucuğa 20 µl olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Referans protein karışımı (molekül ağırlığı belirteci) ilgili işlemlere tabi

olmaksızın 12 µl olacak şekilde yüklenmiştir. Örnekler jele uygulandıktan sonra cam plakalar içindeki jel, mini dikey elektroforez sistemine yerleştirilmiştir. İç ve dış rezervuarlar elektroforez tampon çözeltisi ile gerekli yerlere kadar doldurulmuştur. Tüm bu işlemlerden sonra örnekler 100 voltluk (V) sabit akım altında 60 dakika yürütülmüştür.

Jeldeki protein bantlarının görünürlüğü için Coomassie Brilliant Blue ile boyama yöntemi kullanılmıştır (Spiers ve ark., 1999). Jel 2 kez 200 ml ultra saf su ile 5'er dakika çalkalanarak yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra koloidal Coomassie Brilliant Blue G250 içeren boyama çözeltisi eklenip bantlar görülünceye ve iyice belirginleşinceye kadar (1 gece) boyama işlemine devam edilmiştir.

Boyama çözeltisinden alınan jel, arındırma çözeltisi içinde bekletilerek arka plandaki rengin açılması sağlanmıştır. Örnekler için bantların tam olarak görülebilmesi amacıyla işlem beş kez tekrar edilmiştir. Bu işlemden sonra jelde oluşan protein bantlarının resimleri çekilmiş ve kayıt edilmiştir.

2.2.5.12. Sirküler Dikroizm (CD)

İnsülinin nanopartiküllerin hazırlaması aşamasında maruz kaldığı koşullara karşı konformasyonel stabilitesini gösterebilmek amacıyla CD spektroskopisi (Jasco 815) kullanılmıştır. Bu amaçla nanaopartiküllerden salınan insülinin CD spektrumu alınmıştır. Elde edilen spektrum insülin standartı için elde edilen spektrum ile karşılaştırılmıştır. Her bir örnek 0,5 mg/ml insülin içerecek şekilde hazırlanmıştır. CD çalışmaları için tarama aralığı 200-300 nm, çalışma sıcaklığı ise 20°C olarak belirlenmiştir.

2.2.5.13. Nanopartiküllerin Stabilitelerinin Belirlenmesi

Stabilite çalışmaları için belirlenen optimum nanopartikül formülasyonu liyofilize edildikten sonra buzdolabında (2-8 °C'de) ve 25°C'de iklim dolabında 3 ay bekletilmiştir. Başlangıçla ve 3. ay sonunda alınan örneklerde partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel ölçümleri yapılarak stabiliteleri incelenmiştir.

2.2.6. Nanopartikül İçeren Enterik Kaplı Kapsüllerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Optimizasyonu

Çalışmamızda, insülini mide ortamındaki asidik pH'dan korumak amacıyla insülin içeren nanopartiküllerin sert jelatin kapsüllere doldurulduktan sonra kapsüllerin enterik bir polimer ile kaplanması planlanmıştır. Bu amaçla Eudragit L100-55 polimeri kullanılmıştır. Polimerin aseton içerisindeki %12,5'lük (a/h) çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilere plastizer olarak %2,5 (a/h) polietilen glikol 400 eklenmiştir.

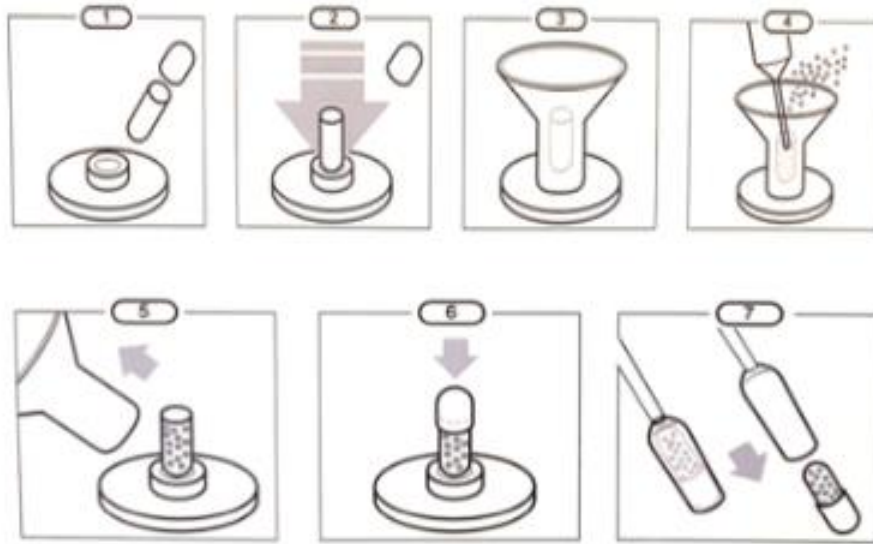
Enterik Kaplama Çözeltisi

Eudragit L100-55.....	3,125 g
PEG 400.....	0,625 mg
Aseton.....	24,25 ml
Distile su.....	0,75 ml

Kapsüllerin mide ortamındaki davranışını incelemek için öncelikle potasyum permanganat ve laktoz karışımı ile doldurulmuş No.4 kapsüllere kaplama işlemi uygulanmıştır. Kapatılan kapsüller daldırma yöntemi ile 3 kez kaplanmıştır. Kaplanan kapsüllerin mide ortamındaki dağılma süresini belirlemek için kapsüller 100 ml pH 1,2 HCl çözeltisi içeren beher içerisine daldırılmıştır. Dağılma ortamını içeren beher ise 37±2 °C'deki çalkalamalı inkübatöre yerleştirilmiştir. 2 saat süreyle kapsüllerde

herhangi bir parçalanma olup olmadığı kapsüllere doldurulmuş olan potasyum permanganat kaynaklı renklenmeden hareketle izlenmiştir.

İn vivo çalışmalarda kullanılacak insülin içeren nanopartiküllerin kapsüllere doldurulması için Capsugel dozlama kiti kullanılmıştır. Liyofilize nanopartiküller 100 IU/kg insülin içerecek şekilde tartılarak No.9 sert jelatin kapsüllere Şekil 2.3’de gösterildiği gibi doldurulmuştur. Doldurma işlemi için kapsüller açılarak kap kısmı standı yerleştirilmiştir. Nanopartiküllerin kayıp yaşanmadan kap kısmına yerleştirilmesi için üzerine huni biçimli aparat yerleştirilmiştir. Nanopartiküller huniye konulduktan sonra sıkıştırıcı aparatla kaba dolumu sağlanmıştır. Sonrasında huni kaldırılmış ve kapsülün kapağı kapatılmıştır.



Şekil 2.3. Kapsüllerin doldurulmasının şematik olarak gösterimi

Dolumu yapılan No.9 sert jelatin kapsüller No.4 kapsüllerde olduğu gibi Eudragit L100-55 çözeltisi ile enterik olarak kaplanmıştır. Kaplanan kapsüller, diyaliz membran içine yerleştirilerek 2 saat boyunca pH 1,2 HCl tamponunda çalkalamalı inkübatörde tutulmuştur. Sonrasında membran içindeki pH 1,2 HCl tamponu ve çözünme ortamı pH 6,8 fosfat tamponu ile değiştirilerek 8 saat boyunca çözünme hızı deneyine devam edilmiştir.

2.2.7. İn Vivo Çalışmalar

İn vivo hayvan çalışmaları Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 10.08.2016 tarihli ve 2016-17-158 numaralı onay dahilinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda 24 adet 350-450 gram ağırlığında, erişkin erkek Sprague Dawley cinsi sıçan kullanılmıştır. Sıçanlarda diyabet modeli, streptozotosinin pH 4,5 sitrat tamponundaki çözeltisinin 50 mg/kg dozda intraperitoneal enjeksiyonu ile oluşturulmuştur. Belirli zaman aralıklarında sıçanların kuyruk veninden kan örnekleri alınarak glukoz konsantrasyonu ölçülmüş, kan glukoz konsantrasyonu 300 mg/dl ve üzerinde olan sıçanlar diyabet kabul edilerek *in vivo* deneye başlanmıştır.

İn vivo çalışmalar için deney grupları aşağıda belirtildiği şekilde oluşturulmuştur:

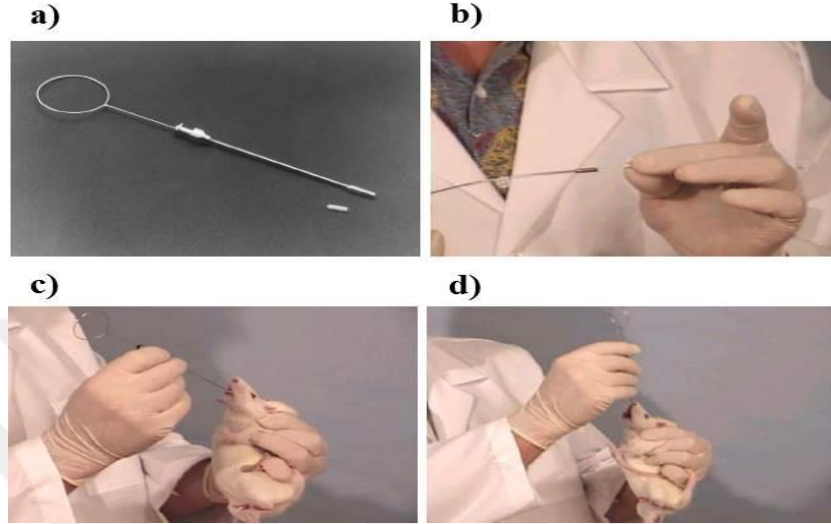
- 1. Grup: İnsülin çözeltisi (2 IU/kg) subkutan enjeksiyon yolu ile,
- 2. Grup: İnsülin çözeltisi (100 IU/kg) oral yol ile,
- 3. Grup: İnsülin (100 IU/kg) yüklü nanopartikül içeren sert jelatin kapsüller oral yol ile,
- 4. Grup: İnsülin (100 IU/kg) yüklü nanopartikül içeren enterik kaplı sert jelatin kapsüller oral yol ile uygulanmıştır.

İn vivo denemeler her bir grupta en az n=6 sayıda hayvan kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İnsülin yüklü nanopartikül içeren sert jelatin kapsüllerin diyabetik sıçanlara uygulanması oral dozlama enjektörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Oral dozlama enjektörü, paslanmaz çelikten yapılmış ve kapsüllerin sıçanlara oral olarak uygulanmasına olanak sağlayan bir ayardır (Şekil 2.4a). Oral olarak uygulanacak kapsül, enjektörün kapsül tutucu bölümüne yerleştirilmiştir (Şekil 2.4b). Enjektörün ucu hayvanın ağzına yerleştirilmiş ve yemek borusunun açılması sağlanmıştır (Şekil 2.4c).

Dozlama enjektörü, hayvan kapsül tutucu bölümünü yutuncaya kadar yavaşça itilmiş ve enjektör mili ile hayvanın başı geriye yatırılmıştır (Şekil 2.4d). Böylece

yemek borusunun düzelmesi ve enjektörün kolay sokulması sağlanmıştır. Enjektörün pistonu itilerek kapsülün çıkması sağlanmıştır.



Şekil 2.4. Oral dozlama enjektörünün kullanımı

Diyabetik sıçanların kuyruk veninden insülin içeren preparatlar uygulanmadan önce ve uygulamadan sonra 1., 2., 4., 6., ve 8. saatlerde alınan örneklerdeki kan glukoz düzeyleri glukoz metre (Accu-Chek®) ile ölçülerek uygulanan formülasyonların etkinlik değerlendirmesi yapılmıştır. Bunun için deney başlangıcındaki plazma glukoz düzeyleri %100 kabul edilmiş, diğer zaman noktalarında ölçülen plazma glukoz düzeyleri başlangıç noktasındaki değere oranlanarak yüzde olarak ifade edilmiştir.

İnsülin yüklü nanopartiküllerin deney hayvanlarında gastrointestinal kanal boyunca dağılımlarını belirlemek için ise, FITC ile işaretlenmiş nanopartikülleri içeren enterik kaplı sert jelatin kapsüller oral kapsül uygulama enjektörü ile anestezi altındaki diyabetik sıçanlara (n=5) uygulanmıştır. Uygulamadan sonra, sıçanlar 4. saatte sakrifiye edilmiştir. Daha sonra, deney hayvanlarının ince bağırsak bölümleri (duodenum, üst ve alt jejunum, üst ve alt ileum) kesilerek çıkarılmıştır. Çıkarılan doku örnekleri PBS ile yıkandıktan sonra sıvı azot ile dondurulmuştur. Havanda ezilen bu dokular homojenize edilmiş ve RIPA Buffer ile ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edilen örneklerdeki floresan içeriği florometre ile belirlenmiştir. Kör olarak FITC ile

işaretlenmiş nanopartikülleri içeren enterik kaplı sert jelatin kapsül uygulaması yapılmamış sıçanlardan alınan doku örnekleri kullanılmıştır.

2.2.7. İstatistiksel Değerlendirme

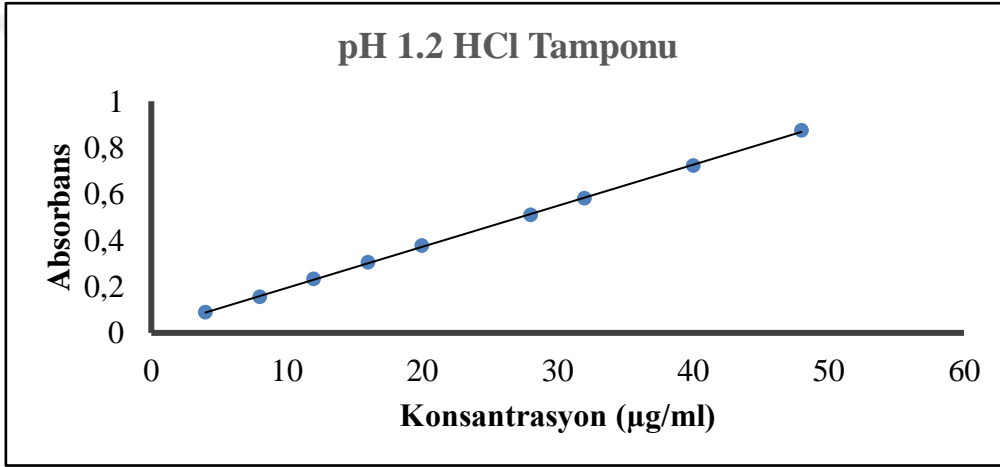
İn vivo çalışmalardan elde edilen sonuçların grup içi ve gruplar arası karşılaştırılması SPSS 20 programı ve One Way-ANOVA ile yapılmıştır. Olasılık değerinin $p < 0,05$ olarak hesaplandığı durumlarda farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edilmiştir (Gigerenzer, 2004).



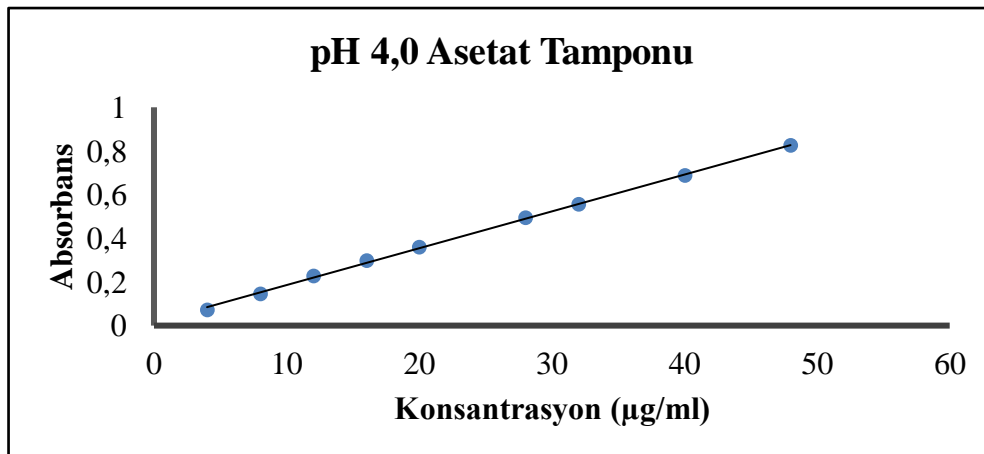
3. BULGULAR

3.1. Etkin Maddenin MikroBCA Analiz Yöntemiyle Kalibrasyonuna Ait Bulgular

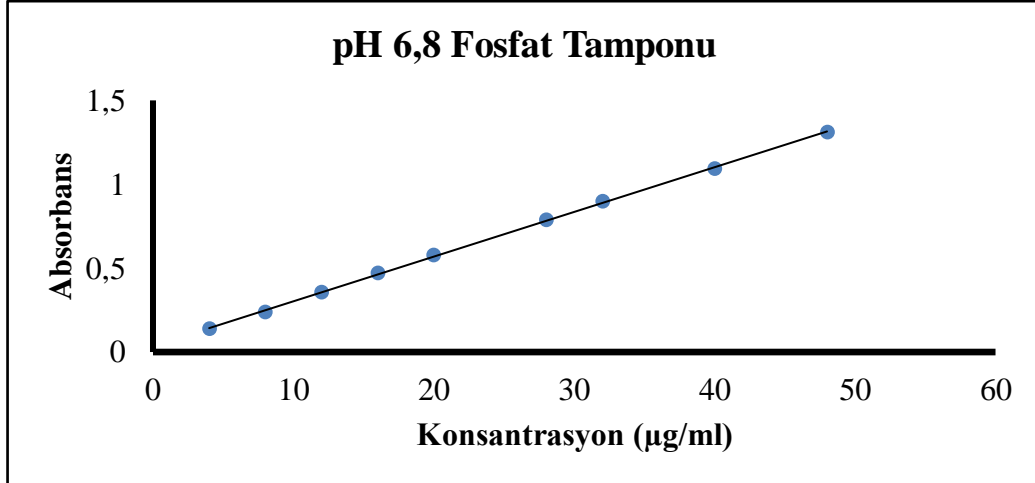
Etkin maddenin Bölüm 2.2.1.'de anlatılan şekilde %0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi, pH 4,0 asetat tamponu ve %0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponu içerisinde yapılan ölçümlerle elde edilen kalibrasyon doğruları Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'de, bu doğrulara ait parameteler ise Çizelge 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisindeki kalibrasyon grafiği



Şekil 3.2. İnsülinin pH 4,0 asetat tamponundaki kalibrasyon grafiği



Şekil 3.3. İnsülinin %0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponundaki kalibrasyon grafiği

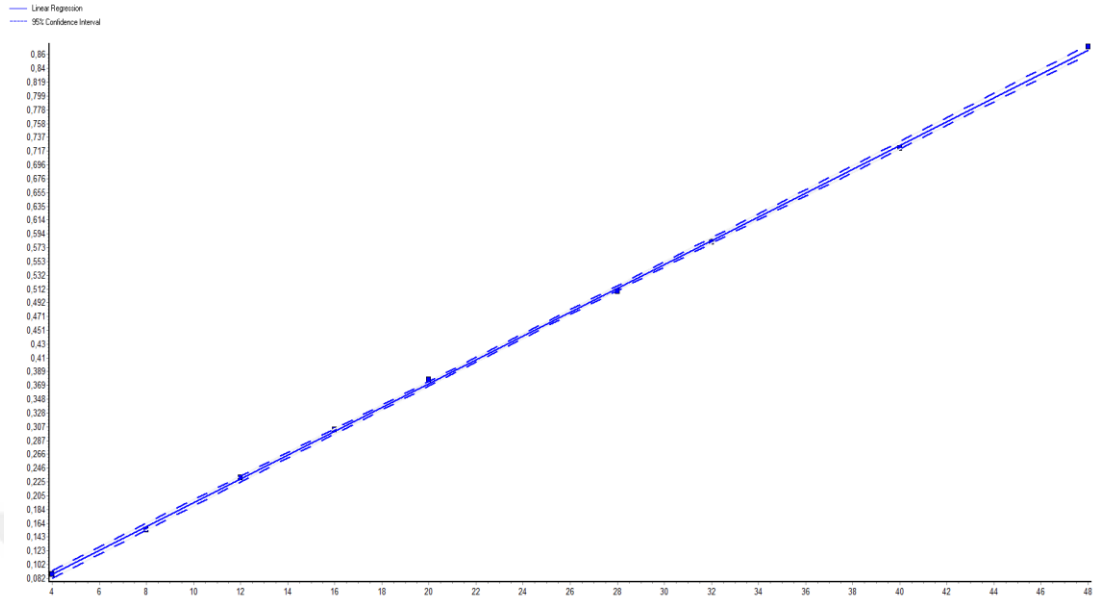
Çizelge 3.1. İnsülinin mikroBCA ile elde edilen kalibrasyon doğrularına ait parametreler

Ortam	Eğim±SS	Kesişim±SS	r ²
pH 1,2 HCl çözeltisi	0,0177±8,94E-05	0,0170±0,00415	0,9999
pH 4,0 asetat tamponu	0,0169±0,000285	0,0169±0,00327	0,9990
pH 6,8 fosfat tamponu	0,0266±0,000365	0,0358±0,00470	0,9995

3.2. Etkin Maddenin MikroBCA Analiz Yöntemiyle Kalibrasyonunun Validasyonuna Ait Bulgular

3.2.1. Doğrusallık ve Aralığı

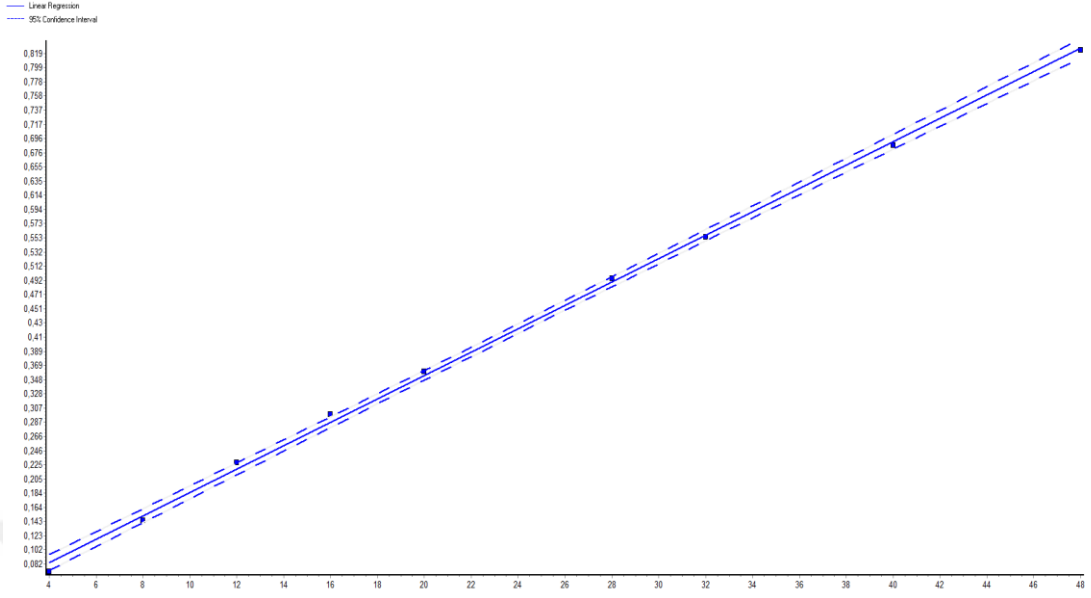
İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi, pH 4,0 asetat tamponu ve % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponundaki miktar tayininin doğrusallık ve aralığı Bölüm 2.2.2.1’de açıklandığı şekilde belirlenmiştir. Elde edilen doğrular Şekil 3.4, Şekil 3.5 ve Şekil 3.6’da, doğrulara ait parametreler ise Çizelge 3.2, Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4’de verilmiştir.



Şekil 3.4. İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi için doğrusallık grafiği

Çizelge 3.2. İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi içindeki miktar tayini yöntemine ait doğrusallık parametreleri

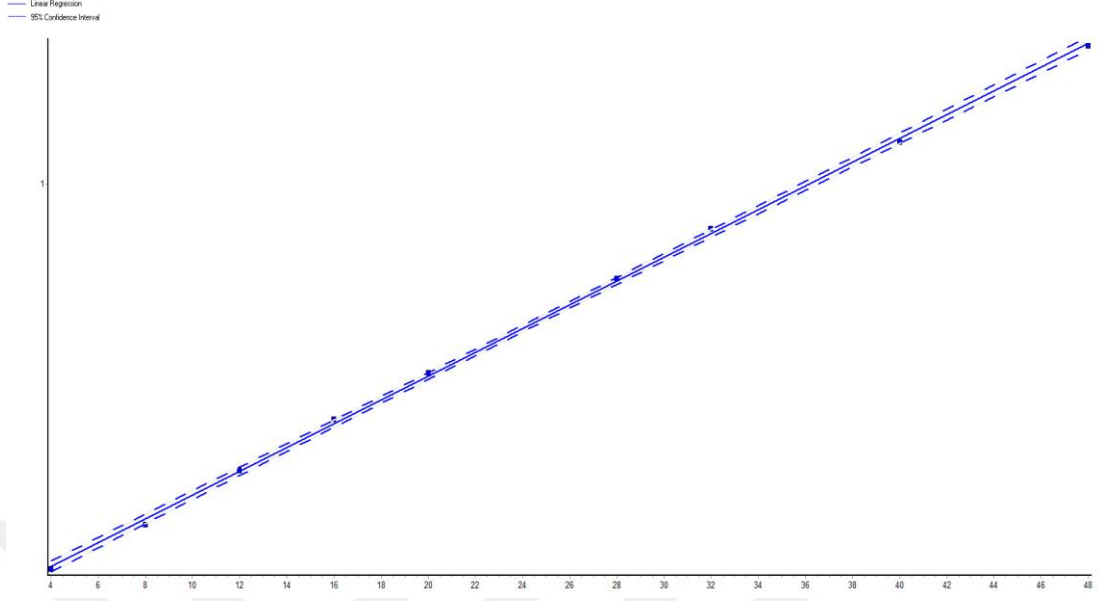
Eğim	0,0177
Eğimin standart hatası	0,000105
Güven sınırları (%95)	0,0175→0,0236
Kesişim (n)	0,0169
Kesişimin standart hatası	0,00285
Kesişimin güven aralığı (%95)	0,0101-0,0236
Korelasyon katsayısı (r)	0,9999
Determinasyon katsayısı (r ²)	0,9998
Regresyon doğrusundan sapmaların standart hatası (Sy.x)	0,00445
Lineer regresyon kareler toplamı	0,5603
Doğrusallıktan sapmaların kareler toplamı	0,000139
Ortalamanın artık kareler toplamı	1,985E-05



Şekil 3.5. İnsülinin pH 4,0 asetat tamponu için doğrusallık grafiği

Çizelge 3.3. İnsülinin pH 4,0 asetat tamponu içindeki miktar tayini yöntemine ait doğrusallık parametreleri

Eğim	0,0169
Eğimin standart hatası	0,000206
Güven sınırları (%95)	0,0164→0,0174
Kesişim (n)	0,0168
Kesişimin standart hatası	0,00556
Kesişimin güven aralığı (%95)	0,00360-0,0299
Korelasyon katsayısı (r)	0,999
Determinasyon katsayısı (r ²)	0,999
Regresyon doğrusundan sapmaların standart hatası (Sy.x)	0,00868
Lineer regresyon kareler toplamı	0,508
Doğrusallıktan sapmaların kareler toplamı	0,000528
Ortalamanın artık kareler toplamı	7,543E-05



Şekil 3.6. İnsülinin % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponu için doğrusallık grafiği

Çizelge 3.4. İnsülinin % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponu içindeki miktar tayini yöntemine ait doğrusallık parametreleri

Eğim	0,0266
Eğimin standart hatası	0,000221
Güven sınırları (%95)	0,0261-0,0272
Kesişim (n)	0,0355
Kesişimin standart hatası	0,00598
Kesişimin güven aralığı (%95)	0,0214→0,0497
Korelasyon katsayısı (r)	0,9998
Determinasyon katsayısı (r ²)	0,9995
Regresyon doğrusundan sapmaların standart hatası (Sy.x)	0,00933
Lineer regresyon kareler toplamı	1,268
Doğrusallıktan sapmaların kareler toplamı	0,000610
Ortalamanın artık kareler toplamı	8,711E-05

3.2.2. Doğruluk ve Geri Elde

İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi, pH 4,0 asetat tamponu ve % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponundaki miktar tayininin doğruluk ve geri eldesi Bölüm 2.2.2.2’de açıklandığı şekilde belirlenmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 3.5, Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.5. % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi için elde edilen doğruluk ve geri elde bulguları

Teorik Konsantrasyon (µg/ml)						
	8		20		40	
	Pratik Konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde
1. Ölçüm	8,135	101,69	20,78	103,91	41,66	104,16
2. Ölçüm	7,958	99,48	20,90	104,50	42,08	105,19
3. Ölçüm	8,017	100,22	20,60	103,03	41,55	103,87
4. Ölçüm	8,017	100,22	20,66	103,32	41,43	103,57
5. Ölçüm	8,076	100,95	20,43	102,15	41,90	104,75
6. Ölçüm	7,958	99,48	20,60	103,03	41,55	103,87
Ortalama % Geri Elde	100,34		103,32		104,23	
SS	0,859		0,810		0,615	
BSS (%)	0,856		0,784		0,590	

Çizelge 3.6. pH 4,0 asetat tamponu için elde edilen doğruluk ve geri elde bulguları

Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)						
	8		20		40	
	Pratik Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	% Geri Elde
1. Ölçüm	8,47	105,84	22,19	110,98	42,88	106,97
2. Ölçüm	8,17	102,14	22,19	110,98	43,62	109,04
3. Ölçüm	8,41	105,10	22,37	111,86	43,44	108,59
4. Ölçüm	8,47	105,84	22,19	110,97	43,62	109,04
5. Ölçüm	8,23	102,88	22,02	110,09	43,56	108,89
6. Ölçüm	8,17	102,14	22,14	110,68	43,56	108,89
Ortalama % Geri Elde	103,99		110,93		108,57	
SS	1,796		0,572		0,801	
BSS (%)	1,72		0,517		0,738	

Çizelge 3.7. % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponu için elde edilen doğruluk ve geri elde bulguları

Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)						
	8		20		40	
	Pratik Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	% Geri Elde
1. Ölçüm	8,24	102,96	20,04	100,21	39,48	98,69
2. Ölçüm	8,54	106,72	20,60	103,03	39,55	98,88
3. Ölçüm	8,27	103,43	20,57	102,84	40,68	101,70
4. Ölçüm	8,16	102,02	20,83	104,15	40,19	100,48
5. Ölçüm	8,39	104,84	20,83	104,15	39,18	97,94
6. Ölçüm	8,54	106,72	20,79	103,97	40,83	102,08
Ortalama % Geri Elde	104,45		103,06		99,96	
SS	1,98		1,51		1,71	
BSS (%)	1,90		1,47		1,71	

3.2.3. Kesinlik

3.2.3.1. Tekrarlanabilirlik

İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi, pH 4,0 asetat tamponu ve % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponundaki miktar tayininin tekrarlanabilirliği Bölüm 2.2.2.3’de açıklandığı şekilde belirlenmiştir. 3 farklı konsantrasyonda 6 kez yapılan ölçümlere ait ortalama, SS ve BSS değerleri Çizelge 3.8, Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl tamponundaki tekrarlanabilirlik bulguları

	Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)		
	8	20	40
1. Ölçüm	8,76	22,59	44,65
2. Ölçüm	9,00	22,59	44,53
3. Ölçüm	8,76	21,81	42,88
4. Ölçüm	8,64	21,81	42,82
5. Ölçüm	8,93	22,09	43,05
6. Ölçüm	8,81	21,92	44,24
Ortalama	8,82	22,13	43,69
SS	0,127	0,366	0,863
BSS (%)	1,449	1,657	1,976

Çizelge 3.9. İnsülinin pH 4,0 asetat tamponundaki tekrarlanabilirlik bulguları

Teorik Konsantrasyon (µg/ml)			
	8	20	40
1. Ölçüm	8,17	22,61	45,57
2. Ölçüm	8,11	22,25	44,92
3. Ölçüm	8,23	22,19	44,86
4. Ölçüm	8,23	21,96	44,68
5. Ölçüm	8,29	22,19	44,56
6. Ölçüm	8,23	22,19	44,56
Ortalama	8,21	22,23	44,86
SS	0,061	0,21	0,377
BSS (%)	0,744	0,947	0,842

Çizelge 3.10. İnsülinin % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponundaki tekrarlanabilirlik bulguları

Teorik Konsantrasyon (µg/ml)			
	8	20	40
1. Ölçüm	8,35	20,68	41,28
2. Ölçüm	8,61	20,23	40,87
3. Ölçüm	8,31	20,60	40,19
4. Ölçüm	8,54	20,38	40,68
5. Ölçüm	8,27	20,72	41,43
6. Ölçüm	8,57	20,91	41,32
Ortalama	8,44	20,59	40,96
SS	0,148	0,245	0,476
BSS (%)	1,753	1,188	1,162

3.2.3.2. Ara Kesinlik

İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi, pH 4,0 asetat tamponu ve % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponundaki miktar tayininin ara kesinliği

Bölüm 2.2.2.3’de açıklandığı şekilde belirlenmiştir. İki farklı günde yapılan ölçümlere ait ortalama, SS ve BSS değerleri Çizelge 3.11, Çizelge 3.12 ve Çizelge 3.13’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.11. % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi için elde edilen ara kesinlik bulguları

Teorik Konsantrasyon (µg/ml)						
	8		20		40	
	1. Gün	2. Gün	1. Gün	2. Gün	1. Gün	2. Gün
1. Ölçüm	8,76	8,59	22,59	22,82	44,65	43,82
2. Ölçüm	9,00	8,94	22,59	22,35	44,53	44,18
3. Ölçüm	8,76	8,88	21,81	23,00	42,88	44,70
4. Ölçüm	8,64	8,82	21,81	22,94	42,82	43,88
5. Ölçüm	8,93	9,00	22,09	22,53	43,05	43,70
6. Ölçüm	8,81	8,70	21,92	22,15	44,24	42,65
Ortalama	8,82	8,82	22,13	22,63	43,69	43,82
SS	0,127	0,154	0,366	0,343	0,863	0,676
BSS (%)	1,449	1,748	1,657	0,343	1,976	1,154

Çizelge 3.12. pH 4,0 asetat tamponu için elde edilen ara kesinlik bulguları

Teorik Konsantrasyon (µg/ml)						
	8		20		40	
	1. Gün	2. Gün	1. Gün	2. Gün	1. Gün	2. Gün
1. Ölçüm	8,17	8,58	22,61	23,61	45,57	47,46
2. Ölçüm	8,11	8,47	22,25	23,56	44,92	46,93
3. Ölçüm	8,23	8,53	22,19	23,44	44,86	46,75
4. Ölçüm	8,23	8,58	21,96	23,49	44,68	46,75
5. Ölçüm	8,29	8,76	22,19	23,38	44,56	46,45
6. Ölçüm	8,23	8,76	22,19	23,79	44,56	45,74
Ortalama	8,21	8,61	22,23	23,55	44,86	46,68
SS	0,061	0,122	0,210	0,146	0,377	0,566
BSS (%)	0,744	1,424	0,947	0,566	0,842	1,214

Çizelge 3.13. % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponu için elde edilen ara kesinlik bulguları

Teorik Konsantrasyon						
	8		20		40	
	1. gün	2. gün	1. gün	2. gün	1. gün	2. gün
1. Ölçüm	8,350	7,523	20,680	19,327	41,282	38,801
2. Ölçüm	8,613	7,711	20,229	19,853	40,868	38,162
3. Ölçüm	8,312	7,673	20,605	19,628	40,192	38,951
4. Ölçüm	8,538	7,523	20,380	19,816	40,680	39,853
5. Ölçüm	8,274	7,786	20,718	19,553	41,432	39,214
6. Ölçüm	8,575	7,598	20,906	19,966	41,320	38,350
Ortalama	8,444	7,635	20,586	19,690	40,962	38,888
SS	0,148	0,106	0,245	0,234	0,476	0,611
BSS (%)	1,753	1,393	1,188	1,187	1,162	1,572

3.2.4. Teşhis ve Tayin Sınırları

İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi, pH 4,0 asetat tamponu ve % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminin teşhis ve tayin sınırları Bölüm 2.2.2.4'de belirtildiği gibi belirlenmiştir. Çizelge 3.14'de hesaplanan teşhis ve tayin sınırları yer almaktadır.

Çizelge 3.14. MikroBCA yöntemi ile belirlenen teşhis (LOD) ve tayin (LOQ) sınırı bulguları

	Teşhis sınırı (LOD) (µg/ml)	Tayin sınırı (LOQ) (µg/ml)
% 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi	0,775	2,349
pH 4,0 asetat tamponu	0,640	1,940
% 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponu	0,584	1,770

3.2.5. Seçicilik

İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi, pH 4,0 asetat tamponu ve % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminde, insülin yüklü nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan sodyum aljinat ve protaminin insülin ile girişim yapıp yapmadığını belirlemek için Bölüm 2.2.2.5’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen seçicilik tayininde yardımcı maddelere ait çözeltilerin 562 nm’de absorbans vermemesi yöntemin insülin için seçici olduğunu göstermiştir.

3.3. Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular

3.3.1. Sodyum Aljinat ile Hazırlanan Formülasyonlara Ait Bulgular

İnsülin içeren nanopartiküllerin hazırlanmasında Bölüm 2.2.3’de belirtilen iyonik çapraz bağlama yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile istenen özelliklere sahip nanopartiküllerin hazırlanıp hazırlanamayacağını belirlemek için Bölüm 2.2.4’de belirtilen şekilde farklı konsantrasyonlarda sodyum aljinat çözeltileri kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği bulguları Çizelge 3.15’de verilmiştir.

Çizelge 3.15. Farklı konsantrasyonlarda sodyum aljinat ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve %EE bulguları (n=3)

Formülasyon Kodu	Partikül Büyüklüğü (nm±SS)	PDI±SS	Zeta Potansiyeli (mV±SS)	EE (%±SS)
SA1	169,00±1,19	0,19±0,019	-33,00±0,04	94,47
SA2	171,10±1,97	0,18±0,006	-32,10±0,11	91,28
SA3	171,20±2,71	0,17±0,003	-21,30±0,44	90,76
SA4	180,40±3,48	0,20±0,019	-31,20±0,21	90,53
SA5	201,60±2,29	0,22±0,003	-39,40±0,71	88,62

PDI:Polidispersite indeksi

EE:Enkapsülasyon etkinliği

3.3.2. Kondroitin Sülfat ile Hazırlanan Formülasyonlara Ait Bulgular

Çalışmamızda, Bölüm 2.2.4’de belirtildiği gibi bir diğer polianyon olan kondroitin sülfat ile de insülin içeren nanopartiküller hazırlanmıştır. Bu formülasyonlar sodyum aljinat ile hazırlanan nanopartiküllerle benzer şekilde hazırlanmış ve in vitro karakterizasyonları yapılmıştır. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait in vitro karakterizasyon sonuçları Çizelge 3.16’da verilmiştir.

Çizelge 3.16. Kondroitin sülfat ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve %EE bulguları (n=3)

Formülasyon Kodu	Partikül Büyüklüğü (nm±SS)	PDI±SS	Zeta Potansiyeli (mV±SS)	EE (%±SS)
CS1	170,80±1,51	0,18±0,015	-34,50±1,78	44,76
CS2	167,60±8,75	0,30±0,058	-15,40±0,46	61,34
CS3	207,60±5,94	0,33±0,048	-32,50±0,59	80,51

PDI:Polidispersite indeksi

EE:Enkapsülasyon etkinliği

3.3.3. Taguchi Deney Tasarımı ile Hazırlanan Nanopartiküllere Ait Bulgular

Bölüm 2.2.4’de belirtildiği gibi yapılan ön çalışmalar ile iyonik çapraz bağlama yöntemi kullanılarak insülin içeren nanopartikül formülasyonlarının hazırlanabildiği belirlendikten sonra, optimum özelliklere sahip nanopartikül formülasyonunun belirlenebilmesi için Taguchi deney tasarımı kullanılmıştır. Taguchi deney tasarımına göre hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği değerleri Çizelge 3.17’de sunulmuştur.

Çizelge 3.17. Taguchi deney tasarımına göre hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve %EE bulguları (n=3)

Formülasyon Kodu	Partikül Büyüklüğü (nm±SS)	PDI±SS	Zeta Potansiyeli (mV±SS)	EE (%±SS)
T1	298,40 ± 1,39	0,42±0,05	-20,50±1,00	96,97±0,14
T2	187,30±0,80	0,25±0,006	-24,70±0,15	97,31±0,19
T3	194,30±3,002	0,34±0,006	-19,80±0,40	98,36±0,34
T4	195,70±2,97	0,35±0,028	-25,40±0,55	98,40±0,05
T5	228,90±4,31	0,51±0,043	-22,70±0,59	98,92±0,04
T6	160,00±2,44	0,27±0,017	-21,00±0,59	98,05±0,35
T7	200,00±3,52	0,23±0,008	-30,00±0,25	98,49±0,29
T8	185,80±0,91	0,21±0,016	-29,60±0,84	98,31±0,06
T9	175,40±2,37	0,23±0,017	-29,00±2,34	98,58±0,08
T10	178,00±0,76	0,23±0,016	-27,30±0,59	98,83±0,02
T11	164,60±2,58	0,22±0,004	-25,00±0,36	97,05±0,14
T12	159,30±2,16	0,20±0,023	-29,80 ± 0,60	96,87±0,34

Çizelge 3.17. Devam

T13	215,90±5,88	0,28±0,011	-29,80±0,44	98,09±0,07
T14	213,40±3,98	0,24±0,010	-31,70±1,30	98,65±0,01
T15	182,60 ± 1,72	0,18±0,011	-30,80 ± 0,74	95,12±0,25
T16	203,40 ± 1,87	0,22±0,010	-28,00 ± 2,33	94,75±1,67
T17	192,70 ± 1,36	0,33±0,010	-30,00 ± 0,15	97,56±0,14
T18	192,50 ± 6,62	0,30±0,020	-27,10 ± 0,79	97,79±0,03

PDI:Polidispersite indeksi

EE:Enkapsülasyon etkinliği

3.3.4. Nanopartiküllere Ait İmalat Verimi Bulguları

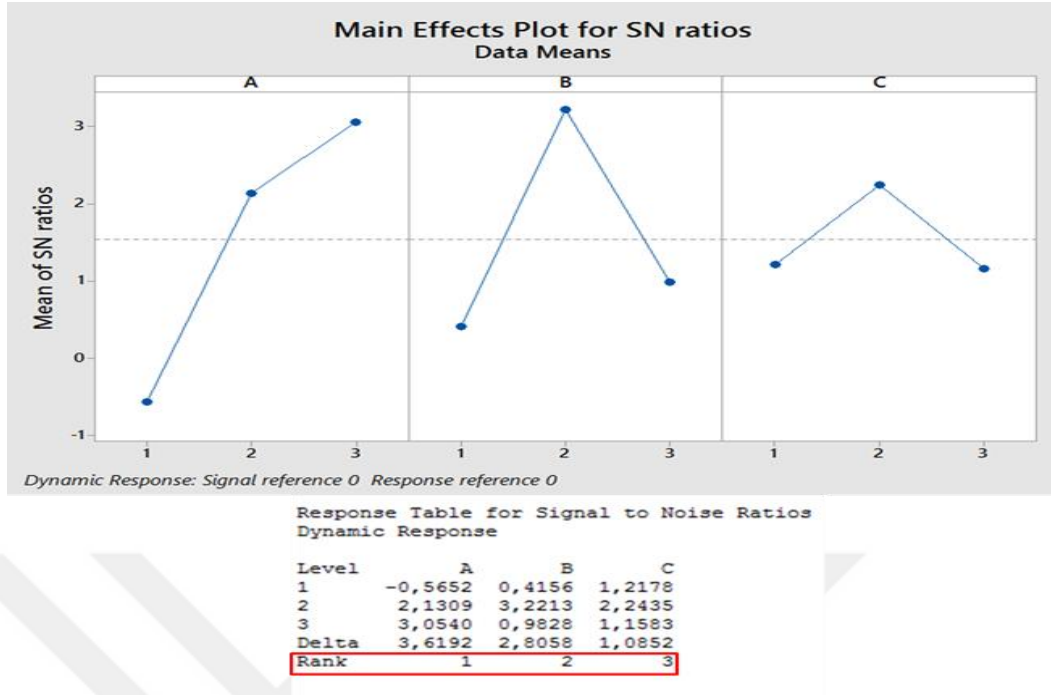
İnsülin içeren nanopartikül formülasyonlarına ait imalat verimi Bölüm 2.2.5.3'de belirtildiği şekilde belirlenmiş ve elde edilen bulgular Çizelge 3.18'de sunulmuştur.

Çizelge 3.18. İnsülin içeren nanopartikül formülasyonlarına ait imalat verimi bulguları

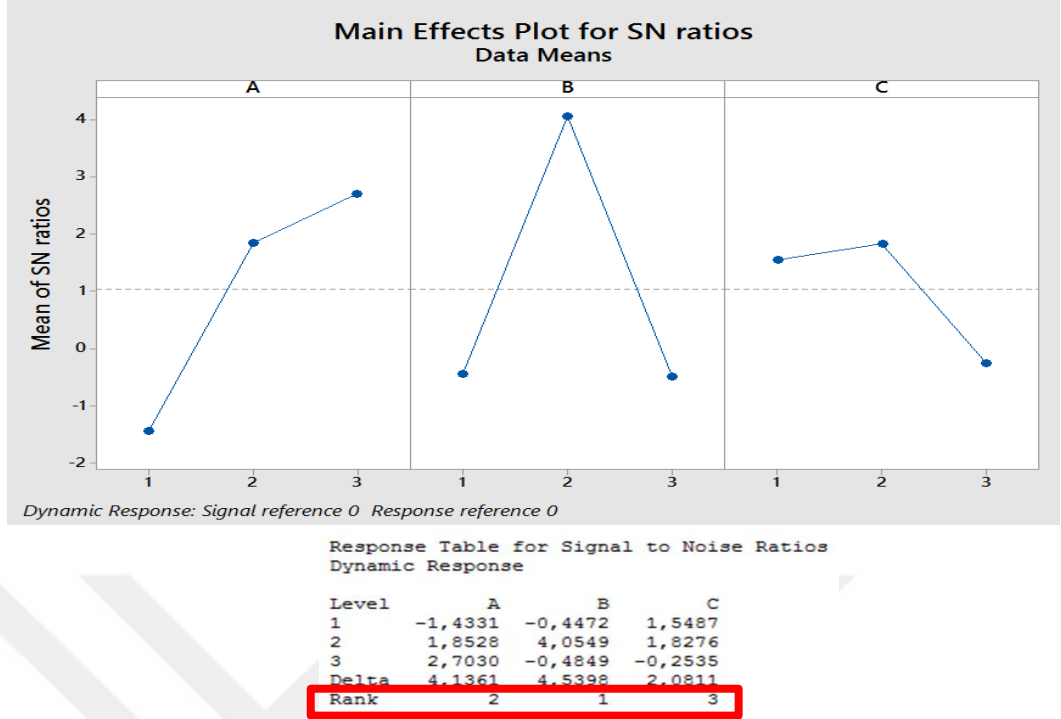
Formülasyon Kodu	İmalat Verimi (%)
T1	97,28
T2	108,16
T3	105,84
T4	107,14
T5	99,38
T6	107,45
T7	104,76
T8	95,24
T9	94,88
T10	93,86
T11	100,00
T12	100,00
T13	99,09
T14	89,57
T15	66,93
T16	95,35
T17	106,08
T18	101,06

3.3.5. İstatistiksel Analiz

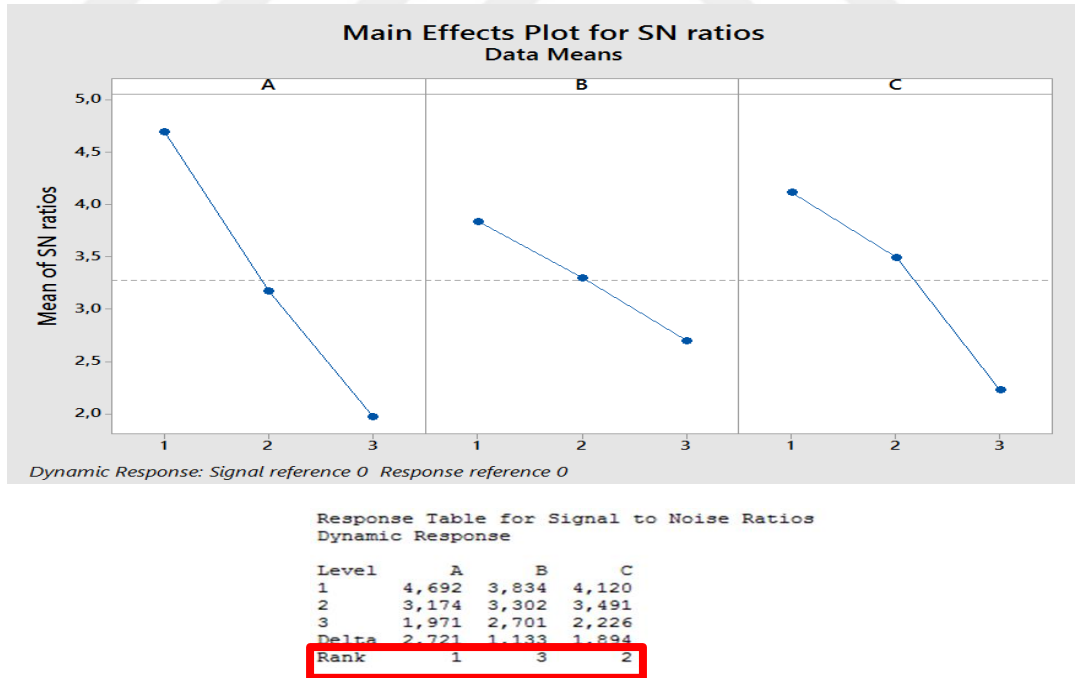
Taguchi deney tasarımına göre hazırlanan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği değerlerinin istatistiksel analizi Minitab Statistical Software 17 analiz programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10 ve Şekil 3.11’de sunulmuştur.



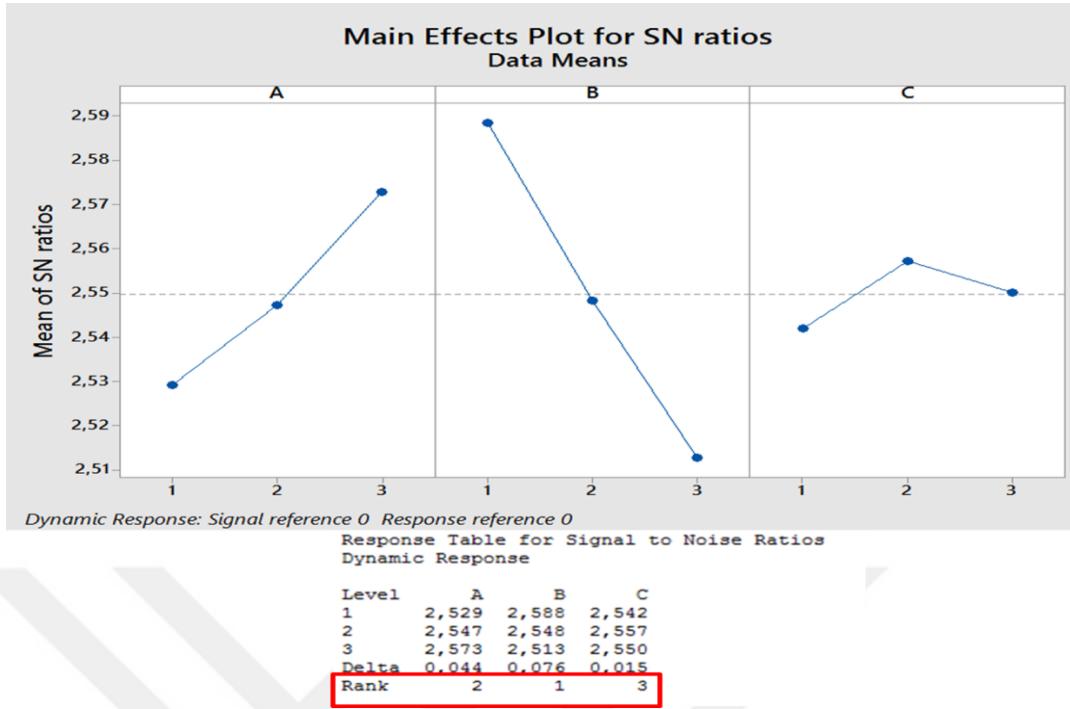
Şekil 3.7. Üretim parametrelerinin (A:sodyum aljinat konsantrasyonu, B:sodyum aljinat:protamin oranı, C:insülin miktarı) nanopartiküllerin partikül büyüklüğü üzerine etkisi



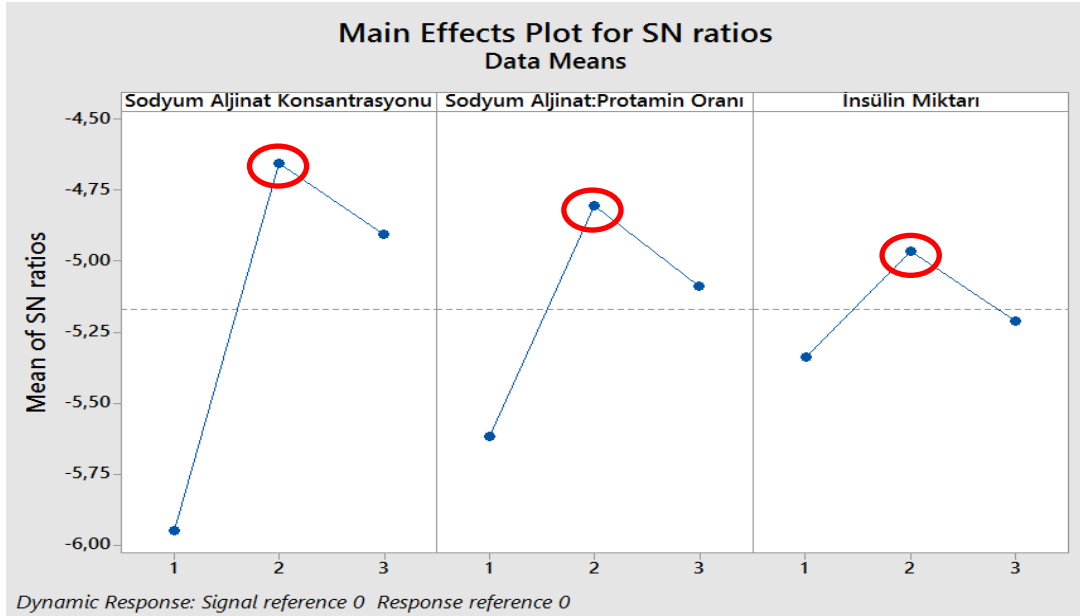
Şekil 3.8. Üretim parametrelerinin (A:sodyum aljinat konsantrasyonu, B:sodyum aljinat:protamin oranı, C:insülin miktarı) nanopartiküllerin PDI değeri üzerine etkisi



Şekil 3.9. Üretim parametrelerinin (A:sodyum aljinat konsantrasyonu, B:sodyum aljinat:protamin oranı, C:insülin miktarı) nanopartiküllerin zeta potansiyeli üzerine etkisi



Şekil 3.10. Üretim parametrelerinin (A:sodyum aljinat konsantrasyonu, B:sodyum aljinat:protamin oranı, C:insülin miktarı) nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi



Şekil 3.11. Üretim parametrelerinin nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi

3.3.6. Optimum Nanopartikül Formülasyonuna Ait Bulgular

Taguchi deney tasarımı sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucunda belirlenen optimum formülasyona ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği değerleri Çizelge 3.19’da sunulmuştur.

Çizelge 3.19. Optimum nanopartikül formülasyona ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve %EE değerleri (n=3)

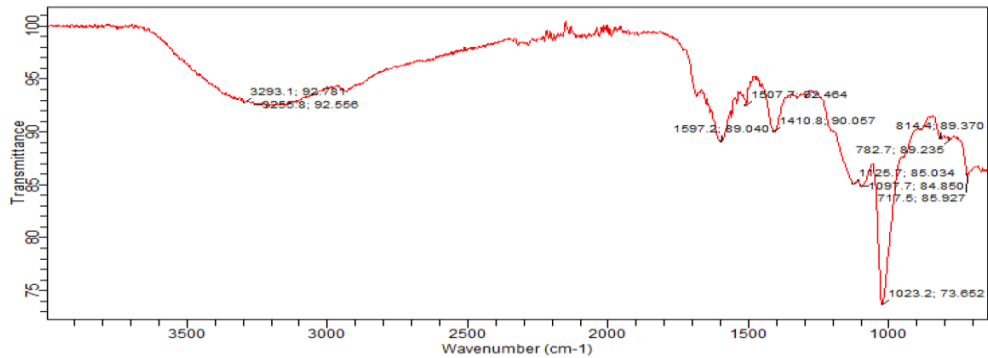
	Partikül Büyüklüğü (nm±SS)	PDI±SS	Zeta Potansiyeli (mV±SS)	EE (%±SS)
Optimum formülasyon	194,40±4,89	0,31±0,03	-23,30±1,41	95,96±0,72

PDI:Polidispersite indeksi
EE:Enkapsülasyon etkinliği

3.3.7. FTIR Analizine Ait Bulgular

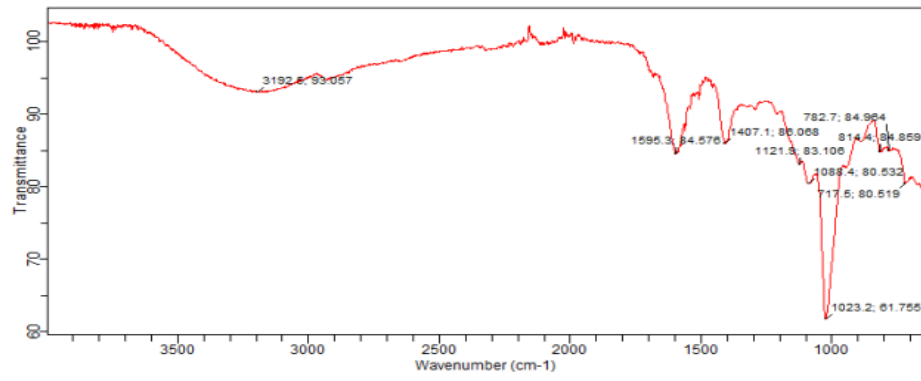
İnsüline, sodyum aljinata, protamine ve optimum nanopartikül formülasyonuna ait FTIR spektrumları Bölüm 2.2.5.4’de açıklandığı gibi alınmıştır. Elde edilen FTIR spektrumları Şekil 3.12’de gösterilmiştir.

A)

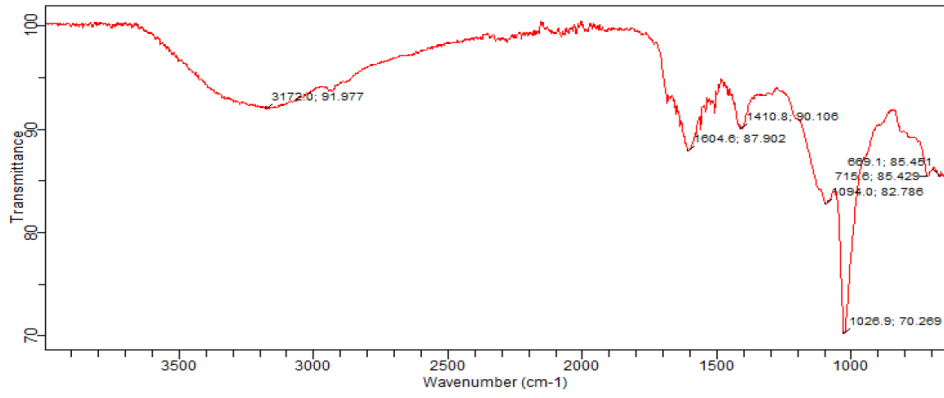


Şekil 3.12. İnsüline (A), sodyum aljinata (B), protamine (C) ve optimum nanopartikül formülasyonuna (D) ait FTIR spektrumları

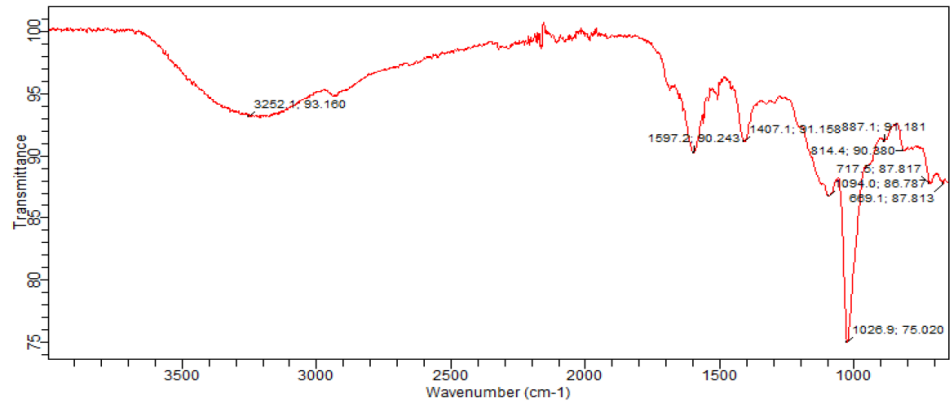
B)



C)



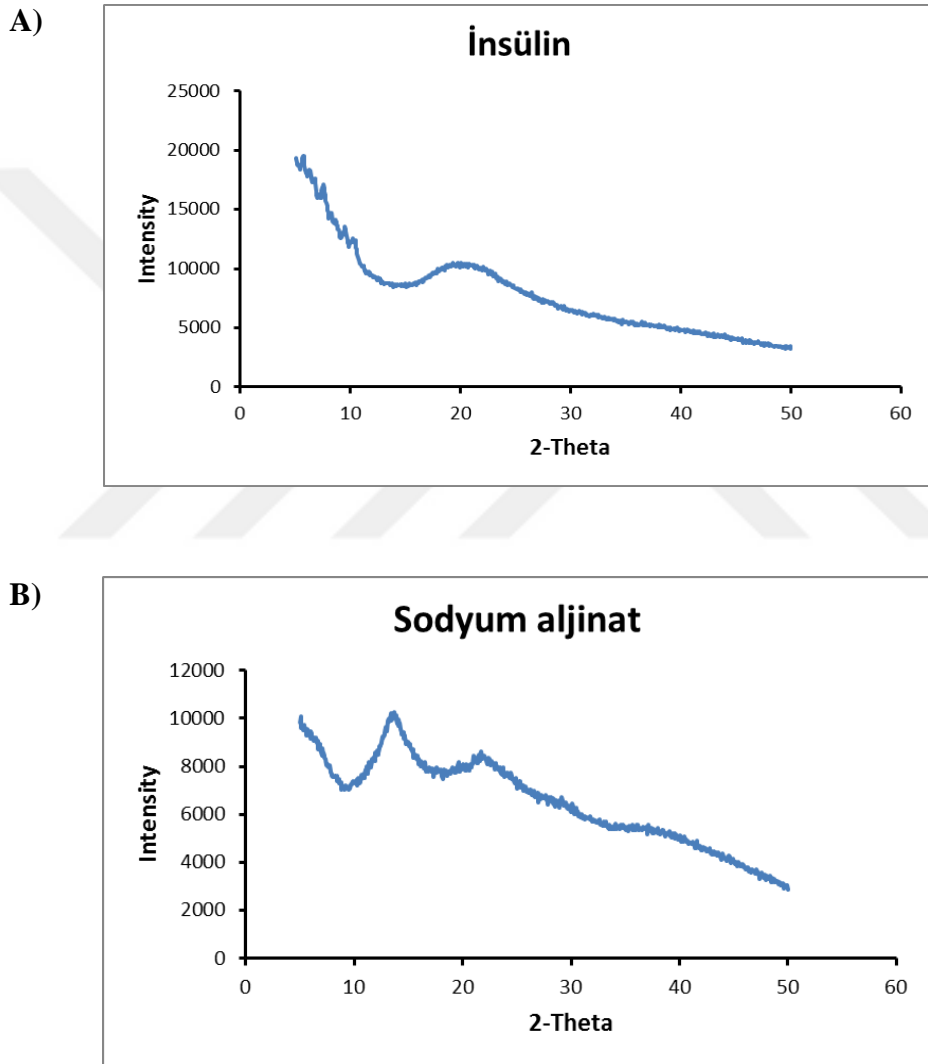
D)



Şekil 3.12. Devam

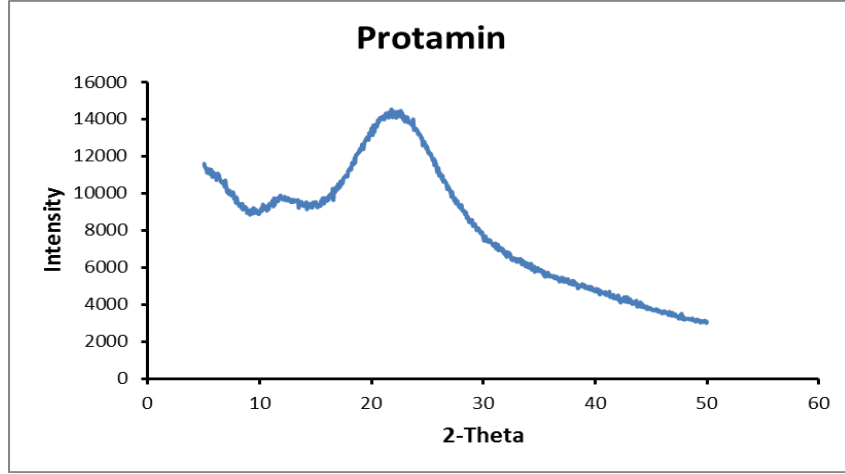
3.3.8. XRD Analizine Ait Bulgular

İnsüline, sodyum aljinata, protamine ve optimum nanopartikül formülasyonuna ait XRD analizi Bölüm 2.2.5.5’de açıklandığı şekilde yapılmıştır. XRD analizine ait sonuçlar Şekil 3.13’de gösterilmiştir.

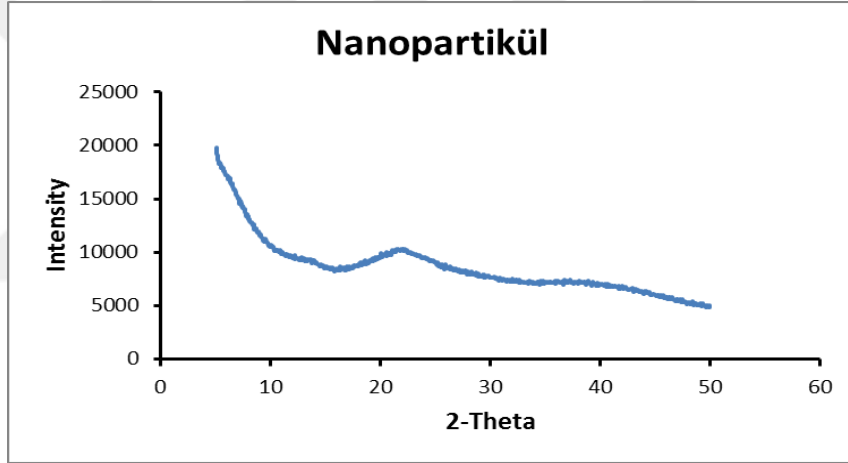


Şekil 3.13. İnsüline (A), sodyum aljinata (B), protamine (C) ve insülin yüklü polielektrolit kompleks nanopartiküllerine (D) ait XRD spektrumları

C)



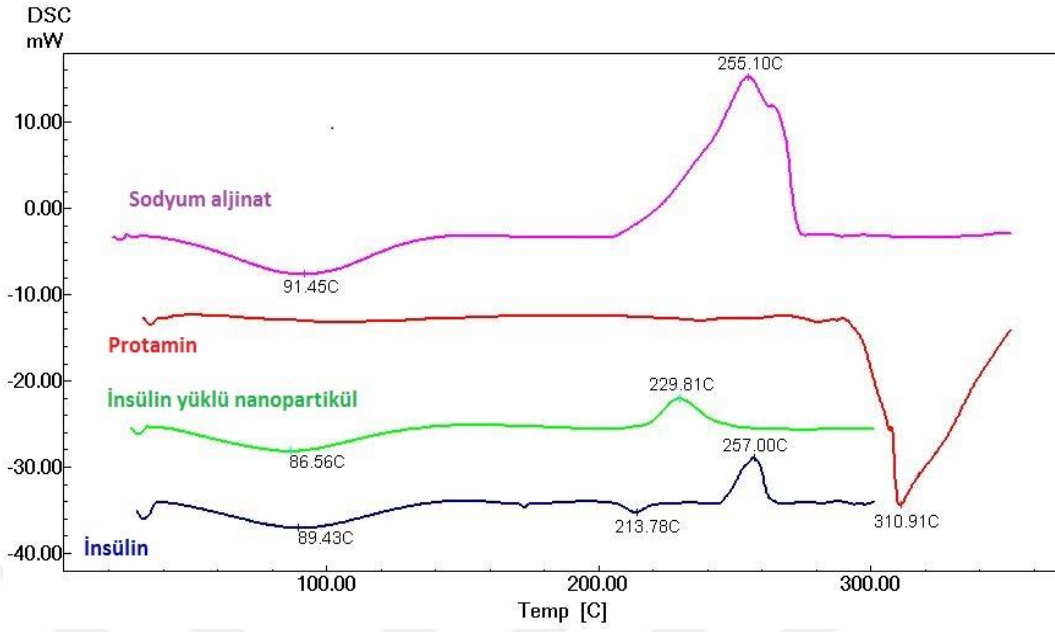
D)



Şekil 3.13. Devam

3.3.9. DSC Analizine Ait Bulgular

İnsülin, sodyum aljinat, protamin ve optimum nanopartikül formülasyonunun termal özellikleri Bölüm 2.2.5.6'da anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.14'te yer almaktadır.

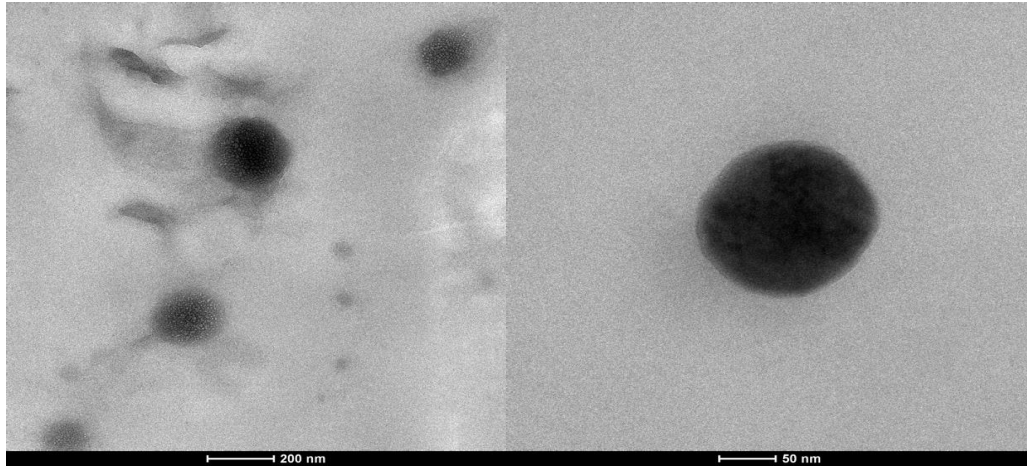


Şekil 3.14. İnsüline, sodyum aljinata, protamine ve optimum nanopartikül formülasyonuna ait DSC termogramları

3.3.10. Nanopartiküllerin Morfolojik Özelliklerine Ait Bulgular

3.3.10.1. TEM Analizine Ait Bulgular

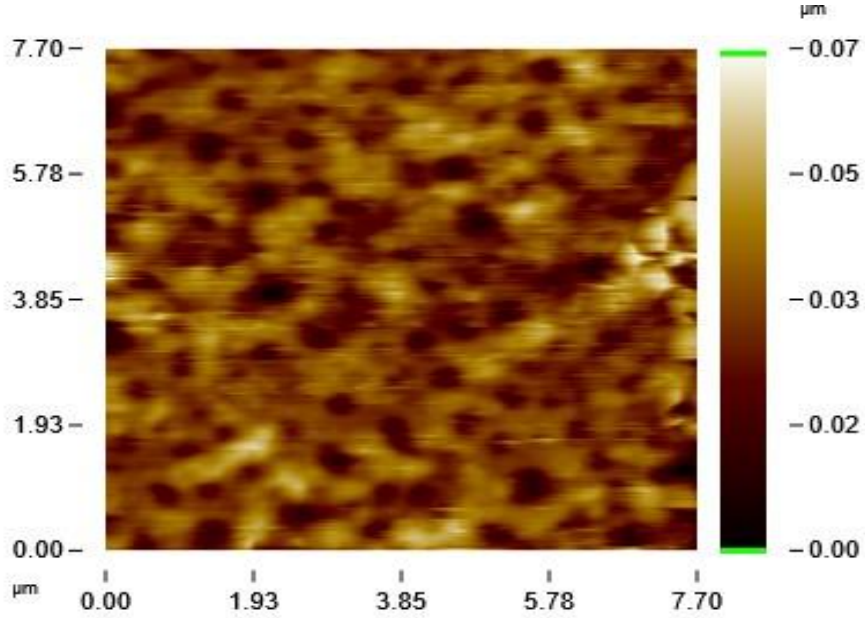
Optimum nanopartikül formülasyonunun morfolojisini belirlemek amacıyla Bölüm 2.2.5.7’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen TEM analizine ait görüntüler Şekil 3.15’de yer almaktadır.



Şekil 3.15. İnsülin yüklü polielektrolit kompleks nanopartiküllerine ait TEM görüntüsü

3.3.10.2. AFM Analizine Ait Bulgular

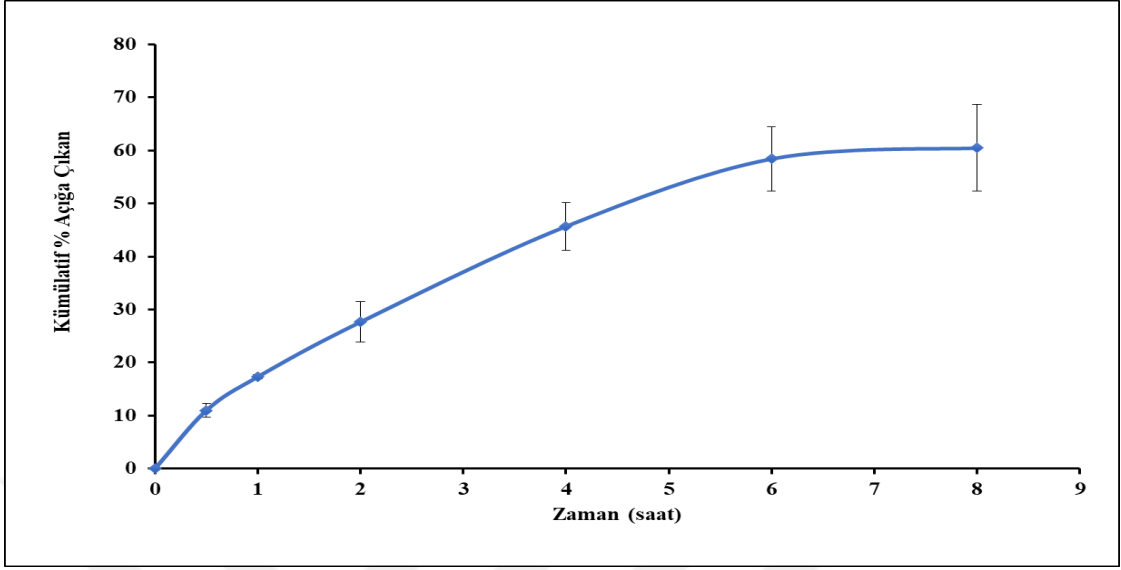
İnsülin yüklü polielektrolit nanopartiküllerinin morfolojisini belirlemek amacıyla Bölüm 2.2.5.8’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen AFM analizine ait görüntü Şekil 3.16’da verilmiştir.



Şekil 3.16. İnsülin yüklü polielektrolit kompleks nanopartiküllerine ait AFM görüntüsü

3.3.11. Çözünme Hızı

Taguchi deney tasarımı ile belirlenen optimum nanopartikül formülasyonuna ait insülin salım profili Bölüm 2.2.5.9’da anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. Elde edilen salım profili Şekil 3.17’de verilmiştir.



Şekil 3.17. Optimum nanopartikül formülasyonuna ait çözünme hızı grafiği (n=3)

3.3.12. Çözünme Hızı Kinetikleri

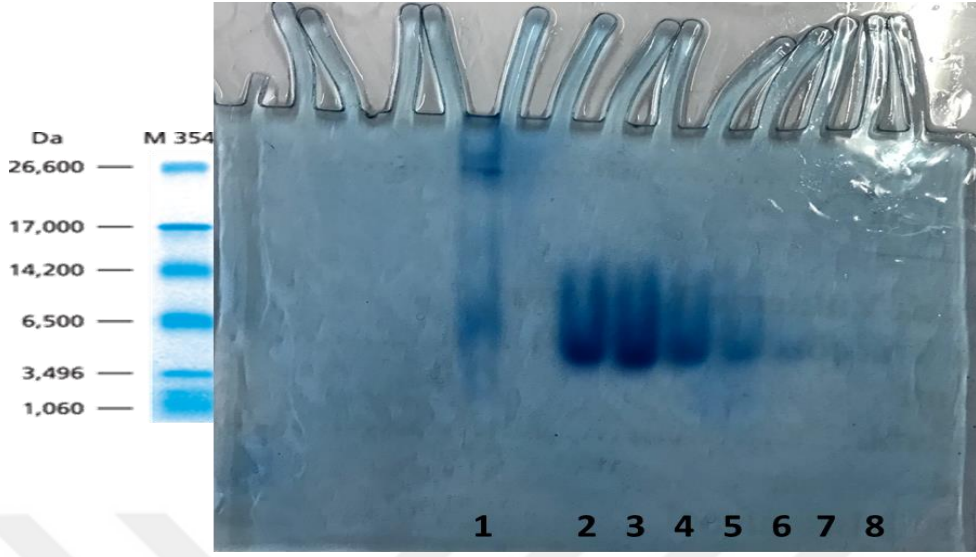
Optimum nanopartikül formülasyonuna ait elde edilen salım profili için Bölüm 2.2.5.10'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilen kinetik değerlendirme sonuçları Çizelge 3.20'de verilmiştir.

Çizelge 3.20. Optimum nanopartikül formülasyonuna ait in vitro salım kinetikleri

0°	r2	0,927
	k0	9,435
	SH	1,182
	RMS	77,139
1°	r2	0,985
	k1	0,179
	SH	0,010
	RMS	0,005
Higuchi	r2	0,979
	kh	29,280
	SH	1,923
	RMS	22,376
Peppas	r2	0,968
	n	0,752
	SH	0,068
	RMS	0,005
Weibull	r2	0,991
	β	0,966
	SH	0,045
	Td	5,035
	RMS	0,02
Hixson-Crowell	r2	0,644
	kh	0,395
	SH	0,131
	RMS	0,949

3.3.13. Native-PAGE Analizine Ait Bulgular

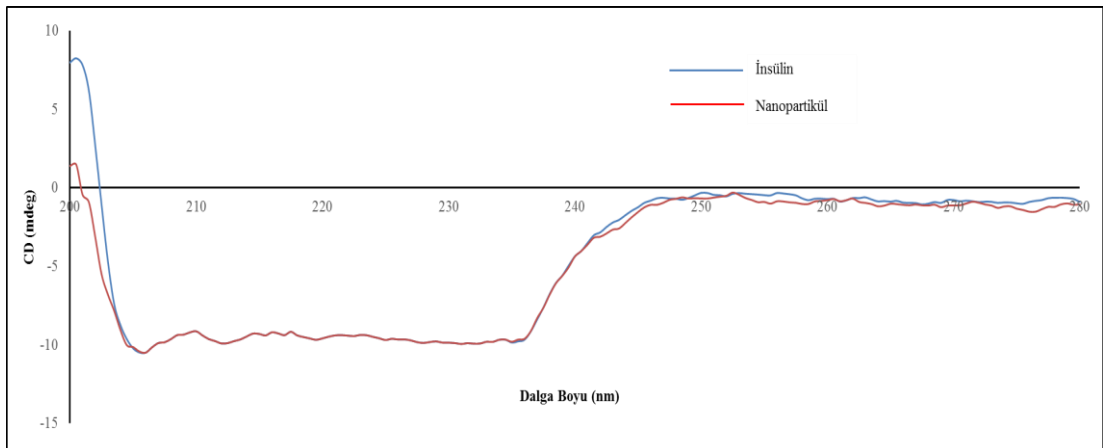
İnsülinin yapısal bütünlüğünü belirlemek amacıyla Bölüm 2.2.5.11’de belirtilen şekilde gerçekleştirilen Native-PAGE analizine ait jel görüntüsü Şekil 3.18’de yer almaktadır.



Şekil 3.18. İnsülinin Native-PAGE ile elektroforetik analiz sonuçları. 1:Referans protein karışımı; 2:nanopartiküllerden salınan insülin; 3-8: 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 ve 1,6 IU/ml insülin çözeltisi

3.3.14. CD Analizine Ait Bulgular

İnsülinin yapısal bütünlüğünü belirlemek amacıyla Bölüm 2.2.5.12’de belirtilen şekilde gerçekleştirilen CD analizine ait bulgular Şekil 3.19’da yer almaktadır.



Şekil 3.19. İnsülin çözeltisine ve nanopartiküllerden salınan insüline ait CD spektrumları

3.3.15. Nanopartiküllerin Stabilitelerinin Belirlenmesi

Optimum nanopartikül formülasyonuna ait stabilite çalışmaları Bölüm 2.2.5.13’de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.21’de yer almaktadır.

Çizelge 3.21. +4°C ve +25°C’de bekletilen nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli değerleri (n=3).

	Partikül Büyüklüğü (nm±SS)		PDI±SS		Zeta Potansiyeli (mV±SS)	
	+4°C	+25°C	+4°C	+25°C	+4°C	+25°C
0. ay	194,40±4,89	194,40±4,89	0,31±0.03	0,31±0,03	-23,30±1,41	-23,30±1,41
3. ay	190,40±3,68	203,03±2,95	0,28±0.03	0,24±0,02	-22,20±3,36	-31,90±0,98

3.4. Nanopartikül İçeren Enterik Kaplı Sert Jelatin Kapsüllerin Karakterizasyonu

3.4.1. Enterik Kaplı Sert Jelatin Kapsüllerin Dağılma Testi

Optimum nanopartikül formülasyonunu içeren No.4 sert jelatin kapsüller Eudragit L100-55 ile kaplandıktan sonra Bölüm 2.2.6’da belirtildiği şekilde dağılma testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.20’de verilmiştir.

A)



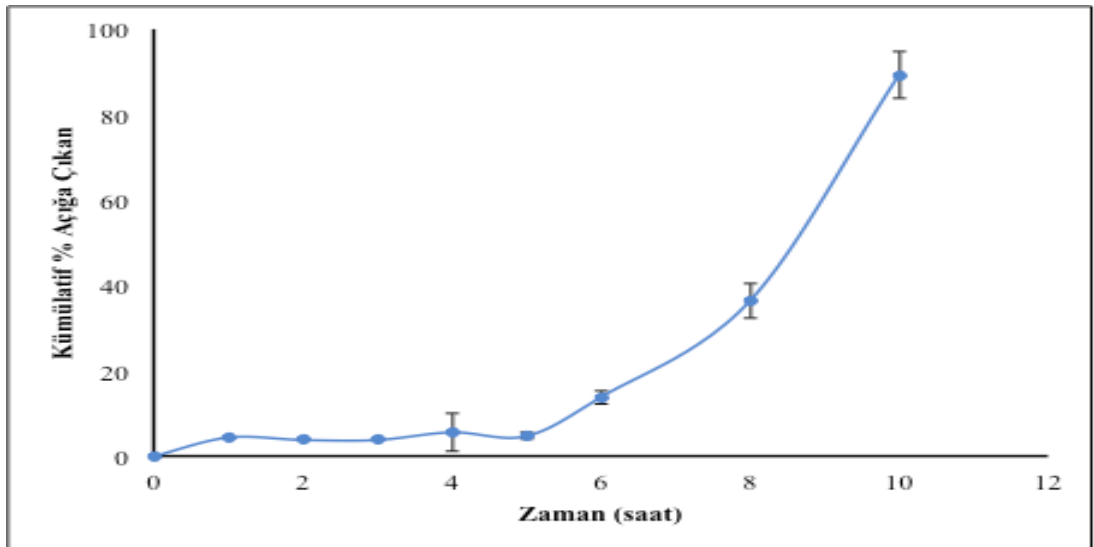
B)



Şekil 3.20. Eudragit L100-55 ile kaplanmış sert jelatin kapsüllerin A) başlangıç, B) 2 saat sonraki görüntüsü

3.4.2. Enterik Kaplı Sert Jelatin Kapsüllerin Çözünme Hızı Deneyi

Optimum nanopartikül formülasyonunu içeren Eudragit L100-55 ile kaplı No.9 sert jelatin kapsüller için Bölüm 2.2.6'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilen çözünme hızı deneyi için elde edilen sonuçlar Şekil 3.21'de verilmiştir.



Şekil 3.21. Eudragit L100-55 ile kaplanmış sert jelatin kapsüllere ait çözünme hızı grafiği

3.5. İn Vivo Çalışmalara Ait Bulguları

3.5.1. İnsülin İçeren Formülasyonlara Ait İn Vivo Bulgular

İnsülin yüklü nanopartiküllerin ve insülin yüklü nanopartikülleri içeren enterik kaplı kapsüllerin in vivo aktivitesini belirlemek amacıyla Bölüm 2.2.7’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen in vivo çalışmalara ait sonuçlar Çizelge 3.22 ve Şekil 3.22’de verilmiştir.

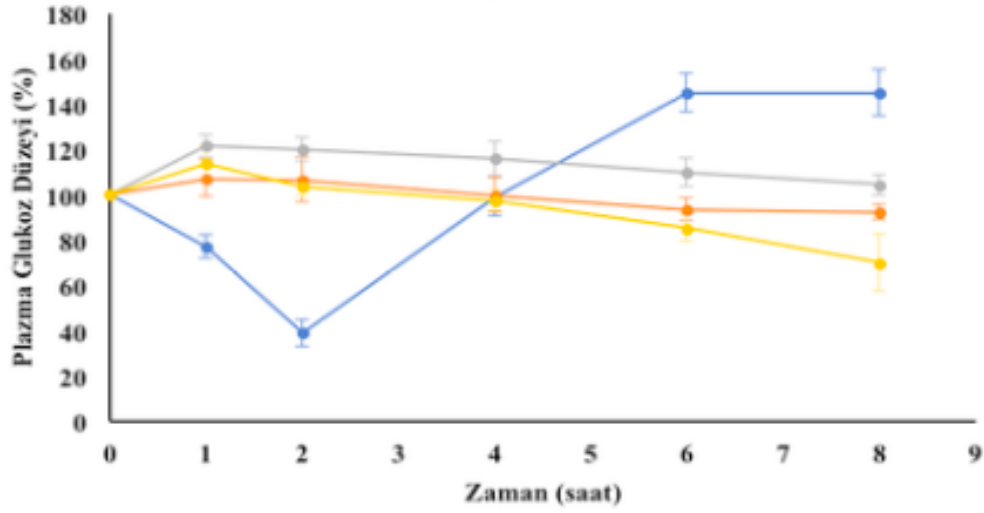
Çizelge 3.22. Belirli zaman aralıklarında ölçülen plazma glukoz düzeyleri (n=6)

Zaman (saat)	1. Grup (Subkutan insülin çözeltisi)		2. Grup (Oral insülin çözeltisi)		3. Grup (Enterik kaplı olmayan kapsüller)		4. Grup (Enterik kaplı kapsüller)	
	PGD	SH	PGD	SH	PGD	SH	PGD	SH
0,5	100	0	100	0	100	0	100	0
1	76,37	4,949	107,040	8,199	121,390	4,749	113,453	7,371
2	37,90	5,866	106,353	9,820	119,799	4,977	103,423	4,159
4	97,82	8,465	99,656	7,483	115,792	7,451	97,297	4,514
6	143,33	8,222	93,245	4,836	109,723	6,086	85,045	5,855
8	143,20	9,971	92,329	3,270	104,242	4,437	69,729	12,665

PGD: Plazma glukoz düzeyi (%).

*Deney başlangıcındaki plazma glukoz düzeyi % 100 kabul edilmiştir.

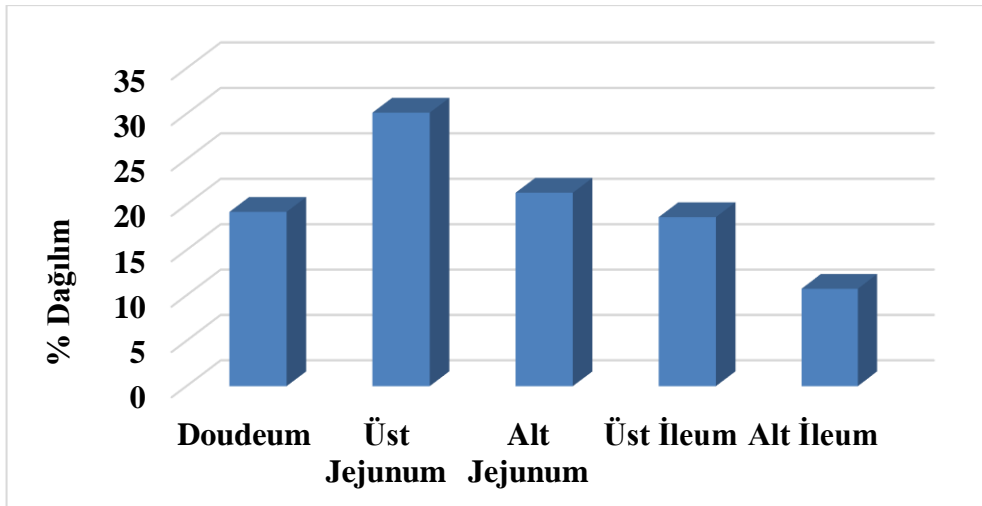
**1. grup ratların PGD’indeki düşüşün durdurulması için 2. saatte beslenmişlerdir.



Şekil 3.22. İn vivo çalışma gruplarında 0-8 saat arasında elde edilen kan glukoz düzeylerindeki % değişimi gösteren grafik (— Subkutan insülin çözeltisi; — Oral insülin çözeltisi; — Oral enterik kaplı olmayan kapsüller; — Oral enterik kaplı kapsüller)

3.5.2. Floresan İşaretli Formülasyonlara Ait İn Vivo Dağılım Bulguları

Floresan işaretli polielektrolit kompleks nanopartiküllerinin gastrointestinal kanaldaki in vivo dağılımını değerlendirmek amacıyla Bölüm 2.2.7’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen deneye ait elde edilen sonuçlar Şekil 3.23’de verilmiştir.



Şekil 3.23. Floresan işaretli polielektrolit kompleks nanopartiküllerinin gastrointestinal kanaldaki in vivo dağılımı (n=6)

4.TARTIŞMA

WHO tarafından 2014 yılında yapılan araştırmaya göre DM dünya genelinde 422 milyon insanı etkilemiş, 2016 yılında ise yaklaşık 1,6 milyon insan DM nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Özellikle tip 1 DM tedavisinde hayat kurtarıcı olan insülin, oral yolla verilişte karşılaştığı fiziksel ve kimyasal bariyerler sebebiyle düşük stabilite ve biyoyararlanım göstermekte ve günümüzde halen subkutan enjeksiyon yolu ile kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında insülinin oral yoldan etkin ve güvenilir bir şekilde verilişini sağlamak amacıyla nanopartiküler formülasyonlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, düşük toksisiteye sahip ve yapısındaki arjinin sayesinde insülini gastrointestinal kanalda enzimatik parçalanmadan koruyabilecek bir polikasyon olan protamin ile mukoadesif özellikteki çeşitli polianyonlar (kondroitin sülfat ve sodyum aljinat) kullanılarak iyonik çapraz bağlama yöntemi ile insülin içeren nanopartiküller hazırlanmıştır. Bu yöntem yüksek enerji, organik çözücü, yüzey etkin madde ve çapraz bağlayıcı kullanmaksızın insülinin nanopartiküllere yüklenmesini sağlamak gibi avantajlara sahip olduğu için tercih edilmiştir. Optimum özelliklere sahip nanopartikül formülasyonunun belirlenmesinde Taguchi deney tasarımı kullanılmıştır. Bu tasarımda; polianyon konsantrasyonları ve polianyon-polikasyon oranları ile insülin miktarı kontrol faktörü olarak seçilmiştir. Bu tasarıma göre Çizelge 2.4'te yer alan formülasyonlar hazırlanmış ve yapılan in vitro karakterizasyon (partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve %EE) sonuçları Minitab Statistical Software 17 kullanılarak analiz edilip optimum formülasyon belirlenmiştir. Belirlenen formülasyon parametrelerine göre hazırlanan nanopartikül formülasyonu daha sonra mide ortamındaki asidik pH'dan korunmak amacıyla sert jelatin kapsüllere doldurulduktan sonra Eudragit L100-55 ile enterik olarak kaplanmıştır. İnsülin yüklü nanopartikülleri içeren enterik kaplı kapsüller diyabetik sıçanlara oral yol ile uygulanarak plazma glukoz seviyelerindeki değişimler incelenmiştir. Ayrıca floresan işaretli nanopartikülleri içeren enterik kaplı kapsüllerin oral yoldan uygulanmasının ardından nanopartiküllerin gastrointestinal kanaldaki dağılımları belirlenmiştir.

4.1. Etkin Maddenin MikroBCA Analiz Yöntemiyle Kalibrasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi

4.1.1. Etkin Maddenin Çeşitli Ortamlardaki MikroBCA ile Analizi

İnsülinin Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Çizelge 3.1’de yer alan % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi, pH 4,0 asetat tamponu ve % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponu içinde mikroBCA yöntemi ile yapılan kalibrasyon doğrusuna ait r^2 değerlerinin 1’e yakın olması, okunan absorbanslardan bulunan konsantrasyon değerlerinin güvenilir sonuçlar vereceğini göstermektedir.

4.1.2. Etkin Maddenin MikroBCA Analiz Yöntemiyle Kalibrasyonunun Validasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi

İnsülinin mikroBCA yöntemi ile kalibrasyonunun validasyonu, kullanılan analitik yöntemin doğru, kesin ve tekrarlanabilir olduğunu göstermek amacıyla ICH’nın Q2 kılavuzuna göre gerçekleştirilmiştir.

4.1.2.1. Doğrusallık ve Aralığı

İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi, pH 4,0 asetat tamponu ve % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponu içinde mikroBCA yöntemi ile elde edilen kalibrasyonunun validasyonu amacıyla incelenen ve Şekil 3.4, Şekil 3.5, Şekil 3.6 ve Çizelge 3.2, Çizelge 3.3, Çizelge 3.4’de yer alan doğrusallık ve aralığı deneyi sonucunda elde edilen doğrunun r^2 değerinin yüksek, regresyon doğrusundan sapmaların standart hatasının düşük oluşu, elde edilen verilerin güvenilirliğini göstermektedir.

4.1.2.2. Doğruluk ve Geri Elde

Bölüm 2.2.2.2’de anlatıldığı şekilde incelenen analitik yöntemin doğruluğuna ilişkin sonuçlar Çizelge 3.5, Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7’de verilmiştir. İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi, pH 4,0 asetat tamponu ve % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponundaki hesaplanan BSS değerlerinin % 2’den küçük olması yöntemin doğruluğunu kanıtlamıştır.

4.1.2.3. Kesinlik

Bir analiz yönteminin kesinliği, normal test koşullarında testin tekrarlanabilirliğinin ve tekrar elde edilebilirliğinin bir ölçüsüdür. Tekrarlanabilirlik için Çizelge 3.8, Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10’da gösterilen veriler BSS değerlerinin % 2’den küçük olma şartına göre yorumlanmış ve uygun oldukları belirlenmiştir. Ara kesinlik için ise farklı iki günde yapılan ölçümlere ait verilere (Çizelge 3.11, Çizelge 3.12 ve Çizelge 3.13) SPSS 20 bilgisayar programı kullanılarak ortalamalar arası farkın önemlilik testi uygulanmış ve istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farkın olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

4.1.2.4. Teşhis ve Tayin Sınırları

İnsülinin % 0,04 (a/h) SDS içeren pH 1,2 HCl çözeltisi, pH 4,0 asetat tamponu ve % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 6,8 fosfat tampon içerisindeki mikroBCA yöntemi ile miktar tayinine ilişkin hesaplanan teşhis sınırları (LOD) (0,775; 0,640 ve 0,584 $\mu\text{g/ml}$) ve tayin sınırları (LOQ) (2,349; 1,940 ve 1,770 $\mu\text{g/ml}$) değerlerinin kalibrasyon doğrusunda yer alan en küçük konsantrasyon değeri olan 4 $\mu\text{g/ml}$ ’den küçük olması kalibrasyon aralıklarımızın insülinin tayin edilebildiği aralıkta yapıldığını göstermiştir.

4.1.2.5. Seçicilik

Seçicilik parametresi incelendiğinde formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin mikroBCA analizi sonucunda insülin ile girişim yapmaması yöntemin insülin için seçici olduğunu doğrulamıştır.

4.2. Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda insülin içeren nanopartikül formülasyonları iyonik çapraz bağlama yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan diğer hazırlama yöntemleri ile karşılaştırıldığında iyonik çapraz bağlama yöntemi diğer nanopartikül hazırlama yöntemlerinde uygulanan organik çözücü, yüksek ısı ya da yüksek karıştırma hızı gibi peptit ve proteinlerin stabilitesini olumsuz yönde etkileyecek stres koşullarının uygulanmıyor olması nedeniyle tercih edilmiştir (Patwekar ve ark., 2016). İyonik çapraz bağlama yöntemi zıt yüklü partiküllerin karıştırılması, kuvvetli ama tersine çevrilebilen elektrostatik bağların oluşması, bu etkileşimin polimerik zincirler arasında gerçekleşmesi ve sonrasında polielektrolit kompleks ağlarının oluşması esasına dayanmaktadır (Hamman, 2010). Bu çalışmada katyonik polimer olarak protamin kullanılmıştır. Protaminin yapısındaki amino asitlerin yaklaşık %90'ı arjininden oluşmaktadır. Arjinin intestinal bir proteaz olan tripsinin parçalama bölgelerinden birisidir. Bu nedenle, insülin gibi tripsin tarafından parçalanan proteinler protamin ile birlikte uygulandığında enzimatik yıkımlarının belirgin bir şekilde baskılandığı görülmüştür (Zhang ve ark., 2008). Protamin ayrıca arjinince zengin viral proteinlere benzer şekilde membran translokasyon aktivitesine sahiptir ve bu özelliği sayesinde hücreye penetre olabilmektedir (Scheicher ve ark., 2015; Umerska ve ark., 2015). Non-toksik bir CPP olan protamin, proteinlere bağlanarak hemen hemen tüm hücre tiplerinden geçişlerine izin vermiştir (Chang ve ark., 2001a; 2001b). Hücre kültürü ve hayvan çalışmaları protaminin TAT ile eşit hücre-internalizasyon potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (He ve ark., 2013). Diğer katyonik lipidlerden ya da transfeksiyon ajanlarından farklı olarak, protamin non-immünojenik ve non-antijenik özelliğe sahiptir. Bu nedenle protaminin insülinin intestinal mukozal tabakadan geçişini

iyileştirmek ve böylece sistemik biyoyararlanımını artırmak için etkili ve güvenli bir araç olarak kullanılabileceği düşünülmüştür (He ve ark., 2013). Çalışmamızda protamin ile kompleks oluşturması için anyonik polimer olarak sodyum aljinat ve kondroitin sülfat kullanılmıştır. Bu polimerlerin ortak özelliği, biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak uyumlu olmalarının yanı sıra doğal polimerler olmaları nedeniyle sentetik polimerler ile karşılaştırıldıklarında çok düşük toksisite göstermeleridir. Aynı zamanda, bu iki anyonik polimerin mukoadhezif özelliğe sahip olması nedeniyle bu polimerler ile hazırlanacak nanopartiküllerin gastrointestinal kanalda kalış süresinin ve hücresel alımının artacağı düşünülmektedir.

İnsülin yüklü nanopartiküller Bölüm 2.2.3'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. İyonik çapraz bağlama yönteminde, polimerler ve iyonize haldeki etkin madde arasındaki elektrostatik etkileşimler açısından ortam pH'sı önem taşımaktadır. Bu amaçla, öncelikle anyonik ve katyonik polimerlerin uygun pH'daki çözücüler içindeki çözeltilerinin hazırlanması gerekmektedir. Dul ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (2017), sodyum aljinat ve protamin ile hazırlanan nanopartiküllerde polimer çözeltilerinin pH'sının nanopartiküllerin partikül büyüklüğü üzerine etkisi incelenmiştir. Polimer çözeltilerinin pH'sı 5,8 olduğunda büyük nanopartiküller oluşmuş ve agregasyon gözlenmiştir. Polimer çözeltilerinin pH'sı 2,0 olduğunda ise nanopartiküller oluşmamıştır. pH 4,0'de ise agregasyon gözlenmemiş ve 70-300 nm aralığında nanopartiküller elde edilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda polimer çözeltileri pH 4,0 asetat tamponu içinde hazırlanmıştır. İnsülin ise asidik pH'da çözündüğü için 0,1 N HCl çözeltisinde çözülerek formülasyona eklenmiştir (Al-Kurdi ve ark., 2015; Alibolandi ve ark., 2016). Hazırlama sırasında, insülin çözeltisi öncelikle anyonik polimer çözeltisi ile karıştırılmış, daha sonra bu karışım katyonik polimer olan protamin çözeltisine eklenmiştir. Mok ve arkadaşları (2007) oligonükleotit yüklü nanopartikülleri hazırladıkları çalışmada, oligonükleotitleri önce anyonik polimer ile karıştırıp daha sonra protamin çözeltisine eklediklerinde çok daha küçük nanopartiküllerin elde edilebildiğini, nanopartikül boyutunun 654 nm'den 166 nm'e düştüğünü göstermişlerdir.

Daha önce de belirtildiği gibi, protamin içeren nanopartiküller herhangi bir çapraz bağlayıcı ajana ihtiyaç olmaksızın protamin ile anyonik polimer arasındaki kompleks oluşumuna bağlı olarak hazırlanabilmektedir. Protaminin nanopartikül oluşumu için tek başına etkili bir çapraz bağlayıcı olarak rol aldığı düşünülmektedir. González-Aramundiz ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (2015), tripolifosfat gibi bir çapraz bağlayıcının eklenmesi, protamin ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğünde ve stabilitesinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Bu nedenle, çalışmamızda nanopartiküllerin hazırlanması için herhangi bir çapraz bağlayıcı ajan kullanılmamıştır.

Anyonik ve katyonik polimer arasında kompleks oluşumunun sağlanması için pek çok literatürde karıştırma süresi olarak 10 dakika kullanılmış ve bu sürenin yeterli olduğu belirtilmiştir (Dul ve ark., 2015; Umerska ve ark., 2014; Umerska ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2018). Çalışmamızda, yapılan ön denemelerde daha uzun karıştırma süreleri denenmiş ancak nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinde anlamlı bir değişim görülmemiştir. Ayrıca insülinin yapısal bütünlüğünün korunması açısından karıştırma süresinin kısa olması avantaj sağlamıştır.

4.2.1. Formülasyon Geliştirme Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

4.2.1.1. Sodyum Aljinat ve Protamin ile Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonları

Sodyum aljinat; protein yapıdaki etkin maddelerin aljinat yapılı formüllere yapısını denatüre etmeyecek koşullar altında kolaylıkla yüklenebilmesi, aljinatın gastrik pH'da büzülüp enkapsüle olan etkin maddeyi salmaması, düşük toksisitesi, mukoadhezif özellikte olması ve etkin maddenin kontrollü salımını sağlaması nedeniyle çalışmamızda tercih edilmiştir (Chavarri ve ark., 2010; Jeon ve Park, 2009; Mukhopadhyay ve ark., 2015; Nahar ve ark., 2017). Kansal ve arkadaşları (2013), protamin sülfat ve sodyum aljinat kullanarak doksorubisin yüklü nanokapsüller

hazırlamışlardır. Hazırlanan nanokapsüllerin 3 ay boyunca fiziksel ve kimyasal olarak stabilitelelerini korudukları belirlenmiştir.

Çalışmamızda, sodyum aljinat ile yapılan ön formülasyon çalışmasına ait elde edilen sonuçlar Çizelge 3.15’de verilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda sodyum aljinat ile hazırlanan nanopartiküller için 169,00-201,60 nm aralığında partikül büyüklüğü değerleri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar artan sodyum aljinat konsantrasyonunun partikül büyüklüğünde artışa neden olduğunu göstermiştir. Polimer konsantrasyonundaki artışın partikül büyüklüğünde artışa sebep olduğu daha önce poli(laktik-ko-glikolikasit) (PLGA) (Wagh ve Apar., 2014), polikaprolakton (PCL) (Ajiboye ve ark., 2017), kalsiyum aljinat (Daemi ve Barikani, 2012) ve kondroitin sülfat-kitozan (Yeh ve ark., 2011) yapıları nanopartiküler sistemler üzerine yapılmış çalışmalarla gösterilmiştir. Bu durum, nanopartiküllere polielektrolitler tarafından sağlanan aşırı yükler arası itme kuvvetinin oluşması sonucu partikül büyüklüğünde ve yüzey alanında artış meydana gelmesiyle açıklanmaktadır (Mukhopadhyay ve ark., 2015; Yen ve ark., 2011). İnsülin içeren nanopartiküllerin PDI değerleri incelendiğinde, PDI değerlerinin oldukça düşük (0,17-0,22) ve 0-0,7 aralığında olması (Çizelge 3.15) hazırlanan nanopartiküllerin dar bir partikül büyüklüğü dağılımına sahip olduğunu göstermektedir (Malvern Dynamic Light Scattering Guideline, 2015).

Kolloidal sistemlerde zeta potansiyeli değeri minimum ± 30 mV olduğunda agregasyon gözlenmediği ve stabil nanosüspansiyon oluşumunun sağlandığı belirtilmiştir (Celia ve ark., 2011). Farklı sodyum aljinat konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyeli değerlerinin (-21,30) ile (-39,40) mV aralığında olduğu görülmektedir (Çizelge 3.15). 30 mV’un üzerinde zeta potansiyeli değerlerinin elde edilmiş olması nanopartiküllerin dispersiyon ortamında agregat oluşturmadığını göstermiştir. Ayrıca, sodyum aljinatın negatif yüklü olması nedeniyle artan sodyum aljinat konsantrasyonuna bağlı olarak nanopartiküllerin negatif yükünde de artış gözlenmiştir.

Çalışmamızda yüksek yükleme kapasitesine sahip nanopartiküllerin hazırlanmasına olanak sağlayan iyonik çapraz bağlama yöntemi kullanılarak nanopartikül formülasyonları hazırlanmıştır (Umerska ve ark., 2015) ve Çizelge

3.15’de görüldüğü gibi oldukça yüksek enkapsülasyon etkinliği değerleri elde edilmiştir. İyonik çapraz bağlama yöntemi kullanılarak hazırlanan insülin yüklü kitozan (Mukhopadhyay ve ark., 2013), pegile oligopeptit (Tsiourvas ve ark., 2012), poli akrilikasit (PAA) (Ibie, 2013) ve dekstran sülfat (Pechenkin ve ark., 2011) yapıları polielektrolit kompleks nanopartikülleri için de benzer şekilde yüksek enkapsülasyon etkinliği değerleri elde edilmiştir.

Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, anyonik polimer olarak sodyum aljinat kullanılarak istenen özelliklerde nanopartiküllerin hazırlanabileceği öngörülmüştür.

4.2.1.2. Kondroitin Sülfat ve Protamin ile Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonları

Kondroitin sülfat, yapısındaki sülfat grupları sayesinde iyonik etkileşimler yoluyla insülinle kompleks oluşturabilmesi, protein yapılı etkin maddelerin stabilitesini uzun süreli koruyabilmesi, düşük sitotoksitesi, biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir olması nedeniyle tercih edilmiştir (Park ve Na, 2009). Ayrıca, kondroitin sülfatın mükemmel bir hidrofilik özelliğe ve yüksek hidrodinamik hacme sahip olması bu polimer ile hazırlanan nanopartiküllerin plazma proteinleri ve hücreler ile istenmeyen etkileşimleri engelleyerek sistemik dolaşımında uzun süre kalmasını sağlamaktadır (Zhao ve ark., 2015). Kondroitin sülfat asidik yapısı nedeniyle pozitif yüklü moleküller ile iyonik kompleksler oluşturma özelliğine sahiptir. Kondroitin sülfat/protamin nanopartikülleri, kondroitin sülfat ve protaminin sulu çözeltilerinin oda sıcaklığında ve basit üretim koşulları altında karıştırılması ile herhangi bir çapraz bağlayıcı kullanılmadan kendiliğinden oluşmaktadır. Kondroitin sülfat/protamin nanopartiküllerine başarılı bir şekilde yüklenen salmon kalsitoninin nanopartiküllerden kontrollü bir şekilde salınması sağlanmıştır (Umerska ve ark., 2015).

Kondroitin sülfat ile hazırlanan nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü 167,60-207,60 nm aralığında, PDI değerleri ise 0,18-0,33 aralığında bulunmuştur (Çizelge 3.16). Zeta potansiyelleri ise (-15,40) – (-34,50 mV) aralığındadır. Kondroitin sülfat ile hazırlanan nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği değerlerine bakıldığında ise sodyum aljinat ile hazırlanan nanopartiküllerden daha düşük enkapsülasyon etkinliğine sahip nanopartiküller elde edilmiştir (Çizelge 3.16). Bu nedenle çalışmamıza anyonik polimer olarak sodyum aljinat ile devam edilmesine karar verilmiştir.

4.2.2. Taguchi Deney Tasarımı Kullanılarak Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonları

Nanopartiküllerin hazırlanmasında uygulanan formülasyon parametrelerinin ürün kalitesini nasıl etkilediğini araştırmak için Taguchi yöntemini kullanan deneysel bir tasarım uygulanmıştır. Taguchi yöntemi; deneylerin optimal tasarımına basit, verimli ve sistematik bir yaklaşım getirmeyi amaçlamaktadır ve deney tasarımı ile ürün kalitesinde minimum deneyle en önemli rolü oynayan faktörler belirlenerek, daha düşük maliyetlerle performansın artırılıp zamandan tasarruf edilmesini sağladığı için tercih edilmiştir (Canyılmaz ve Kutay, 2003). Çalışmamızda Taguchi deney tasarımının kullanılabilmesi için öncelikle insülin içeren nanopartiküllerin özelliklerini etkileyebilecek formülasyon ve proses parametreleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla oluşturulan Ishikawa diyagramı (Şekil 2.1) üzerinde yapılan değerlendirmeler ve literatür incelemeleri sonucunda sodyum aljinat konsantrasyonunun (% a/h), sodyum aljinat:protamin oranının ve insülin miktarının nanopartiküllerin özelliklerini etkileyebileceği öngörülmüştür (Dul ve ark., 2015; Dul ve ark., 2017; Ramasamy ve ark., 2014; Umerska ve ark., 2012; Umerska ve ark., 2014a; Umerska ve ark., 2014b; Umerska ve ark., 2015). Bu parametreler Taguchi deney tasarımında kontrol faktörlerini oluşturmaktadır.

Doğru ve dengeli bir deney tasarımı için uygulanması gereken ikinci adım, kontrol faktörlerinin seviyesini belirlemektir. Çalışmamızda hazırlanacak formül

sayısı göz önünde bulundurularak kontrol faktörleri için seviye sayısı 3 olarak belirlenmiştir. Tasarım için kontrol faktörleri ve bu faktörlerin seviyeleri belirlendikten sonra uygun ortogonal dizi (L9) seçilmiştir. Taguchi deney tasarımında, girdi sinyallerinin (kontrol faktörlerinin) değişmesine bağlı olarak çıktı sinyallerinin (yanıtların) değişmesi durumunda dinamik tasarım kullanılmaktadır. Çalışmamızda formülasyon parametrelerinin (girdi sinyalleri) değişmesine bağlı olarak nanopartikül özellikleri (çıktı sinyalleri) değişeceği için dinamik tasarım kullanılmıştır. Dinamik Taguchi deney tasarımında kontrol faktörleri ile birlikte bir de sinyal faktörünün belirlenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda karıştırma hızı sinyal faktörü olarak belirlenmiş ve 2 farklı seviyede (400 rpm ve 500 rpm) değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, L9 ortogonal dizisi ve iki seviyeli sinyal faktörü dikkate alındığında hazırlanması gereken formül sayısı 18 olarak hesaplanmıştır. Hazırlanan nanopartikül formülasyonları Çizelge 2.4'de yer almaktadır. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği değerleri ise Çizelge 3.17'de sunulmuştur. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü değerleri 159,30 – 298,40 nm, PDI değerleri 0,179 – 0,513, zeta potansiyeli değerleri (-19,80) – (-31,70) mV ve enkapsülasyon etkinliği değerleri %94,75 - %98,92 aralığında bulunmuştur.

4.2.3. Nanopartiküllere Ait İmalat Verimi Bulgularının Değerlendirilmesi

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında %66,93-108,16 imalat verimi elde edilmiştir (Çizelge 3.18). T15 kodlu formülasyon dışında imalat verimi değerlerinin %90'nın üzerinde bulunması iyonik çapraz bağlama yönteminin yüksek imalat verimi ile nanopartikül hazırlanmasına olanak sağlayan bir yöntem olduğunu göstermektedir. Ayrıca, yüksek imalat verimi değerlerinin elde edilmesi, nanopartiküllerin hazırlanma işlemi sırasında Vivaspin 20 kullanılarak uygulanan ayırma işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermiştir.

4.2.4. İstatistiksel Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Taguchi deney tasarımına göre hazırlanan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği değerlerinin istatistiksel analizi Minitab Statistical Software 17 analiz programı kullanılarak yapılmıştır.

Taguchi tasarımında değişkenliği azaltan kontrol faktörlerini tanımlamak için S/N oranı kullanılmaktadır. S/N'nin yüksek değerleri, gürültü faktörlerinin etkilerini en aza indiren kontrol faktörü seviyelerini göstermektedir. Diğer bir ifade ile S/N oranlarının maksimize edilmesi bir yandan sinyali artırırken, diğer yandan da varyansı azaltmaktadır. Yanıt tablolarındaki faktör sıralamaları (rank değerleri) ise faktörlerin etki düzeylerini göstermektedir.

Kontrol faktörlerinin nanopartiküllerin partikül büyüklüğü üzerine etkisi incelendiğinde, Şekil 3.7'de görüldüğü gibi sodyum aljinat konsantrasyonu 3. seviyede olduğunda (% 0,3 a/h) en yüksek S/N oranı elde edilmiştir. Nanopartikül boyutu üzerine etkili ikinci parametre ise sodyum aljinat:protamin oranıdır. En yüksek S/N oranı sodyum aljinat:protamin oranının 2. seviyesi (4,2) için elde edilmiştir (Şekil 3.7). Üçüncü kontrol faktörü olan insülin miktarı için de sodyum aljinat:protamin oranına benzer şekilde en yüksek S/N oranı insülin miktarının 2. seviyesi (3 mg) için elde edilmiştir (Şekil 3.7).

S/N'ler için yanıt tablosuna bakıldığında nanopartikül büyüklüğü üzerinde en fazla etkiye sahip olan faktör sodyum aljinat konsantrasyonu, daha sonra sodyum aljinat:protamin oranı ve en az etkiye sahip olan faktör ise insülin miktarıdır (Şekil 3.7). Farklı sodyum aljinat konsantrasyonları kullanarak yaptığımız ön formülasyon çalışmalarında da görüldüğü ve Bölüm 4.2.1.1'de açıklandığı gibi sodyum aljinat konsantrasyonundaki değişim nanopartiküllerin partikül büyüklüğünde anlamlı değişimlere neden olmuştur. Yapılan çalışmalarda polianyon:polikasyon kütle oranının nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerinde etkili en önemli parametrelerden biri olduğu belirtilmiştir. Umerska ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada (2014), anyonik polimer olarak hyaluronik asit ve katyonik polimer olarak protamin kullanılarak polielektrolit kompleks nanopartikülleri hazırlanmıştır. Farklı hyaluronik asit:protamin kütle oranlarının kullanıldığı bu çalışmada, nanopartiküllerin

partikül büyüklükleri artan protamin miktarına bağlı olarak artış göstermiştir. Partikül büyüklüğü üzerinde en az etkiye sahip olan faktör ise insülin miktarı olmuştur. Umerska ve arkadaşları da (2014) salmon kalsitonin yükledikleri polielektrolit kompleks nanopartikülleri için salmon kalsitonin miktarının partikül büyüklüğü üzerinde tek başına etkili olmadığını belirtmiştir.

Hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü dağılımının göstergesi olan PDI değerlerinin 0,179 ile 0,513 aralığında olduğu görülmektedir (Çizelge 3.17). Daha önce belirtildiği gibi PDI değerlerinin 0,7'den küçük olması hazırlanan nanopartiküllerin dar bir partikül büyüklüğü dağılımına sahip olduğunu göstermektedir (Malvern Dynamic Light Scattering Guideline, 2015). Formülasyon parametrelerinin PDI değerleri üzerine etkisi incelendiğinde, sodyum aljinat:protamin oranının en kritik etkiye sahip faktör olduğu görülmüştür (Şekil 3.8). PDI üzerinde etkili ikinci parametre sodyum aljinat konsantrasyonudur. İnsülin miktarı ise partikül büyüklüğünde olduğu gibi PDI üzerinde de en az etkili faktör olarak belirlenmiştir. S/N oranlarına bakıldığında ise (Şekil 3.8) sodyum aljinat konsantrasyonu için 3. seviyede (% 0,3 a/h), sodyum aljinat:protamin oranı ve insülin miktarı için 2. seviyede (sırasıyla 4,2 ve 3 mg) en yüksek S/N oranı elde edilmiştir.

Çalışmamızda nanopartiküllerin zeta potansiyeli değerlerinin (-20,5) ile (-31,7) mV değerleri arasında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.17). Daha önce yapılan çalışmalarda da benzer şekilde sodyum aljinat/protamin nanopartikülleri için negatif zeta potansiyeli değerleri elde etmiştir (Dul ve ark., 2017; Gonzalez-Aramundiz ve ark., 2015). Bu durumun yapıda yer alan polianyonun polikatyona ağırlıkça oranının 1'den büyük olması sonucu ortaya çıktığı belirtilmiştir (Gonzalez-Aramundiz ve ark., 2015). Çalışmamızda da nanopartiküllerin hazırlanması için kullandığımız sodyum aljinat:protamin oranının 1'den büyük olması (3,1; 4,2; 6,3) negatif zeta potansiyeli değerlerinin elde edilmesine neden olmuştur.

Formülasyon parametrelerinin nanopartiküllerin zeta potansiyeli değerleri üzerine etkisi incelendiğinde, en kritik etkiye sahip faktörün sodyum aljinat konsantrasyonu olduğu bulunmuştur. Zeta potansiyeli üzerinde ikinci derecede etkili kritik parametre insülin miktarıdır. Sodyum aljinat:protamin oranının ise zeta

potansiyeli üzerinde en az etkiye sahip faktör olduğu görülmüştür. S/N oranlarına bakıldığında ise; sodyum aljinat konsantrasyonu, sodyum aljinat:protamin oranı ve insülin miktarı için 1. seviyede (sırasıyla %0,1 a/h, 3,1 ve 1,5 mg) en yüksek S/N oranı elde edilmiştir (Şekil 3.9).

Biyolojik olarak aktif molekülleri içeren nanopartiküllerde, etkin madde yükleme kapasitesi en önemli kalite kontrol parametrelerinden birisidir. Terapötik konsantrasyonun sağlanması ve taşıyıcının olası toksik etkilerini en aza indirmek için yüksek etkin madde yükleme değerleri istenmektedir (Umerska ve ark., 2014a). Çalışmamızda yüksek yükleme kapasitesine sahip nanopartiküllerin hazırlanmasına olanak sağlayan iyonik çapraz bağlama yöntemi kullanılarak nanopartikül formülasyonları hazırlanmıştır (Umerska ve ark., 2015). Çalışmamızda da Çizelge 3.17’de görüldüğü gibi yüksek enkapsülasyon etkinliği değerleri (> %90) elde edilmiştir.

Taguchi deney tasarımından elde edilen sonuçlar sodyum aljinat:protamin oranının enkapsülasyon etkinliği üzerinde en kritik etkiye sahip faktör olduğunu göstermiştir (Şekil 3.10). Enkapsülasyon etkinliği üzerinde etkili ikinci parametre sodyum aljinat konsantrasyonudur. İnsülin miktarı ise nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği üzerinde en az etkili faktör olarak belirlenmiştir. S/N oranlarına bakıldığında sodyum aljinat konsantrasyonu için 3. seviyede (% 0,3 a/h), sodyum aljinat:protamin oranı için 1. seviyede (3,1) ve insülin miktarı için ise 2. sevide (3 mg) en yüksek S/N oranı elde edilmiştir (Şekil 3.10).

4.2.5. Optimum Nanopartikül Formülasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda optimum özelliklere sahip nanopartikül formülasyonuna ait formülasyon parametrelerinin belirlenmesi amacıyla Taguchi deney tasarımı uygulanmış ve tüm kontrol faktörlerine karşılık elde edilen yanıt değerleri (partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği) bir arada değerlendirilmiştir. Şekil 3.11’de verilen “Main Effects Plot for S/N Ratios” grafiğine bakıldığında en yüksek S/N değerlerinin sodyum aljinat konsantrasyonu, sodyum

aljinat:protamin oranı ve insülin miktarı için 2. seviyede elde edildiği görülmektedir. Bu sonuçlardan hareketle optimum nanopartikül formülasyonu sodyum aljinat konsantrasyonu % 0,2 (g/ml), sodyum aljinat:protamin oranı 4,2 ve insülin miktarı 3 mg olduğunda elde edilmektedir.

Belirlenen formülasyon parametreleri ile hazırlanan optimum formülasyona ait partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği değerleri (Çizelge 3.19) incelendiğinde bu formülasyon parametreleri ile 194,40 nm partikül büyüklüğüne, 0,31 PDI değerine, (-23,30) mV zeta potansiyeline ve %95,96 enkapsülasyon etkinliğine sahip nanopartiküllerin elde edildiği görülmektedir.

4.2.6. FTIR Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

İnsülin içeren polielektrolit kompleks nanopartiküllerin yapısal bileşimini belirlemek için FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla insülinin, sodyum aljinatın, protaminin ve insülin yüklü nanopartiküllerin FTIR spektrumları alınmıştır (Şekil 3.12). Sodyum aljinatın FTIR spektrumunda bulunan 1023 cm^{-1} (C-O-C) civarındaki pik sakkarit yapısına aittir. 1595 ve 1407 cm^{-1} 'deki pikler ise karboksilat tuz gruplarının asimetric ve simetric gerilimini göstermektedir (Bijukumar ve ark., 2016). Sodyum aljinatın 1595 cm^{-1} 'deki karakteristik piki insülin yüklü polielektrolit kompleks nanopartiküllerin FTIR spektrumunda 1597 cm^{-1} 'de yer almaktadır. Protaminin FTIR spektrumunda ise 1604 ve 1410 cm^{-1} 'deki pikler amid I ve amid II gruplarına aittir (Jiang ve ark., 2009). Protaminin amid I ve II titreşimlerinin nanopartiküllerin FTIR spektrumunda görülmemesi moleküller arası elektrostatik etkileşimi göstermektedir. Benzer şekilde insülinin spektrumundaki amid I ve II'e ait pikler (1597 ve 1410 cm^{-1} 'deki) moleküller arası elektrostatik etkileşim nedeniyle nanopartiküllerin FTIR spektrumunda bulunmamaktadır (Pippa ve ark., 2015).

4.2.7. XRD Analizine Ait Bulgular

İnsülinin nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan protamin ve sodyum

aljinat ile etkileşimini belirlemek için XRD analizi yapılmıştır. Şekil 3.13’de insüline, protamine, sodyum aljinata ve insülin yüklü nanopartiküllere ait XRD grafikleri verilmiştir. İnsüline ait XRD grafiğinde görülen pikler insülinin kristal yapısından kaynaklanmaktadır (Lu ve ark., 2012). İnsülin içeren nanopartiküllere ait XRD grafiğinde ise pik yoğunluğunda azalma meydana gelmiştir. Bu da kompleks içindeki insülinin moleküler boyutta disperse olduğunu ya da amorf forma dönüştüğünü göstermektedir.

4.2.8. DSC Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

İnsülinin nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimerlerle etkileşimini incelemek için DSC analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla insülinin, sodyum aljinatın, protaminin ve insülin yüklü nanopartiküllerin DSC termogramlarının karşılaştırması yapılmıştır (Şekil 3.14). Sodyum aljinatın DSC termogramı incelendiğinde, 91,45 °C’de geniş bir endotermik pike ve 255,10 °C’de keskin bir ekzotermik pike sahip olduğu görülmektedir. DSC termogramındaki endotermik pikin sodyum aljinatın dehidrasyonu, ekzotermik pikin ise dekompozisyonu sonucunda oluştuğu düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar literatür verileri ile uyumlu bulunmuştur (El-Houssiny ve ark., 2016). Protaminin DSC termogramında 310,91°C’de geniş bir endotermik pik bulunmaktadır. Bu pikin protaminin dekompozisyonu sonucunda oluştuğu düşünülmektedir. Sonuçlar Umerska ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2015) elde edilen sonuçlar ile uyumludur. İnsülinin DSC termogramında yer alan 89,43°C’deki geniş endotermik pik ve dekompozisyon başlangıcını gösteren 257°C’deki ekzotermik pik literatür verileriyle uyumlu bulunmuştur (Gatti ve ark., 2018). İnsülin yüklü nanopartiküllerin termogramında ise 86,56 °C’de geniş bir endotermik pik ve 229,81 °C’de ekzotermik bir pik görülmüştür. Elde edilen sonuçlar insülin ile polimerler arasında önemli bir etkileşimin olmadığını göstermiştir. Han ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (2012) da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

4.2.9. Nanopartiküllerin Morfolojik Özelliklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Nanopartiküllerin morfolojik özelliklerini incelemek amacıyla TEM ve AFM analizleri gerçekleştirilmiştir. Polielektrolit kompleks nanopartiküllerin TEM (Şekil 3.15) ve AFM (Şekil 3.16) fotoğraflarına bakıldığında elde edilen yapının küresel şekle sahip olduğu ve yüzeylerinin düzgün olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, optimum nanopartikül formülasyonu için TEM ile ölçülen partikül boyutunun dinamik ışık saçılımı yöntemiyle elde edilen partikül boyutundan daha küçük olduğu gözlenmiştir. Bu durumun, her iki yöntemin de farklı ölçüm prensiplerine sahip olmasından ve TEM için numune hazırlama sırasında, suyun uzaklaştırılmasının ancak dinamik ışık saçılımı yönteminde nanopartiküllerin su içerisinde disperse edilmiş olmasının bir sonucu olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Elde edilen bu sonuç literatür verileri ile de uyumlu bulunmuştur (Souza ve ark., 2016; Umerska ve ark., 2013).

4.2.10. Çözünme Hızı Verilerinin Değerlendirilmesi

Taguchi deney tasarımı ile belirlenen optimum nanopartikül formülasyonuna ait insülin salım profili % 0,01 SDS içeren pH 6,8 fosfat tamponunda incelenmiştir. Elde edilen salım profili Şekil 3.17'de sunulmuştur. İnsülin yüklü polielektrolit kompleks nanopartiküllerden ilk bir saat içerisinde salınan insülin miktarı % 17,30 iken 8. saatin sonunda % 60,48'e ulaşmıştır. Salımın başlangıçta hızlı şekilde gerçekleşmesinin insülinin nanopartikülün yüzeyi ile zayıf elektrostatik bağ kurması, sonrasında gerçekleşen yavaş salımınsa protamin ve sodyum aljinatla kurduğu kuvvetli elektrostatik bağ sayesinde gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Sepulveda-Rivas ve ark., 2019).

Çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirmesi sıfır derece, birinci derece, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Rosin-Rammler-Sperling-Bennet-Weibull (RRSBW) ve Hixson-Crowell kinetiklerine göre gerçekleştirilmiştir ve yapılan değerlendirmelere ait sonuçlar Çizelge 3.19'da verilmiştir. Optimum formül için elde edilen verilere

bakıldığında en yüksek r^2 değerinin RRSBW ile (0,991) elde edildiği görülmüştür. RRSBW için RMS değerinin de oldukça düşük olduğu (0,02) gözlenmekle birlikte en küçük RMS değeri (0,005) en yüksek ikinci r^2 değerinin (0,985) elde edildiği birinci derece kinetik için hesaplanmıştır. Weibull kinetiğinde hesaplanan β değerinin 1'den küçük olması başlangıçtaki hızlı etkin madde salımının ardından birinci derece kinetiğe benzer şekilde platoya ulaştığını, parabolik bir çözünme hızı profili elde edildiğini göstermektedir (Costa ve ark., 2013). Korsmeyer-Peppas denkleminde göre hesaplanan n değerinin 1'den küçük olması ise, etkin maddenin nanopartiküllerden çıkışının Fick yasasına uymayan (Non-Fickian) bir difüzyon mekanizmasına sahip olduğunu göstermektedir (Ayhan ve Ayhan, 2014).

4.2.11. Native-PAGE Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Yaptığımız çalışmada, nanopartiküllerden salınan insülinin yapısal bütünlüğünü koruyup korumadığını belirlemek amacıyla Native-PAGE yöntemi kullanılmıştır. Native-PAGE yöntemi; SDS-PAGE, SDS-üre-PAGE ve Trisin-SDS-PAGE yöntemlerine göre daha yüksek çözünürlük gösterdiği ve insülin ve analoglarına uygulanabilirliğinin yüksek olması sebebiyle tercih edilmiştir (Chi ve Huang, 2007).

Çalışmamızda molekül ağırlığı ~5,800 kDa olan rekombinant insan insülini kullanılmıştır. Elde edilen jel görüntüsüne bakıldığında (Şekil 3.18) standart insülin çözeltilerine ait bantların 1,060-26,600 kDa molekül ağırlığına sahip referans protein karışımına ait bantlardan 3,496 kDa ve 6,500 kDa molekül ağırlığına sahip proteinlere ait bantların arasında kalan bölge ile çakıştığı ve bant yoğunluklarının konsantrasyonun azalması ile birlikte azaldığı görülmüştür. Nanopartiküllerden salınan insüline ait bantların ise standart insülin çözeltilerine ait bantlar ile aynı seviyede olması nanopartiküllerden salınan insülinin yapısal bütünlüğünü korunduğunu göstermiştir.

4.2.12. CD Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Peptitlerin ve proteinlerin konformasyonu, optimum terapötik etkinin sağlanması için çok önemlidir ve yüksek sıcaklık, mekanik karıştırma ve organik çözücülere maruz kalma gibi çeşitli koşullar altında kolayca bozulabilmektedir. Genel olarak, ikincil yapılar peptit ve proteinlerin etkinliğinden sorumludur ve CD proteinlerin ve peptitlerin ikincil yapılarını değerlendirmek için en etkili yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir (Live ark., 2013). İnsülinin polimerik nanopartiküllere yüklenmesi sonrasında konformasyonunu koruyup korumadığı sodyum aljinat (Patil ve Devarajan, 2014), aljinat-dekstran (Lopes ve ark., 2015), PLGA-PEG (Chopra ve ark., 2017), kitozan (Mahjuv ve ark., 2014), kitozan-aljinat (Goycoolea ve ark., 2009), PEG kaplı silika (Anderani ve ark., 2014) yapılı nanopartiküllerde CD kullanılarak daha önce belirlenmiştir. Tiyaboonchai ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2003) polietilenimin-dekstran sülfat yapılı nanopartiküllerden salınan insülinin konformasyonel yapısını CD ile incelemiş, yapısında belirgin bir konformasyonel değişiklik meydana gelmeyen insülinin streptozozin kullanılarak diyabet modeli oluşturulan ratlarda hipoglisemik etki sağladığını belirtmiştir.

Çalışmamızda Bölüm 2.2.5.10'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen CD çalışmaları sonucunda standart insülin çözeltisi için pik değeri 210-240 nm aralığında elde edilmiştir (Şekil 3.19). Bu pik insülin molekülünün α -heliks yapısından kaynaklanmaktadır. Bu spektrumun literatür verileri ile uyumlu olduğu görülmüştür (Lu et al., 2012). Benzer şekilde nanopartiküllerden salınan insülin için de pik değerleri bu aralıkta bulunmuştur. Standart insülin çözeltisi ile nanopartiküllerden salınan insüline ait piklerin benzer dalga boylarında yer alması nanopartiküllere yüklenen insülinin konformasyonel yapısını koruduğunu göstermiştir (Patil ve Devarajan, 2014).

4.2.13. Nanopartiküllerin Stabilitesinin Değerlendirilmesi

Optimum nanopartikül formülasyonunun kısa süreli stabilitesinin belirlenmesi için buzdolabında (2-8 °C) ve oda sıcaklığında 25 °C'de 3 ay süreyle bekletilen

nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri yapılmıştır. Buzdolabında ve oda sıcaklığında 3 ay boyunca bekletilen nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü değerleri başlangıç partikül büyüklüğü değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmektedir. Benzer şekilde PDI değerlerinde de anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Zeta potansiyeli değerlerine bakıldığında ise buzdolabında bekletilen nanopartiküllerin zeta potansiyelinde değişim görülmezken oda sıcaklığında bekletilen nanopartiküllerin zeta potansiyelinde bir miktar artış gözlenmiştir (Çizelge 3.20) Tüm bu sonuçlar nanopartiküllerin buzdolabında ve oda sıcaklığında 3 ay boyunca stabilitelelerinin korunduğunu göstermiştir.

4.3. Enterik Kaplı Kapsüller Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Peptit ve proteinler oral yolla verildiğinde midenin asidik pH'sı ve pepsin aktivitesi ile karşılaşmakta ve bu durum yapının degradasyonuna yol açarak biyolojik aktivitenin kaybına neden olmaktadır (Brno ve ark., 2013; Shaji ve Patole, 2008). Etkin maddelerin midenin asidik ortamından korunması ve absorpsiyon bölgesi olan intestinal boşluğa başarılı bir şekilde ulaşması gibi amaçlarla uygulanan formülasyon geliştirme tekniklerinden biri de enterik kaplama yapmaktır (Hussan ve ark., 2012). Bu amaçla ilaç taşıyıcı sistemler midenin asidik ortamında çözünmeyen, pH 6 ve üzerindeki değerlerde çözünen Eudragit-S, Eudragit-L, Eudragit FS, polivinil asetat, hidroksipropil metilselüloz ve selüloz asetat gibi polimerlerle kaplanır (Şengel-Türk ve Haşçıçek, 2006). Çalışmamızda nanopartiküllerin ince bağırsakta açığa çıkması ve insülinin intestinal bölgeden absorpsiyonu sağlamak amacıyla nanopartikül yüklü sert jelatin kapsüller Bölüm 2.2.15'te anlatıldığı şekilde, basit, ucuz ve efektif bir yöntem olan daldırma metodu kullanılarak Eudragit L100-55 ile kaplanmıştır (Miller ve ark., 2015). Sonaje ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (2010) liyofilize nanopartiküler sistemlerin sert jelatin kapsüle yerleştirilerek Eudragit L100-55 ile enterik olarak kaplanmasının insülini midenin asidik ve enzimatik yıkımından koruyarak biyoyararlanımını % 20 oranında arttırdığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda öncelikle Eudragit L 100-55'in %15'lik (a/h) çözeltisi kullanılmıştır. Ancak bu konsantrasyon çok viskoz bir polimer çözeltisi elde edilmesine neden olmuştur. Yapılan literatür incelemesi sonucunda polimer konsantrasyonunun %12,5'a (a/h) düşürülmesine karar verilmiştir (Sharma ve Sinha, 2018). Yine yapılan literatür incelemesi sonucunda polimer çözeltisine enterik kaplamanın stabilitesini arttırmak amacıyla plastizer olarak % 2,5 (a/h) polietilen glikol 400 eklenmiştir (Miller ve ark., 2015). Polimeri çözdüğümüz çözücünün tipi de çözeltinin viskozitesini ve buna bağlı olarak kaplama etkinliğini etkilemiştir. Eudragit L 100-55 ilk olarak izopropil alkolde çözülmüştür. Bunun sonucunda oldukça viskoz bir çözelti elde edilmiştir. Bu viskoz çözelti ile kapsüller homojen bir şekilde kaplanamamıştır. Bu nedenle, enterik kaplı kapsüller pH 1,2 HCl çözeltisi içinde çok kısa bir süre içinde dağılmıştır. Eudragit L 100-55 çözücü olarak % 3 (h/h) su içeren aseton içinde çözüldüğünde (Hosny ve ark., 2002) ise çok daha az viskoz bir çözelti elde edilebilmiş ve kapsüllere homojen bir kaplama yapılabilmıştır. Bu şekilde kaplanan kapsüller pH 1,2 HCl çözeltisi içinde 2 saat boyunca dağılmadan kalmıştır (Şekil 3.20). Bu durum yapılan enterik kaplamanın başarılı olduğunu göstermiştir.

İnsülin yüklü nanopartikülleri içeren enterik kaplı sert jelatin kapsüllerin in vitro çözünme hızı deneyi Bölüm 2.2.6'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.21'de görüldüğü gibi pH 1,2 HCl çözeltisinde 2 saat süre boyunca insülin çıkışı olmamıştır. 2. saatin sonunda enterik kaplı kapsüller pH 1,2 HCl çözeltisinden alınarak pH 6,8 fosfat tamponu eklendiğinde 5. saatte insülin salımının olduğu görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş, enterik kaplı dozaj formlarından etkin madde salımının 5. saat civarında başladığı görülmüştür (Ahmadi ve ark., 2018; Moghimipour ve ark., 2018; Patel ve Amin, 2013).

4.4. İn Vivo Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda insülin yüklü nanopartiküllerin ve insülin yüklü nanopartikülleri içeren enterik kaplı kapsüllerin etkinliği diyabetik sıçanlar üzerinde yapılan in vivo çalışmalar ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla; subkutan enjeksiyon ile uygulanan insülin çözeltisi (2 IU/kg), oral yol ile uygulanan insülin çözeltisi (100 IU/kg), oral yol

ile uygulanan insülin (100 IU/kg) yüklü nanopartikülleri içeren kapsüller ve oral yol ile uygulanan insülin (100 IU/kg) yüklü nanopartikülleri içeren enterik kaplı kapsüllere ait plazma glukoz düzeyindeki değişimler Çizelge 3.21 ve Şekil 3.22’de verilmiştir. Ayrıca, hazırlanan nanopartiküllerin gastrointestinal kanaldaki dağılımını belirlemek amacıyla bir grup hayvana (n=5) FITC işaretli nanopartikül içeren enterik kaplı sert jelatin kapsüller oral yoldan verilmiştir. Mide ve ince bağırsağın çeşitli bölümlerine ait ölçülen floresan miktarları Şekil 3.23’de gösterilmiştir.

İnsülinin subkutan olarak uygulanmasının ardından ölçülen kan glukoz seviyeleri arasında yapılan grup içi istatistiksel değerlendirme, uygulamadan 2 saat sonra kan glukoz seviyesinde anlamlı bir düşüş olduğunu göstermektedir ($p<0,05$). 2. saatte gözlenen ani düşüşün ardından bu gruptaki hayvanlar beslendiği için kan glukoz seviyesi artmış, 4. saatte başlangıç seviyesine dönmüş ve bu saatten sonra anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

İnsülin çözeltisinin oral yoldan uygulandığı 2. grupta ve insülin yüklü nanopartikül içeren sert jelatin kapsüllerin oral yolla uygulandığı 3. grupta başlangıç kan glukoz düzeyine göre, ilk 1 saatte artış gözlenmiştir. Bu durum Veihofer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da (2013) belirtildiği gibi uygulamanın yol açtığı stresin adrenal salımına ve dolayısıyla kan glukoz seviyesinde artışa yol açmasından kaynaklanmaktadır. Kan glukoz seviyesindeki bu artışın ardından 1-8. saatler arasında kan glukoz seviyesinde azalma gözlenirse de bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

İnsülin yüklü nanopartikül içeren enterik kaplı sert jelatin kapsüllerin oral yolla uygulandığı 4. grupta da 2. ve 3. gruplara benzer şekilde kan glukoz seviyesinde stres kaynaklı bir artış gözlenmiştir. Sonrasında ölçülen glukoz değerleri başlangıç plazma glukoz değeri ile karşılaştırıldığında 6. saate kadar ölçülen farkın anlamsız olduğu ancak 8. saatte kan glukoz düzeyinin anlamlı bir şekilde düştüğü gözlenmiştir. Bununla birlikte 8. saatteki ölçümün 1, 2, 4 ve 6. saatlerdeki ölçüme göre de anlamlı bir şekilde farklı olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Bu durum hidrofilik bir polipeptit olan ve intestinal boşluktan emilimine kadar çeşitli biyolojik bariyerlerden geçen insülinin

(Lopes ve ark., 2014) ikincil yapısının korunduğunu ve hipoglisemik etki sağladığını göstermektedir (Lopes ve ark., 2015).

Gruplar için elde edilen 1, 2, 4, 6 ve 8. saat değerlerinin birbirleriyle karşılaştırıldığı istatistiksel değerlendirme, 1 ve 2. saatlerde 1. grupta diğer gruplara göre anlamlı bir düşüş olduğunu ancak bu saatte diğer gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir.

4. saat sonuçlarına göre hiçbir grup arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

6. saatte 4. grupta ölçülen kan glukoz düzeyi 1. ve 3. gruplara göre anlamlı bulunurken 2. gruba göre anlamsız olduğu saptanmıştır. 8. saatte ise 4. grupta meydana gelen kan glukoz seviyesindeki düşüşün tüm gruplara göre anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Bu durumun, enterik kaplamanın sert jelatin kapsülleri ve dolayısıyla insülin içeren nanopartikülleri gastrik yıkımdan korumasından, nanopartiküllerin üretiminde kullanılan sodyum aljinatın mukoadezif özelliği sebebiyle mukus tabakasına penetrasyonu sağlayarak emilim bölgesindeki tutulum süresini ve dolayısıyla insülinin salım süresini uzatmasından (Sarmiento ve ark., 2007) ve He ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da (2013) gösterdikleri gibi protamin sülfatın hücresel alımı arttırıcı etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hazırlanan nanopartiküllerin gastrointestinal kanaldaki dağılımını belirlemek amacıyla FITC işaretli nanopartikül içeren enterik kaplı sert jelatin kapsüllerin oral yolla verildiği çalışmanın sonucunda ise nanopartiküllerin çoktan aza doğru sırasıyla; üst jejunum, alt jejunum, doudenum, üst ileum, alt ileumda biriktiği gözlenmiştir (Şekil 3.23). Bu durum Eudragit L100-55 ile yapılan enterik kaplamanın intestinal sıvıda çözünerek nanopartiküllerin kapsülden salımını sağladığını ve floresan işaretli nanopartiküllerin intestinal mukozadan emiliminin sağlandığını göstermektedir (Date ve ark., 2016). Nanopartiküllerin birikiminin doudenum ve jejunum bölgelerinde ileum bölgesine göre daha fazla olmasının, bu bölgelerde goblet hücrelerinden müsin salgısının daha fazla olması ve kapsüllerden salınan mukoadezif özellikteki nanopartiküllerin mukus tabakasında tutulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Date ve ark., 2016).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

İnsülinin oral yolla verilisinde biyoyararlanımının arttırılması amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada;

- Nanopartiküler sistemlerin hazırlanmasında polianyon olarak sodyum aljinat ve kondrotin sülfat kullanılırken polikasyon olarak protamin sülfat kullanılmıştır. Kondroitin sülfat ve protamin sülfat ile hazırlanan nanopartiküler sistemlerin in vitro karakterizasyonu sonucunda enkapsülasyon etkinliğinin düşük bulunması ve hızlı salım sağlanması nedeniyle çalışmalardan çıkarılmıştır.
- Sodyum aljinat ve protamin yapılı nanopartiküler sistemlerin yüksek enkapsülasyon etkinliği, istenilen aralıkta zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü ve dağılımı gösterdiği gözlenmiştir. Bu sebeple çalışmalara bu formülasyon üzerinden devam edilmiş, in vitro karakterizasyon ve in vivo çalışmalar gerçekleştirilmiştir.
- Çalışmalar sırasında Taguchi deney tasarımı metodu kullanılmış ve bu metod sayesinde en az sayıda formülasyon üretilerek optimum formülün belirlenmesi sağlanmıştır.
- İn vivo çalışmalar için insülin yüklü nanopartiküllerin gastrik yıkımdan korunmasını sağlamak amacıyla formülasyon sert jelatin kapsüllere doldurulmuş ve Eudragit L100-55 çözeltisi ile enterik olarak kaplanması sağlanmıştır. Kaplanan kapsüller sıçanlara gastrik gavaj yöntemi ile verilmiştir.
- Hazırlanan nanopartiküllerin intestinal sistemdeki dağılımını görmek amacıyla FITC işaretli nanopartiküller sert jelatin kapsüllere doldurulmuş ve Eudragit L100-55 ile enterik olarak kaplandıktan sonra insülin yüklü nanopartiküllerde olduğu gibi sıçanlara gastrik gavajla verilmiştir.
- İn-vivo çalışmalardan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, insülin yüklü nanopartikülleri içeren enterik kaplı kapsüllerin sıçanların kan glukoz seviyesini 8. saatte oral insülin çözeltisi ve kaplanmamış sert jelatin kapsül

formüllerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdüğü gözlenmiştir ($p<0,05$).

- Nanopartiküllerin intestinal sistemdeki dağılımının incelendiği çalışmanın sonucunda birikimin çoktan aza doğru sırasıyla üst jejunum, alt jejunum, doudenum, üst ileum ve alt ileum şeklinde olduğu gözlenmiştir.
- Sonuç olarak, insülinin oral yolla verilmesini sağlamak amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada, hazırlanan formülasyonlar ile kan glukoz seviyesinde düşüş sağlanmış olup, kan glukoz seviyesinin 24 saat boyunca kontrol altında tutulmasını sağlayacak bir formülasyon ile daha etkin bir tedavinin sağlanabileceği öngörülmektedir.



ÖZET

Oral İnsülin Verilişi İçin Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Değerlendirilmesi

Diabetes mellitus (DM) tüm dünyada en çok ölümlere neden olan hastalıklar arasında 6. sırada yer alan kronik bir hastalıktır. İnsülin, gerek insüline bağımlı diyabet (Tip 1) ve gerekse insüline bağımlı olmayan diyabet (Tip 2) tedavisindeki en önemli araçlardan biridir. İnsülinin bilinen en yaygın uygulama şekli subkutan enjeksiyondur. Bununla birlikte, insülinin vücuda subkutan yol ile uygulanması pek çok yan etkiye neden olmaktadır. Fizyolojik yolağı taklit etmesi ve subkutan enjeksiyon ile görülen yan etkileri potansiyel bir şekilde azaltması nedeniyle, insülinin oral yol ile uygulanmasına giderek artan bir ilgi söz konusudur. Bununla birlikte, oral yol ile uygulanan insülinin midedeki hızlı asidik ve enzimatik yıkımı, intestinal lümendeki proteolitik enzimlerle inaktivasyonu, yüksek molekül ağırlığı ve hidrofilik özelliği nedeniyle intestinal epitelden yetersiz emilimi düşük biyoyararlanıma neden olmaktadır.

Çalışmamızda, etkin ve güvenilir bir diyabet tedavisi sağlamak için oral yol ile uygulanacak insülin formülasyonlarının geliştirilmesi planlanmıştır. Bunun için bir polikasyon olan protamin ve çeşitli polianyonlar kullanılarak iyonik çapraz bağlama yöntemi ile insülin içeren nanopartiküller hazırlanmıştır. İnsülin nanopartiküllerinin hazırlanmasında protamin ile birlikte anyonik polimer olarak sodyum aljinat ve kondroitin sülfat kullanılmıştır. Kullanılan anyonik polimerin tipi, konsantrasyonu, protamin ile kütle oranları değiştirilerek ve farklı konsantrasyonlarda insülin çözeltisi kullanılarak optimum özelliklere sahip nanopartiküllerin hazırlanması planlanmıştır.

Hazırlanan nanopartiküller partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği, morfolojisi, etkin madde salım profilleri, insülinin yapısal bütünlüğü ve stabilite açısından değerlendirilmiştir. Taguchi deney tasarımı yöntemi ile belirlenen optimum özelliklere sahip nanopartiküller sert jelatin kapsüller içine yerleştirilmiş ve nanopartikülleri midenin asidik pH'sından koruyarak bağırsaklarda açığa çıkmalarını sağlamak amacıyla kapsüller Eudragit L100-55 ile enterik olarak kaplanmıştır. Enterik kaplı kapsüller oral yol ile diyabetik ratlara uygulanarak hipoglisemik etkileri incelenmiştir. Hipoglisemik etki; diyabetik ratlardan belirli zaman aralıklarında alınan kan örneklerinde glukoz seviyesini ölçerek değerlendirilmiştir. Ayrıca, enterik kaplı sert jelatin kapsüller içinde diyabetik sıçanlara oral olarak uygulanan florosein izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenmiş nanopartiküller kullanılarak nanopartiküllerin in vivo dağılımı belirlenmiştir.

Sonuç olarak; enterik kaplı sert jelatin kapsüllere yüklenen polielektrolit kompleks nanopartiküllerinin, insülinin oral yolla verilisinde etkin bir dozaj formu olarak değerlendirilebileceği görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Diyabet, Enterik Kaplama, İnsülin, Nanopartikül, Oral Verilişi

SUMMARY

Preparation and Evaluation of Polymeric Nanoparticles for Oral Insulin Delivery

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease that ranks 6th among the most deaths worldwide. Insulin is one of the most important drugs in the treatment of both insulin-dependent diabetes (Type 1) and non-insulin-dependent diabetes (Type 2). The most common administration of insulin is subcutaneous injection. However, subcutaneous administration of insulin to the body causes many side effects. There is increasing interest in oral administration of insulin, since it mimics the physiological pathway and potentially reduces the side effects associated with subcutaneous injection. However, rapid acidic and enzymatic degradation of oral insulin in the stomach, inactivation with proteolytic enzymes in the intestinal lumen, low molecular weight and inadequate absorption from the intestinal epithelium result in low bioavailability.

In our study, it was planned to develop insulin formulations to be administered orally to provide effective and reliable diabetes treatment. For this purpose, insulin-containing nanoparticles were prepared by ionic cross-linking method using protamine, a polycation, and various polyanions. In the preparation of insulin nanoparticles, sodium alginate and chondroitin sulfate were used as anionic polymer together with protamine. It was planned to prepare nanoparticles with optimum properties by changing the type, concentration and mass ratio of anionic polymer to protamine and using different concentrations of insulin solution.

The prepared nanoparticles were evaluated in terms of particle size and distribution, zeta potential, encapsulation efficiency, morphology, drug release profiles, insulin structural integrity and stability. The nanoparticles with the optimum properties determined by Taguchi experimental design method were placed in hard gelatin capsules and the capsules were enterically coated with Eudragit L100-55 to protect the nanoparticles from the acidic pH of the stomach and to release them in the intestines. Hypoglycemic effects of enteric coated capsules were analyzed by administering them to diabetic rats orally. Hypoglycemic effects were determined by measuring glucose levels in blood samples taken at certain time intervals. In addition, in vivo distribution of nanoparticles using fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled nanoparticles administered orally to diabetic rats in enteric coated hard gelatin capsules was determined.

As a result; it has been found that polyelectrolyte complex nanoparticles loaded into enteric coated hard gelatin capsules can be evaluated as an effective dosage form for oral administration of insulin.

Keywords : Diabetes, Enteric Coating, Insulin, Nanoparticle, Oral Administration

KAYNAKLAR

- ACARTÜRK F (2009). "Vajinal İlaç Sistemleri." In: Modern Farmasötik Teknoloji. *Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını*, s.: 379-391
- AGYEI D, AHMED I, AKRAM Z, IQBAL H, DANQUAH M (2017). "Protein and peptide biopharmaceuticals: an overview." *Protein and peptide letters*, **24.2**: 94-101.
- AHIRRAO SP, GIDE PS, SHRIVASTAV B, SHARMA P (2014). "Iontropic gelation: a promising cross linking technique for hydrogels." *Research and Reviews: Journal of Pharmaceutics and Nanotechnology* **2.1**:1-6.
- AHMADI E, SADRJAVADI K, MOHAMMADI G, FATTAHI A (2018). "De-Esterified Tragacanth Microspheres Loaded into Eudragit S-100 Coated Capsules for Colon-Targeted Delivery." *Iran J Pharm Res. Spring*; **17.2**: 470-479.
- AJIBOYE AL, TRIVEDI V, MITCHELL JC (2018). Preparation of polycaprolactone nanoparticles via supercritical carbon dioxide extraction of emulsions. *Drug delivery and translational research*, **8.6**: 1790-1796.
- AKSU B (2015). "Tasarımla Kalite (Quality By Design: QbD) ve Kalite Risk Yönetimi." *Marmara Pharmaceutical Journal*, **19.1**: 12-18.
- AL-KURDI ZI, CHOWHRY BZ, LEHARNE SA, QINNA NA, AL-OMARI MM, BADWAN AA (2015). "Influence of glutathione on the bioactivity of subcutaneously or orally administered insulin to rats." *Protein Pept Lett*. **22.6**: 489-96.
- ANDREANI T, DE SOUZA ALR, KIILL CP, LORENZON EN, FANGUEIRO JF, CALPENA AC, SOUTO EB (2014). "Preparation and characterization of PEG-coated silica nanoparticles for oral insulin delivery." *International journal of pharmaceutics*, **473.1-2**: 627-635.
- ANKERFORS C, ONDARAL S, WAGBERH L, ÖDBERG L (2010). "Using jet mixing to prepare polyelectrolyte complexes: Complex properties and their interaction with silicon oxide surfaces." *Journal of colloid and interface science*, **351.1**: 88-95.

- ANSARI MJ (2015). "Role of protease inhibitors in insulin therapy of diabetes: Are these beneficial." *Bull Env Pharmacol Life Sci*, **4**: 1-8.
- ANSARI MJ (2015). "Oral Delivery of Insulin for Treatment of Diabetes: Classical Challenges and Current Opportunities." *Journal of Medical Sciences* **15**: 209-220
- ARAVAMUDHAN A, RAMOS DM, NADA AA, KUMBAR SG (2014). "Natural polymers: polysaccharides and their derivatives for biomedical applications." *In Natural and synthetic biomedical polymers* p: 67-89
- ATMACA, A. (2012). "Diabetes mellitusun tanı ve izlem kriterleri." *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 29.
- AYHAN H, AYHAN F (2014). "Kontrollü ilaç salımı için fotoçapraz bağlı poli (etilen glikol) hidrojeller." *Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi*, **39.4**.
- BANERJEE A, LEE J, MITRAGOTRI S. (2016). Intestinal mucoadhesive devices for oral delivery of insulin. *Bioengineering & translational medicine*, **1.3**: 338-346.
- BANI-JABER A, AL-AANI L, ALKHATIB H, AL-KHALIDI B (2011). "Prolonged intragastric drug delivery mediated by Eudragit® E-Carrageenan polyelectrolyte matrix tablets." *Aaps Pharmscitech*, **12.1**: 354-361.
- BERNKOP-SCHNURCH A, DUNNHAUPT S (2012). "Chitosan-based drug delivery systems." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **81.3**: 463-469.
- BHAITA S (2016). "Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications." *Natural Polymer Drug Delivery Systems*, p: 33-93
- BHATIA S (2016). "Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications." *Natural polymer drug delivery systems*. Springer, Cham, p.: 33-93.
- BIRCH NP, SCHIFFMAN JD (2014). "Characterization of self-assembled polyelectrolyte complex nanoparticles formed from chitosan and pectin." *Langmuir* **30.12**: 3441-3447.
- BISHNOI M, JAIN A, HURKAT P, JAIN SK (2016). "Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis." *Glycoconjugate journal* **33.5**: 693-705.

- BODDOHI S, MOORE N, JOHNSON PA, KIPPER MJ (2009). "Polysaccharide-based polyelectrolyte complex nanoparticles from chitosan, heparin, and hyaluronan." *Biomacromolecules*, **10.6**: 1402-1409.
- BOURGANIS V, KARAMINIDOU T, KAMMONA O, KIPARISSIDES C (2017). "Polyelectrolyte complexes as prospective carriers for the oral delivery of protein therapeutics." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **111**: 44-60.
- BRUNO BJ, MILLER GD, LIM CS (2013). "Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery." *Therapeutic delivery*, **4.11**: 1443–1467. doi:10.4155/tde.13.104
- CANIYILMAZ E, KUTAY F (2003). "Taguchi metodunda varyans analizine alternatif bir yaklaşım." *Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, **18.3**.
- CCHO HJ, OH J, CHOO MK, HA JI, PARK Y, MAENG HJ (2014). "Chondroitin sulfate-capped gold nanoparticles for the oral delivery of insulin." *International journal of biological macromolecules* **63**: 15-20.
- CEFALU WT, ROSENSTOCK J, LEROITH D, RIDDLE MC (2015). "Insulin's role in diabetes management: after 90 years, still considered the essential "black dress." *Diabetes Care* **38**: 2200–2203.
- CELIA C, COSCO D, PAOLINO D, FRESTA M (2011). "Nanoparticulate devices for brain drug delivery" *Med Res Rev*, **31.5**: 716–756.
- CHANG LC, LIANG JF, LEE HF, LEE LM, YANG VC (2001a). "Low molecular weight protamine (LMWP) as nontoxic heparin/low molecular weight heparin antidote (II): in vitro evaluation of efficacy and toxicity", *AAPS PharmSci* **3.3**: E18.
- CHANG LC, WROBLESKI S, WAKEFIELD T, YANG V (2001b). "Low molecular weight protamine as nontoxic heparin/low molecular weight heparin antidote (III): Preliminary in vivo evaluation of efficacy and toxicity using a canine model", *AAPS PharmSci*, **3.3**: E19.
- CHAVARRI M, MARANON I, ARES R, IBANEZ FC, MARZO F, DEL CARMEN VILLARAN M (2010). "Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions." *International journal of food microbiology* **142.1-2**: 185-189.

- CHI Q, HUANG K (2007). "Polyacrylamide gel electrophoresis of insulin." *Analytical letters*, **40.1**: 95-102.
- CHO HJ, OH J, CHOO MK, HA JI, PARK Y, MAENG HJ (2014). "Chondroitin sulfate-capped gold nanoparticles for the oral delivery of insulin." *International journal of biological macromolecules* **63**: 15-20.
- CHO OJ, OH J, CHOO MK, HA JI, PARK Y, MAENG HJ (2014). "Chondroitin sulfate-capped gold nanoparticles for the oral delivery of insulin." *International journal of biological macromolecules*, **63**: 15-20.
- CHOPRA S, BERTRAND N, LIM JM, WANG A, FAROKHZAD OC, KARNIK R (2017). "Design of insulin-loaded nanoparticles enabled by multistep control of nanoprecipitation and zinc chelation." *ACS applied materials & interfaces*, **9.13**: 11440-11450.
- CHOUHAN R, SHILPI G, ANIL KB (2017). "Recent advancements in oral delivery of insulin: from challenges to solutions." *Nanostructures for Oral Medicine*. p.: 435-465.
- CLEMENT S, STILL JG, KOSUTIC G, MCALLISTER RG (2002). "Oral insulin product hexyl-insulin monoconjugate 2 (HIM2) in type 1 diabetes mellitus: the glucose stabilization effects of HIM2." *Diabetes technology & therapeutics* **4.4**: 459-466.
- COOK MT, TZORTZIS G, CHARALAMPOPOULOS D, KHATORYANSKIY VV (2011). "Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria." *Biomacromolecules* **12.7**: 2834-2840.
- CORMIER M, JOHNSON B, AMERI M, NYAM K, LIBIRAN L, ZHANG DD, DADDONA P (2004). "Transdermal delivery of desmopressin using a coated microneedle array patch system." *Journal of controlled release* **97.3**: 503-511.
- COSTA ALDO, ENEAS PCR, MIRANDA TA, MINGOTI SA, SOARES CDV, PIANETTI GA (2013). "In vitro dissolution kinetic for mycophenolic acid derivatives tablets." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **49.2**: 311-319.
- COŞANSU GK, NAHCIVAN NÖ (2004). Erişkinlerde Diyabet Risk Faktörlerinin Belirlenmesi. *İstanbul Üniversitesi F.N.H.Y.O* **13.52**.

- COURTNEY A, GUPTA RB (2011). "Nanoparticle technology for drug delivery." *Ideas Concyteg* **6.72**: 714-726.
- CROMMELIN DJ, SINDELAR RD, BERND M (2013). "Pharmaceutical biotechnology : Fundamentals and applications." 4th Ed.
- CURCIO M, CLANCO-FERNANDEZ B, COSTOYA A, CONCHEIRO A, PUOCI F, ALVAREZ-LORENZO C (2015). "Glucose cryoprotectant affects glutathione-responsive antitumor drug release from polysaccharide nanoparticles", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **93**: 281-292.
- ÇAKIR E (2016). "Recent technologies in insulin delivery systems." *Journal of Turgut Ozal Medical Center* **23.4**: 477-81.
- ÇOBANOĞLU ZSÜ, ALTUNTAŞ Y, KARAMUSTAFAOĞLU KO, ŞENGÜL A, ÇOBANOĞLU N (2008). "Tip 1 ve Tip 2 diyabetes mellitus hastalarında yeme bozuklukları ve bozulmuş yeme davranışı." *Düşünen Adam: Psikiyatrik ve Nörolojik Bilimler Dergisi* **21**: 24-31.
- ÇUBUK G, İNCE S (2015). "Oral Antidiabetic Drugs." *Kocatepe Veteriner Dergisi*, **8.1**: 95-102.
- DAEMI H, BARIKANI M (2012). "Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles." *Scientia Iranica*, **19.6**: 2023-2028.
- DAMGE C, REIS CP, MAINCENT P (2008). "Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin." *Expert Opin Drug Deliv.* **5.1**: 45-68.
- DASH S, MURTHY PN, NATH L, CHOWDHURY P (2010). "Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems." *Acta Pol Pharm*, **67.3**: 217-23.
- DATE AA, HANES J, ENSIGN LM (2016). "Nanoparticles for oral delivery: Design, evaluation and state-of-the-art." *Journal of Controlled Release*, **240**: 504-526.
- DE JONG WH, BORM PJ (2008). "Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards." *International journal of nanomedicine* **3.2**: 133.

- DEĞİM Z, DEĞİM T, ACARTÜRK F, ERDOĞAN D, ÖZOĞUL C, KÖKSAL M (2005). "Rectal and vaginal administration of insulin–chitosan formulations: An experimental study in rabbits." *Journal of drug targeting* **13.10**: 563-572.
- DELI MA (2009). "Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1788.4**: 892-910.
- DEMİR Ö, AKSU B, ÖZSOY Y (2017). "İlaç Formülasyonu Geliştirilmesinde Deney Tasarımı (DoE) Seçimi ve Kullanımı." *Marmara Pharmaceutical Journal*, **21.2**: 216-227.
- DERMAN S, KIZILBEY K, AKDESTE Z (2013). "Polymeric Nanoparticles". *Journal of Engineering and Natural Sciences* **31**: 109-122.
- DEROBERTIS S, BONFERONI MC, ELVIRI L, SANDRI G, CAMELLA C, BETTINI R (2015). "Advances in oral controlled drug delivery: the role of drug–polymer and interpolymer non-covalent interactions." *Expert opinion on drug delivery*, **12.3**: 441-453.
- DEVİRİM B, BOZKIR A (2013). "Preparation and evaluation of double-walled microparticles prepared with a modified water-in-oil-in-oil-in-water (w1/o/o/w3) method. *Journal of Microencapsulation*, **30.8**: 741-754.
- DEVİRİM B, BOZKIR A (2015). "Design and evaluation of hydrophobic ion-pairing complexation of lysozyme with sodium dodecyl sulfate for improved encapsulation of hydrophilic peptides/proteins by lipid-polymer hybrid nanoparticles." *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, **6.1**: 1.
- DEVİRİM B, BOZKIR A, CANEFE K (2011). "Preparation and evaluation of PLGA microparticles as carrier for the pulmonary delivery of rhIL-2: I. Effects of some formulation parameters on microparticle characteristics." *Journal of Microencapsulation*, **28.6**: 582-594.
- DIMITRIADIS G, MITROU P, LAMBADIARI V, MARATOU E, RAPTIS SA (2011). "Insulin effects in muscle and adipose tissue." *Diabetes research and clinical practice* **93**: 52-59.

DINARVAND R, SEPEHRI R, MANIICHEHRI S, ROUHANI H, ATYABI F (2011). "Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents", *International Journal of Nanomedicine*, **6**: 877-895.

DİNÇÇAĞ N (2011). "Diabetes mellitus tanı ve tedavisinde güncel durum." *İç Hastalıkları Dergisi* **18.4**: 181-223.

DOBARIA NR, MASHRU R, VADIA NH (2007). "Vaginal drug delivery systems: a review of current status." *East and Central African journal of pharmaceutical sciences* **10.1**: 3-13.

DUL M, PALUCH KJ, KELLY H, HEALY AM, SASSE A, TAJBER L (2015). "Self-assembled carrageenan/protamine polyelectrolyte nanoplexes-Investigation of critical parameters governing their formation and characteristics." *Carbohydr Polym.* **123**: 339-49.

DUL M, PALUCH KJ, HEALY AM, SASSE A, TAJBER L (2017). "Optimisation of the self-assembly process: production of stable, alginate-based polyelectrolyte nanocomplexes with protamine." *Journal of Nanoparticle Research.* **19**: 221.

DUMITRIU S, CHORNET E (1998). "Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complexes." *Advanced drug delivery reviews*, **31.3**: 223-246.

EKAMBARAM PA, SATHALI AH, PRIYANKA K (2012). "Solid lipid nanoparticles: a review." *Sci Rev Chem Commun* **2.1**: 80-102.

ERAY E, BALCI MK (2005). "Tip 2 diyabet tedavisi." *Dahili Tıp Bilimleri Dergisi* **12.2**: 66-71

ERDOĞAR N, ISKIT AB, EROĞLU H, SARGON MF, MUNGAN N, BILENSOY E (2014). "Cationic core-shell nanoparticles for intravesical chemotherapy in tumor-induced rat model: safety and efficacy." *International journal of pharmaceutics*, **471.1-2**:1-9.

European Pharmacopeia 6th Edition. Council of Europe, 67075, Strasbourg, Cedex, France.

- FANG J, ZHANG Y, YAN S, LIU Z, HE S, CUI L, YIN J (2014). "Poly (L-glutamic acid)/chitosan polyelectrolyte complex porous microspheres as cell microcarriers for cartilage regeneration." *Acta biomaterialia*, **10.1**: 276-288.
- FARID R, ETMAN MA, NADA AH, EBIAN AEA (2012). "Sodium Alginate-Based Microspheres of Salbutamol Sulphate for Nasal Administration: Formulation and Evaluation." *American journal of pharma tech research* **2.5**: 289-307.
- FONTE P, ARAUJO F, SILVA C, PEREIRA C, REIS S, SANTOS HA, SARMENTO B (2015). "Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: Revisited approaches." *Biotechnology advances*, **33**: 1342-1354.
- FRIEDMAN AJ, PHAN J, SCHAIRER DO, CHAMPER J, QIN M, PIROUZ A, KIM J (2013). "Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan–alginate nanoparticles: A targeted therapy for cutaneous pathogens." *Journal of investigative Dermatology*, **133.5**: 1231-1239.
- FRY A. (2012). "Insulin delivery device technology 2012: where are we after 90 years?" *Journal of diabetes science and technology*, **6:4**: 947-53.
- GEDAWY A, MARTINEZ J, AL-SALAMI H, DASS CR (2018). "Oral insulin delivery: existing barriers and current counter-strategies." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **70.2**: 197-213.
- GOLDBERG M, GOMEZ-ORELLANA I (2003). "Challenges for the oral delivery of macromolecules." *Nature reviews Drug discovery*, **2.4**: 289.
- GONZALEZ-ARAMUNDIZ JV, PELETEIRO OLMEDO M, GONZALEZ-FERNANDEZ A, ALONSO FERNANDEZ MJ, CSABA NS (2015). "Protamine-based nanoparticles as new antigen delivery systems", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97(Pt A): 51-59.
- GOYCOOLEA FM, LOLLO G, REMUNAN-LOPEZ C, QUAGLIA F, ALONSO MJ (2009). "Chitosan-alginate blended nanoparticles as carriers for the transmucosal delivery of macromolecules." *Biomacromolecules*, **10.7**: 1736-1743.
- GRADZIELSKI M, HOFFMAN H (1994). "Influence of charges on structure and dynamics of an O/W microemulsion. Effect of admixing ionic surfactants." *The Journal of Physical Chemistry*, **98.10**: 2613-2623.

- GREGORY JM, MOORE DJ, SIMMONS JH (2013). "Type 1 diabetes mellitus." *Pediatrics in review*, **34.5**: 203-215.
- GUALANDI-SIGNORINI AM, GIORGI G (2001). "Insulin formulations – a review." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* **5**: 73-83.
- HALD A (1998). *A History of Mathematical Statistics from 1750 to 1930*. Wiley.
- HAMMAN JH (2010). "Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems." *Marine drugs* **8.4**: 1305-1322.
- HAMMAN JH (2010). "Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems." *Marine Drugs* **8.4**:1305-1322.
- HE C, YIN L, TANG C, YIN C (2012). "Size-dependent absorption mechanism of polymeric nanoparticles for oral delivery of protein drugs." *Biomaterials*, **33.33**: 8569-8578.
- HEDESKOV CJ (1980). "Mechanism of glucose-induced insulin secretion." *Physiological reviews* **60.2**: 442-509.
- HERWADKAR A, BANGA AK (2011). "Transdermal delivery of peptides and proteins." *Peptide and protein delivery*, p.: 69-86.
- HINCHCLIFFE M, ILLUM L (1999). "Intranasal insulin delivery and therapy." *Advanced Drug Delivery Reviews* **35.2-3**: 199-234.
- HIRTZ J (1985). "The gastrointestinal absorption of drugs in man: a review of current concepts and methods of investigation." *British journal of clinical pharmacology*, 19.S2: 77S-83S.
- HOSNY EA, AL-SHORA HI, ELMAZAR MMA (2002). "Effect of Bioadhesive Polymers, Sodium Salicylate, Polyoxyethylene-9-lauryl Ether, and Method of Preparation on the Relative Hypoglycemia Produced by Insulin Enteric-Coated Capsules in Diabetic Beagle Dogs." *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **28.5**: 563-570.
- HU Y, JIANG X, DING Y, GE H, YUAN Y, YANG C (2002). Synthesis and characterization of chitosan–poly (acrylic acid) nanoparticles. *Biomaterials*, **23.15**: 3193-3201.

- HUA S (2015). "Lipid-based nano-delivery systems for skin delivery of drugs and bioactives." *Frontiers in pharmacology*, **6**: 219.
- HUANG YY, WANG CH (2006). "Pulmonary delivery of insulin by liposomal carriers." *Journal of Controlled Release* **113.1**: 9-14.
- HUSSAN SD, SANTANU R, VERMA P, BHANDARI V (2012). "A review on recent advances of enteric coating." *IOSR Journal of Pharmacy*, **2.6**: 05-11.
- IBIE CO (2013). Novel polyelectrolyte complexes for oral insulin delivery. Available from OpenAIR@RGU.
- JANES KA, CALVO P, ALONSO MJ (2001). "Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules." *Advanced drug delivery reviews* **47.1**: 83-97.
- JATARIU AN, POPA M, PEPTU CA (2010). "Different particulate systems-bypass the biological barriers." *Journal of Drug Targeting*, **18.4**: 243-253.
- JEON O, PARK K (2009). "Biodegradable Polymers for Drug Delivery Systems." *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*, *ISomasundaran, P., Ed., Taylor and Francis*, **1.1**: 1-15.
- KABANOV AV, KABANOV VA (1995). "DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells." *Bioconjugate chemistry*, **6.1**: 7-20.
- KAMEI N, MORISHITA M, EDA Y, IDA N, NISHIO R, TAKAYAMA K (2008). "Usefulness of cell-penetrating peptides to improve intestinal insulin absorption." *Journal of Controlled Release* **132.1**: 21-25.
- KARNA SK, SAHAI R (2012). "An overview on Taguchi method." *International Journal of Engineering and Mathematical Sciences*, **1.1**: 1-7.
- KATSAROU A, GUDBJORNSDOTTIR S, RAWSHANI A, DABELEA D, BONIFACIO E, ANERSON BJ, LERNMARK Å (2017). "Type 1 diabetes mellitus." *Nature reviews Disease primers*, **3**: 17016.
- KESER G (2015). "Sertolizumab pegolün moleküler yapısı ve etki mekanizması." *RAED Dergisi*, **7**: 8-13.

- KHAFAGY ES, MORISHITA M (2012). "Oral biodrug delivery using cell-penetrating peptide." *Advanced drug delivery reviews*, **64.6**: 531-539.
- KIM A, LEE EH, CHOI SH, KIM CK (2004). "In vitro and in vivo transfection efficiency of a novel ultradeformable cationic liposome." *Biomaterials*, **25.2**: 305-313.
- KOUSSOROPLIS SJ, VANBEVER R (2013). "Peptides and Proteins: Pulmonary Absorption." *In Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology, Fourth Edition. Taylor and Francis: New York*, p.: 2607-2618.
- KUMAR S, DILBAGHI N, SAHARAN R, BHANJANA G (2012). "Nanotechnology as emerging tool for enhancing solubility of poorly water-soluble drugs." *BioNanoScience*, **2.4**: 227-250.
- KWOK PCL, CHAN HK (2011). "Pulmonary Delivery of Peptides and Proteins." *Peptide and Protein Delivery*, Chapter 5 p.: 23-46.
- KWON HJ, HAN Y (2016). "Chondroitin sulfate-based biomaterials for tissue engineering." *Turkish Journal of Biology*, **40.2**: 290-299.
- LANGVIN D (2009). "Complexation of oppositely charged polyelectrolytes and surfactants in aqueous solutions. A review." *Advances in Colloid and Interface science*, **147**: 170-177.
- LANKALAPALLI S, KOLAPALLI VRM (2009). "Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology." *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **71.5**: 481-487. doi:10.4103/0250-474X.58165.
- LEE KY, MOONEY DJ (2012). "Alginate: properties and biomedical applications." *Progress in Polymer Science*, **37.1**: 106-126.
- LEE YC, SIMAMORA P, PINSUWAN SH (2002). "Review on the systemic delivery of insulin via the ocular route." *International Journal of Pharmaceutics*, **233.1-2**: 1-18.
- LEE YC, YALKOWSKY SH (1999). "Effect of formulation on the systemic absorption of insulin from enhancer-free ocular devices." *International Journal of Pharmaceutics* **185.2**:199-204.

- LOPES MA, ABRAHIM AB, SEICA R, VEIGA F, RODRIGUES RC, RIBERIO JA (2014). "Intestinal uptake of insulin nanoparticles: facts or myths?." *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **15.7**: 629-638.
- LOPES MA, ABRAHIM-VIEIRA B, OLIVEIRA C, FONTE P, SOUZA AM, LIRA T, SEICA R (2015). "Probing insulin bioactivity in oral nanoparticles produced by ultrasonication-assisted emulsification/internal gelation." *International Journal of Nanomedicine*, **10**: 5865.
- LORENZATI B, ZUCCO C, MIGLIETTA S, LAMBERTI F, BRUNO G (2010). "Oral Hypoglycemic Drugs: Pathophysiological Basis of Their Mechanism of Pharmaceuticals" (Basel, Switzerland), **3.9**: 3005-3020.
- LUIJF YM, DEVRIES JH (2010). "Dosing accuracy of insulin pens versus conventional syringes and vials." *Diabetes Technology & Therapeutics* **12.S1**: 73-77.
- LUO XM, FOSMIRE GJ, LEACH JR RM (2002). "Chicken keel cartilage as a source of chondroitin sulfate." *Poultry Science*, **81.7**: 1086-1089.
- MADHURIMA RC, THROWER SL, NARENDRAN P (2019). "What is type 1 diabetes?" *Medicine*, **47.1**: 5-9, ISSN 1357-3039.
- MAHJUB R, RADMEHR M, DORKOOSH FA, OSTAD SN, RAFIEE-TEHRANI M (2014). "Lyophilized insulin nanoparticles prepared from quaternized N-aryl derivatives of chitosan as a new strategy for oral delivery of insulin: in vitro, ex vivo and in vivo characterizations." *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **40.12**: 1645-1659.
- MALLIKARJUNA SC, SATYA SS, BISWANATH S (2005). "Alginate-coated alginate-polyethyleneimine beads for prolonged release of furosemide in simulated intestinal fluid." *Drug development and industrial pharmacy* **31.4-5**: 435-446.
- MANSUROĞLU BSD, MUSTAFAEVA Z (2011). "Protein-Polielektrolit Kompleks ve Konjugatlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi ile İncelenmesi." *Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi* **36.1**.
- MARTINS S, SARMENTO B, SOUTO EB, FERREIRA DC (2007). "Insulin-loaded alginate microspheres for oral delivery—effect of polysaccharide reinforcement on

physicochemical properties and release profile." *Carbohydrate Polymers*, **69.4**: 725-731.

MATTEUCI E, GIAMPIETRO O, COVOLAN V, GIUSTARINI D, FANTI P, ROSSI R (2015). "Insulin administration: present strategies and future directions for a noninvasive (possibly more physiological) delivery." *Drug design, development and therapy*, **9**: 3109.

MILLER DS, PARSONS AM, BRESLAND J, HERDE P, PHAM DM, TAN A, HSU HY, PRESTIDGE CA, KUCHEL T, BEGG R, AZIZ SM, BUTLER RN (2015). "A simple and inexpensive enteric-coated capsule for delivery of acid-labile macromolecules to the small intestine." *Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*, **16.7**: 586-592.

MOGHASSEMI S, HADJIZADEH A (2014). "Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review." *Journal of controlled release*, **185**: 22-36.

MOGHIMIPOUR E, REZAEI M, KOUCHAK M, FATAHIASL J, ANGALI KA, RAMEZANI Z, AMINI M, DORKOOSH FA, HANDALI S (2018). "Effects of coating layer and release medium on release profile from coated capsules with Eudragit FS 30D: an in vitro and in vivo study." *Drug Dev Ind Pharm*. **44.5**: 861-867.

MOK H, PARK JW, PARK TG (2007). "Antisense oligodeoxynucleotide-conjugated hyaluronic acid/protamine nanocomplexes for intracellular gene inhibition." *Bioconjugate Chem*. **18**: 1483-1489.

MORGAN RV (1995). "Delivery of systemic regular insulin via the ocular route in cats." *Journal of ocular pharmacology and therapeutics* **11.4**: 565-573.

MORISHITA M, MAKEI N, EHARA K, TAKAYAMA I, TAKAYAMA K (2007). "A novel approach using functional peptides for efficient intestinal absorption of insulin." *J. Controlled Release*, **118**: 177-184.

MUHEEM A, SHAKEEL F, JAHANGIR MA, ANWAR M, MALLICK N, JAIN GK, AHMAD FJ (2016). "A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives." *Saudi Pharmaceutical Journal*, **24.4**: 413-428.

MUKHOPADHYAY P, CHAKRABORTY S, BHATTACHARYA S, MISHRA R, KUNDU PP (2015). "pH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for

efficient and safe oral insulin delivery." *International journal of biological macromolecules*, **72**: 640-648.

MUKHOPADHYAY P, SARKAR K, CHAKRABORTY M, BHATTACHARYA S, MISHRA R, KUNDU PP (2013). "Oral insulin delivery by self-assembled chitosan nanoparticles: in vitro and in vivo studies in diabetic animal model." *Materials Science and Engineering: C*, **33.1**: 376-382.

MUNDARGI RC, BABU VR, RANGASWAMY V, PATEL P, AMINABHAVI TM (2008). "Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly (D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives." *Journal of Controlled Release*, **125.3**: 193-209.

MYTHRI G, KAVITHA K, KUMAR MR, SINGH SJ (2011). "Novel mucoadhesive polymers—a review." *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **1.8**: 37-42.

NAGAVARMA BVN., YADAY HK, AYAZ AVLS., VASUDHA LS, SHIYAKUMAR HG (2012). "Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-a review." *Asian J. Pharm. Clin. Res*, **5.3**: 16-23.

NAHAR K, HOSSAIN MK, KHAN TA (2017). "Alginate and Its Versatile Application in Drug Delivery." *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **9.5**: 606.

NAJJAR A, ALAWI M, ABUHEHMEH N, SALLAM A (2014). "A Rapid, Isocratic HPLC Method for Determination of Insulin and Its Degradation Product." *Advances in Pharmaceutics*, Article ID 749823.

OLGUN N, YAKIN H, DEMİR HG (2011). "Diyabetle mücadelede diyabet risklerinin belirlenmesi ve tanılama." *Turkish Family Phycian* **2.2**: 36-44.

OLIVIER JC (2005). "Drug transport to brain with targeted nanoparticles". *NeuroRx*, **2.1**: 108–119.

OPREA A, NEAMTU A, STOICA B, VASILE C (2009). "Cellulose/chondroitin sulphate hydrogels as carriers for drug delivery applications." *Analele Stiintifice ale Universitatea Alexandru Ioan Cuza, Sectiunea Genetica si Biologie Moleculara* **10**.

- OYARZUN-AMPUERO FA, GOYCOOLEA FM, TORRES D, ALONSO MJ (2011). "A new drug nanocarrier consisting of polyarginine and hyaluronic acid." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **79.1**: 54-57.
- ÖZER S, KERİMOĞLU O, UĞURLU T (2017). "Nanocarriers: Novel Approaches to Oral Delivery of Insulin/Nanotasiyicilar: Oral Insulin Tedavisine Yeni Yaklasimlar." *Clinical and Experimental Health Sciences* **7.3**: 115-123.
- ÖZSOY Y, GÜNGÖR S, CEVHER E (2009). "Nasal delivery of high molecular weight drugs." *Molecules* **14.9**: 3754-3779.
- PARK W, NA K. (2009). "Polyelectrolyte complex of chondroitin sulfate and peptide with lower pI value in poly (lactide-co-glycolide) microsphere for stability and controlled release." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **72.2**: 193-200.
- PATAN AK, SASIKANTH K, SREEKANTH N, SURESH P (2013). "Nanofibers—A New Trend in Nano Drug Delivery Systems." *Int. J. Pharm. Res. Anal* **3**: 47-55.
- PATEL MM, AMIN AF (2013). "Development of a novel tablet-in-capsule formulation of mesalamine for inflammatory bowel disease." *Pharm Dev Technol.* **18.2**: 390-400.
- PATIL NH, DEVARAJAN PV (2016). "Insulin-loaded alginate acid nanoparticles for sublingual delivery." *Drug delivery*, **23.2**: 429-436.
- PATWEKAR SL, POTULWAR AP, PEDEWAD SR, GAIKWAD MS, KHAN SA, SURYAWANSHI AB (2016). "Review on polyelectrolyte complex as novel approach for drug delivery system." *IJPPR*, **5**: 97-109.
- PECHENKIN MA, BALABUSHEVICH NG, ZOROV IN, STAROSEL'TSEVA LK, MIKHALCHIK EV (2011). "Design In Vitro and in Vivo Characterization of Chitosan-Dextran Sulfate Microparticles for Oral Delivery of Insulin." *J Bioequiv Availab* **3**: 244-250.
- PICONE P, SABATINO MA, DITTA LA, AMATO A, SAN BIAGIO P, MULE F, DICARLO M (2018). "Nose-to-brain delivery of insulin enhanced by a nanogel carrier." *Journal of Controlled Release*, **270**: 23-36.

- PILLAI O, KUMAR N, DEY CS, SIVAPRASAD N, PANCHAGNULA R (2004). "Transdermal iontophoresis of insulin: III. Influence of electronic parameters." *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* **26.6**: 399-408.
- POLITIS SN, COLOMBO P, COLOMBO G, REKKAS DM (2017). "Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development." *Drug development and industrial pharmacy*, **43.6**: 889-901.
- ODIAN G (2004). "Principles of polymerization" Fourth Edition.
- PROKOP A, HUNKELER D, POWERS AC, WHITESSELL RR, WANG TG (1998). "Water soluble polymers for immunoisolation II: Evaluation of multicomponent microencapsulation systems." *In Microencapsulation Microgels Iniferters*, p.: 53-73.
- PUNDIR R, CHARY GHVC, DASTIDAR MG (2018). "Application of Taguchi method for optimizing the process parameters for the removal of copper and nickel by growing *Aspergillus* sp." *Water resources and industry*, **20**: 83-92.
- RAMASAMY T, TRAN TH, CHO HJ, KIM JH, KIM YI, JEON JY, CHOI HG, YONG CS, KIM JO (2014). "Chitosan-based polyelectrolyte complexes as potential nanoparticulate carriers: physicochemical and biological characterization." *Pharm Res.* **31.5**: 1302-14.
- RANIA R, VALLANT RM, NAJAM-UL-HAQ M, RAINER M, SZABO Z, HUCK CW, BONN GK (2007). "Medicinal applications of fullerenes." *International journal of nanomedicine*, **2.4**: 639.
- RAUF IA (2015). "Applied Statistical Design of Experiments: Applications in Natural Sciences." *Journal of Physical Chemistry & Biophysics*, **5.5**: 1.
- RIBEIRO AJ, SILVA C, FERREIRA D, VEIGA F (2005). "Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **25.1**: 31-40.
- RICHARDSON JL, NIDAL FF, LISBETH I (1992). "Enhanced vaginal absorption of insulin in sheep using lysophosphatidylcholine and a bioadhesive microsphere delivery system." *International journal of pharmaceutics* **88.1-3**: 319-325.

- RITGER PL, PEPPAS NA (1987). "A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices", *Journal of Controlled Release*, **5**: 37-42.
- ROWE RC, SHESKEY PJ, WELLER PJ (2003). Handbook of pharmaceutical excipients. London: Pharmaceutical Press. s: 622-624.
- SADRJAVADI K, SHAHBAZI B, FATTAHI A (2018). "De-esterified tragacanth-chitosan nano-hydrogel for methotrexate delivery; optimization of the formulation by Taguchi design." *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, **46.2**: 883-893.
- SANCHES ACC., CORRER CJ, VENSON R, GONCALVES PR, GARCIA MM, PIANTAVANI MS, PONTAROLO R (2013). "Insulin analogues versus human insulin in type 1 diabetes: direct and indirect meta-analyses of efficacy and safety." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **49.3**: 501-509.
- SAREI F, DOUNIGHI NM, ZOLAGHARIAN H, KHAKI P, BIDHENDI SM (2013). "Alginate nanoparticles as a promising adjuvant and vaccine delivery system." *Indian journal of pharmaceutical sciences* **75.4**: 442.
- SARIKA RP, NIRMALA RJ (2016). "Polyelectrolyte complex nanoparticles from cationised gelatin and sodium alginate for curcumin delivery." *Carbohydrate polymers*, **148**: 354-361.
- SARMENTO B, RIBEIRO A, VEIFA F, SAMPAIO P, NEUFELD R, FERREIRA D (2007). "Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery." *Pharmaceutical research*, **24.12**: 2198-2206.
- SATMAN İ (2007). "Diabetes Mellitus tanı ve izleminde yeni kriterler ve belirlenme gerekçeleri." *Turkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*, **3.3**: 1-15.
- SATO H, SUGIYANA Y, TSUJI A, HORIKOSHI I (1996). "Importance of receptor-mediated endocytosis in peptide delivery and targeting: kinetic aspects." *Advanced Drug Delivery Reviews*, **19.3**: 445-467.
- SCHATZ C, LUCAS JM, VITON C, DOMARD A, PICHOT C, DELAIR T (2004). "Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers." *Langmuir* **20.18**: 7766-7778.

- SCHNEIDERS W, REINSTORF A, RUHNOW M, REHBERG S, HEINECK J, HINTERSEHER I, RAMMELT S (2008). "Effect of chondroitin sulphate on material properties and bone remodelling around hydroxyapatite/collagen composites." *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, **85.3**: 638-645.
- SEINO Y, NANJO K, TAJIMA N, KADOWAKI T, KASHIWAGI A, ARAKI E, NANAFUSA T (2010). "Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus." *Journal of diabetes investigation*, **1.5**: 212-228.
- SEPULVEDA-RIVAS S, FRITZ HF, VALENZUELA C, SANTIVIAGO CA, MORALES JO (2019). "Development of Novel EE/Alginate Polyelectrolyte Complex Nanoparticles for Lysozyme Delivery: Physicochemical Properties and In Vitro Safety." *Pharmaceutics*, **11.3**: 103.
- SHAH B, BHAVIK NS, MISRA A (2011). "Other Routes of Protein and Peptide Delivery: Transdermal, Topical, Uterine, and Rectal." *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics, Elsevier*, p.: 623-671.
- SHAH RB, PATEL M, MAAHS DM, SHAH VN (2016). "Insulin delivery methods: Past, present and future." *International journal of pharmaceutical investigation*, **6.1**: 1.
- SHAJI J, PATOLE V (2008). "Protein and Peptide drug delivery: oral approaches." *Indian journal of pharmaceutical sciences*, **70.3**: 269-277.
- SHARMA S, SINHA VR (2018). "Liquid nanosize emulsion-filled enteric-coated capsules for colon delivery of immunosuppressant peptide." *AAPS PharmSciTech*. **19.2**: 881-885.
- SHI Y, XUE J, SANG Y, XU X, SHANG Q (2019). "Insulin-loaded hydroxypropyl methyl cellulose-co-polyacrylamide-co-methacrylic acid hydrogels used as rectal suppositories to regulate the blood glucose of diabetic rats." *International journal of biological macromolecules* **121**: 1346-1353.

- SILVIA CM, RIBEIRO AJ, FERREIRA D, VEIGA F (2006). "Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation." *European journal of pharmaceutical sciences* **29.2**: 148-159.
- SMRDEL P, BOGATAJ M, ZEGA A, PLANINSEK O, MRHAR A (2008). "Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation." *Journal of microencapsulation*, **25.2**: 90-105.
- SOARES S, COSTA A, SARMENTO B (2012). "Novel non-invasive methods of insulin delivery." *Expert opinion on drug delivery* **9**:11539-1558.
- SONAJE K, CHEN YJ, CHEN HL, WEY SP, JUANG JH, NGUYEN HN, SUNG HW (2010). "Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly (γ -glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery." *Biomaterials*, **31.12**: 3384-3394.
- SOUZA TGD, CIMINELLI VST, MOHALLEM NDS (2016). "A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles." *In Journal of Physics: Conference Series* **733.1**: 012039.
- SÖNMEZ A. KUTLU M (2010). "Gestasyonel Diyabet Güncel Tarama ve Tanı Yöntemleri." *Türkiye Klinikleri Journal of Endocrinology Special Topics*, **3.1**: 1-5.
- SPIERS ID, ALPER HO, EYLES JE, BOZKIR A, MILLER J, WILLIAMSON ED (1999). "Studies on the Co-encapsulation, Release and Integrity of Two Subunit Antigens: rV and rF1 from *Yersinia pestis*." *Journal of pharmacy and pharmacology*, **51.9**: 991-997.
- SULTANA F, MANIRUJJAMAN M, IMRAN-UL-HAQUE MA, SHARMIN S (2013). "An overview of nanogel drug delivery system." *J Appl Pharm Sci* **3.8**: 95-105.
- SWIERCZEWSKA M, CRIST RM, MCNEIL SE (2018). "Evaluating Nanomedicines: Obstacles and Advancements." *In: McNeil S. (eds) Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. Methods in Molecular Biology*, 1682.
- ŞENEL S (2014). "Nanotaşıyıcılarda Kullanılan Polimerler." *A. Zırh-Gürsoy içinde, Nanofarmasötikler ve Uygulamaları. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği*. S 9-22.

- ŞENGEL-TÜRK CT, HASÇİÇEK C (2009). "Polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerde yüzey modifikasyonu." *J. Fac. Pharm*, **2**: 137 – 154.
- ŞENGEL-TÜRK TC, HASÇİÇEK C (2006). "Kolona hedeflenen ilaç taşıyıcı sistemler." *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **35.2**: 125-148.
- TAKKA S, ACARTÜRK F (1998). "Aljinik Asit ve Tuzlarının Eczacılıkta Kullanımı." *FABAD J. Pharm. Sci.*, **23**: 17-27.
- TANG W, TSAREVSKY NV, MATYJASZEWSKI K (2006). "Determination of equilibrium constants for atom transfer radical polymerization." *Journal of the American Chemical Society*, **128.5**: 1598-1604.
- THAKUR VK, THAKUR MK (2015). *Handbook of Polymers for Pharmaceutical Technologies, Structure and Chemistry*. Vol. 1. John Wiley & Sons.
- The United State of Pharmacopeia-National Formulary (USP 30-NF 25) (2007). The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, M.
- THOMPSON C, CHENG WP (2011). "Chemically Modified Polyelectrolytes for Intestinal Peptide and Protein Delivery." *Peptide and Protein Delivery*. p.: 123-164.
- TIYABOONCHAI W, WOISZWILLO J, SIMS RC, MIDDAUGH CR (2003). "Insulin containing polyethylenimine–dextran sulfate nanoparticles." *International journal of pharmaceuticals*, **255.1-2**: 139-151.
- TOKARZ VL, MACDONALD PE, KLIP A (2018). "The cell biology of systemic insulin function." *J Cell Biol* **217.7**: 2273-2289.
- TONNESEN HH, KARLSEN J (2002). "Alginate in drug delivery systems." *Drug development and industrial pharmacy* **28.6**: 621-630.
- TSIOURVAS D, SIDERATOU Z, STERIOTI N, PAPADOPOULOS A, NOUNESIS G, PALEOS CM (2012). "Insulin complexes with PEGylated basic oligopeptides." *Journal of colloid and interface science* **384.1**: 61-72.

TSUCHIDA E (1994). "Formation of polyelectrolyte complexes and their structures." *Journal of Macromolecular Science—Pure and Applied Chemistry* **31.1**: 1-15.

Türkiye Diyabet Programı (2014). T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Ankara, Yayın No: 816.

UÇKUN A, ÇALIKOĞLU AS (2003). "Çocukluk Çağında Tip İki Diyabet." *Sted*, **12.5**: 174-179.

UMERSKA A, PALUCH KJ, INKIELEWICZ-STEPNIAK I, SANTOS-MARTINEZ MJ, CORRIGAN OI, MEDINA C, TAJBER L (2012). "Exploring the assembly process and properties of novel crosslinker-free hyaluronate-based polyelectrolyte complex nanocarriers." *Int J Pharm.* **15.436(1-2)**: 75-87.

UMERSKA A, PALUCH KJ, MARTINEZ MJ, CORRIGAN OI, MEDINA C, TAJBER L (2014). "Self-assembled hyaluronate/protamine polyelectrolyte nanoplexes: synthesis, stability, biocompatibility and potential use as peptide carriers." *J Biomed Nanotechnol.* **10.12**: 3658-73.

UMERSKA A, CORRIGAN OI, TAJBER L (2014). "Intermolecular interactions between salmon calcitonin, hyaluronate, and chitosan and their impact on the process of formation and properties of peptide-loaded nanoparticles". *Int J Pharm.* **477.1-2**: 102-12.

UMERSKA A, PALUCH KJ, SANTOS-MARTINEZ MJ, MEDINA C, CORRIGAN OI, TAJBER L (2015). "Chondroitin-based nanoplexes as peptide delivery systems—investigations into the self-assembly process, solid-state and extended release characteristics." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **93**: 242-253.

VARGHESE OP, LIU J, SUNDARAM K, HILBORN J, OOMMEN OP (2016). "Chondroitin sulfate derived theranostic nanoparticles for targeted drug delivery." *Biomaterials science* **4.9**: 1310-1313.

VASS IZ, DEAK Z, PAUL K, KOVACS S, VASS I (2015). "Interaction of nanoparticles with biological systems." *Acta Biologica Szegediensis* **59.2**: 225-245.

- VEHLOW D, SCHMIDT R, GEBERT A, SIEBERT M, LIPS K, MULLER M (2016). "Polyelectrolyte complex based interfacial drug delivery system with controlled loading and improved release performance for bone therapeutics." *Nanomaterials*, **6.3**: 53.
- VEIHOF A, JAVOT L, BEDUNEAU A, PELLEQUER Y, LAMPRECHT A (2013). "Oral insulin delivery in rats by nanoparticles prepared with non-toxic solvents." *International journal of pharmaceutics*, **443.1-2**: 169-174.
- VOLPI N (2002). "Oral bioavailability of chondroitin sulfate (Condrosulf®) and its constituents in healthy male volunteers." *Osteoarthritis and Cartilage* **10.10**: 768-777.
- VYAS SP, PALIWAL R, PALIWAL SR (2011). "Ocular Delivery of Peptides and Proteins." *Peptide and Protein Delivery*. Chapter 5 p.: 87-103.
- WANG J, TABATA Y, MORIMOTO K (2006). "Aminated gelatin microspheres as a nasal delivery system for peptide drugs: evaluation of in vitro release and in vivo insulin absorption in rats." *Journal of Controlled Release* **113.1**: 31-37.
- WANG L, DONGDONG C, SUN J (2009). "Layer-by-layer deposition of polymeric microgel films on surgical sutures for loading and release of ibuprofen." *Langmuir* **25.14**: 7990-7994.
- WANG VD, APAR DU (2014). "Cyclosporine a loaded PLGA nanoparticles for dry eye disease: in vitro characterization studies." *Journal of Nanotechnology*, Article ID 683153.
- WEISS M, STEINER DF, PHILIPSON LH (2000). Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279029/>
- WELLS BG, DIPIRO JT, SCHWINGHAMMER TL, DIPIRO CV (2014). *Pharmacotherapy Handbook*. 7th Ed.
- WOITISKI CB, SARMENTO B, CARVALHO RA, NEUFELD RJ, VEIGA F (2011). "Facilitated nanoscale delivery of insulin across intestinal membrane models." *International journal of pharmaceutics* **412.1-2**: 123-131.

- WU L, ZHANG J, WATANABE W (2011). "Physical and chemical stability of drug nanoparticles." *Advanced drug delivery reviews* **63.6**: 456-469.
- YAMADA S, KAZUYUKI S (2008). "Potential therapeutic application of chondroitin sulfate/dermatan sulfate." *Current drug discovery technologies* **5.4**: 289-301.
- YANG R, NAM K, KIM SW, TURKSON J, ZOU Y, ZUO YY, CHOUGULE MB (2016). "Factorial design based multivariate modeling and optimization of tunable bioresponsive arginine grafted poly (cystaminebis (acrylamide)-diaminohexane) polymeric matrix based nanocarriers." *Molecular pharmaceutics*, **14.1**: 252-263.
- YATURU S (2013). "Insulin therapies: Current and future trends at dawn." *World Journal of Diabetes* **4.1**:1-7
- YEH MK, CHENG KM, HU CS, HUANG YC, YOUNG JJ (2011). "Novel protein-loaded chondroitin sulfate–chitosan nanoparticles: Preparation and characterization." *Acta biomaterialia*, **7.10**: 3804-3812.
- YERLIKAYA F (2013). Paklitaksel Nanopartiküllerinin Kalite Tasarımı İle Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi.
<http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/handle/11655/1153>
- YOU WP, HENNEBERG M (2016). "Type 1 diabetes prevalence increasing globally and regionally: the role of natural selection and life expectancy at birth." *BMJ Open Diabetes Research and Care*, **4.1**: e000161.
- YUAN W, WU F, GUO M, JIN T (2009). "Development of protein delivery microsphere system by a novel S/O/O/W multi-emulsion." *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **36.2-3**: 212-218.
- ZHANG H, YU H, MEI J, ZHANG Y, DENG Z (2018). "Preparation, characterization and in vitro release of β -galactosidase loaded polyelectrolyte nanoparticles." *Int J Biol Macromol*. **115**: 1-9.
- ZHANG K, TANG X, ZHANG J, LU W, LIN X, ZHANG Y, TIAN B, YANG H, HE H (2014). "PEG-PLGA copolymers: their structure-influenced drug delivery applications", *Journal of Controlled Release*, **183**: 77-86.

ZHANG ZH, ZHANG YL, ZHOU JP, LV HX (2012). "Solid lipid nanoparticles modified with stearic acid-octaarginine for oral administration of insülin." *Int J Nanomedicine*. **7**: 3333–3339.

ZHAO L, LIU M, WANG J, ZHAI G (2015). "Chondroitin sulfate-based nanocarriers for drug/gene delivery." *Carbohydrate polymers* **13**: 391-399.

ZIRH-GÜRSOY A. (2014). Giriş . A. Zırh-Gürsoy içinde, Nanofarmasötikler ve Uygulamaları (s. 2,3). *İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği*.

ZU Y, ZHANG Y, ZHAO X, SHAN C, ZU S, WANG K, GE Y (2012). "Preparation and characterization of chitosan–polyvinyl alcohol blend hydrogels for the controlled release of nano-insulin." *International journal of biological macromolecules*, **50.1**: 82-87.

Ek-1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 10/08/2016
TOPLANTI NO : 2016-17
DOSYA NO : 2016-114
KARAR NO : 2016-17-158

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr.Burcu Devrim'in yaptığı, araştırmacı olarak Prof.Dr.Asuman Bozkır, Doç.Dr.Murat Palabıyık, Yrd.Doç.Dr.İşıl Özakça ve Arş.Gör.Dr.Berrin Küçüktürkmen'in katıldığı "Oral İnsülin Verilişi İçin Protamin Bazlı Nanopartikülleri İçeren Enterik Kaplı Kapsüllerin Hazırlanması, İn vitro ve İn vivo Değerlendirilmesi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"ne göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü :Sıçan
Hayvan Sayısı :32
Geçerlilik Süresi :01/04/2017-01/04/2020

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatih CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünler Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K	
Prof.Dr.Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan/ANKARA Telefon : 0 (312) 212 60 40 / 2101 Faks : 0 (312) 212 60 49

Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Gülnur GÖLLÜ BAHADİR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Fatma Aysun ÇOSKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Büşra ARPAÇ

Doğum yeri ve tarihi: SİVAS / 10.11.1992

Uyruğu: TC

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi: Güvenlik Cad. 117/9 Aşağı Ayrancı/Çankaya, Ankara

II- Eğitimi

- Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı (Eylül 2016 – Eylül 2019)
- Università Degli Studi di Padova, Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences (Stajyer, Haziran 2017-Ekim 2017)
- İstanbul Medipol Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2011-2016)
- Sivas Prof. Dr. Necati Erşen Anadolu Öğretmen Lisesi (2006-2010)
- Yabancı dili: İngilizce

III- Mesleki Deneyimi

- İkinci Eczacı, Hacettepe Şükran Eczanesi (Ağustos 2018-Halen)

IV- Bilimsel İlgi Alanları

- Effect of chondroitin sulfate concentration on the chitosan based nanoparticles for peptide delivery (BIOMED 2017, Ankara/Turkey).
- Oral delivery of insulin polyelectrolyte complex nanoparticles (IPTS 2018, Antalya/Turkey).
- Sodium Alginate and Protamine Based Self-Assembled Polyelectrolyte Complex Nanoparticles for Insulin Delivery; Optimization of the Formulation by Taguchi Design (EUFEPS 2019, Frankfurt/Germany).