T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİNİN ORAL İLAÇ ŞEKLİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

DOKTORA TEZİ

Uzm. Ecz. Canan İSKENDEROĞLU

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK

ANKARA
Haziran, 2007

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİNİN ORAL İLAÇ ŞEKLİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

DOKTORA TEZİ

Uzm. Ecz. Canan İSKENDEROĞLU

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK

ANKARA
Haziran, 2007

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 02/2004-25 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

Sevgili Eşime....

Doktora tezimi planlayıp yöneten, bilgi ve tecrübesi ile
çalışmalarıma destek olan hocam
Prof. Dr. Füsun Acartürk'e**,**
Gösterdikleri yakın ilgi ve yardımlarından dolayı
Prof. Dr. Nevin Çelebi, Prof. Dr. Kadri Yamaç'a**,**
Farmakokinetik ve istatistik hesap ve değerlendirmelerimde sağladığı olanak ve yardımlardan
dolayı **Prof. Dr. İlbeyi Ağabeyoğlu'**na**,**
Destek ve yardımlarından dolayı **Prof. Dr. Tanver Doğanay'**a**,**
İn vivo deneylerimde gösterdiği yakın ilgi ve yardımlarından dolayı
Doç. Dr. Tuncer Değim'e**,**
Çalışmalarım sırasında sağlamış oldukları yardım ve desteklerinden dolayı
Doç Dr. Zeliha Gül Değim, Doç. Dr. Sevgi Takka,
Doç Dr. Figen Tırnaksız, Dr. Ecz. Zeynep Şafak Teksin'e**,**
Tavşan plazmalarında ölçümleri yürüten, destek ve emeğini esirgemeyen
Şerafettin Kirazlı ve **Adnan Özdemir'**e**,**
Histolojik incelemelerde sağladıkları olanak ve yardımlarından dolayı
Prof. Dr. Deniz Erdoğan ve **Dr. Yeşim Bardakçı'**ya**,**
Bazı kimyasal maddelerin teminini sağlayan **Schering-Plough İlaç Firması**'na
Çalışmalarım sırasında sağlamış oldukları yardım ve olanaklardan dolayı
Dr. Ecz. Yasemin Akkoç, Uzm. Ecz. Abdullah Uslu,
Uzm. Ecz. Berna Ökçelik, Bil. Uzm. Serkan Demirci,
Doç. Dr. Nusret Ertaş, Uzm. Ecz. Fatmanur Tuğcu-Demiröz ve Fatma Çelik'e**,**
Sağladıkları destekten dolayı **Prof. Dr. Koray Sakar, Uzm. Ecz. Birsel Subaşı,**
Ecz. Sıdıka Övez, Uzm. Ecz. Belgin Kutlu'ya
Çalışmalarım sırasında anlayış gösteren ve destek olan iş arkadaşlarım
Uzm. Ecz. Müge Doğru ve **Ecz. Mustafa Akgül'**e**,**
Çalışmalarımın çeşitli aşamalarında emeğini esirgemeyen arkadaşlarım
Ecz. Can Dokak, Uzm. Ecz. Sibel İlbasmış-Tamer, Uzm. Ecz. Tuba İnceçayır'a**,**
Tüm sıkıntılarımı benimle paylaşan ve destek olan **aileme** ve **dostlarıma**,

Sevgi, hoşgörü ve emeğiyle destek olan
eşim **Mithat Şener İskenderoğlu**'na

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

T.C.
Gazi Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

DOKTORA /YÜKSEK LİSANS TEZ SINAV TUTANAĞI

Öğrencinin Adı ve Soyadı : Canan Serin İskenderoğlu
Anabilim Dalı : Farmasötik Teknoloji
Sınav Tarihi : 26.06.2007
Tez Konusu : Heparinin Oral İlaç Şekli Üzerine Çalışmalar

KARAR :

Yukarıda belirtilen tarihte yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda yukarıda konusu belirtilen tezin

Düzeltilmesine :
Kabulüne : **X**
Reddine :

OYBİRLİĞİ / ~~OYÇOKLUĞU~~ ile karar verilmiştir.

GEREKÇE:

Prof.Dr.Füsun ACARTÜRK
Jüri Başkanı

Prof.Dr.İlbeyi AĞABEYOĞLU
Jüri Üyesi

Prof.Dr.Nevin ÇELEBİ
Jüri Üyesi

Prof.Dr.Sema ÇALIŞ
Jüri Üyesi

Prof.Dr.Yıldız ÖZSOY
Jüri Üyesi

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller	XIII
Resimler	XV
Tablolar ve Şemalar	XVII
Kısaltmalar	XX
A. GİRİŞ VE AMAÇ	1
B. GENEL BİLGİLER	1
B.1. Antikoagülan Tedavi ve Temel Bilgiler	3
B.2. Heparin ve Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin	4
B.2.1. Heparinin Yapisi, Farmakolojisi Ve Kullanımı	5
B.2.2. Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinin Yapısı, Farmakolojisi ve Kullanımı	8
B.3. Heparin ve Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinin Analiz Yöntemleri	10
B.4. Heparin ve Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinin Alternatif Yollardan Uygulanmasina Yönelik Çalışmalar	11
B.4.1. Heparin ile Yapılan Çalışmalar	11
B.4.1.1. Çözelti Tipi Formülasyon	11
B.4.1.2. Jel Tipi Formülasyon	12
B.4.1.3. Lipozom Tipi Formülasyon	13
B.4.1.4. Partiküler Sistemler	13
B.4.1.5. Matris Tipi İlaç Şekilleri	15
B.4.1.6. Yama	15
B.4.2. Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin ile Yapılan Çalışmalar	15
B.4.2.1. Çözelti Tipi Formülasyon	15
B.4.2.2. Jel Tipi Formülasyon	17

B.4.2.3. Lipozom Tipi Formülasyon 17
B.5. Heparin ve Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinin Oral Uygulamasına Yönelik Çalışmalar 18
B.5.1. Heparinin Oral Formülasyonları 18
B.5.1.Çözelti Tipi Formülasyon 18
B.5.1.1. Heparin Kompleksleri ve Tuzları ile Çözelti 18
B.5.1.2. Emilim Artırıcı İçeren Çözelti 19
B.5.1.3. Emülsiyon ve Mikroemülsiyon Tipi Formülasyon 21
B.5.1.4. Lipozom Tipi Formülasyon 22
B.5.1.5. Partiküler Sistemler 22
B.5.1.6. Ko-matris sistem 23
B.5.2. Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinin Oral Formülasyonları 24
B.5.2.1. Çözelti Tipi Formülasyon 24
B.5.2.1.1. Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin ile Çözelti 24
B.5.2.1.2. Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin Kompleksi ile Çözelti 25
B.5.2.1.3. Emilim Artırıcı İçeren Çözelti 25
B.5.2.1.4. Biyoadezif Polimerlerle Çözelti 26
B.5.2.2. Süspansiyon Tipi Formülasyon 26
B.5.2.3. Biozom Tipi Formülasyon 26
B.5.2.4. Partiküler Sistemler 27
B.5.2.5. Tablet 27
B.5.2.6. Kapsül 28
B. 6. Aljinatlar 28
B. 7. Aljinatların Çok Değerlikli Katyonlarla Reaksiyonu ve Jel Oluşumu 32
B.8. Aljinik Asit ve Tuzlarının Uygulama Alanları 34
B.8.1. Aljinik Asit ve Tuzlarının Sağlık Alanında Kullanımı 34
B.8.1.1. Eczacılıkta Kullanımı 34
B.8.1.1.1. Aljinatların Kullanıldığı Çeşitli Farmasötik Dozaj Şekilleri ile Yapılmış Çalışmalar 35

B.8.1.1.1.1. Çözelti 35
B.8.1.1.1.2. Süspansiyon 35
B.8.1.1.1.3. Tablet 36
B.8.1.1.1.4. Kapsül 37
B.8.1.1.1.5. Boncuk ve Mikroboncuk/Mikroküre 37
B.8.1.2.6. Jel 40
B.8.1.1.1.7. Film 41
B.8.1.1.1.8. Supozituvar 41
B.8.1.1.1.9. Lipozom 41
B.8.1.1.1.10. Biyomoleküler taşıyıcı sistemler 41
B.8.1.2. Tıp Alanında Kullanımı 42
B.8.1.3. Diş Hekimliğinde Kullanımı 43
B.8.2.Aljinik Asit Ve Tuzlarının Diğer Alanlarda Kullanımı 43
B. 9. Kitozan 43
B. 10. Siklodekstrin 44
B. 11. Faktöriyel Tasarım 45
B. 11. 1. 2^n Faktöriyel Tasarım 46
B.11. 2. 2^2 Faktöriyel Tasarım 46
B.11.3. 2^3 Faktöriyel Tasarım 47

C. GEREÇ VE YÖNTEM 49
C.1. GEREÇ 49
C.1. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 49
C.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler 50
C.2. YÖNTEM 51
C. 2.1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler 51
C.2.1.1. Etkin Maddenin Erime Derecesinin Tayini 51
C.2.1.2. Etkin Maddenin Partikül Büyüklüğü 51
C.2.1.3. Etkin Maddenin IR spektrumu 51

C.2.1.4. Etkin Maddenin Spektrumu 51
C.2.2. Kullanılan Polimerler Üzerinde Yapılan Çalışmalar 52
C.2.2.1. Aljinat ve Kitozanın Viskozite ve Akış Özelliklerinin İncelenmesi 52
C.2.3. DMAH ile Standart Doğrunun Hazırlanması 52
C.2.4. Spektrofotometrik Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu 53
C.2.4.1. Doğrusallık 53
C.2.4.2. Doğruluk ve Geri Elde 53
C.2.4.3. Kesinlik 53
C.2.4.4. Seçicilik 54
C. 2.4.4.1. Kitozan-TPP Mikropartiküllerinde Seçicilik Çalışmaları 54
C.2.4.4.2. Kitozan Tablet Formülasyonundaki Yardımcı Maddelerle Seçicilik Çalışmaları 54
C.2.4.4.3. Aljinat Boncuklarda Seçicilik Çalışmaları 55
C.2.5. DMAH'nın Kitozanla Etkileşimini İnceleme Çalışmaları 55
C.2.5.1. DMAH-Kitozan arasındaki etkileşmenin UV spektrofotometresi ile incelenmesi 55
C.2.5.2. DMAH-Kitozan arasındaki etkileşmenin IR spektrofotometresi ile incelenmesi 55
C.2.6. Formülasyon Çalışmaları 55
C.2.6.1. Kitozan Mikropartikül Hazırlamak İçin Önformülasyon Çalışmaları 56
C.2.6.1.1. Doğrudan Sertleştirici İlavesiyle Kitozan Mikropartikülleri Hazırlama 56
C.2.6.1.2. Emülsiyon Oluşturup Sertleştirici Bir Madde İlavesiyle Kitozan Mikropartikül Hazırlama 57
C.2.6.1.2.1. Emülsiyon Yöntemiyle ve TPP Kullanarak Kitozan Mikropartikülleri Hazırlamada Optimum Şartların Belirlenmesi 59
C.2.6.1.3. DMAH İçeren Kitozan Mikropartikül Hazırlamak İçin Çalışmalar 61

C.2.6.1.3.1. Hazırlama Sırasında DMAH'i Yükleme Çalışmaları 61
C.2.6.1.3.1.1. İç Faza DMAH Ekleme Denemeleri 61
C.2.6.1.3.1.2. Oluşan Emülsiyona Heparin Ekleme 61
C.2.6.1.3.1.3. Sertleştirici Çözeltisine DMAH Ekleme 62
C.2.6.1.3.2. Hazırlanan Mikropartiküllere DMAH Yükleme Çalışmaları 62
C.2.6.2. Kitozan Tabletlerde Formülasyon Çalışmaları 64
C.2.6.2.1. Tablet Formülasyonları 64
C.2.6.2.2. Tabletlere Uygulanan Testler 64
C.2.6.2.2.1. Tabletlerin Çap ve Yüksekliği 64
C.2.6.2.2.2. Tabletlerin Ağırlık Sapması 65
C.2.6.2.2.3. Tabletlerin Sertliklerinin Tayini 65
C.2.6.2.2.4. Tabletlerin Etkin Madde İçeriğinin Tayini 65
C.2.6.2.2.5. Tabletlerin Dağılma Sürelerinin Tayini 65
C.2.6.2.2.6. Kitozan Tabletlerde Çözünme Hızı Deneyleri 65
C.2.6.3. Siklodekstrin İçeren Çözelti Formülasyonları 66
C.2.6.4. Aljinat Boncuk Önformülasyon Çalışmaları 66
C.2.6.4.1. Aljinat- Sıvı Parafin ile Yüksek Devirde Emülsiyon oluşturup $CaCl_2$ ile Sertleştirme 67
C.2.6.4.2. Aljinat-$CaCl_2$ ile Etkileşme ile Yüksek Devirde Boncuk Oluşturma 67
C.2.6.4.3. Aljinat-$CaCl_2$ İyonik Etkileşme ile Boncuk Oluşturma 67
C.2.6.5. Faktöriyel Tasarımla Aljinat Boncuk Hazırlama 69
C.2.7. Aljinat Boncuklarda Yapılan Denetimler 70
C.2.7.1. Aljinat Boncuklarda Veriminin ve Enkapsülasyon Etkinliğinin Tayini 70
C.2.7.2. Aljinat Boncuklarda Partikül Büyüklüğü Tayini 71
C.2.7.3. Aljinat Boncuklarda Şişme Deneyi 71
C.2.7.4. Aljinat Boncuklardan Etkin Maddenin Çözünme Tayini 71
C.2.8. Aljinat Boncuklarda DMAH-Aljinat Etkileşimlerinin İncelenmesi 72

C.2.8.1. DSC Ölçümleri 72
C.2.8.2. X-Işını Kırınımı 72
C.2.8.3. FT-IR ölçümleri 72
C.2.9. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Ölçümleri 73
C.2.10. İn vivo Deneyler 73
C.2.10.1. Tavşan Plazmasında DMAH ile Kalibrasyon 75
C.2.10.2. Herhangi Bir Formülasyon Uygulanmamış tavşanlarda Yapılan ölçümler 75
C.2.10.3. Tavşanlara Uygulanan DMAH Preparatları 75
C.2.10.3.1. Tavşanlara İntravenöz DMAH Uygulanması 76
C.2.10.3.2. DMAH İçeren Çözelti 76
C.2.10.3.3. Siklodekstrin Formülasyonları ile Deneyler 76
C.2.10.3.4. Kitozan Tablet Formülasyonları ile Öndeneyler 77
C.2.10.3.5. Aljinat Boncuk Formülasyonları ile Deneyler 77
C.2.11. İn Vivo Deney Sonuçlarının Farmakokinetik Ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi 77
C.2.12. Tavşan Midelerinin Histolojik Açıdan İncelenmesi 78

D. BULGULAR
D.1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler 79
D.1.1. Etkin Maddenin Erime Derecesinin Tayini 79
D.1.2. Etkin Maddenin Partikül Büyüklüğü 79
D.1.3. Etkin Maddenin IR spektrumu 80
D.1.4. Etkin Maddenin Spektrumu 80
D.2. Kullanılan Polimerler Üzerinde Yapılan Çalışmalar 81
D.2.1. Aljinat ve Kitozanın Viskozite ve Akış Özelliklerinin Ölçülmesi 81
D.3. DMAH ile Standart Doğrunun Hazırlanması 84
D.4. Spektrofotometrik Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu 85
D.4.1. Doğrusallık 85

D.4.2. Doğruluk ve Geri Elde 85
D.4.3. Kesinlik: 86
D.4.4. Seçicilik Çalışmaları 88
D.4.4.1. Kitozan-TPP Mikropartiküllerinde Seçicilik Çalışmaları 88
D.4.4.2. Kitozan Tablet Formülasyonundaki Yardımcı Maddelerle Seçicilik Çalışmaları 89
D.4.4.3. Aljinat Boncuklarda Seçicilik Çalışmaları 89
D.5. DMAH'nın Kitozanla Etkileşimini İnceleme Çalışmaları 90
D.5.1. DMAH-Kitozan Arasındaki Etkileşmenin UV Spektrofotometresi ile İncelenmesi 90
D.5.1. DMAH-Kitozan Arasındaki Etkileşmenin IR Spektrofotometresi ile İncelenmesi 91
D.6.Formülasyon Çalışmaları 94
D.6.1. Kitozan Mikropartikül Hazırlamak İçin Önformülasyon Çalışmaları 94
D.6.1.1. Doğrudan Sertleştirici İlavesiyle Kitozan Mikropartikülleri Hazırlama 94
D.6.1.2. Emülsiyon Oluşturup Sertleştirici Bir Madde ilavesiyle Kitozan Mikropartikül Hazırlama 95
D.6.1.3. Emülsiyon Yöntemiyle ve TPP Kullanarak Kitozan Mikropartikülleri Hazırlamada Optimum Şartların Belirlenmesi 96
D.6.1.4. DMAH İçeren Mikropartikül Hazırlamak İçin Çalışmalar 97
D.6.1.4.1. Hazırlama Sırasında DMAH'i Yükleme Çalışmaları 97
D.6.1.4.1.1. İç Faza DMAH Ekleme Denemeleri 97
D.6.1.4.1.2. Oluşan Emülsiyona DMAH Ekleme 98
D.6.1.4.1.3. Sertleştirici Çözeltisine DMAH Ekleme 98
D.6.1.4.2.Hazırlanan Mikropartiküllere DMAH Yükleme Çalışmaları 99
D.6.2. Kitozan Tabletlerde Formülasyon Çalışmaları 100
D.6.2.1. Tablet Formülasyonları 100
D.6.2.2. Tabletlere Uygulanan Testler 100

D.6.2.2.1. Tabletlerin Çap ve Yüksekliği 100
D.6.2.2.2. Tabletlerin Ağırlık Sapması 100
D.6.2.2.3. Tabletlerin Sertlikleri 100
D.6.2.2.4. Tabletlerin Etkin Madde İçerikleri 100
D.6.2.2.5. Tabletlerin Dağılma Süreleri 100
D.6.2.2.6. Tabletlerde Çözünme Hızı 100
D.6.3. Siklodekstrin İçeren Çözelti Formülasyonları 102
D.6.4. Aljinat Boncuk Önformülasyon Çalışmaları 102
D.6.4.1. Aljinat- Sıvı Parafin İle Yüksek Devirde Emülsiyon Oluşturup $CaCl_2$ İle Sertleştirme 102
D.6.4.2. Aljinat-$CaCl_2$ İle İyonik Etkileşme İle Yüksek Devirde Boncuk Oluşturma 103
D.6.4.3. Aljinat-$CaCl_2$ İyonik Etkileşme İle Boncuk Oluşturma 103
D.6.5. Faktöriyel Tasarımla Aljinat Boncuk Hazırlama 104
D.7. Aljinat Boncuklarda Yapılan Denetimler 107
D.7.1. Aljinat Boncuklarda Veriminin ve Enkapsülasyon Etkinliğinin Tayini 107
D.7.2. Aljinat Boncuklarda Partikül Büyüklüğü Tayini 108
D.7.3. Aljinat Boncuklarda Şişme Deneyi 110
D.7.4. Aljinat Boncuklardan Etkin Maddenin Çözünme Tayini 110
D.8. Aljinat Boncuklarda DMAH-Aljinat Etkileşimlerinin İncelenmesi 111
D.8.1.DSC Ölçümleri 111
D.8.2. X-Işını Kırınımı 111
D.8.3. FT-IR ölçümleri 114
D.9. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Ölçümleri 114
D.10. İn Vivo Deneyler 120
D.10.1. Tavşan Plazmasında DMAH ile Kalibrasyon 120
D.10.2. Herhangi Bir Formülasyon Uygulanmamış Tavşanlarda Yapılan Ölçümler 121

D.10.3. Tavşanlara Uygulanan DMAH Preparatları 122
D.10.3.1. DMAH Çözeltisinin İV Uygulanması 122
D.10.3.2. DMAH İçeren Çözelti 122
D.10.3.3. Siklodekstrin Formülasyonları ile Deneyler 123
D.10.3.4. Kitozan Tablet Formülasyonları ile Öndeneyler 126
D.10.3.5. Aljinat Boncuk Formülasyonları ile Deneyler 127
D.11. İn Vivo Deney Sonuçlarının Farmakokinetik Ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi 129
D.12. Tavşan Midelerinin Histolojik Açıdan İncelenmesi 130
D.12.1. Tavşan Midelerine Ait Birinci Saatteki Bulgular 130
D.12.2. Tavşan Midelerine Ait İkinci Saatteki Bulgular 131
D.12.3. Tavşan Midelerine Ait Üçüncü Saatteki Bulgular 132

E. TARTIŞMA 145
E.1. Etkin Madde ve Polimerler Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler 145
E.2. Analiz Yöntemlerinin Seçimi ve Validasyonunun Değerlendirilmesi 146
E.3. Etkileşme Çalışmaları 146
E.4. Formülasyon Çalışmaları 148
E.4.1. Kitozanla Yapılan Önformülasyon ve Formülasyon Deneyleri 148
E.4.1.1. Kitozan Mikropartikül Önformülasyonları 149
E.4.1.2. Kitozan Mikropartikülleri hazırlamada Optimum Şartların Belirlenmesi 150
E.4.1.3. DMAH İçeren Kitozan Mikropartikül Hazırlama Çalışmaları 151
E.4.1.4. DMAH-Kitozan Tabletler 153
E.4.2. Aljinat Boncuk Önformülasyon Çalışmaları 154
E.4.3. Faktöriyel Tasarımla Aljinat Boncuk Hazırlama ve Faktöriyel Tasarıma Ait Bulguların Değerlendirilmesi 156

E.4.3.1. Faktörlerin Tutulan Etkin Madde Oranına ve İn vitro Salım Bulgularına Etkileri 156
E.4.3.1.1. Etkin Madde: Aljinat Oranının Etkisi 157
E.4.3.1.2. Sertleştirici Maddenin Etkisi 157
E.4.3.1.3. Sertleştirme Süresinin Etkisi 158
E.4.3.2. Faktörlerin % Tutulan Etkin Madde ve $t_{\%50}$ Cevabına Etkisinin Varyans Analizi Tablosunun Değerlendirilmesi 158
E.5. Aljinat Boncuklarda Yapılan Denetimler 159
E.5.1. Aljinat Boncuklarda Veriminin Tayini 159
E.5.2. Aljinat Boncuklarda Partikül Büyüklüğü Tayini 160
E.5.3. Aljinat Boncuklarda Şişme Deneyi 160
E.6. Aljinat Boncuklarda DMAH-Aljinat Etkileşimlerinin İncelenmesi 161
E.6.1. DSC Ölçümleri 161
E.6.2. X-ışını Kırınımı 161
E.6.3. FT-IR ölçümleri 161
E.7. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Ölçümleri 162
E.8. İn vivo Verilerin Değerlendirilmesi 163
E.8.1. Tavşanlara İntravenöz DMAH Uygulanması 165
E.8.2. DMAH İçeren Çözelti 166
E.8.3. Siklodekstrin Formülasyonları ile Deneyler 166
E.8.4. Kitozan Tablet Formülasyonları ile Ön Deneyler 168
E.8.5. Aljinat Boncuk Formülasyonları ile Deneyler 169
E.9. İn Vivo Deney Sonuçlarının Farmakokinetik ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi 170
E.10. Tavşan Midelerinin Histolojik İncelenmesi 171

F. SONUÇ 173
G. ÖZET 176
H. SUMMARY 179
I. KAYNAKLAR 182
J. EKLER 208
K. ÖZGEÇMİŞ 209

Şekiller

	Sayfa No
Şekil 1. Heparinin yapısı	5
Şekil 2. Koagülasyon şeması	6
Şekil 3. Aljinat blok tipleri	29
Şekil 4. Aljinat ile kalsiyumun etkileşimi	33
Şekil 5. Kitozanın yapısı	43
Şekil 6. Siklodekstrininin yapısı	44
Şekil 7. DMAH-Aljinat mikropartiküllerinin hazırlanma yöntemlerinin şematik olarak gösterilmesi	68
Şekil 8. DMAH'in partikül büyüklüğü dağılımı	79
Şekil 9. DMAH'e ait FT-IR spektrumu	80
Şekil 10. DMAH'in UV spektrumu	81
Şekil 11. Sodyum aljinatın (Protonal LF 120 M) sudaki %1'lik çözeltisinin reogramı	82
Şekil 12. Sodyum aljinatın (Protonal LF 240D) sudaki %1'lik çözeltisinin reogramı	83
Şekil 13. Kitozanın %1'lik çözeltisinin reogramı	83
Şekil 14. DMAH'in kalibrasyon grafiği	84
Şekil 15. Kitozan mikropartiküllerde pH 1.2 de ve pH 6.8 de absorbans taramaları	88
Şekil 16. Yardımcı maddelere ait UV spektrumları	89
Şekil 17. Aljinat boncuklarda pH 1.2 de ve pH 6.8 de absorbans taramaları	90
Şekil 18. DMAH-Kitozan etkileşmesinin UV spektrumları	91
Şekil 19A. Kitozan-DMAH etkileşimlerinin IR spektrumları, DMAH-Kitozan (1:1)	92
Şekil 19B. Kitozan-DMAH etkileşimlerinin IR spektrumları, DMAH-Kitozan (1:2)	93
Şekil 20. DMAH-Kitozan tabletlerde çözünme hızı	102

Şekil 21. Aljinat boncuklarda partikül büyüklüğü 108
Şekil 22. Aljinat boncuklarda partikül büyüklüğü dağılımları 109
Sekil 23. Aljinat boncuklarda şişme oranları 110
Şekil 24. Aljinat boncuklarda DMAH'in çözünme profilleri 111
Şekil 25. DSC termogramları 112
Şekil 26. X-ışını kırınımı örnekleri 113
Şekil 27. FT-IR spektrumları 114
Şekil 28. AXa ölçümü kalibrasyon grafiği 120
Şekil 29. DMAH içeren (100 IU/kg) çözeltilerin tavşanlara iv uygulanmasıyla elde edilen Anti Xa seviyeleri 122
Şekil 30. DMAH çözeltisinin (5000 IU/kg) oral uygulaması ile plazmadaki Anti Xa seviyeleri 123
Şekil 31. DMAH çözeltisine %5 siklodekstrin eklenerek hazırlanan formülasyonların, boş siklodekstrin çözeltisinin ve DMAH çözeltisinin oluşturduğu Anti Xa düzeyleri 125
Şekil 32. DMAH-Kitozan tabletler ile plazma Anti Xa seviyeleri 126
Şekil 33. DMAHAB, AB ve DMAHÇ formülasyonlarının oral yoldan uygulanmasıyla elde edilen Anti Xa seviyelerini 128
Şekil 34. DMAHAB ve İV formülasyonlarının tavşanlara uygulanmasıyla elde edilen Anti Xa seviyeleri. 128

Resimler

Resim 1a. SEM görüntüleri: Boş aljinat boncuk 115
Resim 1b. SEM görüntüleri: DMAH içeren aljinat boncuk 116
Resim 1c. SEM görüntüleri: DMAH içeren aljinat boncuk pH 1.2'de 2 saat sonra 117
Resim 1d. SEM görüntüleri: DMAH içeren aljinat boncuk, pH 6.8'de 0.5 saat sonra 118
Resim 1e. SEM görüntüleri: DMAH içeren aljinat boncuk, pH 1.2'de 2 saat ve pH 6.8'de 0.5 saat sonra 119
Resim 2. Oral DMAH çözeltisi (DMAHÇ) uygulanan grup,1. saat, yarı ince kesit 134
Resim 3 a-b. Oral DMAH çözeltisi (DMAHÇ) uygulanan grup, 1. saat 134
Resim 4. Oral boş aljinat boncuk (AB) uygulanan grup, 1. saat, yarı ince kesit. 135
Resim 5 a-b. Oral boş aljinat boncuk (AB) uygulanan grup, 1. saat, yüzey epitel hücreleri. 135
Resim 6. Oral DMAH-aljinat boncuk (DMAHAB) uygulanan grup, 1. saat, yarı ince kesit 136
Resim 7 a-b. Oral DMAH-aljinat boncuk (DMAHAB) uygulanan grup, 1. saat. 136
Resim 8. İV DMAH (İV) uygulanan grup, 1. saat, yarı ince kesit. 137
Resim 9 a-b. IV DMAH (İV) uygulanan grup, 1. saat, yüzey epitel hücreleri 137
Resim 10. Oral DMAH çözeltisi (DMAHÇ) uygulanan grup, 2. saat, yarı ince kesit 138
Resim 11 a –b. Oral DMAH çözeltisi (DMAHÇ) uygulanan grup, 2. saat 138

Resim 12. Oral boş aljinat boncuk (AB) uygulanan grup, 2. saat, yarı ince kesit. 139
Resim 13. Oral boş aljinat boncuk (AB) uygulanan grup, 2. saat. 139
Resim 14. Oral DMAH-aljinat boncuk (DMAHAB) uygulanan grup, 2. saat, yarı ince kesit. 140
Resim 15 a-b. Oral DMAH-aljinat boncuk (DMAHAB) uygulandığı grup, 2. saat 140
Resim 16. İV DMAH (İV) uygulanan grup, 2. saat, yarı ince kesit 141
Resim 17. İV DMAH (İV) uygulanan grup, 2. saat, yüzey epitel hücreleri 141
Resim 18. Oral DMAH çözeltisi (DMAHÇ) uygulanan grup, 3. saat, yarı ince kesit. 142
Resim 19. Oral DMAH çözeltisi (DMAHÇ) uygulanan grup, 3. saat 142
Resim 20. Oral boş aljinat boncuk (AB) uygulanan grup, 3. saat, yarı ince kesit 143
Resim 21. Oral boş aljinat boncuk (AB) uygulanan grup, 3. saat. 143
Resim 22. Oral DMAH-aljinat boncuk (DMAHAB) uygulanan grup, 3. saat, yarı ince kesit. 144
Resim 23. Oral DMAH-aljinat boncuk (DMAHAB) uygulanan grup, 3. saat 144
Resim 24. İV DMAH (İV) uygulanan grup, 3. saat, yarı ince kesit. 145
Resim 25 . İV DMAH (İV) uygulanan grup, 3. saat, yüzey epitel hücreleri. 145

Tablolar

Tablo1. Aljinatların viskozite ve molekül ağırlıklarına göre gruplandırılması 29
Tablo 2. 2^2 Faktöriyel denemesinde etkilerin katsayıları 47
Tablo 3. 2^3 Faktöriyel denemesinde etkilerin katsayıları 47
Tablo 4. 2^3 Faktöriyel deneme kombinasyonları 48
Tablo 5. Doğrudan sertleştirici ilavesiyle hazırlanan kitozan mikropartikül formülasyonlarının kodları ve içerikleri 57
Tablo 6. Emülsiyon oluşturup sertleştirici bir madde ilavesiyle hazırlanan kitozan mikropartikül formülasyonlarında değişkenler ve oranları 58
Tablo 7. Emülsiyon yöntemiyle ve TPP kullanarak hazırlanan kitozan mikropartikül formülasyonlarının kodları ve içerikleri 60
Tablo 8. Sertleştirici çözeltisine DMAH ekleyerek DMAH yüklü kitozan mikropartikül hazırlama 63
Tablo 9 . Tablet formülasyonlarının kodları ve içerikleri 64
Tablo 10. Aljinat boncuk önformülasyon çalışmalarında değişkenler ve oranları 68
Tablo 11. Aljinat boncuk faktöriyel tasarım formülasyonlarında faktörler ve seviyeleri 69
Tablo 12. Aljinat boncuk faktöriyel tasarım formülasyonlarında değişkenler ve oranları 69
Tablo 13. İn vivo deney grupları ve kodları 76
Tablo 14. Aljinatların %1'lik çözeltilerinin ve kitozanın %1'lik çözeltisinin viskozite değerleri. 82
Tablo 15. DMAH'in kalibrasyon parametreleri 84
Tablo 16. DMAH'in kalibrasyon verileri 85
Tablo 17. DMAH'in geri elde ile hesaplanan miktarları 86
Tablo 18. Kesinlik sonuçları 86
Tablo 19. Gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları 87
Tablo 20. Günlerarası tekrarlanabilirlik sonuçları 87

Tablo 21. Doğrudan sertleştirici (TPP) ilavesiyle hazırlanan kitozan mikropartikül formülasyonları 95
Tablo 22. Tablet formülasyonlarına uygulanan farmasötik kontrollerin sonuçları 101
Tablo 23 . DMAH-Kitozan tabletlerde çözünme hızı verileri 101
Tablo 24. Aljinat boncuk önformülasyonlarında değişkenler ve oranları 103
Tablo 25. DMAH içeren aljinat boncuklarda faktöriyel tasarımda bağımsız değişkenlere karşı elde edilen cevap değişkenler 104
Tablo 26. Etkin madde:polimer oranı, $CaCl_2$ konsantrasyonu ve sertleştirme süresinin % tutulan etkin madde cevabına etkisini incelemek üzere oluşturulan hesap matris örneği 105
Tablo 27. 2^3 Faktöriyel tasarımda % tutulan etkin madde için varyans analizi sonuçları 106
Tablo 28. Etkin madde:polimer oranı, $CaCl_2$ konsantrasyonu ve sertleştirme süresinin $t_{\%50}$'ye etkisini incelemek üzere oluşturulan hesap matris örneği 106
Tablo 29. 2^3 Faktöriyel tasarımda $t_{\%50}$ için varyans analizi sonuçları 107
Tablo 30. Aljinat boncuklarda verim ve enkapsülasyon etkinliği 107
Tablo 31. Aljinat boncuklarda ortalama partikül büyüklüğü 108
Tablo 32. Aljinat boncuklardan etkin maddenin çözünme bulguları 110
Tablo 33. AXa ölçümü kalibrasyonda kullanılan veriler 121
Tablo 34. DMAH verilmeksizin yapılan ölçüm sonuçları 121
Tablo 35.Tavşanlara DMAH içeren (100 IU/kg) çözeltilerin İV uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar 122
Tablo 36. DMAH çözelti (5000 IU/kg) oral uygulama 123
Tablo 37. Tavşanlara sadece siklodekstrin (%5) içeren çözeltilerin (SDÇ) oral uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar 124
Tablo 38. DMAH çözeltilere siklodekstrin eklenmesiyle yapılan in vivo deney sonuçları. DMAH içeriğine göre: 1500 U/kg (DMAHSDÇ 1500), 3000 U/kg (DMAHSDÇ 3000) 124

Tablo 39. Tavşanlara % 5 siklodekstrin içeren DMAH çözeltilerinin (5000 IU/kg) oral uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar 125
Tablo 40. DMAH-Kitozan tabletlerde in vivo ön deneme sonuçları. DMAH içeriğine göre: 1500 U/kg (KT1500), 3000 U/kg (KT3000), 5000 U/kg (KT5000). 126
Tablo 41. Tavşanlara DMAH içermeyen aljinat boncukların (AB) oral uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar 127
Tablo 42. Tavşanlara DMAH içeren aljinat boncukların (DMAHAB, 5000 IU/kg) oral uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar 127
Tablo 43. Her tavşana uygulanan formülasyolara ait AUC değerleri 144
Tablo 44. Oral yoldan tavşanlara uygulanan formülasyonlara ait AUC ve C_{maks} değerleri 144

Şemalar

Şema 1. DMAH içeren kitozan mikropartikül hazırlama (DMAH'in oluşan emülsiyona eklenmesi) 61
Şema 2. DMAH içeren kitozan mikropartikül hazırlama (DMAH'in sertleştirici çözeltisine eklenmesi) 62

Kısaltmalar

AXa: Anti Xa veya Antifaktör Xa
ATIII: Antitrombin III
aPTZ: Aktive edilmiş parsiyel tromboplastin zamanı
aKZ :Aktive edilmiş koagülasyon zamanı
CD: Siklodekstrin
DFYİ: Doku faktör yolağı inhibitörü
DMAH: Düşük molekül ağırlıklı heparin
DMSO:Dimetil sülfoksit
DM-β-CD: Dimetil -β-siklodekstrin
DOCA: Deoksikolik asit
EDTA: Etilendiamintetraasetikasit
ePTFE: Politetrafluroetilen
FXa: Faktör Xa
HPMC: Hidroksipropil metilselüloz
İV: İntravenöz
MKK: Mono-N-karboksimetil kitozan
NaCMC: Sodyum karboksimetilselüloz
OD: Optik dansite
PCL: Poli- -kaprolakton
PEVAc: Polietilen vinil asetat
PEG: Polietilenglikol
PLG: Poli (D,L- laktid-ko-glikolid)
PLGA: Poli(D-L-laktik-ko-glikolik asit)
PTZ: Parsiyel tromboplastin zamanı
SNAC: Sodyum N-(8-[2-hidroksibenzoil]amino) kaprilattır
SNAD: N-[10-(2-hidroksi benzoil) amino] dekonat
TDM: Tetradesilmaltosit
TPP: Tripolifosfat
YDH: Yumuşak doku hücreleri

A. GİRİŞ VE AMAÇ

Heparin ve düşük molekül ağırlıklı heparin (DMAH) derin ven trombozunun ve pulmoner embolinin önlenmesinde ve tedavisinde yaygın olarak kullanılan antikoagülanlardır[1-4].

Heparin, oral antikoagülanlara göre tedavideki üstünlüğü ve daha güvenilir olması nedeniyle daha çok tercih edilir[5]. Heparinin plasentadan geçmemesi, etkisinin hızlı ortaya çıkması ve tedavinin kesilmesiyle de hızla ortadan kalkması avantaj sağlar[6]. Heparinin fraksiyonlanması veya depolimerizasyonu ile elde edilen DMAH'lerin, heparine göre eşit antitrombotik etkinliklerine karşılık, kanama yapma riski daha azdır. DMAH'nin heparine göre yarılanma ömrü daha uzun, biyoyararlanımı daha yüksektir[7]. Bu avantajlar son yıllarda DMAH'lerin heparine göre daha çok tercih edilmesine yol açmıştır. Piyasada farklı isimler altında bulunan ve farklı depolimerizasyon yöntemleriyle hazırlanan DMAH'ler, temelde aynı yapıda olmakla birlikte farmakokinetik özellikler ve antikoagülan etki açısından birtakım farklılıklar gösterebilmektedir[8].

Heparin ve DMAH, oral emilimlerinin ve biyoyararlanımlarının çok düşük olmaları nedeniyle sadece parenteral kullanılabilmektedir. Bu durum üretim ve kullanım aşamasında bazı sorunları beraberinde getirmektedir. Parenteral uygulama hasta açısından zordur ve parenteral preparatların hazırlanmasındaki işlemler ve maliyet fazladır. Bu nedenle alternatif uygulama yollarına yönelik formülasyonlar araştırılmıştır.

Heparin ve DMAH'in rektal, transdermal, nazal, pulmoner, sublingual ve çoğunlukla da oral yollardan uygulanmak üzere çeşitli formülasyonları hazırlanmıştır. Emülsiyon, lipozom, biozom, jel, matris, tablet, kapsül tipinde formülasyonlar sınırlı sayıda çalışılmıştır. Daha çok mikropartiküler sistemler ve çözeltiler tercih edilmiştir. Çözeltilerde emilim artırıcı maddeler veya biyoadezif polimerler kullanılmıştır. Heparin ve DMAH formülasyonlarda en fazla tercih edilen emilim artırıcı madde sodyum N-(8-[2-hidroksibenzoil]amino) kaprilattır

(SNAC). SNAC ile hazırlanmış ve klinik deneme aşamasında olan oral heparin preparatı da mevcuttur.

Çalışmamızda DMAH tercih edilmiştir, çünkü DMAH, yukarda belirtilen avantajlarının yanısıra düşük moleküllü olduğu için heparine göre absorbsiyona daha elverişlidir[5-7].

Çalışmamızda doğal, biyogeçimli ve biyoparçalanabilir polimerlerden faydalanılmıştır. Kullandığımız polimerler gastrointestinal kanaldan absorbe olmaz ve sistemik yan etki göstermemektedirler[9]. Ayrıca biyoadezif özellikteki bu polimerler, ilacın gastrointestinal kanalda kalış süresini ve böylece ilacın emilimini de artırmaktadır[10].

Bu çalışmanın amacı DMAH'in oral uygulanabilecek ilaç şekillerinin geliştirilerek, etkinliğinin in vivo olarak incelenmesidir. Bu amaçla:

- ✓ Biyoadezif polimerler olan aljinat ve kitozan kullanılarak DMAH'in mikropartikül ve tablet formülasyonları geliştirilmiştir.
- ✓ Ayrıca emilim artırıcı olarak siklodekstrinin etkisi incelenmiştir.
- ✓ Aljinat mikropartiküllerinde faktöriyel tasarım uygulanarak, etkin madde:polimer oranı, sertleştirici madde konsantrasyonu ve sertleştirme süresi gibi değişkenlerin enkapsülasyon oranı ve salım özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir.
- ✓ Aljinat mikropartiküllerde verim, partikül büyüklüğü, şişme özellikleri ve yüzey görüntüleri ile etkin madde-polimer etkileşimleri incelenmiştir.
- ✓ İn vitro deneyler sonucuna göre seçilen formülasyonlar in vivo olarak tavşanlarda denenmiştir.

B. GENEL BİLGİLER

B.1. ANTİKOAGÜLAN TEDAVİ VE TEMEL BİLGİLER

Antikoagülan ilaç grubunda yer alan heparin ve DMAH ile ilgili bilgilerin daha iyi değerlendirilebilmesi için önce antikoagülan tedavideki temel kavram ve bilgiler açıklanacaktır.

Damarın hasara uğradığında kanamanın spontan olarak durması hemostaz adı verilen fizyolojik bir durumdur[4]. Trombozda ise pıhtı (trombüs) damar içinde oluşur ve patolojik bir durum söz konusudur. Damar çeperinin durumu, trombositlerin aktivasyonu, pıhtılaşma faktörleri, bazı reolojik faktörler tromboz eğiliminde rol oynar[11].

Tromboza ve embolizme (tıkanma) eğilim yaratan nedenler ve durumlar arasında cerrahi girişimler, kronik konjestif kalp yetmezliği, aterosklerotik kalp hastalıkları, diyabet, yüksek kolesterol, hipertansiyon, hiperlipidemi, neoplastik hastalıklar, gebelik, obezite, sigara, oral kontraseptif kullanımı, sepsis ve travma gibi faktörler sayılabilir[1].

Vücutta normal damarlarda tromboz oluşmaz. Doğal antikoagülanlar sayesinde pıhtılaşma dengelenir. Doğal antikoagülanlar prostosiklin, antitrombin III, protein C ve fibrinolitik sistemlerdir. Antitrombin III'ün inhibitör etkisi heparin varlığında artar[12].

Arterlerin ve venlerin çeperinde ve içinde kan dolaşan yapay yüzeylerde trombus oluşmasını ve gelişmesini inhibe eden ilaçlara (antikoagülanlar ve antitrombositikler gibi) ve oluşmuş pıhtıyı eriten ilaçlara (trombolitikler veya fibrinolitikler) antitrombotik ilaçlar denir[11].

Heparinin de içinde yer aldığı grup olan antikoagülanlar, koagülasyon mekanizmasını değişik kademelerde engeller, oluşan pıhtı üzerine etkisi yoktur[13]. Bu grupta heparinin yanı sıra varfarin, dikumarol, fenindion gibi diğer oral antikoagülanlar sayılabilir. Antitrombositikler, trombositlerin aktivasyonunu önlerler.

Aspirin ve tiklopidin bu gruptadır. Alteplaz, streptokinaz, ürokinaz, anistreplaz ise trombüsleri parçalayan trombolitik (fibrinolitik) ilaçlara örnektir[4].

B.2. HEPARİN VE DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİN

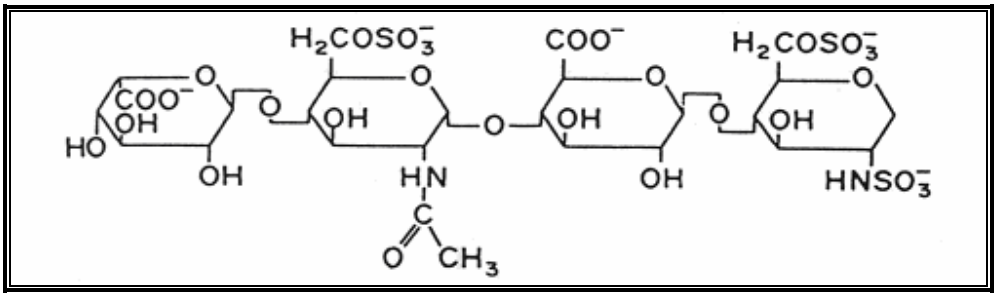
Heparin ve düşük molekül ağırlıklı heparin (DMAH) derin ven trombozunun ve pulmoner embolinin önlenmesinde ve tedavisinde yaygın olarak kullanılan antikoagülanlardır[1-4].

Heparin ilk kez, 1916 yılında karaciğerden izole edilmiştir. Antikoagülan özellikteki bu maddeye karaciğerde lokalize olması nedeniyle "heparin" ismi verilmiştir[2]. Heparin, sığır akciğerinden veya domuz, koyun ve sığırların ince barsaklarından elde edilir[14]. Heparin, tedavideki üstünlüğü ve oral antikoagülanlara göre daha güvenilir olması nedeniyle oldukça tercih edilen bir antikoagülan maddedir[5]. Heparinin plasentadan geçmemesi, etkisinin hızlı ortaya çıkması ve tedavinin kesilmesiyle de hızla ortadan kalkması avantaj sağlar[6]. Ticari preparatlarda bulunan heparin tipleri, heparin sodyum, heparin kalsiyum ve düşük molekül ağırlıklı heparindir (DMAH). Heparin sodyum ve kalsiyum tuzu genel olarak eşit etkinliğe sahiptir[15]. Ancak heparin kalsiyumun, heparin sodyuma göre injeksiyon yerinde daha seyrek lokal hemotama neden olduğu bildirilmiştir[11].

DMAH'ler ile ilgili gelişmeler ise 1970'lerin ortası ve 1980'lerin başından itibaren hız kazanmıştır. Bunda, heparinden elde edilen DMAH'in, aktive edilmiş parsiyel tromboplastin zamanını uzatma etkinliğinin ortadan kalkması (aPTZ'yi), fakat faktör Xa'yı inhibe etme etkisinin devam etmesi ve eşit antitrombotik etkiye karşılık, heparine göre kanama yapma riskini azaltması rol oynamıştır[7]. DMAH'lerin molekül ağırlığı 5000-8000 arasındadır. DMAH'ler, heparinin fraksiyonlanması veya depolimerizasyonu ile elde edilebilirler. Piyasada farklı isimler altında bulunan ve farklı depolimerizasyon yöntemleriyle hazırlanan DMAH'ler, temelde aynı yapıda olmakla birlikte, farmakokinetik özellikler ve antikoagülan etki açısından birtakım farklılıklar gösterebilmektedir[8].

B.2.1. HEPARİNİN YAPISI, FARMAKOLOJİSİ VE KULLANIMI

Heparin, doğrusal zincir yapısında, sülfatlanmış, kompleks bir mukopolisakkarittir (Şekil 1). Hidrofilik özellikte olan heparinin molekül ağırlığı 6000-30000 Dalton arasında değişir[16].



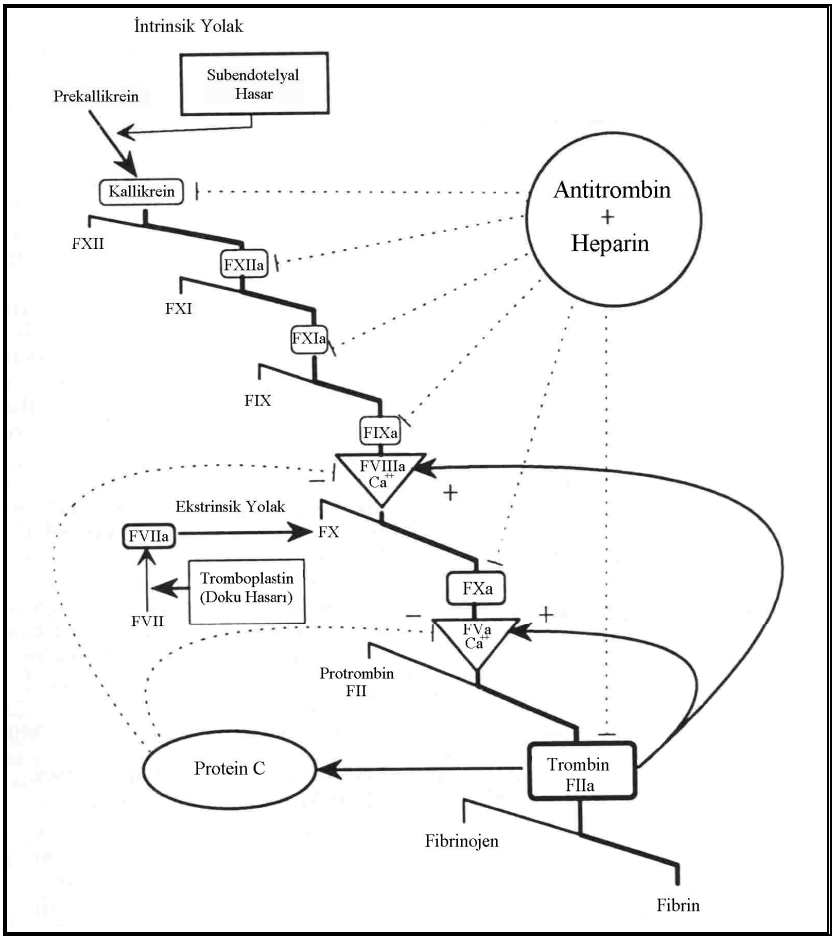
Şekil 1. Heparinin yapısı [2]

Heparin beyaz veya hafif krem renkte, kokusuz, nem çekici, amorf bir tozdur. Suda kolay çözünür(20 kısım suda), pratik olarak alkol, aseton, benzen, kloroform ve eterde çözünmez. Ticari preparatlarında koruyucu olarak % 0.5 fenol veya klorbutanol içerir[16]. Heparinin % 1'lik sulu çözeltisinin pH'sı 6-8 civarındadır[3,17]. Liyofilize kuru heparin oda sıcaklığında ve 30ºC'de sıkı kapatılmış bir şekilde birkaç yıl aktivitesini kaybetmez. Heparin sodyum çözeltisinde pH 4-9 arasında kalite kaybı gözlenmemiştir[18]. Heparin sodyumun injeksiyonluk çözeltisinin oda sıcaklığında 7 yıl stabil kaldığı kanıtlanmıştır[18].

İlacın kandan uzaklaşması 1. derece kinetikledir. Antikoagülan etkinin yarı ömrü uygulanan doza bağlıdır. Heparinin 100, 400 ve 800 IU/kg iv enjeksiyonu sonucu antikoagülan aktivitenin yarı ömrü sırasıyla 1, 2.5, ve 5 saattir[2].

Heparinin etki mekanizması, kanda inaktif durumda bulunan antitrombin III'ü (AIII) aktif duruma getirmesine dayanır. AIII, aktive edilmiş enzimatik pıhtılaşma faktörlerini (trombin, faktör Xa, faktör XII, faktör XI, faktör VII, kallikrein gibi) inhibe ederek pıhtılaşmayı bloke eder (Şekil 2)[3]. Ayrıca, heparinin damar endotelinde

birikerek yaptığı elektronegatif etki trombosit agregasyonunu önleyebilmektedir. Düşük dozda uygulanan heparin, kan pıhtılaşma zamanında belirgin bir uzama yapmadan antitrombotik etki oluşturabilir [11].



Şekil 2. Koagülasyon şeması [3]

Heparin, antikoagülan etki yapmayan dozlarda (çok düşük dozlarda) uygulandığında, lipoprotein lipaz enziminin dolaşıma salımını sağlayarak lipemiyi berraklaştırıcı etki gösterir[2]. Yani yağdan zengin besin yedikten sonra insanda, plazmada oluşan bulanıklık, heparin injekte edildiğinde yok olur. Lipemiyi berraklaştırıcı etki, şilomikronların lipoprotein lipaz tarafından parçalanmasına bağlıdır[5]. Sonuçta, serbest yağ asiti konsantrasyonu yükselir. Bu durumun, hiperlipideminin tedavisi yönünden pratik bir önemi yoktur[11].

Heparinin antiinflamatuvar etkisinin incelenmesi amacıyla ülseratif kolitli hastalarda kullanıldığı çalışmalar mevcuttur[19]. Ülseratif kolitte tromboemboli görülme sıklığı da arttığından heparinin bu amaçlı kullanımının yanısıra antiinflamatuvar etkisinden de faydalanmak amaçlanmıştır. Diğer bir çalışmada intragastrik uygulanan heparinin sıçanlardaki ülser iyileşmesini hızlandırdığı belirtilmiştir[20]. Ancak başka bir çalışmada, orta ve şiddetli ülseratif kolitin tedavisinde metilprednisolon ile karşılaştırmak üzere sadece heparin verilen hastalarda iyileşme gözlenmemiş ve kanama gözlenmiştir[21].

Ticari heparin, değişik molekül ağırlığında molekül grupları içerdiğinden verilen heparinin konsantrasyonu ve pıhtılaşma üzerine etkisinin korelasyonu genellikle düşüktür. Bu nedenle heparinin etkinliği biyolojik ünite ile belirlenir[4].

Heparin, pulmoner embolizmi ve derin ven trombozunu önlemek ve gelişmesini durdurmak amacıyla, ayrıca postoperatif tromboz profilaksisinde ve venöz tromboemboli riskinin arttığı durumlarda da kullanılır[1-3].

Heparinin iv infüzyonla uygulanmasında, başlangıçta infüzyon borusuna 5000 ünite heparin injekte edilir; daha sonra 24 saatte bir 20000-30000 ünite heparin % 5'lik dekstroz çözeltisi içinde, yaklaşık 0.5 ünite.kg^{-1}.dk^{-1} hızla verilir. Sonraki günlerde hız, test sonuçlarına göre ayarlanır. Heparinin iv injeksiyonla uygulanmasında, başlangıçta 5000 ünite, sonra 4 saatte bir 5000-10000 ünite verilir. Heparin sc uygulanacaksa, 12 saatte bir 12500 ünite verilir [11].

Heparin dozunun ayarlanması için hastalarda aktive edilmiş parsiyel tromboplastin zamanı (aPTZ) ve aktive edilmiş koagülasyon zamanı (aKZ) testleri yapılır. Heparin tedavisi sırasında aPTZ'nin 1.5-2, aKZ'nin 2.5-3 kat artması uygun görülür[15]. İnsanlarda normal aPTZ değeri 24-36 sn, aKZ değeri ise 80-130 sn'dir. aPTZ testi, duyarlı, ucuz, tutarlı ve rutin olarak kullanılan bir testtir. aPTZ koagülasyonun intrinsik yolağının ve faktör XII, yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMWK), prekallikrein, XI, IX ve VIII'ün yeterli olup olmadığını gösterir[11].

Heparin, yüksek dozda uzun süre kullanıldığında, spontan kanamalara ve osteoporoza neden olabilir. Ayrıca, uzun süre kullanıldığında seyrek de olsa,

trombositopeniye (trombositlerin azalması) ve trombosit agregasyonuna yol açabilir. Doz aşımında heparinin antidotu olan protamin sülfat iv yoldan verilir [5].

B.2.2. DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİNİN YAPISI, FARMAKOLOJİSİ VE KULLANIMI

DMAH'nin antitrombotik etkinliği, fraksiyonlanmamış heparin (uzun zincirli mukopolisakkarit olan heparinin farklı molekül ağırlıklarına göre fraksiyonlanmamış şekli) ile yaklaşık eşit iken, antihemostatik (kanama yapıcı) etkinliği daha azdır DMAH'nin yarılanma ömrü heparinden daha uzun, biyoyararlanımı daha yüksektir[11]. DMAH'lerin molekül ağırlıkları, spesifik aktiviteleri (anti Xa/anti IIa oranı) ve plazma klerensleri farklıdır ve farklı dozlarda kullanılırlar[22]. Farmakokinetik özellikler ve antikoagülan etki açısından farklılıklar gösterdiklerinden, klinikte birbirinin yerine kullanılamazlar[7]. DMAH'lerde "mg veya g" yerine biyolojik etkinlik esas alınarak "IU Axa" (International Unit of AntiXa) birimi kullanılır.

DMAH'nin antitrombin etkisi düşükken, antifaktör Xa etkinliği (anti Xa), yani pıhtılaşma ortak yolağında rol alan faktör Xa'yı inhibe etme etkinliği daha güçlüdür. Faktör Xa protrombini trombine dönüştürerek fibrin (pıhtı) oluşumunu sağlar. Heparin veya DMAH varlığında heparin+antitrombin III kompleksi faktör Xa'yı inhibe eder. DMAH'lerin anti Xa aktivitelerinin 70 $IU.mg^{-1}$'dan fazla, spesifik aktivitelerinin (anti Xa/anti IIa oranı) ise 1.5'in üzerinde olması istenir[14]. Bu oranın yüksek olması tercih edilir, çünkü anti Xa aktivitesi antitrombotik etkinliği ifade ederken, anti IIa aktivitesi kanama insidansını ifade eder[23].

DMAH'ler aPTZ'yi uzatmadıklarından dozun izlenmesi için aPTZ değil, anti Xa etkinlik testi kullanılır. Klinikte anti Xa konsantrasyonu rutin olarak izlenmez ancak renal yetersizlik, obezite, hamilelik gibi durumlarda ve pediatrik hastalar ile perkütan koroner müdaheleye giden hastalarda anti Xa izlenmesi önerilmektedir[24]. DMAH'ler ile tromboembolizmin tedavisi ve kanama riskinin en iyi şekilde dengede tutulması açısından tavsiye edilen anti Xa konsantrasyonu profilaksi için 0.1-0.5

IU/mL iken tedavi için 0.5-1.0 IU/mL'dir[23]. Ancak kaynaklarda kullanılan DMAH tipine göre kanama riski için verilen limitler değişiklik göstermektedir[24]. Birçok kaynakta 0.2 IU/mL'nin üzerindeki anti Xa seviyesi etkinliğin kanıtı olarak belirtilmiştir[25-27].

DMAH'lerin fraksiyonlanmamış heparin ve diğer oral antikoagülanlarla karşılaştırıldığı çalışmalarda etkinlikleri ve güvenilirlikleri kanıtlanmıştır. Akut pulmoner embolide DMAH'in sc uygulanması ile fraksiyonlanmamış heparinin İV uygulanması durumunda etkinliklerinin 612 hastada karşılaştırıldığı bir çalışmada, 8 gün ve 90 gün sonraki tedavi kıyaslanmıştır. Tedavi oranı, ilk 8 günün sonunda fraksiyonlanmamış heparin ile % 2.9, DMAH ile % 3 olurken, 90 gün sonra fraksiyonlanmamış heparinle % 7.1 ve DMAH ile % 5.9 olmuştur. Büyük kanama riski her iki grupta benzer çıkmıştır. Sonuçta, bu çalışmada sc DMAH uygulamasının, İV fraksiyonlanmamış heparin uygulaması kadar etkili ve emniyetli olduğu sonucuna varılmıştır[28].

DMAH'in sc uygulanmasının (günde bir kez) ve varfarin sodyum uygulanmasının karşılaştırıldığı bir çalışmada ise, diz ve kalça implantasyonundan sonra derin ven trombozunu önlemek amaçlanmıştır. Toplam 1207 hastanın, ven trombozunu ölçmek amacıyla venogramları çekilmiştir. Derin ven trombozu oranı, varfarinli grupta % 37.4 iken DMAH uygulanan grupta % 31.4 çıkmıştır. Sonuçta, sc uygulanan DMAH'in derin ven tromboz sıklığını varfarine göre daha fazla düşürdüğü gözlenmiştir[29].

Heparinle olduğu gibi DMAH'le de ülseratif kolitin tedavisinde antiinflamatuvar etkinlikten faydalanmak üzere araştırmalar yapılmıştır[30]. Sonuçta DMAH'in kortikosteroide dirençli ülseratif kolitin tedavisinde kullanılabileceği ve oral DMAH kullanımıyla ciddi bir komplikasyon gözlenmediği belirtilmiştir.

B.3. HEPARİN VE DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİNİN ANALİZ YÖNTEMLERİ

Heparin ve DMAH'in teşhisinde ve miktar tayininde, IR, NMR, kromatografik (kağıt, İTK, jel kromatografisi gibi), elektroforetik, kolorimetrik, fluorimetrik, titrimetrik, türbidimetrik ve nefelometrik, polarografik yöntemler, biyokimyasal ve biyolojik testler kullanılabilir[14,18].

Günümüzde in vitro miktar tayini için en çok tercih edilen yöntem kolorimetrik metodtur. Heparin çeşitli boyalarla metakromazi (boyanın absorbsiyonundaki değişim) gösterir. Metilen mavisi, gece mavisi, azure A, azure I, azure II, alsiyan mavisi, toluidin mavisi heparinin metakromazi gösterdiği boyalardır. Boya ve heparin miktarı önemlidir; belli aralıkta çalışılır[31-33]. Toluidin mavisi ve azure, heparinin kolorimetrik tayini için en çok tercih edilen boyalardır. Heparinin toluidin mavisi ile verdiği kompleksin renk şiddeti, azure A ile verdiğinden daha kuvvetlidir. Toluidin mavisiyle plazma idrar ve dokulardan heparin tayin edilebilir, ancak önce ITK ya da elektroforezle ayırım yapılmalıdır[18].

Heparin ve DMAH'lerin biyolojik tayin metodları ise aPTZ, aKZ ve anti Xa testleridir[11].

DMAH'lerin aPTZ'yi uzatma etkinliği düşük olduğundan, biyolojik tayinlerinde anti Xa testi kullanılır.

Anti Xa ölçümünün prensibi sentetik kromojenik substrat kullanılarak yarışmalı bir sistem oluşturulup DMAH'nin anti Xa aktivitesinin ölçülmesi suretiyle DMAH seviyesinin belirlenmesine dayanır[34]. DMAH'lerin absorbsiyonunu ve biyoyararlanımını ölçmek amacıyla farmakodinamik cevabın kullanıldığı bu dolaylı metot, DMAH'lerin terapötik etkinliğinin izlenmesinde geniş çapta kullanılır. Plazmada faktör Xa'nın oluşmasıyla protrombinin trombine dönüşmesi ve sonuçta fibrin (pıhtı) oluşumu sağlanır. Heparin varlığında ise, heparin+antitrombin III kompleksi oluşumuyla, bu mekanizma ile inhibitor mekanizma arasında yarışma olur. Ölçümde plazmaya liyofilize kromojenik substrat eklenir. Sonra bu karışıma faktör Xa eklenir eklenmez faktör Xa substratı ayırır ve heparin-AT III kompleksi

tarafından faktör Xa inhibe edilir. Yarışmalı reaksiyon dengeye gelir. Ortamdaki heparin konsantrasyonu ile ters orantılı olarak salınan substrat ölçülür[18, 35].

Farklı boyalarla metakromatik esasa dayanan fizikokimyasal tayin yöntemleriyle, trombin zamanı tayini gibi biyolojik tayin yöntemleri incelenmiş ve bu yöntemler arasındaki korelasyon kanıtlanmıştır[36-38].

B.4. HEPARİN VE DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİNİN ALTERNATİF YOLLARDAN UYGULANMASINA YÖNELİK ÇALIŞMALAR

Heparin ve DMAH'ler ile farklı dozaj şekilleriyle ve farklı uygulama yollarıyla yapılmış çalışmalar mevcuttur. Hazırlanan formülasyonlar çözelti, jel, lipozom, yama, matris ve mikropartiküler sistemlerdir. Oral uygulamaya yönelik çalışmaların sayıca fazla olması ve son yıllarda uygulama kolaylığı nedeniyle de çalışmalarda daha çok oral yol tercih edildiği için oral uygulamaya yönelik formülasyonlar ayrı bir başlık altında toplanmıştır.

B.4.1. HEPARİN İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

B.4.1.1. Çözelti Tipi Formülasyon

Rektal yoldan sıçanlara heparin uygulanan bir çalışmada, heparinin barsaktan emilimine safra tuzlarının etkisini araştırmak amacıyla, sıçanlara verilen heparin çözeltisine sodyum kolat ya da sodyum deoksikolat eklenmiştir. Heparinin emilimi radyoaktif işaretleme ile incelenirken, biyolojik etki plazma lipaz aktivitesi ve parsiyel tromboplastin zamanının (PTZ) uzaması ölçülerek izlenmiştir. Aynı heparin konsantrasyonunda safra tuzu eklenmediği zaman, kanda radyoaktivite gözlenmemiş, PTZ'de uzama ve plazma lipaz aktivitesi oluşmamıştır[39].

B.4.1.2. Jel Tipi Formülasyon

Heparinin jel tipi formülasyonlarla deriye uygulandığı bir çalışmada Carbopol 934®, Pluronic F-127® ve Methocel J5MS® kullanılarak heparinin jel formülasyonlarından salımı ve insan derisine penetrasyonu incelenmiştir. Heparinin salım hızı şu sırayla artmıştır: Methocel®<Pluronic®<Carbopol®. Heparinin difüzyon katsayısı ile jel viskozitesi arasında ters ilişki gözlenmiştir. Carbopol® jele, % 5 Azon® veya % 10 N-metilpirolidon eklenmesiyle heparinin deriden geçişi kontrol jele göre dört kat artmıştır[40].

Vücuda yerleştirilen ve kanla temas eden sistemlerin sebep olduğu trombozun önlenmesi için heparinin sistemik verilmesi yan etkileri de beraberinde getirmektedir. Bu nedenle, bu sistemlerin yüzeylerinin heparin yüklü polimerle kaplanması düşünülmüştür. Bu amaçla yapılan bir çalışmada[41], N-izopropilakrilamit kopolimeri ile bütil metakrilat (hidrofobik) veya akrilik asit (hidrofilik) ko-monomeri kullanılarak sıcaklığa duyarlı hidrojel sentezlenmiştir. Düşük sıcaklıkta heparin çözeltisi şişmiş olan jele yüklenir ve jel vücutta yüksek sıcaklıkla karşılaştığında büzüşerek heparini salar. Sistemde hidrofobik ko-monomer hız kontrol edici membran gibi davranmaktadır. Heparin yüklemesi sıcaklık, çözelti konsantrasyonu ve jel kompozisyonunun fonksiyonu olarak yapılmıştır. Maksimum heparin yüklemesi, % 4-6 heparin çözeltisi kullanıldığında yapılabilmiştir. Heparinin salım kinetiği ise, jel kompozisyonu ve yükleme sıcaklığı ile jelin büzüşme (deswelling) kinetiğinden etkilenmektedir.

Brazel ve Peppas[42], poli(N-izopropilamit-ko-metakrilik asit) sentezleyerek bu hidrojele heparin ve streptokinaz yüklemişler ve böylece pH ve sıcaklığa hassas salım elde etmişlerdir. Kullanılan polimerlerden poli(N-izoakrilamit) sıcaklığa, poli(metakrilik asit) ise pH'ya hassastır. Bu şekilde kan pıhtısı civarındaki pH ve sıcaklık değişiminin etkisiyle lokal ilaç salımı sağlanmış olur ve böylece büyük miktar doz uygulamasından ve yan etkilerden kaçınılmış olur.

B.4.1.3. Lipozom Tipi Formülasyon

Etki süresini uzatmak amacıyla heparin, 0.5-4.0 μm çapında, büyük çok tabakalı lipozomlara hapsedilmiştir. Lipozomlar İV yoldan sıçanlara verilmiş ve antikoagülan aktivite süresinin yaklaşık üç kat arttığı gözlenmiştir[43].

Fosfolipon 80 (FL80) ve sfingomiyelin ve bunların karışımları kullanılarak heparin ve DMAH içeren lipozom formülasyonları hazırlanmış ve insan derisinden geçişi in vitro olarak incelenmiştir[44]. Lipozomlar, etanol injeksiyon metodunun modifiye edilmesiyle hazırlanmıştır. Heparin içeren sulu fazın lipit içeren etanol fazına hızla eklenmesiyle ve homojenizatörde karıştırılmasıyla lipozomlar elde edilmiştir. Heparinin epidermal membrana penetrasyonu molekül ağırlığına bağlıdır ve DMAH'in penetrasyonu, heparinden daha fazladır. Heparin, stratum korneumun dış tabakalarında kalırken, DMAH daha derin epidermal tabakalara penetre olmuştur. Heparin epidermise sadece FL80 içeren lipozom formülasyonu ile penetre olmuştur. Heparinin epidermise penatrasyonunun, heparinin molekül ağırlığı ve lipozom formülasyonu tarafından etkilendiği belirtilmiştir. Sonuç olarak DMAH'in kapillerdeki kan konsantrasyonu, farmakolojik etki için gerekli seviye açısından yeterli olmamıştır.

B.4.1.4. Partiküler Sistemler

Küçük çaplı vasküler graftlarda, bölgesel ve kontrollü heparin salımını sağlayacak bir sistemin amaçlandığı çalışmada, heparin ve çeşitli sürfaktanlar kullanılarak, poli (D,L- laktid-ko-glikolit 50:50) (PLG) mikroküreleri hazırlanmıştır[45]. Mikroküreler mikroporlu poliüretan tüplere yüklenerek parçalanma ve salım özellikleri incelenmiştir. Sürfaktan olarak Lesitin, Span 20, Span 40, Span 60, Span 85 kullanılmış, heparin salımı en fazla Span 85 ve en az Span 40 ile olmuştur. Salım 12 hafta devam etmiş ve ilk 4 saat ani salım (burst etki) gözlenmiştir.

Diğer bir çalışmada ise, heparin mikroküreleri, biyoparçalanabilir bir polimer olan poli(D-L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kullanılarak, püskürterek kurutma yöntemiyle hazırlanmıştır[46]. Bu çalışmada da ateroskleroz, venöz by-pass, graft

hastalıkları ve restenoz gibi hastalıklarda yumuşak doku hücrelerinin (YDH) artışını önlemek için hedef bölgede gerekli ilaç konsantrasyonunun sağlanması ve uzun süreli salımın gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. PLGA ile hazırlanan mikroküreleri heparinin salım süresi uzamıştır. Koroner by-pass ameliyatı olan hastalardan alınan dokularla yapılan deneylerin sonucunda, YDH artışının azaldığı gözlenmiştir.

Yıldız ve arkadaşları[47] polilaktik asit kullanarak solvan uçurma yöntemiyle hazırladıkları heparin yüklü mikroküreleri nazal olarak sıçanlara uygulamıştır. Polivinil alkol ile emülsiyon oluşturucu maddenin konsantrasyonu ve polimer:ilaç oranları değiştirilerek farklı formülasyonlar oluşturulmuştur. Mikroküre lerin yüzey özelliği, partikül boyutu, verimi, enkapsülasyon etkinliği ve salım özellikleri incelenmiştir. Sonuçta bu formülasyonların uygulanması ile antikoagülan etkinliğin süresinin uzadığı ve bağıl biyoyararlanımın arttığı belirtilmiştir.

Yıldız ve arkadaşları başka bir çalışmada pulmoner uygulama amacıyla heparin yüklü biyoparçalanabilir mikropartiküller hazırlamıştır[48]. Heparinin akciğer inflamasyonu ve havayolu hiperreaktivitesi üzerindeki etkinliğinden faydalanmak amaçlanmıştır. PLGA kullanılarak ve püskürterek kurutma metoduyla, 2.55-3.86 µm büyüklüğünde mikropartiküller elde edildiği ve ilaç yükleme kapasitesinin yüksek olduğu belirtilmiştir.

Kanla temas eden biyolojik materyallerin ve sistemlerin uygulanmasıyla oluşabilecek trombozisin önlenmesi amacıyla heparinin kontrollü salımını sağlayan mikroküreler üçlü blok haldeki (poli-L-laktik asit)-(polietilen glikol)-(poli-L-laktik asit) polimerlerini kullanılarak hazırlanmıştır[49]. Mikroküreler s/y/s emülsiyonu oluşturarak solvan uçurma tekniğiyle hazırlanmış ve yüzey ve salım özellikleri incelenmiştir. Polietilen glikolün zincir uzunluğunun ve triblok polimerdeki oranının, mikroküre lerin yüzey özellikleri ve heparin salımında kilit faktör olduğu sonucuna varılmıştır.

B.4.1.5. Matris Tipi İlaç Şekilleri

Matris tipi ilaç sistemi olarak poli(allilamin)/heparin kompleksi hazırlanmıştır[50]. Elektriksel uyarılma ile iki polimerin oluşturduğu kompleks

ayrılarak çözünmüştür ve heparin salımı gerçekleşmiştir. Elektriksel uyarılmanın tekrarı ile kontrollü salım amaçlanmıştır ve akımın verildiği basamaklar süresince sabit salım hızı gözlenmiştir.

Diğer bir çalışmada poli-L-laktit, poli-L-laktid-ko-glikolit kullanılarak heparin yüklü filmler hazırlanmıştır[51]. Plastifiyan olarak kullanılan polietilen glikol, heparinin salım profili ve kinetiğine poli-L-laktit kullanıldığıda etki ederken poli-L-laktid-ko-glikolit ile önemli bir fark gözlenmemiştir.

B.4.1.6. Yama

Vasküler hasar sonucu oluşan YDH artışını önleyen heparinin perivasküler salımını sağlayan, biyoparçalanabilir polimerle hazırlanan yama (wrap) şeklinde bir sistem geliştirilmiştir. Heparin hapsedilmiş PLGA mikrokürelerinin aljinat jel içine konulmasıyla ince tabakalar oluşturulmuş ve bu tabakalarla hücre kültürlerinde ve sıçanlarda deneyler yapılmıştır. Sonuçta PLGA-aljinat heterojen matrisinden heparin salımı geciktirilmiş; artırılan heparin dozuyla doğru orantılı olarak YDH azalmıştır[52].

Vasküler cerrahide politetrafluroetilen (ePTFE) yamaların kullanımıyla meydana gelebilen pıhtı oluşumunu önlemek amacıyla yüzeyi kitozan-heparin kompleksiyle modifiye edilmiş ePTFE yamalar geliştirilmiştir. Modifiye ePTFE vasküler graftların kanla geçimli olması ve platelet adezyonunun düşürülmesi sonucu başarı sağlanmıştır[53].

B.4.2. DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİN iLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

B.4.2.1. Çözelti Tipi Formülasyon

Nissan ve arkadaşlarının[54] yaptığı çalışmada DMAH, sodyum kolat ile birlikte rektal yoldan çözelti şeklinde sıçanlara ve mikroenema şeklinde sağlıklı gönüllülere verilmiş ve barsaktan emilim gözlenmiştir. Sağlıklı gönüllülere 25000 U DMAH'in 20 $mg.mL^{-1}$ sodyum kolat ile birlikte mikroenema şeklinde uygulanmasıyla

plazma anti Xa seviyesi 15. dakikada 0.38 $U.mL^{-1}$ bulunmuştur. İstenen etkinin elde edilmesinin yanısıra, DMAH'in sodyum kolat ile birlikte uygulanabileceği ve emniyetli olduğu gözlenmiştir. Ancak uzun süreli plazma seviyesi için yavaş salım yapan bir formülasyonun gerekebileceği belirtilmiştir.

Diğer bir çalışmada, burun damlası şeklinde hazırlanan, DMAH ve fraksiyonlanmamış heparin içeren preparatlar sıçanlarda denenmiştir. Formülasyonlara emilim artırıcı olarak noniyonik yüzey etkin madde olan tetradesilmaltosit (TDM) eklenmiş ve heparin emilimini incelemek amacıyla plazma anti Xa aktivitesi ölçülmüştür. Zamana karşı anti Xa aktivitesinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen eğriden, eğri altında kalan alan (AUC) ve maksimum plazma seviyesi (C_{max}) hesaplanmış ve % 0.25 TDM eklenmesiyle DMAH'in AUC ve C_{max}'ında belirgin bir artış gözlenmiştir. Ancak, fraksiyonlanmamış heparinde daha düşük bir artış olmuştur. DMAH içeren formülasyonun mutlak biyoyararlanımı % 0.4±0.4'den, TDM varlığında % 19.0±0.3'e yükselmiştir [25].

Heparin ve DMAH çözeltisinin deriden geçişinin düşük frekanslı ultra ses dalgaları (20 kHz) kullanılarak artırıldığı bir çalışmada, in vitro domuz derisi ve in vivo sıçan derisi kullanılmıştır[55]. Transdermal olarak verilen heparinin biyolojik aktivitesi antiXa testi ile ölçülmüştür. DMAH konsantrasyonu, derinin geçirgenliği veya uygulama alanı etkin doza ulaşmada etkili faktörlerdir. Sonuçta deriden geçişin arttığı, DMAH ile uzatılmış etki elde edildiği belirtilmiştir.

DMAH'in nazal uygulandığı bir çalışmada, çözeltiye eklenen siklodekstrinlerin absorbsiyona etkisi ve etki mekanizması araştırılmıştır. Dimetil -β-siklodekstrin (DM-β-CD), β-siklodekstrin ve hidroksi-propil-β-siklodekstrinden daha etkili bulunmuştur. Siklodekstrinlerin sıkı bağlanma noktalarını (tight junction) açarak absorbsiyonu artırdıkları düşünülmüştür[56].

DMAH'in pulmoner uygulanması amacıyla, TDM veya DM-β-CD ile çözeltileri hazırlanarak sıçanlara uygulandığı bir çalışmada, TDM ve DM-β-CD'in geçişi artırdığı, ancak TDM'in daha etkili olduğu bildirilmiştir[26].

B.4.2.2. Jel Tipi Formülasyon

Carbopol 934®, trietanolamin ve propilen glikol kullanılarak DMAH'in jel formülasyonları hazırlanmış ve bazı penetrasyon artırıcılar eklenerek insan derisinde in vitro perkütan emilim incelenmiştir[57]. Kullanılan penetrasyon artırıcıların etkinlik sıralaması şöyledir: laurokapram (Azone®) > nerolidol > 1,8-sineol. Penetrasyon artışı kontrole göre, % 2 laurokapram ile 4.4 kat, % 2 nerolidol ile 2 kat olmuştur. 1,8-sineol, düşük konsantrasyonda kullanıldığında penetrasyonda önemli bir artış sağlamazken, % 10 oranında kullanıldığında DMAH'in akısı 3.5 kat artmıştır.

DMAH ile kitozan ve sodyum aljinat kullanılarak topikal jel formülasyonları hazırlanmıştır[58]. Formülasyonlara penetrasyon artırıcı olarak d-limonen farklı konsantrasyonlarda eklenmiştir ve selüloz asetat membrandan geçiş incelenmiştir. Sonuç olarak kitozan-aljinat kombinasyonunun DMAH'nin topikal jel formülasyonu hazırlamak için kullanılabileceği ve d-Limonenin de penetrasyon artırıcı olarak düşünülebileceği belirtilmiştir.

B.4.2.3. Lipozom Tipi Formülasyon

DMAH'in topikal uygulaması için katyonik, nötral ve anyonik esnek lipozomlar (fleksozom) hazırlanmıştır[59]. Fizikokimyasal özellikler, DMAH yükleme, deriye penetrasyon ve derinin alt tabakalarında lokalizasyon açısından katyonik fleksozom diğer formülasyonlardan daha iyi sonuç vermiştir.

B.5. HEPARİN VE DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİNİN ORAL UYGULAMASINA YÖNELİK ÇALIŞMALAR

B.5.1. HEPARİNİN ORAL FORMÜLASYONLARI

Heparinin oral uygulanmasını sınırlandıran özellikleri, büyük molekül yapısına sahip olması, negatif yük yoğunluğunun yüksek olması, hidrofilik yapıda olması[60] ve midede kolay parçalanabilir yapıda olmasıdır[61].

Heparinin mideden emilimini ve oral biyoyararlanımını engelleyen bu sebepleri gidermeye yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

B.5.1.1.Çözelti Tipi Formülasyon

B.5.1.1.1. Heparin Kompleksleri ve Tuzları ile Çözelti

Heparinin çeşitli maddelerle komplekslerinin ve tuzlarının hazırlanmasına yönelik olarak yapılan çalışmalarda, gastrointestinal kanaldan geçişi artırmak amacıyla, heparinin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değiştirilmesi esas alınmıştır.

Heparinin, etilendiamintetraasetikasit (EDTA) ile birlikte oral uygulanmasına yönelik bir çalışmada[62] EDTA tuzları ile hazırlanan heparin kompleksleri ve heparinoitler (sentetik heparin türevleri) kullanılmış, 50 $mg.kg^{-1}$ heparin ve 500 $mg.kg^{-1}$ sodyum EDTA içeren sulu çözelti şeklindeki preparat sıçanlara 100 $mg.kg^{-1}$ heparin ve 50 $mg.kg^{-1}$ sodyum EDTA içeren jelatin kapsüller köpeklere verilmiştir. Lipemiyi berraklaştırıcı aktivite, sıçanlarda 0.04±0.03'den 1.46±0.17'ye (30. dakika) çıkarken, köpeklerde 0.19±0.18'den, 0.99±0.66'ya (2. saat) yükselmiştir. Pıhtılaşma süresi ise, sıçanlarda 7±1 dakikadan 13.3 dakikaya (30. dakika) yükselirken, köpeklerde 11.3±2.1 dakikadan 44±22 dakikaya (2. saat) yükselmiştir. Sonuçta EDTA'nın alkali tuzu ile verilen heparinin gastrointestinal kanaldan emildiği kararına varılmıştır.

Leone-Bay ve arkadaşlarının[63] yaptığı çalışmada, hazırlanan 10 bileşik (açillenmiş non α-aminoasit yapısında) ile oluşturulan heparin komplekslerinin çözeltileri, sıçanlara ve maymunlara oral yoldan verilmiştir. aPTZ ve anti Xa

ölçümleri ile heparinin gastrointestinal emilimi kanıtlanmıştır. Heparin ile açillenmiş non α-aminoasit yapısındaki salım ajanı arasında nonkovalan etkileşme nedeniyle emilimin sağlandığı yorumu yapılmıştır.

Heparinin safra asitleriyle kompleksinin hazırlandığı çalışmalarda çoğunlukla deoksikolik asit (DOCA) tercih edilmiştir. Genellikle gastrointestinal kanal duvarının yapısı bozulmaksızın emilimin artması, hidrofobisitenin artmasına ve DOCA kompleksinin ileumdaki safra asiti reseptörleriyle etkileşmesine bağlanmıştır.

Lee ve arkadaşları[64] tarafından farklı mol oranlarında heparin-DOCA kompleksleri hazırlanmış ve sıçanlara oral yoldan verilmiştir. Pıhtılaşma zamanını en çok artıran formülasyonun, en fazla DOCA oranıyla hazırlanan formülasyon olduğu gözlenmiştir. Mol oranı 10 olan Heparin-DOCA kompleksi ile yapılan deneyde aPTZ değerinin heparinin dozuna bağlı olarak arttığı ve 200 $mg.kg^{-1}$ heparinle aPTZ'nin 7 kat arttığı gözlenmiştir.

B.5.1.1.2. Emilim Artırıcı İçeren Çözelti

Oral heparin uygulamasına yönelik olarak, emilimi artırmak amacıyla yapılan çalışmalarda en sık kullanılan madde asetillenmiş aminoasit olan sodyum N-(8-[2-hidroksibenzoil]amino) kaprilattır (SNAC). SNAC, farmakolojik ve toksikolojik cevap oluşturmadan ve gastrointestinal kanalda hasara yol açmaksızın heparinin emilimini artırmaktadır. SNAC'nin etki mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, heparinin fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek ve gastrointestinal kanalı etkileyerek emilimi artırdığı düşünülmektedir.

Heparin ve SNAC'nin, % 25 (h/h) propilen glikol içeren sulu çözeltilerinin maymunlara oral yoldan verildiği bir çalışmada, aPTZ değerinin arttığı gözlenmiştir[60]. SNAC (150 $mg.kg^{-1}$) varlığında heparin (15, 30, 100 $mg.kg^{-1}$) uygulandığında, artırılan heparin dozuna bağlı olarak aPTZ değerinin de arttığı belirtilmiştir. İstenmeyen farmakolojik bir etki oluşmadığı gibi, gastrointestinal hasar da gözlenmemiştir.

Sağlıklı gönüllülerle yapılan bir çalışmada, 30000-150000 IU arasında değişen dozlarda heparin çözeltisine 2.25 g SNAC eklenerek formülasyonlar hazırlanmış ve gönüllülere verilmiştir[65]. Anti Xa'nın, heparin dozunun artışına bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Doku faktör yolağı inhibitörü (DFYİ) konsantrasyonu bu çalışmada 2.5-3 kat artmıştır. Doku faktörüne bağlı yolak kısa sürede pıhtı oluşumunu sağlamaktadır. Daha önceki çalışmalarda DFYİ'nün 7500 IU heparinin İV uygulanmasından sonra 1.5-6.5 kat arttığı bildirilmiştir; böylece heparinin antikoagülan yanıtında bireylerarası değişkenlik olabileceği gösterilmiştir. Kullanılan dozda SNAC miktarıyla yan etki gözlenmemiştir .

Gonze ve arkadaşları[66], sıçanlarda derin ven trombozunu önlemek için oral heparin uygularken, emilim artırıcı olarak SNAC kullanmışlardır. Oral gavajla 300 $IU.kg^{-1}$ SNAC ve 300 $IU.kg^{-1}$ heparin içeren preparat verilmiştir. aPTZ'nin normal seviyesinin 1.87 katına çıktığı, tromboz oluşumunun % 25'e düştüğü gözlenmiştir. Etki mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, SNAC'nin, heparine nonkovalan bağlanarak lipofilitesini artırdığı ve barsak lümeninden taşınarak sistemik dolaşıma geçmesini sağladığı sonucuna varılmıştır.

Aynı grubun diğer bir çalışmasında, SNAC ve heparin içeren preparatlar derin ven trombozu oluşturulan sıçanlara oral yoldan uygulanmıştır[67]. Derin ven trombozu oluşturduktan sonraki 7 günlük tedavi sonucunda, derin ven trombozu oranı kontrol grubunda % 100 iken, 30 $mg.kg^{-1}$ heparin ve 300 $mg.kg^{-1}$ SNAC içeren preparatın günde üç kez verilmesiyle % 10 olmuştur. Bu düzey 5 $mg.kg^{-1}$ DMAH içeren ticari heparin (sc) preparatının uygulanmasıyla elde edilen sonuçla aynı çıkmıştır.

SNAC kullanılarak oral heparin uygulamasıyla ilgili diğer bir çalışma, damar zedelenmesi sonucu oluşan neointimal hiperplaziyi önlemek amacıyla yapılmıştır[68]. Neointimal hiperplazi damar içinde yeni tabaka oluşumu ve büyümesidir. Bu durumda uzun süreli ve tekrarlayan dozlarda heparin tedavisi gerekir; dolayısıyla oral uygulamanın önemi artar. Çalışmada stent ve balon ile damarları açılan tavşanların, heparin tedavisi uygulandıktan sonra damarları alınarak incelenmiş,

damardaki daralmayı önlemede SNAC ile birlikte oral heparin uygulamasının etkili olduğu gözlenmiştir

SNAC ile beraber verilen heparinin oral emilim yolunu incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, Caco-2 tek tabaka hücreleri ve floresan mikroskopisi kullanılmıştır[69]. SNAC varlığında heparinin Caco-2 hücrelerinden geçişinin selektif olduğu (spesifik bir mekanizma), plazma membran geçirgenliğiyle veya sıkı bağlanma noktalarının (tight junction) açılmasıyla ilgili olmadığı belirtilmiştir. SNAC-heparin kompleksinin (nonkovalan bağlanma), tek başına heparinden daha lipofilik bir yapı oluşturarak hücre membranından pasif difüzyona uğrayıp, sonra kan dolaşımına geçtiği ve daha sonra ayrılıyor olabileceği belirtilmiştir

Emisphere firması tarafından, heparinin SNAC ile hazırlanmış oral sıvı dozaj şekli faz III klinik çalışmaları aşamasındadır[70,71]. İnsanlara toplam 60000 IU heparin ve 2.25 g SNAC içeren çözelti oral yoldan uygulandığında antikoagülan etkinlik eşiğine (>0.2 AXa IU/mL) ancak ulaşılmış, toplam heparin dozu 90000 IU'ye çıkarıldığında ise plazmada 0.3 AXa IU/mL seviye gözlenmiştir. Maksimum konsantrasyona ulaşma süresi 40 dakikadır[72]. Ayrıca, oral katı heparin preparatı hazırlamak için doğrudan basım ajanı olan mikrokristal selülozun konsantrasyonunun ve granülasyon işleminin etkileri incelenmiştir[73]. Granülasyon ve kurutma şartlarının SNAC'nin kristal özelliklerini değiştirmediği gözlenmiştir. Aynı firma, SNAC'nin modifikasyonuyla geliştirdiği sodyum N-[10-(2-hidroksi benzoil) amino] dekanoat (SNAD) isimli salım ajanıyla oral heparin tabletleri de hazırlamıştır[74]. Emisphere firması son olarak çözelti formülasyonuna göre daha az heparin ve SNAC kullanarak yumuşak jelatin kapsül hazırlamıştır. Firma çalışmalarına halen devam etmektedir[71].

B.5.1.2. Emülsiyon ve Mikroemülsiyon Tipi Formülasyon

Emülsiyon şekli ile yapılan çalışmada, su-içinde-yağ emülsiyonu hazırlanmış ve heparin emilimine, emülsiyon bileşenlerinin oranlarının etkisi incelenmiştir[75]. Bu

amaçla lipemiyi berraklaştırıcı etki incelenmiş ve heparin emiliminin emülsiyondaki yağ damlacıklarının büyüklüğü ve total yüzey alanı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir

Küçük partiküllü heparin/kitozan kompleksi içeren mikroemülsiyonun hazırlandığı çalışmada ise, mikroemülsiyonun bulanıklık, damlacık büyüklüğü gibi özellikleri araştırılmıştır[76]. Mikroemülsiyon (s/y) damlacıkları içinde nanopartikül boyutunda kitozan/heparin kompleksi oluşmuştur. Sonuçta, heparinin oral uygulaması için mikroemülsiyonla oluşturulan heparin-kitozan kompleksinin kullanılabileceği belirtilmiştir.

B.5.1.3. Lipozom Tipi Formülasyon

Heparinin lipozom şeklindeki preparatlarının hazırlanması, gastrointestinal kanalda heparinin parçalanmasını önlemeye yönelik olmuştur. Lipozomun yüzey yükü emilimde önemli bir etkendir. Ueno ve arkadaşlarının[77] yaptığı çalışmada, negatif ve pozitif yüklü heparin lipozomları hazırlanmış ve oral yoldan uygulanmıştır. Pozitif yüklü lipozomlar, % 10 stearilamin ve % 90 fosfatidilkolin kullanılarak hazırlanmıştır ve gastrointestinal kanaldan en fazla heparin emilimini sağlayan bu grup olmuştur. Yüklü lipozomun absorbe olmadığı, fakat midede parçalandıktan sonra ya da barsak mukoza hücrelerinde intraselüler sindirime uğradıktan sonra venöz dolaşıma geçtiği belirtilmiştir. Sonuç olarak, lipozomla gastrointestinal parçalanmadan korunma sağlandığı ve pozitif yüklü lipitlerin gastrointestinal emilimi kolaylaştırdığı belirtilmiştir.

B.5.1.4. Partiküler Sistemler

Mikropartikül ve nanopartiküller ile oral heparin uygulamasına yönelik çalışmalarda çeşitli polimerler ve polimer kombinasyonları kullanılarak, bunların ilaç salımına etkileri incelenmiştir[78-80]. Bu çalışmalarda çok fazla miktarda heparin kullanmaksızın, oral yoldan istenilen etkiye ulaşılması ve polimerlerin yan etkilerinin olmaması avantaj olarak belirtilmiştir.

Jiao ve arkadaşlarının[81] yaptığı çalışmada, biyoparçalanabilir polimerler, poli-€-kaprolakton (PCL), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve pozitif yüklü biyoparçalanamaz polimerler, Eudragit® RS ve RL, tek başlarına veya kombinasyonları kullanılarak, çift emülsiyon ve solvan evaporasyon tekniğiyle nanopartiküller hazırlanmıştır. Eudragit® içeren formülasyonlarda ilaç yüklenme oranı artarken, in vitro salımın yavaşladığı gözlenmiştir. Araştırmacılar aynı polimerleri ve karışımlarını kullanarak hazırladıkları heparin yüklü nanopartikülleri oral yoldan tavşanlara uygulamıştır[61]. Heparin (600 $IU.kg^{-1}$) yüklü nanopartiküllerden oluşan tüm formülasyonlarla anti Xa aktivitesi ve aPTZ değeri artmıştır. Heparin içeren Eudragit® RL/PCL nanopartiküllerinin oral uygulanmasından yedi saat sonra, aPTZ düzeyinin iki kat arttığı ve mutlak biyoyararlanımın % 23 bulunduğu belirtilmiştir.

Araştırmacılar[79] aynı polimer ve polimer kombinasyonlarının yanısıra jelatin de kullanarak s/y/s emülsiyon ve evaporasyon yöntemiyle mikropartikül hazırlamıştır. Polimerlerin ve bazı yardımcı maddelerin, mikropartiküllerin özellikleri ile heparin yüklemesi ve salım üzerine etkileri incelenmiştir. Çeşitli polimerlerle, 80-130 μm olarak elde edilen ortalama çap, dış faza jelatin A eklenmesiyle artmıştır. İlaç yükleme oranı Eudragit® RS ve RL ile artarken (sırasıyla % 49 ve % 80), ilaç salımı azalmıştır (sırasıyla % 17 ve % 3.5).

Başka bir çalışmada PCL ve PLGA ile Eudragit® RS ve RL'nin tek başına veya kombinasyonları halinde kullanılmasıyla ve jelatinin de eklenmesiyle hazırlanan mikropartiküllerde in vivo deneyler yapılmıştır. Jelatinli formülasyonlarda salımın hızlı olduğu, Eudragit® içeren PLGA mikroküreleri nde antikoagülan etkinin 4-10 saate kadar uzadığı ve aPTZ değerinin de iki kat arttığı gözlenmiştir[80].

B.5.1.5. Ko-matris Sistem

Bir grup araştırmacı farklı polimerler kullanarak heparinle ve aspirinle sinerjik etki sağlamak üzere ko-matris sistem hazırlamıştır[82]. Çalışmada aspirin yüklenmiş kitozan mikroküreleri, heparin sodyum içeren polietilen vinil asetat

(PEVAc) tabakaya dökülmüş, tamamen kurutularak ko-matris sistem hazırlanmış ve polisitiren butadien ile kaplanmıştır. İlaç salımı, platelet adezyonu ve tromboplastin zamanı ölçümleri, aspirin ve heparinin sinerjik etki gösterdiği bu formülasyonun etkili olduğunu kanıtlamıştır.

Aynı grup, diğer çalışmalarında aspirin-heparin komatris sisteminin kalp kapakçıklarının takılmasından sonra gözlenen perikardial kalsifikasyonu önlemede etkili olup olmadığını araştırmışlardır[83]. Sonuçta aspirin-heparin kompleksinin antitrombotik etkisinin yanında perikardial kalsifikasyonu önlemede de başarılı olduğu belirtilmiştir.

B.5.2. DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİNİN ORAL FORMÜLASYONLARI

Son yıllardaki çalışmalarda, genellikle DMAH tercih edilmektedir. Bunun nedeni, DMAH'in eliminasyon yarılanma ömrünün heparinden daha uzun olması, biyoyararlanımının daha yüksek olması ve kanama riskinin daha az olmasıdır. Dolayısıyla hastanın sürekli kontrol altında tutulma zorunluluğu ortadan kalkmaktadır. Ayrıca, molekül ağırlığının küçük olması emilim açısından avantajlıdır. Değişik ilaç şekillerinin uygulanmasına yönelik olarak yapılan çalışmalara örnekler aşağıda verilmiştir.

B.5.2.1. Çözelti Tipi Formülasyon

B.5.2.1.1. Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin ile Çözelti

DMAH çözeltileri oral yoldan 0, 0.25, 0.1, 0.8, 1.7, 3.3, 7.5, 15 $mg.kg^{-1}$ dozlarda sıçanlara verilmiş ve 0.1 $mg.kg^{-1}$ doz ile trombozda % 50 azalma gözlenmiştir[84]. Uygulanan doz 15 $mg.kg^{-1}$ olduğunda tromboz % 80'den % 16'ya düşmüştür. Endotel heparin seviyesi plazmadan 1000 kat daha fazla bulunmuştur. Bu çalışmada, DMAH ile fraksiyonlanmamış heparin karşılaştırılmış ve DMAH'in daha düşük dozda etkili olduğu belirlenmiştir .

B.5.2.1.2. Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin Kompleksi ile Çözelti

DMAH (6 kDa) ile DOCA kullanılarak hazırlanan 100 $mg.kg^{-1}$ DMAH-DOCA kompleksi oral yoldan çözelti şeklinde uygulanmıştır[85]. DMAH-DOCA kompleksiyle, gastrointestinal duvarın yapısı değişmeksizin, etkili heparin kan konsantrasyonuna oral yoldan ulaşılabileceği belirtilmiştir.

Diğer bir çalışmada DMAH (4.5 kDa) ile farklı oranlarda DOCA'nın yeraldığı üç tip DMAH-DOCA konjugatı hazırlanmıştır ve dimetil sülfoksit (DMSO) de eklenerek oral biyoyararlanımın artırılması hedeflenmiştir. %10 DMSO varlığında biyoyararlanımın %17.6 oranında artırılması başarılmıştır ve intestinal dokuda hasar gözlenmemiştir[86].

B.5.2.1.3. Emilim Artırıcı İçeren Çözelti

DMAH (15 $mg.kg^{-1}$) ve emilim artırıcı SNAD (300 $mg.kg^{-1}$) içeren çözelti sıçanlara oral olarak uygulanmış ve trombus oluşumunda azalma gözlenmiştir. Anti Xa seviyesinin 30. dakikada 1 $IU.mL^{-1}$ olduğu gözlenmiş ve terapötik anti Xa plazma seviyesine ulaşıldığı kanıtlanmıştır[87].

DMAH'in, emilim artırıcı olarak yüzey etkin bir madde olan kaprilokaproil makrogolgliserit (Labrasol®) ile beraber uygulandığı çalışma, in situ olarak sıçanlarla yapılmıştır. DMAH (200 $IU.kg^{-1}$) ile 50 $mg.kg^{-1}$ Labrasol® birlikte uygulanmıştır. Duodenum, jejunum ve ileumdan DMAH'in emilimi gözlenmiştir. Labrasol®'un barsaktan emilimi artırdığı, bunun için en etkili bölgenin jejunum olduğu belirtilmiştir. Anti Xa seviyesi 160 dakika terapötik seviyede kalmış ve Labrasol®'un emilim artırıcı etkisi geri dönüşümlü olmuştur[88].

DMAH'in oral biyoyararlanımını artırmak amacıyla penetrasyon artırıcı olarak sodyum kaprat içeren çözeltileri sıçanlarda denenmiştir. DMAH (1200 IU/kg) ve 100 mg/kg sodyum kaprat ile bağıl biyoyararlanım % 27'lere çıkarken, plazma anti Xa ölçümleri terapötik seviyeye ulaşıldığını göstermiştir. Gastrointestinal duvarda herhangi bir hasar gözlenmemiştir[27].

B.5.2.1.4. Biyoadezif Polimerlerle Çözelti

Kitozanın poliamfolitik bir türevi olan Mono-N-karboksimetil kitozan (MKK) ile (% 3-% 5 a/h) çözeltileri hazırlanmış, DMAH eklenerek 7200 AntiXa $U.kg^{-1}$ dozda intradoudenal olarak sıçanlara uygulandığında DMAH'in barsaklardan geçişinin arttığı belirtilmiştir[89].

Başka bir çalışmada ise %1 Carbopol® 934P içeren çözeltiye DMAH eklenerek 10800 anti-Xa $U.kg^{-1}$ dozda sıçanlara, 5000 anti-Xa $U.kg^{-1}$ dozda domuzlara intradoudenal verilmiş ve emilimin arttığı gözlenmiştir. Sadece DMAH verildiğinde plazma anti Xa seviyeleri terapötik seviyenin altında iken Carbopol® 934P ile beraber DMAH verildiğinde anti Xa seviyesinde artış gözlenmiştir. Carbopol® 934P'nin interselüler "tight junction"ları etkileyerek paraselüler ilaç permeabilitesini artırdığı düşünülmüştür[90].

B.5.2.2. Süspansiyon Tipi Formülasyon

Yapılan bir çalışmada DMAH'in oral uygulanması amacıyla penetrasyon artırıcı olarak polikatyonik lipofilik-çekirdek dendronlar kullanılmıştır[91]. DMAH içeren (7500 IU/kg) formülasyonlar sıçanlara uygulanmış ve terminal lizin artığı içeren dendronlar terminal arjinin içerenlerden daha etkili bulunmuştur. Dendron-DMAH komplekslerinin sudaki çözünürlüğü zayıf olduğundan süspansiyon şeklinde verildiği, ancak yapılan çalışmalarla çözünürlüğün artırılabileceği belirtilmiştir.

B.5.2.3. Biozom Tipi Formülasyon

Bohlinder ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada[92] biozom olarak adlandırılan lipit matris sistemler kullanılarak hazırlanan DMAH formülasyonları tavşanlar üzerinde denenmiştir. Biozomlar soya yağı fosfotidil kolini ve orta zincirli monogliserollerden oluşturulmuş ve DMAH yüklenmiştir. DMAH (25 $mg.kg^{-1}$) içeren biozomlar tavşanlara oral olarak verilmiştir. Biyoyararlanım % 15.5±6.1 bulunmuştur.

B.5.2.4. Partiküler Sistemler

Heparin ve DMAH ile PEG-aljinat mikroküre hazırlanıp yüzeyi kitozan ve selüloz asetat ftalat ile kaplanmıştır. Kaplanmış mikrokürelerle kontrollü salım elde edilmiş ve mikrokürelerde in vitro olarak antikoagülan aktivite gözlenmiştir[93].

Hoffart ve arkadaşları[94] biyoparçalanabilir polimerler, PCL, PLGA ve pozitif yüklü biyoparçalanmaz polimerler, Eudragit® RS ve RL'yi tek başına veya kombinasyonları halinde kullanarak, DMAH nanopartikülleri hazırlamıştır. Nanopartiküllerin ortalama çapları 240-490 nm bulunmuştur. Eudragit® ile PCL ve PLGA'ya göre ilaç yükleme oranı artmıştır. Tüm formülasyonlarda in vitro olarak fosfat tamponunda DMAH'in salımı %10-25 iken, ortama esteraz eklenmesiyle 2-3 kat artmıştır.

DMAH mikropartiküllerinin hazırlandığı başka bir çalışmada PCL, PLGA ve Eudragit® RS ve RL tek başına veya kombinasyonları halinde kullanılmıştır. İlaç yükleme oranı % 16-47 dir[95]. Eudragit® içeren formülasyonlarda ilaç yükleme oranının artması, pozitif yüklü polimerle negatif yüklü DMAH'in etkileşmesi ile açıklanmıştır. Ancak in vitro salımın çok az olduğu, bunun da güçlü iyonik etkileşmeden kaynaklanabileceği belirtilmiştir. En fazla salım PLGA ile gözlenmiştir.

Araştırmacılar bir diğer çalışmalarında DMAH nanopartiküllerini PCL ve Eudragit® RS kullanarak hazırlamışlardır[96]. DMAH, 200 ve 600 anti Xa U/kg dozda tavşanlara oral yoldan verildiğinde mutlak biyoyararlanım sırasıyla % 59 ve % 51 bulunmuştur ve antikoagülan etkinin süresi sekiz saate kadar uzatılmıştır.

B.5.2.5. Tablet

Tiyollenmiş polikarbofil kullanılarak permeasyonu düzenleyici glutatyon içeren DMAH (279 IU) tabletleri basılmıştır. Tabletler Eudragit 100-55 L ile kaplanarak sıçanlara oral yoldan verilmiştir. Modifiye edilmiş polimerle biyoyararlanımın arttığı gözlenmiştir[97].

Diğer bir çalışmada ise, mukoadezif salım sistemi hazırlamak amacıyla farklı ortalama molekül ağırlığına sahip DMAH'lerin minitabletleri hazırlanmıştır. Minitabletler tiyollenmiş polikarbofil ve karşılaştırma için kontrol olarak hidroksietil selüloz kullanarak hazırlanmıştır[98]. DMAH'in SC verilerek bağıl biyoyararlanım hesaplarının da yapıldığı çalışmada sıçanlar kullanılmıştır. DMAH (3 kDa) 279 IU dozda verildiğinde bağıl biyoyararlanım %19.1 iken, kontrol % 8.1 bulunmuştur. DMAH (6 kDa) 300 IU dozda verildiğinde bağıl biyoyararlanım % 10.7 iken, kontrol % 2.1 bulunmuştur.

B.5.2.6. Kapsül

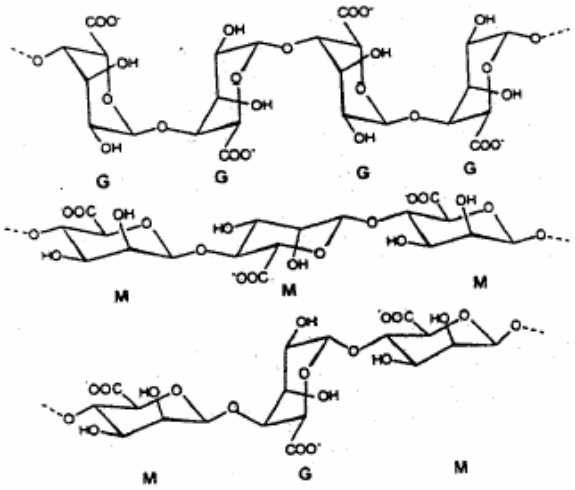
Andriuoli ve arkadaşları yaptıkları çalışmada[99], DMAH'in diamin tuzunu kapsüller içinde tavşanların doudenumlarına yerleştirmiştir. Emilimin artması ve plazma heparin düzeyinin, heparinin diamin tuzu kullanıldığında sodyum tuzuna göre belirgin seviyede yüksek olması, yeni yapının lipofilitesinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Böylece lipofilitesi artan yapının, biyolojik membrandan geçişinin arttığı belirtilmiştir.

B. 6. ALJİNATLAR

Aljinatlar kahverengi deniz yosunlarından elde edilen, suda çözünür, lineer yapıda polisakkaritlerdir[100,101]. İlk kez 1886 yılında Krefting'in saf olarak elde ettiği aljinik asitin yapısında D-mannuronik asitin olduğu 1930 yılında, Nelson ve Carter tarafından, mannuronik asit (M)ile birlikte guluronik asitin (G) varlığı ise, 1955 yılında Fischer ve Dörfel tarafından saptanmıştır[102]. Doğal, toksik olmayan, geçimli yapıdaki aljinatlar bu özelliklerinden dolayı farmasötik ve kozmetik alanda sıkça tercih edildikleri gibi, tıp (hemostatik, antiasit), diş hekimliği (dolgu), gıda (kıvam verici, stabilizatör, dispersiyon ajanı), tekstil ve kağıt (boyalarda), tarım (pestisitlerin denetimli salımı) alanlarında da tercih edilmektedirler[103,104].

Aljinatların yapılarında 1-4 α-L-guluronik (G) ve β-D-mannuronik asit (M) bulunur (Şekil 3)[105]. Aljinatlar yapısındaki G veya M ünitelerinin sahip olduğu

karboksilat grubu sayesinde, nötral veya bazik pH'larda negatif yüklü polielektrolitlerdir[106].



Şekil 3. Aljinat blok tipleri. G: Guluronik asit, M: Mannuronik asit[104].

Aljinatlardaki M ve G bloklarının kompozisyonu aljinik asitin elde edildiği kaynağın yetiştiği bölgeye, aljinik asit türüne, mevsim ve coğrafi bölgeye göre değişmektedir. Aljinatların viskoziteleri ve çok değerli katyonlarla birleşmek için seçicilik özelliği ise elde edildiği algin kaynağına ve yapısında yer alan mannuronik ve guluronik asitin birbirine oranına göre değişmektedir[104].

Aljinatların molekül ağırlıkları 12.000-190.000 arasında değişmektedir ve molekülün uzunluğu arttıkça viskozite artmaktadır (Tablo 1). Hazırlama yönteminin değiştirilmesiyle farklı molekül ağırlıklarına sahip aljinatlar elde edilmektedir[105,107].

Tablo1. Aljinatların viskozite ve molekül ağırlıklarına göre gruplandırılması

Düşük viskoziteli	(12.000-80.000)
Orta viskoziteli	(80.000-120.000)
Yüksek viskoziteli	(120.000-190.000)

Aljinik asit suda çözünmez, fakat amonyum ve alkali metal tuzları soğuk suda çözünerek viskoz çözelti oluşturur. Bu çözeltilerin akış özellikleri fiziksel ve kimyasal değişkenlere bağlıdır. Bu değişkenler ve etkileri şu şekilde özetlenebilir[103]:

1- Fiziksel değişkenler:

a) Sıcaklık: Sıcaklık arttıkça aljinat çözeltilerinin viskoziteleri azalır.

b) Kayma gerilimi: Seyreltik aljinat çözeltileri ve düşük molekül ağırlıklı aljinat ile hazırlanan çözeltiler Newtonian akış gösterir fakat yüksek molekül ağırlıklı aljinat ile hazırlanan çözeltiler düşük konsantrasyonda bile Non-newtoinan akış gösterir[108].

c) Molekül ağırlığı:Aljinat molekülünün ağırlığının artmasıyla viskozite artar.

d) Konsantrasyon: Çözeltideki aljinat konsantrasyonu arttıkça viskozluk artar.

e) Su ile karışan çözücülerin (alkol, glikoller, aseton vb) ilavesi: Aljinat çözeltilerine artan miktarlarda su ilavesi aljinat çözeltilerinin viskozitesinde artışa ve sonuçta çökmeye neden olur.

2- Kimyasal değişkenler:

a) pH'nın etkisi: Alkali pH aljinat çözeltilerinin viskozitesini düşürmektedir.

b) Yardımcı maddelerin ilavesi: Aljinat çözeltilerine koruyucu amaçla ilave edilen yardımcı maddeler (sodyum hekzametafosfat vb) viskoziteyi düşürür.

c) Tek değerli tuzların etkisi: Aljinat çözeltilerine tek değerli tuzların (örn. NaCl) ilavesi viskoziteyi artırmakta veya düşürmektedir. Seyreltik aljinat çözeltisine NaCl ilavesi sonucu viskozite düşmektedir[108]. Eklenen tuz konsantrasyonunun artması ile çökme başlamakta ve viskozite artmaktadır. Ancak bu tuzların etkisinin, aljinat kaynağına,

konsantrasyonuna, polimerizasyon derecesine ve kullanılan tek değerli tuzun tipine göre değiştiği bildirilmektedir

d) Çok değerli katyonların etkisi: Çok değerli katyonlar (Mg^{++} hariç) aljinatlar ile iyon değişimi yaparak reaksiyona girerler. Aljinat çözeltisine katılan çok değerli katyon konsantrasyonu arttıkça kalınlaşma, jelleşme ve sonuçta çökme olayı görülmektedir.
e) Katerner amonyum bileşikleri: Sodyum aljinat gibi anyonik polimerler katyonik amonyum bileşikleri ile çözünmeyen bir yapı oluştururlar. Bu reaksiyon iki mekanizma ile önlenir:
    a. pH, katyonik bileşiğin reaksiyona giremeyeceği seviyeye düşürülür.
    b. Katyonik bileşiğin etkisini baskılayacak elektrolit tuz (NaCl) eklenir.

Piyasada aljinik asit ve aljinik asitin çeşitli tuzlarla muamelesi sonucu Na-aljinat, Ca-aljinat, K-aljinat, Mg-aljinat, NH_4-aljinat ve propilenglikol aljinat türevleri bulunur. Bunlardan sodyum ve kalsiyum aljinat toksik olmayıp, biyogeçimli, biyoparçalanabilir ve biyoadezif özellikte olmalarından dolayı farmasötik, kozmetik ve gıda endüstrisinde sıkça kullanılmaktadır[100].

Aljinatlar pH'ya bağımlı davranış gösterirler. Mide sıvısında hidrate olan sodyum aljinat çözünmez hale gelir, ancak intestinal bölgenin yüksek pH'sına geçince çözünür viskoz tabakaya dönüşür[109].

Aljinik asit dispersiyonları mikroorganizma üremesi sonucu bozunur ve viskozite azalır. Bozunmayı önlemek için dispersiyona benzoik asit, potasyum sorbat, sodyum benzoat, sorbik asit veya parabenler % 0.1-0.2 oranında eklenebilir[105]. Aljinik asit gibi polisakkaritlerin serbest asit şekillerinin stabilitesi çok düşüktür, buna karşılık aljinik asit tuzları daha stabildir. Sodyum aljinatın en stabil olduğu aralık pH 4-8'dir[107]. Polimerizasyon derecesi 500 olan sodyum aljinatın 10-20°C'de 3 yıl bozunmadan kaldığı bilinmektedir. Yüksek polimerizasyon derecesine

(600-1000) sahip sodyum aljinatın ise bozunduğu özellikle yüksek sıcaklıklarda (50ºC) ve nem varlığında depolimerizasyon hızının arttığı gözlenmiştir[103]. Aljinatların biyolojik olarak parçalandığı ve hiçbir ortamda birikmediği bilinmektedir[104].

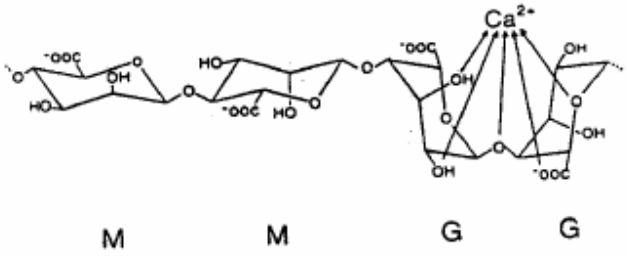
B. 7. ALJİNATLARIN ÇOK DEĞERLİKLİ KATYONLARLA REAKSİYONU VE JEL OLUŞUMU

Aljinatların en önemli özellikleri Ca^{2+} gibi divalan katyonlarla jel oluşturmalarıdır. Monovalan metal iyonları aljinatla çözünür tuz oluştururken, divalan veya multivalan katyonlarla (Mg^{2+} hariç) jel veya çökelek oluştururlar[104]. Tercih edilen etkin maddeyi içeren sodyum aljinat çözeltisi Ca^{2+}, Sr^{2+},Ba^{2+} gibi divalan çapraz bağlayıcı içeren çözeltiye damlatılır[110]. Jel oluşturmak için kullanılan aljinat konsantrasyonu % 0.5-2 arasında değişir. Çok değerli katyon tuzu ile aljinat arasında aşağıda verilen reaksiyon gelişir ve sonuçta viskozite artar, jel oluşumu ve çökme gözlenir.

$$2Na.Alg + MCl_2 \rightarrow M.Alg_2 + 2NaCl$$

M: İki değerlikli katyon

Sodyum aljinat çözeltisine kalsiyum iyonları ilave edildiğinde, kalsiyum iyonları aljinat çözeltisindeki karboksil ve hidroksil gruplarına bağlanarak “egg-box” (Şekil 4) modeli oluşturmaktadır[111].



Şekil 4. Aljinat ile kalsiyumun etkileşimi[104]

Jel oluşumunda çeşitli iyonların aljinata afinitesi farklılık gösterir: Pb>Cd> Ba>Sr>Ca>Co,Ni,Zn>Mn[110]. Yüksek oranda G içeren aljinatlarda M içeriği zengin olanlara göre bağlanma ve jel oluşumu daha güçlüdür[104]. Bunun sebebi guluronik asitin yapısındaki karboksil ve hidroksil gruplarının arasındaki mesafenin mannuronik asite göre daha kısa olmasıdır. Dolayısıyla guluronik asit ile kalsiyum arasında daha güçlü bir bağlanma gerçekleşir. Aljinat ile kalsiyum arasındaki reaksiyon oda sıcaklığında veya soğukta olabilir. Yüksek sıcaklıklarda ise jel oluşumu daha yavaş gerçekleşir[106]. Jel oluşumunda kalsiyum miktarı da önemlidir, düşük kalsiyum oranıyla geçici birleşme olur, yüksek viskozitede tiksotropik çözelti elde edilir. Yüksek kalsiyum seviyesi ile jel oluşumu veya çökme oluşur, bağlanma kalıcıdır[109].

Yüksek polimerizasyon derecesine sahip aljinatlar, daha az miktarda kalsiyum ile reaksiyona girerken, düşük polimerizasyon dereceli aljinatlar daha çok miktarda kalsiyum ile reaksiyona girerler[103].

Aljinat boncuklar guluronik asitçe zengin olduğunda ve yüksek konsantrasyonda kullanıldığında ilaçların salımını geciktirmede çok etkilidir. Guluronik asit içeriği, yüksek oranda kalsiyum tutulmasını sağlar ve böylece şişmeye ve erozyona daha az eğilimli katı jeller oluşur. Mannuronik asit içeriğini artırmak jelin daha yumuşak ve elastik olmasını sağlar, fakat bu jeller daha az poröz yapıdadır ve daha kolay çözünür. Bu durum aljinatla güçlü bağ oluşturan moleküllerde farklı olabilir[111].

Oluşan jel yapıyı kuvvetlendirmek için formülasyona kitozan, pektin, etilselüloz, Eudragit® gibi farklı iyonik yapıda polimerler ilave edilebilir. Kitozanın amin grubu, guluronik asit bloklarının boşluklarına girer, polianyonik-polikatyonik kompleks oluşur. Kompleks oluşumu ile boncukların porozitesi azalır, suda fazla çözünen ilaçların verilmesinde daha uygun hale gelir[109].

B.8. ALJİNİK ASİT VE TUZLARININ UYGULAMA ALANLARI

B.8.1. ALJİNİK ASİT VE TUZLARININ SAĞLIK ALANINDA KULLANIMI

B.8.1.1. Eczacılıkta Kullanımı

Aljinik asit ve tuzları doğal, biyogeçimli ve biyoparçalanabilir oldukları aynı zamanda toksik olmadıklarından dolayı farmasötik ve kozmetik alanda çok tercih edilirler. Kullanımları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1. Süspansiyon ajanı ve inceltici olarak çeşitli pat, krem ve jellerde[105,107]
2. Stabilize edici ajan olarak y/s emülsiyonlarında[105,100]
3. Dağıtıcı ve bağlayıcı olarak tablet ve kapsül formülasyonlarında[105, 107,100]
4. Viskozite artırıcı ajan olarak çözeltilerde[105,107]
5. Salımın denetlenmesi veya geciktirilmesi amacıyla kontrollü salım yapan sistemlerde[101,107,112]
6. İlaçların mikroenkapsülasyonunda[107]
7. Nanopartikül ve boncuk şeklinde formülasyon hazırlamada [101,107]
8. Film ve jel oluşturmada[101]
9. Adezif hidrojellerin hazırlanmasında[107]
10. Mukozal adezif tabletlerin hazırlanmasında[107]
11. Oftalmik çözeltilerde[107]
12. Düşük moleküllü aljinatlar çözünürlüğü ve çözünme hızını artırıcı olarak [103,113]

13. Terapötik amaçla mide ekşimesinde ve gastroözofagal reflünün tedavisinde antiasitlerle, ya da H_2- reseptör antagonistleri ile kombine olarak[100,107].

Aljinatlar eczacılık teknolojisinde oral, rektal, parenteral, transdermal, oftalmik ve lokal olarak kullanılan çeşitli formülasyonlarda yer alırlar. İyonik etkileşimlerle mikropartiküler sistemler veya jel yapılar oluşturmaları aljinatlar için geniş kullanım alanı sağlar. Son yıllarda ise mikropartiküler sistemlerin yanı sıra özellikle gastrointestinal hastalıkların tedavisinde yardımcı olarak ve/veya bu amaçla kullanılan etkin maddelerin taşınmasında veya kontrollü salımında rol almaktadırlar.

B.8.1.1.1. Aljinatların kullanıldığı çeşitli farmasötik dozaj şekilleri ile yapılmış çalışmalar:

B.8.1.1.1.1. Çözelti

Teofilin, sürekli etkili elde etmek için % 1-2 sodyum aljinat çözeltisi ile oral yoldan sıçanlara uygulanmıştır. Formülasyon kompleks halde Ca^{++} içermektedir. Oral uygulamayı takiben in-situ jel oluşumu gözlenmiştir. Sıvı formülasyonda kompleks haldeki Ca^{++} midedeki asit ortamda açığa çıkarak aljinatla birleşmiştir, güçlü jel oluşumu gözlenmiştir. Ca^{++} yokken jel oluşumu zayıftır, ilaç salımında kullanılmaya uygun yapıda değildir, sürekli etkili profil gözlenmemiştir[114].

B.8.1.1.1.2. Süspansiyon

Özofagusun kaplanarak gastrik reflüye karşı korunmasının amaçlandığı çalışmada % 40 (a/a) sodyum aljinat içeren süspansiyon formülasyonları hazırlanmıştır[115]. Aljinat süspansiyon içildiğinde şişmesi, mukozaya tutunması ve adezif bir tabaka şeklinde özafagusu kaplaması hedeflenmiştir. Sonuçta özafagusun alt bölümünde tutulmanın daha yüksek olduğu ve sistemin

gastrointestinal reflü vb durumlarda özafagusu korumak için veya etkin madde yüklenerek ilaç salım sistemi olarak da kullanılabileceği belirtilmiştir.

Batchelor ve arkadaşları[116] özafagus kanseri veya gastroözafagal reflu vb durumların tadavisinde özafagusa lokal ilaç uygulamalarında kullanılmak üzere aljinat içeren süspansiyon hazırlamıştır. Sadece suyla hazırlanmış süspansiyon ve aljinat içeren süspansiyon karşılaştırılmıştır. Aljinat içeren süspansiyonda 30 dakikanın üzerinde özafagusa adezyon gözlenmiştir.

B.8.1.1.1.3. Tablet

Matris tabletlerde ilaç salımını modifiye etmek amacıyla 17 farklı tipte sodyum aljinatın kullanıldığı çalışmada salıma etki eden faktörler incelenmiştir[117]. Aljinatlarda yüksek viskozitenin salım hızını yavaşlattığı fakat asit fazdaki salım hızını artırdığı belirtilmiştir. Başlangıçta, aljinik asit jel bariyerin oluşumu dolayısıyla ani (burst) salımın gecikmesinde en önemli faktör partikül büyüklüğüdür. Ancak büyük partiküllü aljinatla çalışmak yerine aljinat konsantrasyonunu artırmanın daha etkili olacağı belirtilmiştir. İlaç salımını düzenlemede yüksek oranda M içeren aljinat, yüksek oranda G içeren aljinata göre daha avantajlı bulunmuştur. Sonuç olarak sodyum aljinat matris tabletle suda çözünürlüğü yüksek ilaçlarla bile salım sekiz saate kadar sürdürülebilmiştir.

Bir çalışmada sodyum aljinat ile teofilinin sürekli etkili tabletleri hazırlanmıştır. Formülasyonlara farklı konsantrasyonlarda jel oluşumu için $CaCl_2$ veya $AlCl_3$ eklenmiştir; ayrıca bazı formülasyonlara da salımı geciktirici amaçla hidroksipropil metil selüloz (HPMC K4M) ilave edilmiştir. Aljinat ile kalsiyum ve aluminyum çapraz bağ yaparak çözünmeyen jele dönüşür. Trivalan yapıdaki aluminyum divalan kalsiyuma göre daha çok aljinat molekülü bağlayabilmiştir. Bu nedenle aluminyum düşük konsantrasyonda bile hızla jel oluşumu sağlayarak çözünme ortamının tablete girmesini engellemiştir; sonuçta daha yavaş salım gözlenmiştir[118].

İkinci ve arkadaşları biyoadezif özellikteki karbomer (Carbopol®974P NF) veya sodyum aljinat ile farklı oranlarda HPMC kullanarak bukal biyoadezif nikotin

tabletleri hazırlamıştır[119]. Biyoadezif özellik, karbomer oranının artmasıyla artmış, sodyum aljinat artışından etkilenmemiştir. Karbomer:HPMC tabletlerde HPMC oranının artmasıyla etkin madde salımı artmıştır. Sodyum aljinat:HPMC tabletlerde ise HPMC oranının artmasıyla etkin madde salımı azalmıştır.

B.8.1.1.1.4. Kapsül

Veski ve Marvola[120] ibuprofen içeren ve denetimli salım yapan sert jelatin kapsüllerde sodyum aljinat kullanarak sıfır derece kinetik elde etmişlerdir. Yüksek viskoziteli sodyum aljinat kullanıldığında salım hızının düştüğü gözlenmiştir.

B.8.1.1.1.5. Boncuk ve Mikroboncuk/Mikroküre

Aljinat boncukları hazırlamada aljinat çözeltisinin çok değerlikli katyon çözeltisine damlatılması çok kullanılan bir yöntemdir. Boncuklar genellikle 1 mm'den büyüktürler ve aljinat çözeltisinin viskozitesi ve damlatıldığı ucun çapı arttıkça oluşan partikülün çapı da artar. Sodyum aljinat konsantrasyonu arttıkça boncuklar da daha küresel yapı alır, ancak konsantrasyon fazla artırıldığında çalışmak zorlaşmaktadır[111].

Aljinat boncuk ve mikropartiküler sistemler asit ortamda şişmez ve dağılmazlar; bu ortamda salım difüzyonla gerçekleşir. Barsak pH'sında sistem şişerek ilacı salmaya başlar sonra da erozyona uğrar[104,109,121]. Farklı çalışmalarda aljinat-jel boncuk ve mikropartiküler sistemlerin özelliklerine ve ilaç salımına etki eden faktörler incelenmiştir. Bunlar arasında aljinatın tipi ve aljinattaki guluronik/mannurik asit miktarı ve oranları[103,122], aljinatın konsantrasyonu[123], çapraz bağ yapıcı ajanın tipi ve konsantrasyonu[110,121,124], ilaç:polimer oranı[103,106] sertleştirme süresi, kurutma süresi ve şekli[125], boncuk büyüklüğü[126], çözünme ortamının pH'sı sayılabilir[103,106]

Takka ve Acartürk'ün yaptığı çalışmada[124] çapraz bağlanma ajanının türü ve konsantrasyonunun ilaç salım hızına etkisi incelenmiştir. Nikardipin HCl'in

kullanıldığı çalışmada, kalsiyum aljinat boncuklar etkin maddeyi Ba ve Sr aljinat boncuklara göre daha yavaş ve kontrollü salmıştır.

Acartürk ve Takka[125], etkin madde:aljinat oranı, $CaCl_2$ konsantrasyonu ve sertleştirme süresinin etkin maddenin salımına etkisini incelemişlerdir. Etkin madde: aljinat oranı ve $CaCl_2$ konsantrasyonunun artması etkin madde salımının artmasını sağlamıştır.

Whitehead ve arkadaşları tarafından[127] çözünmüş veya süspande olmuş halde amoksisilin içeren, yüzen aljinat boncuklar hazırlanmıştır. Sodyum aljinat çözeltisi (% 2), amoksisilin içeren % 2 $CaCl_2$ çözeltisine damlatılmıştır. Boncuklar süzülmüş ve dondurarak kurutulmuştur. Dolgu maddesi olarak kullanılan amiloz içeriğinin artmasıyla yükleme verimi ve enkapsülasyon azalmıştır.

Yenice ve arkadaşları[122] ise osteomiyelit tedavisinde kullanmak üzere biyoparçalanabilir implante teikoplanin yüklü aljinat boncuklar hazırlamıştır. Aljinat boncuklardan antibiyotik salımında aljinat tipi ve molekül ağırlığının etkili olduğu belirtilmiştir.

Arıca ve arkadaşları göğüs kanseri tedavisinde kullanmak üzere hazırladıkları 5-Florourasil taşıyan aljinat boncuklarda kullanılan aljinatın konsantrasyonunun artmasıyla salımın azaldığını gözlemiştir[123].

Başka bir çalışmada Arıca ve arkadaşları ibuprofen yüklü aljinat mikroküreleri, % 0.5 a/h sodyum karboksimetil selüloz (NaCMC) çözeltisinde farelere oral yoldan uygulamıştır[128]. Aljinat boncuklarda verim % 80-90, partikül boyutu 1.15±0.4-3.15±0.6 mm bulunmuştur. Aljinat konsantrasyonunun artmasıyla salım hızı azalmıştır. Partikül boyutunun küçülmesi daha hızlı ve daha yüksek oranda ilaç salımına neden olmuştur. İbuprofenin aljinat boncuk şeklinde uygulanması gastrik lezyonları önlemiştir.

Son yıllarda küçük boyutta aljinat partiküler sistemler hazırlamak üzere atomizasyon, koaservasyon ve emülsiyon oluşturma metodları kullanılmıştır[126,129-131]. Aljinat mikroboncuk/mikroküre oluşturmak için bu yöntemlerden en çok tercih

edilen ise ekztrüzyon aleti veya küçük delik (orifice) kullanarak atomizasyon veya püskürtme (spreyleme) metodudur.

Atomizasyon yöntemiyle aljinat mikroküre hazırlayan araştırmacılar, etkin madde içeren aljinat çözeltisini atomizer yardımıyla $CaCl_2$ çözeltisine püskürterek yaklaşık 15 µm çapında mikroküreler elde etmiştir[132].

Kim ve arkadaşları, % 1.2 sodyum aljinat çözeltisini % 2 $CaCl_2$ çözeltisine ultrasonik nozzle aracılığıyla püskürtmüştür. Oluşan mikrokürelerin stabilizasyonu amacıyla poli-L-lizin kullanılmıştır. Sonuçta 10 µm ve daha küçük çapta mikroküreler elde edilmiştir[129].

Bir çalışmada aljinat mikroküreler, etkin madde içeren aljinat çözeltisi, sürfaktan madde ve $CaCl_2$ kullanarak emülsiyon oluşturma yöntemiyle hazırlanmıştır. Bu yöntemle ortalama 8 µm çapında mikroküreler elde edilmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı aljinatla hazırlanan mikrokürelerden sığır serum albumininin salım hızının azaldığı gözlenmiştir[130].

Tu ve arkadaşları sprey-koagülasyon metodu ile aljinat mikroküre hazırlamıştır[126]. Suda çözünen ve çözünmeyen model maddeler kullanarak ajinat konsantrasyonu, $CaCl_2$ konsantrasyonu, guluronik/mannurik asit oranı gibi değişkenlerin yükleme ve salım karakteristiklerine etkileri araştırılmıştır. Sonuçta bu yöntemle por içeren aljinat mikropartiküller elde edilebileceği, ilacın absorbsiyon metoduyla yüklenebileceği ve bu mikropartiküllerin suda çözünürlüğü düşük ilaçların asit ortamda salımını geciktirmek için kullanılabileceği belirtilmiştir.

Çapraz bağlayıcı olarak gluteraldehitin de kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Sodyum aljinat gluteraldehit ile çapraz bağlanarak elde edilen boncuklar sefadroksilin kontrollü salımında kullanılmıştır. Bu çalışmada yüksek enkapsülasyon etkinliği elde edilmiştir[133].

Kompleks koaservasyon ise, aljinatla beraber kitozan, jelatin gibi karşıt yüklü polielektrolitler kullanılarak yapılmaktadır[134].

Yapılan bir çalışmada anyonik sodyum aljinat veya sodyum poliakrilat ile katyonik kitozan kullanılarak poliiyonik kompleks oluşturulmuştur[135]. Poliiyonik katı

kompleks oluşumu için aljinat ile kitozan kullanıldığında bağlanma oranı 1:1 bulunmuştur. Bağlanma oranının ortam pH'sına bağlı olduğu ancak kitozan-sodyum akrilat kullanıldığında pH'dan daha fazla etkilendiği belirtilmiştir.

Gürel, çalışmasında sodyum aljinat ile kitozan ve $CaCl_2$ arasında iyonik çapraz bağlanma sonucu aljinat-kitozan jel boncuklar hazırlamıştır[106]. Sığır serum albumininin kullandığı çalışmada aljinat-kitozan-sodyum taurokolat formülasyonu mide ortamında stabil kalıp, barsak ortamında proteini salmıştır.

B.8.1.1.1.6. Jel

Son yıllarda aljinat kullanarak yüzen jel veya sal (raft) şeklinde praparatlar hazırlanmaktadır. Amaç mide içeriğinin üzerinde fiziksel bariyer oluşturarak özafagus mukozası ve korozif gastrik sıvı arasında bariyer kurmaktır[136]. Salların kohezif, batmayan, hacimli, reflüye ve mide hareketliliğine dayanıklı olması istenir. Vücutta a) Gastrik sıvının etkisiyle çözünebilir aljinattan çözünmeyen aljinik asit jeline dönüşüm gerçekleşir b) Çözünür aljinat ile antasit tarafından salınan metal iyonları arasında etkileşim olur. Antasit varlığında kullanılan salın batmamasında, gastrik asitin rolüyle antasit bikarbonat tuzunun ürettiği karbondioksit etkili olur. Antasitin tipi, konsantrasyonu ve aljinata oranı, asit nötralize kapasitesi ve viskozite sal oluşumunu etkileyen faktörlerdir. Oluşan jelin dayanıklılığı aljinattaki guluronik asit blokları içeriğine ve aljinatın molekül ağırlığına bağlıdır. Yüksek orandaki guluronik asit blokları ve düşük molekül ağırlığı dolayısıyla düşük viskozite hızlı ve güçlü jel oluşumunu sağlar[137]. Bazı antasit preparatlar kullanılarak bu preparatların yararlılığı ve oluşan salın özellikleri in vitro olarak incelenmiştir. Güçlü sal oluşumları reflüye daha dayanıklı ve daha esnek bulunmuştur. Sal batmazlığı için farklı ürünlerde farklı değerler bulunmuştur, fakat salın batmazlığı ile ürünün formülasyonu veya karbondioksit miktarı arasında ilişki gözlenmemiştir.

B.8.1.1.1.7. Film

Ye ve arkadaşları[138] aljinat ve kitozan kullanarak basamak basamak tabaka sayısını artırarak çok tabakalı film hazırlamıştır. Tabaka sayısı arttıkça her basamakta tutulan indometazin miktarı azalmıştır ve indometazin salım süresi artmıştır. Sonuç olarak suda az çözünen etkin maddelerin kontrollü salım amacıyla bu yöntemin tercih edilebileceği belirtilmiştir.

B.8.1.1.1.8. Supozituvar

Aljinik asit kullanarak sürekli etkili morfin supozituvarının hazırlandığı çalışmada supozituvarlar oral morfin çözeltisi ile karşılaştırılmıştır. Supozituvarlar ile yüksek biyoyararlanım ve uzatılmış rektal absorbsiyon gözlenmiştir[139].

B.8.1.1.1.9. Lipozom

Takagi ve arkadaşları[140] ilaç salımını modifiye etmek ve stabilitesini artırmak amacıyla fosfolipidlerle hazırladıkları lipozomlarda, jel oluşturucu madde olarak aljinattan faydalanmışlardır.

Lipozomlarda etkin madde salımını geciktirici ve stabiliteyi artırıcı olarak başka araştırmacılar da aljinattan faydalanmışlardır[104].

B.8.1.1.1.10. Biyomoleküler taşıyıcı sistemler

Aljinatlar proteinler, DNA, ve hücreler gibi biyomoleküllerin uygulanmasında kullanılırlar. Ayrıca aljinatlarla kemoterapötikleri sc uygulamak amacıyla geliştirilmiş parenteral formülasyon çalışmaları mevcuttur[104]. Aljinatların biyogeçimliliği ve immunojenitesi M/G oranıyla tanımlanabilir. G içeriği yüksek olan aljinatların biyogeçimliliği M içeriği yüksek olanlara göre daha iyidir[111]. Aljinatların immunojenitesini etkileyen faktörler arasında ise boncukların şekli ve büyüklüğü, kompozisyonu, yumuşaklığı, membran viskozitesi sayılabilir[104]. Ca ile çapraz bağlı aljinata enkapsüle edilen proteinin biyolojik aktivitesi muhafaza edilebilir. Özellikle pozitif yüklü proteinler aljinattaki karboksilik asit gruplarına karşı Ca ile yarışmalı

olarak yüklenebilirler Aljinat matrise enkapsüle edilmiş proteinin salımında iki mekanizma etkilidir: 1. Polimer ağındaki porlardan proteinin difüzyonu, 2. polimerik ağın parçalanması (degradasyonu). Negatif yüklü proteinler aljinat matrisden daha çabuk salınırlar. Molekül ağırlığı ve α-L- guluronik asit içeriği düşük olan aljinatlarla protein salımı daha hızlıdır[109].

Yapılan bir çalışmada antijen salım sistemi olarak aljinat mikroküreleri kullanılabilirliği test edilmiştir. Model antijen olarak BSA seçilmiştir. Emülsiyon tekniğiyle ve $CaCl_2$ ile jelleşme sağlanarak, ortalama 8 µm çapında mikroküreler elde edilmiştir. Sonuçta mikroküreler antijen salım sistemi olarak başarılı bulunmuştur[130].

Aljinat mikropartikül aşı ile tavşanlarda bakteriyel bir patojene karşı immünizasyon oluşturulmuştur. Evcil tavşanlarda önemli bir patojen olan "pasteurella multocida'nın" ekstre edilmesiyle elde edilen tiyosiyanat (PTE) yüklenmiş mikropartiküllerin oral uygulanmasıyla başarılı sonuç elde edilmiştir[132].

Kim ve arkadaşları tarafından retrovirüs antijenleri yüklenmiş aljinat mikroküreler ile oral immünizasyonu takiben immün yanıtın indüklenmesi amaçlanmıştır[129]. Sonuçta aljinat mikroküreleri, oral immunizasyon amacıyla kullanımda iyi bir aday olduğu belirtilmiştir.

Hormon üreten hücrelerin implantasyonu için önemli potansiyele sahip görülen aljinatlarla bu amaçla yapılmış çalışmalar mevcuttur. Vücutta bulunan Langerhans hücrelerinin aljinatla kaplandığı ve birkaç hafta içinde kültürle çoğaltılabildiği ve glukoza cevap olarak insülin salgıladığı ve birkaç ay içinde hiperglisemiyi düzelttiği saptanmıştır[141].

B.8.1.2. Tıp Alanında Kullanımı

Aljinatlar implantlarda, yara iyileşmesinde[101,142,143] ve hemostatik etkisi nedeniyle cerrahi malzemelerde kullanılmaktadır[100]. Ayrıca kalsiyum aljinat kolay hazırlanabilmesi, elastik yapısı ve düşük maliyeti nedeniyle plastik cerrahide ölçü alma materyali olarak denenmiş ve başarılı sonuç alınmıştır[144].

B.8.1.3. Diş Hekimliğinde Kullanımı

Diş tedavisinda ölçü alma maddesi olarak potasyum aljinat ve trietanolamin aljinattan yararlanılmaktadır[145,146].

B.8.2.ALJİNİK ASİT VE TUZLARININ DİĞER ALANLARDA KULLANIMI

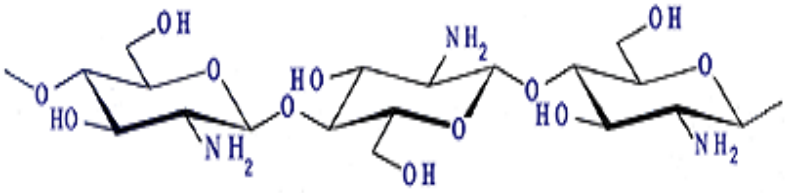
Gıda sanayiinde kıvam verici, stabilizatör, dispersiyon ajanı olarak, dondurma, reçel, marmelat, peynir, margarin, puding gibi birçok ürünün içeriğine girmektedir[101,104].

Tekstil ve kağıt sanayiinde boyaların akış özelliklerini ayarlamak amacıyla kullanılır[147].

Tarım alanında pestisitlerin denetimli salımı için kullanılmaktadırlar[101,109].

B. 9. KİTOZAN

Kitozan [(1-4)-2-amino-2-deoksi-β-d-glukon] yapısında olup (Şekil 5), molekül ağırlığı 10000-1000000 Dalton arasında değişir. Kitozan yengeç, karides ve istakozdan elde edilir[109].



Şekil 5. Kitozanın yapısı (Poli(1, 4-2-armino -2-deoksi-β-D-glukozamin)

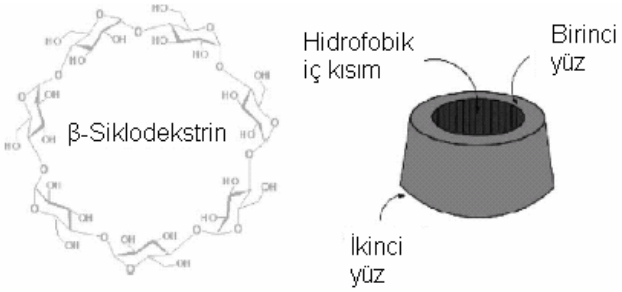
Kitozan doğal, biyogeçimli ve biyoparçalanabilir bir polimer olduğundan farmasötik ve tıbbi amaçlı olarak çok sık kullanılır. Hidrofilik özellikte katyonik bir polimer olan kitozan kuvvetli ve zayıf asit çözeltilerinde çözünür, suda çözünmez[148,149]. Kitozan pH 6.5'in altında pozitif yüklüdür ve polianyonlar ile jel oluşturur. Toksisitesi çok düşüktür[150].

Kitozan, kitozan klorür, kitozan glutamat, N-trimetil kitozan, Mono-N-karboksimetil kitozan şeklinde birçok formülasyonda yer alır[151-154]. Kitozanın kullanımı genel olarak aşağıdaki gibidir:

1. Eczacılıkta,
    a. Güç çözünen etkin maddelerin çözünürlüğünü ve çözünme hızını artırmada[155-157]
    b. Jel tipi preparatların hazırlanmasında[158-160]
    c. Film şeklindeki formülasyonlarda[159,161]
    d. Denetimli salım yapan tablet, mikroküre, mikrokapsül vb ilaç şekillerinin hazırlanmasında [158,162-169]
    e. Absorbsiyon artırıcı ve enzim inhibitörü olarak[170-173]
    f. Biyoteknolojide aşıların uygulanmasında ve enzimleri ve canlı hücreleri kaplamada[174-182]
2. Diş hekimliğinde biyoadezif materyal olarak[148, 183]
3. Tıpta biyomedikal uygulamalarda[150, 184, 185].
4. Veteriner ilaçlarda[186]

B. 10. SİKLODEKSTRİN

Siklodekstrinler (CD), nişastadan siklodekstrin glukanotransferaz enzimi ile intermoleküler transglukozilasyon reaksiyonu sonucu elde edilirler. Halkasal yapıdadırlar, iç yüz hidrofobik, dış yüz hidrofilik yapıdadır (Şekil 6)[187].



Şekil 6. Siklodekstrinin yapısı[187]

CD'nin etkinliği ve güvenilirliği kullanılan CD tipine ve konsantrasyonuna bağlıdır, kullanıldığı dozaj şekli de önemlidir[188,189].

CD'ler eczacılığın yanısıra kozmetikte ve kişisel bakım ürünlerinde, yiyeceklerde ve baharatlarda, kimya endüstrisinde, ziraatte, yapıştırma ve kaplamada geniş kullanım alanına sahiptir[187].

CD'ler eczacılıkta oral[190,191], nazal[192-194], pulmoner[195], oftalmik[196], rektal[197,198], vajinal[197], transdermal[198-200] preparatlarda yer alırlar. CD'lerin bu formülasyonlarda kullanımları ise aşağıdaki amaçlarladır:

1. Çözünürlüğü düşük olan ilaçların çözünürlüğünü artırarak biyoyararlanımı artırmak [201-207]
2. İlaçların stabilitesini artırmak[208-210]
3. İlacın yan etkileri ve toksisitesini azaltmak[190, 211]
4. Absorbsiyon artırıcı olarak[194,195,212]
5. Denetimli salım sistemlerinde[211-214]
6. Tat ve koku maskelemek için[187, 191]

B. 11. FAKTÖRİYEL TASARIM

Faktöriyel tasarım pahalı araştırma giderlerini azaltmak, araştırmalarda zaman ve emek tasarrufu sağlamak amacıyla istenen sonuçlara ulaşmak için yeterli en az deney yapma ilkesine dayanan bir deney tasarım yöntemidir[215]. Faktöriyel denemelerde, birden çok etkenin değişik düzeyleri aynı anda incelenmekte, bir başka deyişle bir etkenin durumu, diğer etken ve etkenlerin değişik düzeylerinde ele alınabilmekte ve etkenler arasında etkileşim olup olmadığı ortaya çıkarılabilmektedir[216] Bu durumda faktöriyel denemelerin avantajları şöyle sıralanabilir[217]:

1. Tek etkenli deneylerden daha etkindir
2. Etkenlerin hesaplanmasında bütün veriler kullanılmaktadır

3. Etkenlerin etkileşimleri hakkında bazı bilgiler elde edilebilmektedir

Faktöriyel tasarımda etkenlerden ve düzeylerinden bahsedilir. Etken, bağımlı ya da yanıt değişkene etki edebilecek, kontrol edilebilen bağımsız değişkendir. Etken nitel veya nicel olabilir. Düzey kelimesi ise bir faktörün değişik miktar ve halleri için kullanılır.

Faktöriyel denemelerde, denemeye alınan değişik faktörlerin arasında etkileşim yoksa, bu faktörlerin etkileri bağımsızdır. Aksi halde etkilerin biribirine bağımlı oldukları kabul edilir. Faktöriyel bir denemede, denemeye alınan faktörler arasındaki etkileşimin önemli çıkması, aralarında etkileşim olan faktörlerin tek başlarına denemeye alınmaları halinde bunlar hakkında eksik bilgi sağlanacağını ifade etmektedir[103].

Faktöriyel tasarım eczacılık teknolojisinde birçok çalışmada; tabletler, mikropartiküler sistemler gibi çeşitli formülasyonlarda ve önformülasyon çalışmalarında yardımcı maddelerin ve eklenecek miktarlarının seçiminde ve stabilite çalışmalarında tercih edilmiştir[106, 134].

B. 11. 1. 2^n Faktöriyel Tasarım

İki düzeyli olmak üzere (n) sayıda değişken bulunmaktadır. Ön deneylerle uygun aralıklar seçildikten sonra faktöriyel tasarım uygulanır. 2^n sayıda deney yapmak gerektiğinden deney koşullarının özel işaretler ve sıralama ile verilmesi uygun olur. Bu işaretlemede (1) sembolü bütün değişkenlerin düşük değerde olduğunu, (ab) sembolü A ve B değişkenlerinin yüksek değerde olduğunu, varsa diğer değişkenlerin düşük değerde olduğunu gösterir. Tablolarda a, b, c değişkene ait temel etkiyi; ab, bc, ac ve abc değişkenler arasında iç etkileşim olup olmadığını gösterir. Ayrıca (+) değişkenin kombinasyonda yüksek değerde olduğunu, (-) ise düşük değerde olduğunu göstermektedir [215].

B.11. 2. 2^2 Faktöriyel Tasarım

Faktöriyel denemelerin en basiti olan bu denemelerde, her biri iki düzeyli olan iki etken denenmektedir[216].

Tablo 2. 2^2 Faktöriyel denemesinde etkilerin katsayıları

Deneme Kombinasyonları	Faktör A	Faktör B
(1)	-	-
a	+	-
b	-	+
ab	+	+

B.11.3. 2^3 Faktöriyel Tasarım

Üç faktörlü denemelerin en basitidir, her faktör 2'şer seviyede ele alınır. Sekiz kombinasyonu vardır. ab, ac ve bc kombinasyonları, birinci derece etkileşimi, abc kombinasyonu ise ikinci derece etkileşimi göstermektedir[217].

Tablo 3. 2^3 Faktöriyel denemesinde etkilerin katsayıları

Deneme Kombinasyonları	Faktör A	Faktör B	Faktör C
(1)	-	-	-
a	+	-	-
b	-	+	-
ab	+	+	-
c	-	-	+
ac	+	-	+
bc	-	+	+
abc	+	+	+

Kombinasyon tablosu hazırlanırken tasarımda kullanılan faktörler ve deney sonuçlarından faydalanılır. Tablodan hesaplanan faktöriyel etki toplamları varyans analiz tablosunda kullanılır. Kombinasyon tablosunda eğer faktöriyel etki tek sayıda faktörden meydana gelmiş (A ve ABC) gibi ve konu kombinasyonunda, kendisindeki faktörle müşterek tek sayıda faktör varsa, o konu kombinasyonu için işaret (+), geriye kalanlar için (-)'dir.

Faktöriyel etki çift sayıdan meydana gelmiş (AB, AC vb) ve konu kombinasyonunda, kendisindeki faktörle müşterek çift sayıda faktör var veya hiç yoksa, o kombinasyon için katsayının işareti (+), diğerleri için (-)'dir. Bu kurallara göre aşağıdaki tablo oluşturulur:

Tablo 4. 2^3 Faktöriyel deneme kombinasyonları

Faktöriyel	Konu Kombinasyonları							
Etki	-1	a	b	c	ab	ac	bc	abc
A	-	+	-	-	+	+	-	+
B	-	-	+	-	+	-	+	+
C	-	-	-	+	-	+	+	+
AB	+	-	-	+	+	-	-	+
AC	+	-	+	-	-	+	-	+
BC	+	+	-	-	-	-	+	+
ABC	-	+	+	+	-	-	-	+

Kombinasyon tablosunda hesaplanan faktöriyel etki toplamları varyans analizi tablosunda kullanılır. Faktöriyel tasarım, varyans analizi ile birleştirildiğinde çok daha etkin bir yöntem haline dönüşür[217]. Faktöriyel denemelerin istatistik analizlerinde, varyans analizi sonucu bulunan F değeri tablo F değeri ile karşılaştırılır ve yorum yapılır[216]. Faktöriyel denemede kullanılan faktörlerin deney sonucunda elde edilen cevaba göre polinomiyal denklemi bulunur. Faktörlerin cevap üzerindeki etkisi, bu polinomiyal denklem ile gösterilmektedir.

C. GEREÇ VE YÖNTEM

C.1. GEREÇ

C.1. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Aljinat (Protonal LF 120M ve 240D)	FMC Biopolymer, ABD
Anti Xa kit (STA-Rotachrom)	Diagnostica Stago, Fransa
Çapraz Bağlanmış Karboksimetilselüloz (Crosscarmellose®)	Tip B- NF, ABD
Dimetil-β-siklodekstrin	Cyclolab, ABD
Düşük molekül ağırlıklı heparin	Fluka, ABD
İzooktan	Merck, Almanya
Kalsiyum klorür (CaCl2.2H2O)	Merck, Almanya
Kitozan	Sigma, ABD
Kitozan klorür (Protosan® UPCL 213)	Novamatrix, Norveç
Kitozan glutamat (Protosan® UPG 213)	Novamatrix, Norveç
Mikrokristal selüloz (Avicel® PH 102)	FMC, ABD
N-Hekzan	Merck, Almanya
Sıvı parafin	Sigma, ABD
Tripolifosfat (TPP)	Sigma, ABD
Toluidin mavisi	Sigma, ABD
Tween 80	Sigma, ABD

C.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

AntiXa ölçüm cihazı	Diagnostica Stago, Fransa
Diferansiyel taramalı kalorimetri	DSC Q 100 TA Instruments, İngiltere
FT-IR cihazı	Thermo Nicolet – 6700, ABD
Homojenizatör	Heidolph, Almanya
Kan alma tüpleri	Grainer, % 3.2 sodium citrate, 2 mL,
Manyetik karıştırıcı	Snijders
Mekanik karıştırıcı	Stuart, Scientific, İngiltere
Otomatik pipetler	Eppendorff, Almanya
Partikül büyüklüğü ölçüm aleti	Laser-Diffraction Particle Sizer, Sympatec Gmbh, System-Partikel-Technik, Almanya
pH Metre	Schott CG 840, Almanya
Santrifüj	Jouan, MR1822, Fransa
Spektrofotometre	Beckman DU-600, ABD
Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	Joel JSM-6400 , Japonya
Termostatlı ısıtıcı	Heto, Almanya
Ultrasonik banyo	Bransonic,221, Almanya
Viskozimetre	Brookfield Digital Viscometer LVTD, ABD
Vorteks	Nüve, 110
X-Işını Kırınımı	Rigaku Miniflex, Japonya

C.2. YÖNTEM

C. 2.1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

C.2.1.1. Etkin Maddenin Erime Derecesinin Tayini

DMAH'in erime derecesi tayini Elektrotermal 9300 aleti ile yapıldı. Cihazın sıcaklığı yükseltilerek DMAH'in eridiği yada dekompoze olduğu sıcaklık kaydedildi*.

C.2.1.2. Etkin Maddenin Partikül Büyüklüğü

Partikül büyüklüğünü belirlemek için "Laser-Diffraction Particle Sizer" aleti kullanıldı. Bu alette saçılmadan gönderilen lazer ışığının toz partiküllerin yüzeyine çarptığında oluşan saçılımlar esas alınarak ölçüm yapılır[218].

C.2.1.3. Etkin Maddenin IR spektrumu

Etkin maddenin yaklaşık 1 mg'ı 200 mg potasyum bromür ile tekdüze olarak karıştırıldı. Toz karışım 1000 $kg.cm^{-2}$'lük basınç altında sıkıştırıldı ve elde edilen diskin FT-IR'de (Fourier Transform Infrared) spektrumu alındı*.

C.2.1.4. Etkin Maddenin Spektrumu

DMAH'in spektrofotometrede ölçümü için toluidin mavisi ile metakromatik esasa dayalı spektrofotometrik yöntem[32] seçilmiştir. Metakromazi, tayin edilecek madde ile boyanın (metakromatik madde) kompleks oluşturması sonucu boyanın absorbsiyonunun değişmesidir. Bu yöntemde, DMAH toluidin mavisi ile metakromazi göstermektedir ve kompleks oluşumu sonucu boyanın rengi açılmaktadır.

DMAH ve boya miktarı önemlidir, belli aralıkta çalışılması gerekmektedir (10 μg ile 70 μg arasında). Bu yöntemde –referans kaynakta[32] olduğu gibi-

*Erime derecesi tayini ve IR spektrumu deneyleri Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalında yapılmıştır. Sayın Dr. Ecz. Yasemin Akkoç'a teşekkür ederiz.

kalibrasyon ve miktar tayini ölçümlerinde kullanılan DMAH miktarı, konsantrasyon olarak değil, doğrudan miktar (μg) olarak verilmiştir.

Stok olarak % 0.025'lik DMAH çözeltisi ve kör olarak % 0.2 NaCl çözeltisi hazırlandı. Toluidin mavisi çözeltisinin hazırlanması için % 0.005 olacak derişimde toluidin mavisi, % 0.2 NaCl içeren 0.01 N HCl içinde çözüldü.

DMAH'nin UV spektrumunun alınması için, DMAH çözeltisinden 30μg, 50μg ve 70 μg DMAH içerecek şekilde tüplere konuldu. Çözeltiler toplam 0.5 mL olacak şekilde % 0.2'lik NaCl çözeltisi ile tamamlandı. Çözeltilerin üzerine 2.5 mL toluidin mavisi çözeltisi eklendi ve tüpler 30 sn vortekste çalkalandı. Tüplere 5 mL hekzan da eklenerek 30 sn daha çalkalandı. Sulu faz ayrılarak % 0.2'lik NaCl çözeltisi ile 3 kat seyreltildi ve 30 dk içinde spektrofotometrede okundu. DMAH eklenmeksizin aynı şartlarda hazırlanarak boyanın tek başına verdiği absorbans da ölçüldü.

DMAH'in UV spektrumu için 350-750 nm arasında 1 cm'lik kuvartz küvet kullanılarak, köre karşı spektrum taraması yapıldı ve λ_{maks} değeri saptandı.

C.2.2. Kullanılan Polimerler üzerinde Yapılan Çalışmalar

C.2.2.1. Aljinat ve Kitozanın Viskozite ve Akış Özelliklerinin İncelenmesi

Aljinatların sudaki % 1'lik, kitozanın asetik asit (% 2) çözeltisindeki %1'lik çözeltilerinin reogramları "Brookfield Digital Viscometer" kullanılarak oda sıcaklığında çizilmiştir.

C.2.3. DMAH ile Standart Doğrunun Hazırlanması

DMAH'in miktar tayini yöntemi olarak toluidin mavisi ile metakromatik esasa dayalı spektrofotometrik ölçüm yöntemi[32] seçilmiş ve bu yöntemle standart doğru hazırlanmıştır.

Bu amaçla stok olarak % 0.025'lik DMAH çözeltisi ve kör olarak % 0.2 NaCl çözeltisi hazırlandı. Toluidin mavisi çözeltisinin hazırlanması için % 0.005 olacak derişimde toluidin mavisi, % 0.2 NaCl içeren 0.01 N HCl içinde çözüldü.

Stok DMAH çözeltisinden, sonuçta 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 μg DMAH içerecek şekilde tüplere konuldu. Çözeltiler toplam 0.5 mL olacak şekilde % 0.2'lik NaCl çözeltisi ile tamamlandı. Çözeltilerin üzerine 2.5 mL toluidin mavisi çözeltisi eklendi ve tüpler 30 sn çalkalandı. Tüplere 5 mL hekzan da eklenerek 30 sn daha çalkalandı. Sulu faz ayrılarak % 0.2'lik NaCl çözeltisi ile 3 kat seyreltildi ve 30 dk içinde spektrofotometrede okundu. DMAH eklenmeksizin aynı şartlarda hazırlanan boyanın tek başına verdiği absorbans da ölçüldü. Tüm deneyler altışar kez tekrarlandı. Elde edilen deneysel bulgulardan doğru denklemini tanımlayan kalibrasyon parametrelerinin bulunmasında doğrusal regresyon kullanıldı. Bu amaçla SPSS 11.5 programı[219] kullanıldı.

C.2.4. Spektrofotometrik Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Validasyon belirli bir işlem sonrasında elde edilen ürün ya da denetim yönteminin doğru ve kesin bir şekilde sürekli olarak bekleneni gerçekleştirdiğinin kanıtlanmasıdır.

C.2.4.1. Doğrusallık

DMAH derişimleri ile absorbans değerlerinin belirli bir aralıkta orantılı olduğu regresyon yöntemi ile gösterildi. Deney bölüm C.2.3.'de anlatıldığı şekilde ve 6 paralel yapıldı. Kalibrasyon doğrusu denklemi hesaplandı, bulgular istatistiksel olarak değerlendirildi ve derişim ile absorbans arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu gösterildi.

C.2.4.2. Doğruluk ve Geri Elde

Doğruluk ve geri elde, saptanan değerin gerçek değere yakınlığıdır. Miktar tayini yönteminin doğruluğunu gösterir. Üç farklı miktarda (20, 40, 60 μg) DMAH içeren çözeltiler altışar kez hazırlanarak absorbansları ölçüldü ve sonuçları değerlendirildi. Yüzde geri eldeyi hesaplamak için standart denklem kullanıldı ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

C.2.4.3. Kesinlik

Kesinlik tekrarlanan analizlerin birbirine yakınlığının derecesini ifade eder. Aynı derişimde hazırlanan örneklerin ölçümü tekrarlanarak istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı.

Kesinlik bir analitik yöntemin tekrar edilebilirlik derecesinin de ölçüsüdür.

Tekrar edilebilirlik:

1. Gün içi tekrarlanabilirlik: Aynı gün içinde üç farklı stoktan hazırlanan yedi adet kalibrasyon örneği ölçüldü.
2. Günlerarası tekrarlanabilirlik: Üç gün içinde üç farklı stoktan hazırlanan yedi adet kalibrasyon örneği ölçüldü.

C.2.4.4. Seçicilik

Seçicilik analitik yöntemin sadece analiz edilen maddeye cevap vermesidir. Bu amaçla tüm önformülasyon ve formülasyonlarda kullanılan maddelerle, DMAH'in miktar tayini yönteminde dalga boyu taramaları sonucu maksimum pik verdiği dalga boyunda ve absorbans değerlerinde değişim olup olmadığı incelenmiştir.

C. 2.4.4.1. Kitozan-TPP Mikropartiküllerinde Seçicilik Çalışmaları

DMAH yüklenmemiş kitozan mikropartikül çözeltileri maksimum dalga boyu ve absorbans değerleri açısından incelendi. DMAH yüklenmemiş mikropartiküller pH 1.2'de (2 saat) ve ardından pH 6.8'de (1 saat) karıştırılarak bekletildi, örnekler alındı ve UV spektrumları tarandı.

C.2.4.4.2. Kitozan Tablet Formülasyonundaki Yardımcı Maddelerle Seçicilik Çalışmaları

DMAH ile kompleks oluşturarak miktar tayini ölçümünü sağlayan toluidine mavisinin, tablet içeriğine giren yardımcı maddelerle etkileşip etkileşmediği araştırılmıştır. Bu amaçla tablette bulunan oranlarda yardımcı maddelerin (kitozan, Avicel®, laktoz, Crosscarmellose®, magnezyum stearat) çözeltileri hazırlanarak maksimum dalga boyu taramaları yapıldı ve absorbans değerinde değişim olup olmadığı araştırıldı.

C.2.4.4.3. Aljinat Boncuklarda Seçicilik Çalışmaları

Aljinat boncuklarda DMAH tayini için toluidine mavisi ile aljinat boncuk arasında etkileşme olup olmadığı araştırıldı. DMAH yüklenmemiş boncuklar pH 1.2'de (2 saat) ve ardından pH 6.8'de (1 saat) karıştırılarak bekletildi, örnekler alındı ve UV spektrumları tarandı.

C.2.5. DMAH'nın Kitozanla Etkileşimini İnceleme Çalışmaları

Çalışmalarımız sırasında DMAH'in kitozanla etkileştiğine dair gözlemlerimiz olmuştur. Bu nedenle etkileşimin araştırılması için çalışmalar yapılmıştır.

C.2.5.1. DMAH-Kitozan Arasındaki Etkileşmenin UV spektrofotometresi ile incelenmesi

DMAH ile kitozan arasındaki etkileşmeyi incelemek için DMAH-Kitozan'ın (1:0.75) pH 1.2 ve pH 6.8'de çözeltileri hazırlanarak aynı derişimdeki sadece DMAH çözeltisi ile karşılaştırılmıştır. DMAH içeren çözelti ile DMAH ve kitozan içeren çözeltinin aynı spektrumu verip vermediği ayrıca maksimum absorbans verdiği dalga boyunun değişip değişmediği incelenmiştir.

C.2.5.2. DMAH-Kitozan arasındaki etkileşmenin IR spektrofotometresi ile incelenmesi

Kitozan-DMAH arasındaki etkileşmenin tesbit edilmesi ve incelenmesi amacıyla FT-IR spektrumları alındı. 1:1 ve 1:2 oranlarında DMAH-Kitozan fiziksel karışımları hazırlandı. % 1'lik kitozan çözeltisine (% 1'lik asetik asitteki ve 0.1 N HCl'deki) DMAH-Kitozan oranları 1:1 ve 1:2 olacak şekilde DMAH eklendi. Hazırlanan çözeltiler 5 dk manyetik karıştırıcıda karıştırıldı, oluşan kompleks oda sıcaklığında vakumlu desikatörde kurutuldu ve FT-IR spektrumları alınarak incelendi.

C.2.6. Formülasyon Çalışmaları

DMAH içeren oral uygulamaya yönelik kitozan mikropartikül, kitozan tablet, siklodekstrin çözelti ve aljinat boncuk formülasyonları hazırlandı. Bu

amaçla ilk olarak önformülasyon çalışmaları yapıldı. Önformülasyon çalışmalarında in vitro deneylerde olumsuz sonuç veren grupların formülasyon çalışmalarına geçilmedi.

C.2.6.1. Kitozan Mikropartikül Hazırlamak İçin Önformülasyon Çalışmaları

Etkin madde içermeyen, kitozan mikropartiküllerini hazırlamak için iki farklı yöntem ve farklı maddeler kullanıldı. Birinci yöntemde sertleştirici çözeltisi doğrudan karıştırılmakta olan kitozan çözeltisine damlatılırken, ikinci yöntemde önce kitozan çözeltisi ile emülsiyon oluşturulup üzerine sertleştirici çözeltisi eklenmiştir. Önformülasyon çalışmaları sonucunda optimum şartların belirlenip en iyi formülasyonun seçilmesi amacıyla deney parametreleri değiştirilerek denemeler yapıldı.

C.2.6.1.1. Doğrudan Sertleştirici İlavesiyle Kitozan Mikropartikülleri Hazırlama

Bu yöntemle kitozan mikropartikül hazırlamak için daha önce yapılmış birkaç yöntem, üzerinde değişiklikler yapılarak kullanılmıştır[220,221]. Mikropartikülleri hazırlamak için 4 mL tripolifosfat (TPP) çözeltisi , % 1'lik (h/h) asetik asit içinde hazırlanan 2 mL kitozan çözeltisine damla damla eklendi. Kullanılan kitozan ve TPP oranları Tablo 5'de gösterilmiştir. Manyetik karıştırıcıda 1000 rpm'de karıştırıldı. Mikropartiküller 10000g'de 30 dk santrifüj edildi. Dipteki tabaka ayrıldı ve 25°C'de kurutuldu. Çalışmada opak süspansiyon oluşturan formülasyonlar belirlendi. Aglomere olan veya berrak çözelti şeklinde kalan formülasyonlar seçilmedi.

Tablo 5. Doğrudan sertleştirici ilavesiyle hazırlanan kitozan mikropartikül formülasyonlarının kodları ve içerikleri.

Formülasyon	Kitozan Yüzdesi	TPP Yüzdesi
1	0.2	0.1
2	0.2	0.2
3	0.2	0.4
4	0.5	0.1
5	0.5	0.2
6	0.5	0.4
7	1	0.1
8	1	0.2
9	1	0.4

C.2.6.1.2. Emülsiyon Oluşturup Sertleştirici Bir Madde İlavesiyle Kitozan Mikropartikül Hazırlama

Bu amaçla yüzey etkin madde içeren dış faz (organik solvan veya yağlı madde) karıştırılarak üzerine iç faz (kitozan çözeltisi) ilave edildi. Emülsiyon oluşumu için bir süre karıştırmaya devam edildi. Daha sonra sertleştirici madde çözeltisi ilave edildi. Oluşan partiküller yıkanıp, kurutuldu. Bu amaçla hazırlanan yedi grup, kitozan mikropartikül formülasyonlarına (KFD) ait değişkenler Tablo 6'da gösterilmiştir.

İç faz olarak kitozan (2.5 mL, 10g, 20g) kullanıldı. Dış faz olarak izooktan (75 g), zeytinyağı (50 mL) ve sıvı parafin (25 mL, 50 mL) kullanıldı. Sertleştirici madde olarak 1M sodyum hidroksit (7.5 mL), sodyum sitrat (50 mL), % 25 gluteraldehit (1, 2 mL) ve sodyum tripolifosfat (10, 20, 50, 100 mL) kullanıldı. Emülsiyon oluşturulurken 700, 900, 1000, 1200, 1500, 6000 ve 8000 devirde denemeler yapıldı. Emülsiyon oluşturma süresi 5, 10, 15, 30 dk olarak seçildi. Sertleştirme farklı formülasyonlarda, 0.5, 1, 3, 4 saat süreyle yapıldı.

Emülgatör olarak Tween 80 (polioksietilen sorbitan monooleat) ve Span 85 (sorbitan trioleat) kullanıldı.

Emülsiyonun oluşması, emülsiyonun yapısı, partiküllerin şekli ve boyutu, yağlı fazı ayırabilme, mikropartikül verimi, kuru partiküllerin şekli açısından formülasyonlar incelenmiştir.

Tablo 6. Emülsiyon oluşturup sertleştirici bir madde ilavesiyle hazırlanan kitozan mikropartikül formülasyonlarında değişkenler ve oranları

	FORMÜLASYONLAR						
PARAMETRELER	**KFD 1**	**KFD 2**	**KFD 3**	**KFD 4**	**KFD 5**	**KFD 6**	**KFD 7**
İç faz (kitozan)	% 1 20 g	% 2 20 g	% 2 2.5 mL	% 2 2.5 mL	% 2 20 g	% 2 20 g	% 2 10 g
Dış faz	İzooktan 75 g	Sıvı parafin 50 mL	Zeytinyağ 50 mL	Zeytinyağ 50 mL	İzooktan 75 g	İzooktan 75 g	Sıvı parafin 25 mL
Yüzey etkin madde	Span 85 % 2	Tween 80 % 2	-	-	Span 85 % 2	Span 85 % 2	Tween 80 % 2
Sertleştirici madde	1 M NaoH 7.5 mL	Gluteraldehit (% 25 çözelti) 1, 2 mL	% 1 Na-Sitrat 50 mL	% 1 ve % 2 TPP 50 mL	%1 TPP 10, 20 mL	% 1 TPP 10, 20 mL	% 1 TPP 100 mL
Karıştırma hızı (rpm)	1000, 8000	700	700, 1000, 1200	700, 900, 1200	700, 1500, 8000	700, 1500, 6000, 8000	1200
Emülsiyon oluşturma süresi (dk)	10, 30	10	10	10	5, 30	5, 10, 30	15
Sertleştiriciyi ekleme aralıkları	2, 30 dk	30 dk	10 dk	10 dk	5, 30 dk	5, 10, 30 dk	15 dk
Sertleştirme süresi	30 dk, 4 saat	30 dk, 60 dk	3 saat	3 saat	10 dk, 3 saat	10 dk, 30dk, 3 saat	3 saat

C.2.6.1.2.1. Emülsiyon Yöntemiyle ve TPP Kullanarak Kitozan Mikropartikülleri Hazırlamada Optimum Şartların Belirlenmesi

Denenen mikropartikül formülasyonlarından en iyi sonucu veren KFD 7 grubu (sıvı parafin ve TPP kullanılarak hazırlanan) seçilerek üzerinde ayrıntılı çalışmalar yapıldı. Bu grupta dış faz olarak sıvı parafin kullanıldı. Yüzey etkin madde olarak Tween 80 dış faza eklendi. İç faz olarak % 1 asetik asit çözeltisi içinde kitozan hazırlandı. Bazı formülasyonlarda İç fazın dış faza eklenmesiyle emülsiyon oluşturuldu ve sertleştirici madde çözeltisi olarak tripolifosfat (TPP) çözeltisi eklendi. Kitozan mikropartikülleri incelendi. Formülasyonlara ait değişkenler Tablo 7'de gösterilmiştir. Toplam çalışma miktarı, sertleştici madde miktarı, emülsiyon oluşturma devri, emülsiyon oluşturma süresi, sertleştirme devri, sertleştirme süresi, yıkama çözeltisinin bileşenlerinin oranı ve yıkama miktarının etkilerini incelemek için 10 formülasyon hazırlandı.

Hazırlanan formülasyonlar emülsiyonun oluşması, emülsiyonun yapısı, partiküllerin şekli ve boyutu, yağlı fazı ayırabilme, mikropartikül verimi ve kuru partiküllerin şekli açısından değerlendirilerek en iyi formülasyon seçildi. DMAH içeren mikropartikül hazırlamak için K6 formülasyonu ile çalışmalara devam edildi.

Tablo 7. Emülsiyon yöntemiyle ve TPP kullanarak hazırlanan kitozan mikropartikül formülasyonlarının kodları ve içerikleri

	FORMÜLASYONLAR									
PARAMETRELER	**K1**	**K2**	**K3**	**K4**	**K5**	**K6**	**K7**	**K8**	**K9**	**K10**
İç faz (kitozan)	% 2 (10 g)	% 2 (10 g)	% 2 (10 g)	% 2 (20 g)	% 2 (10 g)	% 2 (20 g)	% 2 (20 g)	% 2 (20 g)	% 2 (20 g)	% 3 (20 g)
Dış faz (sıvı parafin)	25 mL	25 mL	25 mL	50 mL	25 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL
Yüzey etkin madde (Tween 80)	% 2	% 2	% 2	% 2	% 2	% 2	% 2	% 2	% 2	% 2
Sertleştici madde TPP (% 1 çözelti)	100 mL	100 mL	25 mL	50 mL	50 mL	50 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
Karıştırma Hızı (rpm)	1200	5000	5000	5000	1000	1200	1200	1200	1200	1200
Emülsiyon oluşturma süresi (dk)	15	10	10	10	15	10	10	10	10	10
Sertleştiriciyi ekleme aralıkları	15 dk (iki seferde)	15 dk (iki seferde)	Tek seferde eklendi	Tek seferde eklendi	Tek seferde damla damla	Tek seferde damla damla	Tek seferde damla damla	Tek seferde damla damla	Tek seferde damla damla	Tek seferde damla damla
Sertleştirme süresi	3 saat	30 dk	30 dk	30 dk	1 saat	1 saat	1 saat	1 saat	1 saat	1 saat
Yıkama	2 kez Aseton:su 50 :50, 10mL 1 kez su 20 mL	2 kez Aseton:su 50 :50, 10mL 1 kez su 20 mL	2 kez Aseton:su 50 :50, 10mL 1 kez su 20 mL	2 kez Aseton:su 50 :50, 10mL 1 kez su 20 mL	2 kez Aseton:su 50 :50, 10mL 1 kez su 20 mL	2 kez Aseton:su 50 :50, 20mL 1 kez su 20 mL	2 kez Aseton:su 50 :50, 20mL 1 kez su 20 mL	2 kez Aseton:su 80 :20, 20mL 1 kez su 20 mL	3 kez Aseton:su 60 :40, 30mL 1 kez su 50 mL	2 kez Aseton:su 60 :40, 30mL 1 kez su 50 mL

C.2.6.1.3. DMAH İçeren Kitozan Mikropartikül Hazırlamak İçin Çalışmalar

C.2.6.1.3.1. Hazırlama Sırasında DMAH'i Yükleme Çalışmaları

C.2.6.1.3.1.1. İç Faza DMAH Ekleme Denemeleri

İç faz olarak kullanılan kitozana doğrudan toz haldeki DMAH eklendiğinde bulanıklık ve agregat oluşumları gözlendiğinden DMAH çözeltisini düşük konsantrasyonlarda ekleyerek agregat oluşturmadan yüklenip yüklenemeyeceği araştırıldı. DMAH çözeltisinin (% 0.4) 1 mL'sinin % 2'lik, 10 g kitozan çözeltisine eklenmesiyle agregasyon gözlenmesi üzerine DMAH çözeltisini % 2'lik, 5 g kitozan çözeltisine damla damla ekleyerek DMAH yükleme kapasitesi titrasyonla hesaplandı: DMAH % 0.2, % 0.1, % 0.05 derişimlerde bulanıklık oluşana kadar kitozan çözeltisine eklendi.

C.2.6.1.3.1.2. Oluşan Emülsiyona Heparin Ekleme

Aşağıda şematik olarak verildiği üzere mikropartikül hazırlama yönteminde emülsiyon oluşumunu takiben etkin madde çözeltisi emülsiyona eklendi.

% 1 (h/h) Asetik asit içinde % 2 (a/h) Kitozan çözeltisi (10 g)
↓ damla damla ekle
% 2 Tween 80 (a/h) içeren 25 mL sıvı parafin çözeltisi
↓ karıştır
Oluşan emülsiyona 20 mg DMAH içeren 5 mL çözelti eklendi
↓ karıştır
TPP (% 1) eklendi (25 mL)
↓ karıştır
↓Santrifüj et (3000 rpm, 5 dk)
↓ süz
↓ yıka 2 kez 10 mL Aseton:su (1:1) ve 10 mL su ile
↓ kurut

Şema 1. DMAH içeren kitozan mikropartikül hazırlama (DMAH'in oluşan emülsiyona eklenmesi)

C.2.6.1.3.1.3. Sertleştirici Çözeltisine DMAH Ekleme

Aşağıda verilen mikropartikül hazırlama yönteminde emülsiyon oluşumunu takiben etkin madde içeren sertleştirici çözeltisi emülsiyona eklendi. Etkin madde ve sertleştirici çözeltisi miktarı değiştirilerek dört farklı deneme yapıldı (Tablo 8).

% 1 (h/h) Asetik asit içinde % 2 (a/h) Kitozan çözeltisi (10 g)
↓ damla damla eklendi.
% 2 Tween 80 (a/h) içeren 25 mL sıvı parafin çözeltisi
↓ karıştır
Oluşan emülsiyona DMAH içeren TPP (% 1) eklendi
↓ karıştır
↓Santrifüj et (3000 rpm, 5 dk)
↓ süz
↓ yıka (2 kez 10 mL Aseton:su (1:1) ve 10 mL su ile)
↓ kurut

Şema 2. DMAH içeren kitozan mikropartikül hazırlama (DMAH'in sertleştirici çözeltisine eklenmesi)

C.2.6.1.3.2. Hazırlanan Mikropartiküllere DMAH Yükleme Çalışmaları

50 mg kurutulmuş mikropartikül, 15 mg DMAH içeren 2 mL 0.1 M HCl (pH 1.2) çözeltisine eklendi. Bir saat düşük devirde manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Çözeltide başlangıçtaki DMAH miktarı ve yükleme işleminden sonra kalan DMAH miktarı ölçüldü. Yükleme oranı hesaplandı. Aynı işlem pH 6.8 'de ve pH 7.4'de tekrarlandı. Mikropartiküllerin bu üç ortamda da miktar tayinleri yapıldı.

Tablo 8. Sertleştirici çözeltisine DMAH ekleyerek DMAH yüklü kitozan mikropartikül hazırlama

	FORMÜLASYONLAR			
PARAMETRELER	**K-DMAH1**	**K-DMAH2**	**K-DMAH3**	**K-DMAH4**
İç faz (Kitozan)	% 2 (10 g)	% 2 (10 g)	% 2 (10 g)	% 2 (10 g)
Dış faz (Sıvı parafin)	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL
Yüzey etkin madde (Tween 80)	% 2	% 2	% 2	% 2
Sertleştici madde	% 1 TPP, 100 mL+ DMAH, 40mg	% 1 TPP, 100 mL+ DMAH, 40mg	% 1 TPP, 25 mL + DMAH, 20mg	% 1 TPP, 25 mL + DMAH, 5mg
Karıştırma hızı (rpm)	1200	5000	5000	5000
Emülsiyon oluşturma süresi (dk)	15	10	10	10
Sertleştiriciyi ekleme aralıkları	15 dk (iki seferde)	15 dk (iki seferde)	Tek seferde eklendi	Tek seferde eklendi
Sertleştirme süresi	3 saat	30 dk	30 dk	30 dk

C.2.6.2. Kitozan Tabletlerde Formülasyon Çalışmaları

C.2.6.2.1. Tablet Formülasyonları

Doğrudan basım yöntemiyle hazırlanan tabletlerde, doğrudan basım ajanı olarak Avicel PH 102, süper dağıtıcı ajan olarak Crosscarmellose, glidan ve lubrikan olarak magnezyum stearat kullanılmıştır.

Tablet formülasyonları DMAH:Kitozan oranı (1:0.65, 1:0.75, 1:1 ve 1:1.25) olacak şekilde aşağıda Tablo 9'da belirtilen içeriklerde 7 mm'lik zımba ile basılmıştır. Tabletler 32 mg DMAH (=4500 IU) içermektedir, bu doz ortalama 3 kg tavşana 1500 IU/kg DMAH verilecek şekilde seçilmiştir. Daha sonra seçilen F5 grubu ile 3000IU/kg (toplam 64 mg DMAH) ve 5000 IU/kg (toplam 107 mg DMAH) olacak şekilde tabletler de hazırlanmıştır.

Tablo 9 . Tablet formülasyonlarının kodları ve içerikleri

	F1 (DMAH:K 1:0.65)	F2 (DMAH:K 1:0.75)	F3 (DMAH:K 1:1)	F4 (DMAH:K 1:1.25)	F5 (DMAH:KK 1:0.75)
DMAH (mg)	32	32	32	32	32
Kitozan (mg)	20	24	32	40	-
Kitozan klorür (mg)	-	-	-	-	24
Laktoz	40	36	28	20	36
Avicel PH 102 (mg)	20	20	20	20	20
Crosscarmellose (mg)	7	7	7	7	7
Magnezyum stearat (mg)	1	1	1	1	1
Toplam (mg)	120	120	120	120	120

K: Kitozan, KK: Kitozan Klorür

C.2.6.2.2. Tabletlere Uygulanan Testler

C.2.6.2.2.1. Tabletlerin Çap ve Yüksekliği

Hazırlanan tabletlerin çap ve yükseklikleri mikrometre ile ölçülüp, standart sapmaları hesaplandı (n=6).

C.2.6.2.2.2. Tabletlerin Ağırlık Sapması

Basılan tabletlerden 6'şar adet tek tek tartılarak ortalama ağırlık ve standart sapma hesaplandı.

C.2.6.2.2.3. Tabletlerin Sertliklerinin Tayini

Altı tablet alınıp sertlik ölçme aletiyle sertlikleri Newton cinsinden bulunup, ortalama sertlikleri ve standart sapmaları hesaplanmıştır(n=6).

C.2.6.2.2.4. Tabletlerin Etkin Madde İçeriğinin Tayini

Altı tablet tartılıp, temiz bir havanda iyice toz edildi. Bu toz karışımdan 32 mg DMAH'e eşdeğer miktarda tablet tozu tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye alınıp pH 6.8 fosfat tamponuyla 100 mL'ye tamamlandı. DMAH-Kitozan etkileşmesi pH 6.8'de gözlenmediğinden ölçümler bu ortamda yapılmıştır. Örnekler 15 dakika ultrasonik banyoda tutuldu ve 15 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmaya devam edildi daha sonra 0.2 μm'lik filtreden süzüldü ve absorbansları, spektrofotometrede, 631 nm'de, 10 kat seyreltilerek ölçüldü. Paralel yapılan deneylerin sonuçları kalibrasyon denkleminde yerine konarak, tabletlerdeki ortalama DMAH miktarı bulundu (n=3).

C.2.6.2.2.5. Tabletlerin Dağılma Sürelerinin Tayini

Altı tablet alınarak, dağılma süreleri pH 1.2 yapay mide ortamında, 37±0.5°C'de USP dağılma test aletinde, disk olmaksızın, 2 saat süresince izlendi.

C.2.6.2.2.6. Kitozan Tabletlerde Çözünme Hızı Deneyleri

Tabletlerde çözünme hızı testi, çalkalayıcı su banyosu kullanılarak yapıldı. Çözünme hızı deneyi 37±0.1°C'deki 20 mL ortamda, 100 darbe/dakikada yapıldı ve 5., 15., 30., 60., 90. dakikalarda, 1'er mL örnek alınarak, 0.2 μm'lik filtrelerden süzüldü. Alınan örneklerin absorbansları, UV spektrofotometresinde, 1cm'lik kuvartz küvette okundu. Seyreltme faktörleri de hesaba katılarak, kalibrasyon denkleminden yararlanılarak çözünme profilleri belirlendi (n=6). Çözünme ortamı olarak pH 6.8 fosfat tamponu kullanıldı.

Çözünme hızı deneyleri, pH 1.2 USP yapay mide ortamında kitozan-DMAH etkileşmesi nedeniyle absorbanslar değerlendirilemediğinden, pH 6.8'de yapıldı.

pH 6.8 tamponunun hazırlanışı

Enzimsiz yapay mide ortamı…….160 mL

Enzimsiz yapay barsak ortamı…..840 mL

Enzimsiz yapay mide ortamının (pH 1.2) hazırlanışı

NaCl……2 g

HCl……..7 mL

Distile su…ym....1000 mL

Enzimsiz yapay barsak ortamının (pH 7.4) hazırlanışı

I nolu çözelti……..130 mL

II nolu çözelti……..870 mL

I nolu çözelti	II nolu çözelti
Potasyum dihidrojen fosfat...9.073 g	Disodyum hidrojen fosfat…11.87 g
Distile su…….ym...1000 mL	Distile su……ym…1000 mL

C.2.6.3. Siklodekstrin İçeren Çözelti Formülasyonu

% 5 oranında siklodekstrin içerecek şekilde tartılan siklodekstrin ve DMAH havanda iyice karıştırılarak öğütüldükten sonra distile suda çözüldü.

C.2.6.4. Aljinat Boncuk Önformülasyon Çalışmaları

Aljinat boncuklar, emülsiyon oluşturduktan sonra $CaCl_2$ ile iyonik etkileşim ve doğrudan $CaCl_2$ ile iyonik etkileşim esasına dayanarak hazırlanmıştır. Yüksek devirde, doğrudan $CaCl_2$ ile iyonik etkileşim esasına dayanarak hazırlanan formülasyon grubunda ise partikül boyutunu düşürmek hedeflenmiştir.

C.2.6.4.1. Aljinat- Sıvı Parafin ile Yüksek Devirde Emülsiyon Oluşturup $CaCl_2$ ile Sertleştirme

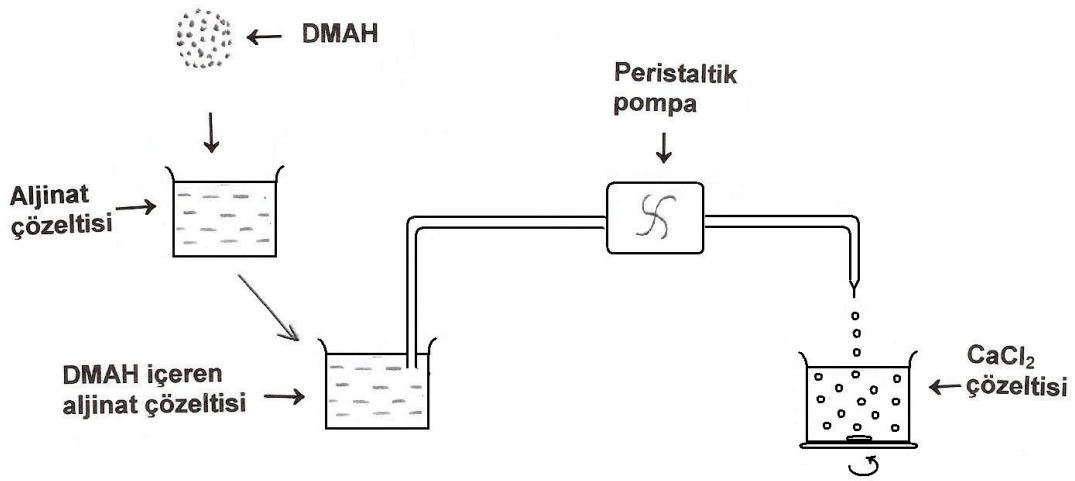
Aljinat çözeltisi (% 2'lik, 10 g), % 2 Tween 80 (a/h) içeren 25 mL sıvı parafine damla damla eklendi ve 5000 rpm'de karıştırıldı. Oluşan emülsiyona sertleştirici olarak 0.5 M $CaCl_2$ eklendi (20 mL). Karıştırma işlemine 5000 rpm'de 30 dk devam edildi ve daha sonra 5000 g'de 5 dk santrifüj işlemi yapıldı. Oluşan partiküller ayrılamadığından yıkama, kurutma gibi aşamalara geçilemedi.

C.2.6.4.2. Aljinat-$CaCl_2$ ile İyonik Etkileşme ile Yüksek Devirde Boncuk Oluşturma

Aljinat çözeltisi (% 2'lik, 10 mL), 5000 rpm'de karıştırılan 0.5 M $CaCl_2$ çözeltisine (10 mL) damla damla eklendi, 5000 rpm'de karıştırılmaya devam edildi. Boncuk oluşumu sağlanamadığından, yıkama kurutma gibi aşamalara geçilemedi.

C.2.6.4.3. Aljinat-$CaCl_2$ İyonik Etkileşme ile Boncuk Oluşturma

Aljinat ve $CaCl_2$ arasındaki iyonik etkileşime dayanan boncuk hazırlama yöntemi kullanıldı[121,123]. Polimer tipi ve oranı, $CaCl_2$ oranı, etkin madde:polimer oranı, damlatma hızı ve süresi, sertleştirme süresi değiştirilerek ön deneyler yapıldı (Tablo 10). Aljinat çözeltisi peristaltik pompaya takılı enjektör ucu (0.8x3.8 mm) ile 5 cm yükseklikten manyetik karıştırıcı ile karışmakta olan $CaCl_2$ çözeltisine damlatıldı (Şekil 7). Oluşan boncukların belirli sürelerde $CaCl_2$ çözeltisi içinde karıştırılmasına devam ederek sertleşmeleri sağlandı. Elde edilen boncuklar süzüldü ve 0.1 N HCl çözeltisi ile yıkanıp 25ºC etüvde vakumlu desikatörde kurutuldu.



Şekil 7. DMAH-Aljinat boncukların hazırlanma yöntemlerinin şematik olarak gösterilmesi

Tablo 10 . Aljinat boncuk önformülasyon çalışmalarında değişkenler ve oranları

	İçerik	$CaCl_2$	Sertleştirme süresi	Damlatma hızı
AÖF1	% 2 protonal LF120	0.5 M	15 dk	10 mL/dk
AÖF2	% 2 protonal LF 240	0.5 M	15 dk	10 mL/dk
AÖF3	% 2 protonal LF 240	0.5 M	10 dk	20 mL/dk
AÖF4	% 3 protonal LF 120	0.5 M	10 dk	20 mL/dk
AÖF5	% 2 protonal LF120	0.5 M	10 dk	20 mL/dk
AÖF6	% 2 protonal LF 240	0.5 M	10 dk	20 mL/dk
AÖF7	% 2 protonal LF120	0.8 M	15 dk	10 mL/dk
AÖF8	% 2 protonal LF120	0.2 M	15 dk	10 mL/dk
AÖF9	% 2.5 protonal LF120	0.5 M	15 dk	10 mL/dk

C.2.6.5. Faktöriyel Tasarımla Aljinat Boncuk Hazırlama

Etkin madde:polimer oranı, sertleşme süresi ve $CaCl_2$ oranı 2^3 faktöriyel tasarım için belirlenen faktörlerdir. Düşük ve yüksek olmak üzere iki seviyeli çalışılmıştır (Tablo 11 ve 12).

Tablo 11. Aljinat boncuk faktöriyel tasarım formülasyonlarında faktörler ve seviyeleri

FAKTÖRLER	DÜŞÜK SEVİYE	YÜKSEK SEVİYE
A: Etkin Madde:Polimer	1:1	1:2
B: $CaCl_2$ oranı (M)	0.1	0.5
C: Sertleştirme süresi (dk)	15	30

Tablo 12. Aljinat boncuk faktöriyel tasarım formülasyonlarında değişkenler ve oranları

Formülasyonlar	DMAH:Aljinat	$CaCl_2$ (M)	Sertleştirme Süresi (dk)
FH1	1:1	0.1	15
FH2	1:1	0.1	30
FH3	1:1	0.5	15
FH4	1:1	0.5	30
FH5	1:2	0.1	15
FH6	1:2	0.1	30
FH7	1:2	0.5	15
FH8	1:2	0.5	30

C.2.7. Aljinat Boncuklarda Yapılan Denetimler

C.2.7.1. Aljinat Boncuklarda Veriminin ve Enkapsülasyon Etkinliğinin Tayini

Hazırlanan aljinat boncuklarının verimini hesaplamak amacıyla boncuklar kurutulduktan sonra tartıldı ve aşağıdaki formüle göre hesap yapıldı.

$$\%\ Boncuk\,Verimi = \frac{Olusan\,boncuk\,miktan\ (g)}{Formülasyondaki\,toplam\,madde\,miktan\ (g)} \times 100$$

(Eşitlik1)

Enkapsülasyon etkinliği, boncukların miktar tayini sonucu elde edilen DMAH miktarının, formülasyona konulan DMAH miktarına oranıdır. Enkapsülasyon etkinliğini diğer bir deyişle % tutulan etkin madde oranını ölçmek için, boncuklar etkin maddenin tamamını elde etmek amacıyla uzun süre (12 saat) pH 6.8'de karıştırıldı, ardından vorteksde karıştırıldıktan sonra ölçüm yapıldı. Ancak hesaplanan miktarlar çok düşük bulunmuş olup çözünme hızı deneyi sonucunda elde edilen seviyenin çok altında kalmıştır. Bu durum bize uzun süre pH 6.8'de bekletip karıştırma sonucu boncuklardaki tüm etkin maddeyi ölçemediğimizi göstermiştir. Boncukların SEM görüntülerinden de anlaşılacağı üzere doğrudan pH 6.8'de karıştırılan boncuklarda yapı bozulmazken, pH 1.2'de 2 saat bekleyip ardından pH 6.8'e alınan boncuklar tamamen dağılıp çözünmüştür. Bu amaçla boncuklardaki DMAH oranının saptanması için çözünme hızı deneyindeki 3 saat sonunda salınan etkin madde miktarı (t_∞'da çözünen miktar) esas alınmıştır. Deney şartları "C.2.7.4. Aljinat Boncuklardan Etkin Maddenin Çözünme Tayini" bölümünde ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Bulunan etkin madde miktarı aşağıdaki denklemde yerine konularak enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır.

$$Enkapsülasyon\ Etkinligi = \frac{Miktar\ tayini\ ile\ hesaplanan\ DMAH}{Boncuk\ içine\ konulan\ DMAH} \times 100$$

(Eşitlik 2)

C.2.7.2. Aljinat Boncuklarda Partikül Büyüklüğü Tayini

Partikül büyüklüğü ölçümü için "Laser-Diffraction Particle Sizer" aleti kullanılmıştır. Boncuklar 0.1 N HCl içinde dağıtıldı ve 10 saniye vortekste karıştırılarak hiç bekletmeden boyutları ölçüldü.

C.2.7.3. Aljinat Boncuklarının Şişme Deneyleri

İçine 20 mL pH 1.2 ve pH 6.8 tampon çözeltileri konulan beherler, 37ºC±0.1'deki su banyosuna yerleştirildi. Aljinat boncuklar darası alınmış sepetlere konularak tartım yapıldı ve su banyosundaki beherlere yerleştirildi. Belirli zaman aralıklarında sepetler su banyosundan çıkarıldı ve sepet üzerindeki sıvı uzaklaştırılarak tartıldı. Tartılan sepetler tekrar behere konuldu ve deneye devam edildi. Elde edilen veriler aşağıdaki denkleme yerleştirilerek şişme oranları hesaplandı.

$$Şişme\ Oranı = \frac{A_t - A_0}{A_0} \times 100 \qquad \text{(Eşitlik 3)}$$

A_t: t anındaki sepet ve boncuk ağırlığı (mg)

A_0: Başlangıçtaki sepet ve boncuk ağırlığı (mg)

C.2.7.4. Aljinat Boncuklardan Etkin Maddenin Çözünme Tayini

Boncuklarda çözünme testi, çalkalayıcılı su banyosu kullanılarak yapıldı. Çözünme deneyi 37±0.1°C'deki 20 mL ortamda, 100 darbe/dakikada, 50 mg boncuk ile yapıldı. pH 1.2'de 2 saat tutulan boncuklar daha sonra pH 6.8 tamponuna aktarıldı ve deneye devam edildi. Örnekler 15., 30., 60., 120., 135., 150., 180. dakikalarda, 1'er mL alınarak, 0,2 μm'lik filtrelerden süzülmüştür. Alınan örneklerin yerine taze tampon konulmuştur. Alınan örneklerin absorbansları, spektrofotometrede, 1 cm'lik kuvartz küvette okunmuştur. Seyreltme faktörleri de hesaba katılarak, kalibrasyon denklemlerinden yararlanılarak bulunan miktarlardan çözünme profilleri belirlenmiştir. Çözünme

ortamı olarak, pH 1.2 USP yapay mide ortamı ve pH 6.8 fosfat tamponu kullanılmıştır.

C.2.8. Aljinat Boncuklarda DMAH-Aljinat Etkileşimlerinin incelenmesi

C.2.8.1. DSC Ölçümleri

DSC (Differantial Scanning Calorimetry) kullanılarak, 10°C/dak tarama hızında yapıldı ve 300°C'ye kadar olan sıcaklık aralığı kullanıldı*. Etkin madde ve polimer tek olarak, toz karışım halindeki boncuk formülasyon içeriği ve boncuk formülasyonlarının öğütülmesiyle hazırlanan tozların termogramları incelenmiştir.

C.2.8.2. X-Işını Kırınımı

Bu yöntemle etkin madde ve polimer tek olarak, toz karışım halindeki boncuk formülasyon içeriği ve boncuk formülasyonlarının öğütülmesiyle hazırlanan tozları incelenmiştir. X-ışını kırınımı aletinde bakır tüp (Cu kα) kullanılarak 30 kilovolt, 15 miliamperde elde edilen x-ışını ile tozların kristal durumları incelenmiştir. Alette kırınım piklerinin çizilmesi 2.0 derece/dakika hızla yapıldı*.

C.2.8.3. FT-IR ölçümleri

FT-IR (Fourier Transform Infrared) cihazı kullanılarak etkin madde ve polimer tek olarak, toz karışım halindeki boncuk formülasyon içeriği ve boncuk formülasyonlarının öğütülmesiyle hazırlanan tozların analizleri yapılmıştır**.

---

*DSC ve X-Işını kırınımı ölçümleri Fargem AŞ'de yapıldı. Sayın Uzm. Ecz. Abdullah Uslu ve Uzm. Ecz. Berna Ökçelik'e teşekkür ederiz.

**FT-IR ölçümleri Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde yapıldı. Sayın Doç. Dr. Tuncer Çaykara ve Bil. Uzm. Serkan Demirci'ye teşekkür ederiz.

C.2.9. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Ölçümleri

Aljinat boncukların yüzey görüntüleri ve genel görüntülerini incelemek amacıyla JSM-6400 SEM (Scanning Electron Microscopy) kullanıldı.

Karbon bant üzerine yapışmış olan boncuklar iletkenlik sağlamak amacıyla altınla yaklaşık 30 µm kalınlıkta kaplanarak görüntülendi. Etkin madde yüklü ve boş boncukların görüntüleri incelendi. Ayrıca etkin madde içeren boncuklar, 37±0.1°C'deki 20 mL ortamda, 100 darbe/dakikada çalkalayıcılı su banyosunda karıştırıldı. Boncukların pH 1.2'de 2 saat ve pH 6.8'de yarım saat sonraki görüntüleri, salım sırasındaki yapısal değişiklikleri gözlemek amacıyla incelenmiştir. Boncuklarda pH 6.8'e alındıktan sonra parçalanma ve çözünme uzun sürmediğinden değişiklikleri gözlemlemek için yarım saatin sonunda örnek alınmıştır.

C.2.10. İn Vivo Deneyler

DMAH düzeylerini plazmadan doğrudan ölçmek mümkün değildir[18]. Faktör Xa inhibisyonunun (Anti Xa) miktarı kullanılarak AUC, C_{max}, t_{max} gibi parametreler hesaplanmaktadır. İn vivo deneylerde 1 mg DMAH'in 140 IU Axa etkiniğe sahip olduğu göz önüne alınarak tavşanlara verilen DMAH'in doz hesabı yapılmıştır (DMAH 140 IU /mg). Deneylerde Yeni Zelanda cinsi, 2.5-3 kg ağırlığında, erkek tavşanlar kullanıldı. İn vivo deneyler, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan onay alınarak (G.Ü.ET-03.015), etik kurallara uygun olarak yapıldı.

Tavşanlar bir gece önceden aç bırakıldı, formülasyonlar (Tablo 13) oral yoldan gastrik lavajla içirildi. Tavşanların kulak veninden alınan kan örnekleri (1 mL), sodyum sitrat:kan oranı 1:9 olacak şekilde sodyum sitrat (% 3.2) içeren tüplere alındı. Kan örnekleri 0, 30, 60, 120, 180, 240, 360. dakikalarda alınarak 3000 g'de, 15ºC'de, 10 dk santrifüj edildi ve -80ºC'de okunma zamanına kadar saklandı.

Plazmadan anti Xa aktivitesi hazır kitlerle (STA-Rotachrom® Heparin) ölçüldü.* Hazır kitlerle Anti Xa okunurken üç temel öğe kullanılmaktadır[35]: 1. Kalibratör, 2. Kontrol, 3. Anti Xa kiti. Cihaz kalibrasyon için üç noktada bilinen Anti Xa konsantrasyonuna (IU/mL) karşı optik dansite (OD) değeri okumaktadır.

Kalibratör olarak, firma tarafından hazırlanan havuzlanmış liyofilize insan plazması sulandırılır ve DMAH içeren flakonlarla beraber cihaza yerleştirilir. Cihaz artan konsantrasyona karşı azalan optik dansite değerlerinin logaritmalarını kullanarak bir kalibrasyon doğrusu oluşturmaktadır. Cihaz kontrol flakonlarındaki çözeltileri kullanarak iki noktada testin doğruluk denetimini yapmaktadır. Anti Xa konsantrasyonu okumak için Anti Xa kitleri ve tavşanlardan alınan plazmalar kullanılarak elde edilen optik dansiteler kalibrasyon denkleminde yerine konuldu. Kalibrasyonda hazır kitlerde insan plazması kullanıldığından, tavşan plazmasına göre yeniden kalibrasyon yapıldı. Anti Xa ölçümleri sonucu elde edilen optik dansite değerleri tavşan plazması ile hazırlanan kalibrasyon denkleminde yerine konularak Anti Xa konsantrasyonları hesaplandı.

Anti Xa kitleri substrat, FXa (Faktör Xa) ve çözücü olmak üzere üç öğeden oluşmaktadır. Ölçüm prensibi kromojenik substrat kullanılarak yarışmalı bir sistem oluşturulup DMAH'nin anti Xa aktivitesinin ölçülmesi suretiyle DMAH seviyesinin belirlenmesine dayanır[34]. Plazmada faktör Xa'nın oluşmasıyla protrombinin trombine dönüşmesi sağlanır ve sonuçta fibrin (pıhtı) oluşumu sağlanır. Heparin ve DMAH varlığında ise, heparin+antitrombin III kompleksi oluşumuyla bu mekanizma inhibe edildiğinden, bu mekanizma ile inhibitor mekanizma arasında yarışma olur. Ölçümde plazmaya liyofilize kromojenik substrat eklenir. Karışıma faktör Xa eklendiğinde heparin-AT III kompleksi tarafından faktör Xa inhibe edilir geriye kalan faktör Xa substratı ayırır. Ortamdaki heparin konsantrasyonu ile ters orantılı olarak salınan substrat ölçülür[18,35]

---

*: Anti Xa ölçümleri Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hematoloji Bölümü'nde yapıldı. Sayın Şerafettin Kirazlı ve Adnan Özdemir'e teşekkür ederiz.

C.2.10.1. Tavşan Plazmasında DMAH ile Kalibrasyon

Anti Xa ölçümü için tavşan plazması kullanarak kalibrasyon yapıldı. Standart doğru hazırlamak üzere tavşan plazmaları birleştirilerek bilinen miktarlarda DMAH eklendi ve konsantrasyonlara (K) karşı optik dansite (OD) değerlerinin logaritmaları grafiğe geçirilerek doğru denklemi hesaplandı. Bu deney için 24 tane tavşandan alınan kanlar santrifüj edilerek elde edilen plazmalar birleştirildi.

C.2.10.2. Herhangi Bir Formülasyon Uygulanmamış Tavşanlarda Yapılan Ölçümler

Kontrol amacıyla hiç bir uygulama yapılmadan (6 saat boyunca belirli aralıklarda (n=2) ve tek bir sefer (n= 18)) tavşanlardan kan alındı ve Anti Xa seviyeleri ölçüldü. Deney ve ölçümler bölüm C.2.10.'da anlatıldığı şekilde yapıldı.

C.2.10.3. Tavşanlara Uygulanan DMAH Preparatları

Tavşanlarda DMAH formülasyonları oral uygulanarak etki elde etmek amaçlanmıştır. Literatürde 0.2 IU/mL plazma AXa seviyesini sağlayan formülasyonlar başarılı olarak değerlendirilmektedir[25-27]. Biz de 0.2 IU/mL ve üzerinde plazma seviyesi sağlayan formülasyonları başarılı olarak değerlendirdik.

Tavşanlara oral uygulamalar dışında İV yoldan, 100 IU/kg dozda DMAH çözeltisi uygulanmıştır (İV). Kontrol olarak sadece DMAH içeren çözelti 5000 IU/kg dozda oral olarak uygulanmıştır (DMAHÇ). DMAH içeren siklodekstrinli çözeltiler ise farklı dozlarda uygulanmıştır (DMAHSDÇ1500, DMAHSDÇ3000, DMAHSDÇ5000). Ayrıca siklodekstrinin tek başına etkisini görmek amacıyla sadece siklodekstrin çözeltisi (SDÇ) verilmiştir. Kitozan tabletler ise ön deneme olarak az sayıda tavşana, farklı dozlarda uygulanmıştır (KT1500, KT3000, KT5000). Aljinat boncuklarda, DMAH içerenlerle (DMAHAB) ve DMAH içermeyenlerle (AB) deney yapılmıştır. Tavşanlara uygulanan formülasyonlar ve kodları Tablo 13'de gösterilmiştir.

Tablo 13. İn vivo deney grupları ve kodları

Grup kodu	Deney grubu	Uygulanan DMAH dozuna göre
İV	İV uygulama	100 IU/kg DMAH
DMAHÇ	DMAH içeren çözelti	5000 IU/kg DMAH
DMAHSDÇ	DMAH ve siklodekstrin (% 5) içeren çözelti	**DMAHSDÇ1500**; 1500 IU/kg DMAH
		DMAHSDÇ3000; 3000 IU/kg DMAH
		DMAHSDÇ5000: 5000 IU/kg DMAH
SDÇ	Boş siklodekstrin çözeltisi	DMAH içermeyen
KT	Kitozan tablet	**KT1500**; 1500 IU/kg DMAH
		KT3000; 3000 IU/kg DMAH
		KT5000; 5000 IU/kg DMAH
DMAHAB	DMAH içeren aljinat boncuk	5000 IU/kg DMAH
AB	Boş aljinat boncuk	DMAH içermeyen

C.2.10.3.1. Tavşanlara İntravenöz DMAH Uygulanması

Tavşanlara 100 IU/kg DMAH çözelti İV olarak kulak veninden uygulanmıştır. Bu grupta farklı olarak 0, 0.083, 30, 60, 120, 180, 240, 360. dakikalarda kan örnekleri alındı. Deney ve ölçümler bölüm C.2.10.'da anlatıldığı şekilde yapıldı.

C.2.10.3.2. DMAH İçeren Çözelti

Kontrol grubu olarak 5000 IU/mL DMAH içeren çözelti oral yoldan gastrik lavajla içirildi (DMAHÇ, n=5). Deney ve ölçümler bölüm C.2.10.'da anlatıldığı şekilde yapıldı.

C.2.10.3.3. Siklodekstrin Formülasyonları ile Deneyler

DMAH'in oral uygulanmasında absorbsiyon artırıcı olarak siklodekstrinin etkisini görmek amacıyla ön deneme olarak 1500, 3000 IU/kg DMAH ve % 5 oranında siklodekstrin içeren çözeltiler tavşanlara oral yoldan gastrik lavajla uygulandı (DMAHSDÇ1500, n=3 ve DMAHSDÇ3000, n=2). Daha sonra 5000

IU/kg DMAH ve % 5 oranında siklodekstrin içeren çözelti (DMAHSDÇ5000, n=5) ve aynı oranda sadece siklodekstrin içeren çözelti (SDÇ, n=5) oral yoldan gastrik lavajla tavşanlara içirildi. Deney ve ölçümler bölüm C.2.10.'da anlatıldığı şekilde yapıldı.

C.2.10.3.4. Kitozan Tablet Formülasyonları ile Öndeneyler

İn vitro deneyler sonucunda seçilen F2 (DMAH:K 1:0.75) tablet formülasyonu 1500, 3000 ve 5000 IU/kg DMAH içerecek şekilde ön deneme amacıyla tavşanlara gastrik lavajla verildi (KT1500, KT3000, KT5000, n=2). Deney ve ölçümler bölüm C.2.10'da anlatıldığı şekilde yapıldı. Doz artırılmasına rağmen hiçbir etkinlik gözlenmediğinden DMAH içeren kitozan formülasyonlarıyla in vivo deneyler bu noktada bırakıldı.

C.2.10.3.5. Aljinat Boncuk Formülasyonları ile Deneyler

İn vitro deneyler sonucunda FH7 formülasyonu in vivo deneyler için seçildi. Bu formülasyondan 5000 U/kg DMAH içeren miktarda (DMAHAB) ve DMAH içermeyen boncuklar (AB) tavşanlara verildi (n=5). Formülasyonlar oral yoldan gastrik lavajla içirildi. Boncuklar ince gastrik lavaj borusuna yerleştirildi ve 5 mL su ile içirildi ardından 5 mL daha su verildi. Deney ve ölçümler bölüm C.2.10.'da anlatıldığı şekilde yapıldı.

C.2.11. İn Vivo Deney Sonuçlarının Farmakokinetik Ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

İn vivo deneyler sonucu bulunan AXa konsantrasyonları zamana karşı grafiğe geçirilerek eğri altına kalan alanlar (AUC) hesaplandı. Hesaplamalar için **BOOMER**[222] bilgisayar programı kullanıldı.

İstatistiksel hesaplar için **SPSS 11.5**[219] bilgisayar programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemi, Tukey'in karşılaştırmalı testi ile

---

* İn vivo deney sonuçlarının farmakokinetik ve istatistiksel olarak değerlendirilmesinde sağladıkları olanaklar ve yardımlarından dolayı sayın Prof. Dr. İlbeyi Ağabeyoğlu ve Uzm. Ecz. Tuba İnceçayır'a teşekkür ederiz.

istatistiksel olarak değerlendirildi. P<0.05 iken anlamlı farklı olarak karşılaştırıldı.

İn vivo deneylerde:

- ✓ DMAHAB diğer tüm gruplarla
- ✓ Tüm gruplar kontrol ile
- ✓ DMAHSDÇ, SDÇ ile karşılaştırılmıştır.

C.2.12. Tavşan Midelerinin Histolojik Açıdan İncelenmesi

Tavşanlara 12 saat açlık uygulamasından sonra ilk üç grup hayvana oral olarak DMAH içeren çözelti (DMAHÇ, 5000 IU/kg), boş aljinat boncuk (AB), ve DMAH yüklü aljinat boncuk (DMAHAB, 5000 IU/kg) gastrik lavaj ile ve son gruba da DMAH, 100 IU/kg dozda intravenöz olarak uygulandı. Uygulamanın ardından her gruptan 1, 2 ve 3. saatte birer deneğin, letal dozda tiopental anestezisi altında ötenazileri yapılarak hızlıca mide doku örnekleri alındı ve 0.1 M fosfat tamponlu % 2.5'lik gluteraldehit (pH 7.4) tespit çözeltisine konuldu. Bir miktar sertleştikten sonra 1 mm^3'lük parçalara bölünen doku örnekleri 0.1 M fosfat tamponlu % 2.5'lik gluteraldehitte (pH 7.4) 2 saat tespit edilmiştir. Tespit süresi bitiminde tampon ile 3 kez yıkanan dokular 1 saat % 1'lik osmiyum tetraoksite etkin bırakılarak postfiksasyonları yapılmıştır. Süre bitiminde dereceli alkol serilerinden geçirilen dokuların dehidrate olmaları sağlanmıştır. Son olarak propilen oksite etkin bırakılan dokular Araldit CY212 kit ile hazırlanan gömme materyali ile blok haline getirilmişlerdir. 56°C'lik etüvde 48 saat polimerize edilen bloklardan yarı-ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyanmış ve ışık mikroskobunda incelenmiştir. İşaretlenen bölgelerden alınan ince kesitler uranil asetat–kurşun sitrat ile boyanarak Carl Zeiss EM900 transmission elektron mikroskopta (TEM) değerlendirilmiştir ve bulguları yansıtan uygun büyültmelerde resimlendirilmiştir*.

---

*Tavşan midelerinin histolojik açıdan incelenmesi Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında yapılmıştır. Sayın Prof. Dr. Deniz Erdoğan ve Dr. Yeşim Bardakçı'ya teşekkür ederiz.

D. BULGULAR

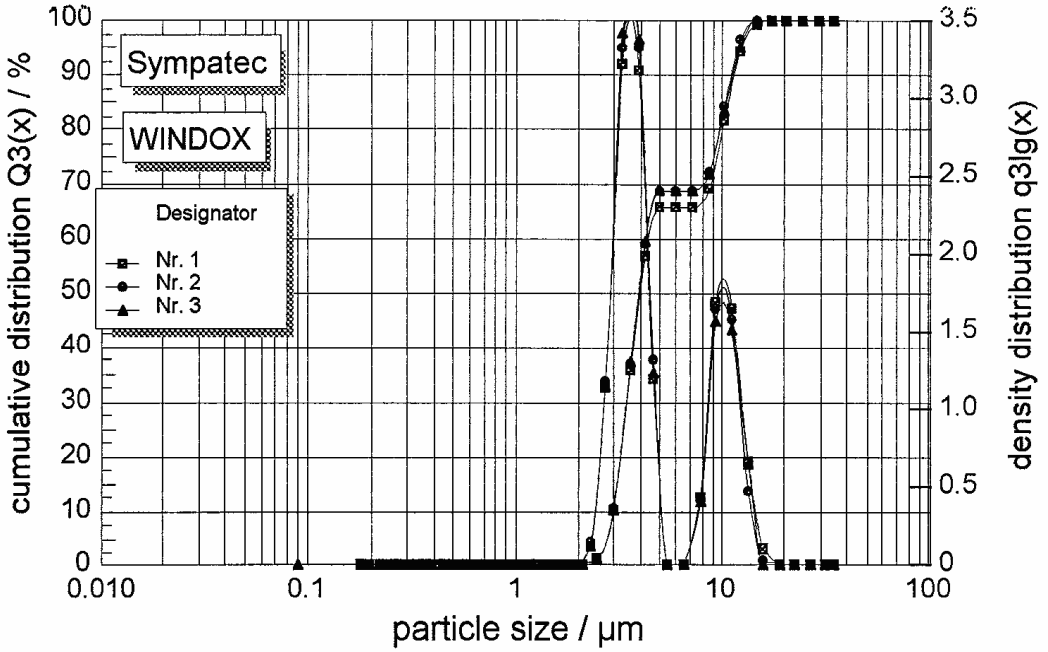
D.1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

D.1.1. Etkin Maddenin Erime Derecesinin Tayini

DMAH'in erime derecesi tayini Bölüm C.2.1.1.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Deneyin sonucunda DMAH'in 241-243ºC'de dekompoze olduğu gözlenmiştir.

D.1.2. Etkin Maddenin Partikül Büyüklüğü

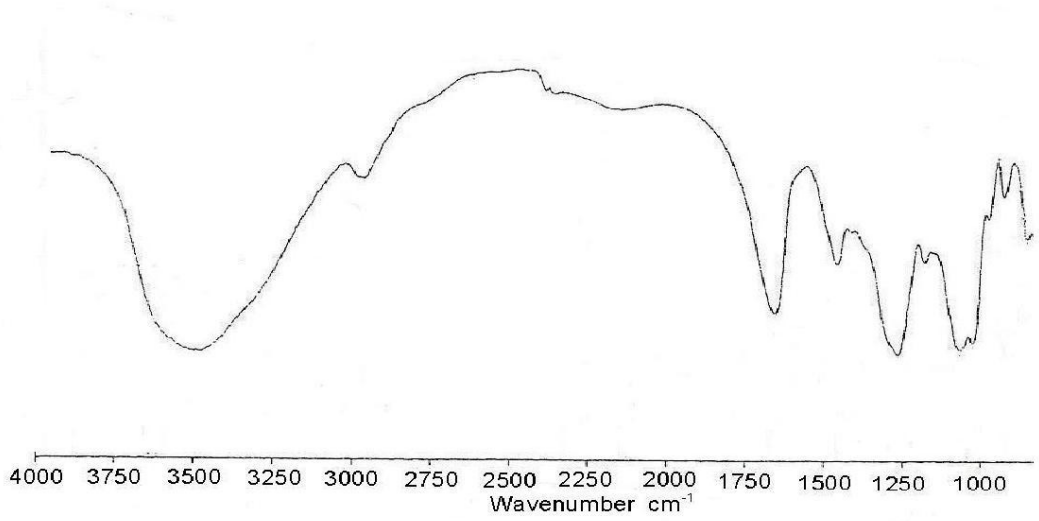
Etkin maddeye ait partikül büyüklüğü dağılımı Şekil 8'de gösterilmiştir. Buna göre DMAH'in ortalama partikül büyüklüğü 3.97±0.09 µm bulunmuştur.



Şekil 8. DMAH'in partikül büyüklüğü dağılımı

D.1.3. Etkin Maddenin IR Spektrumu

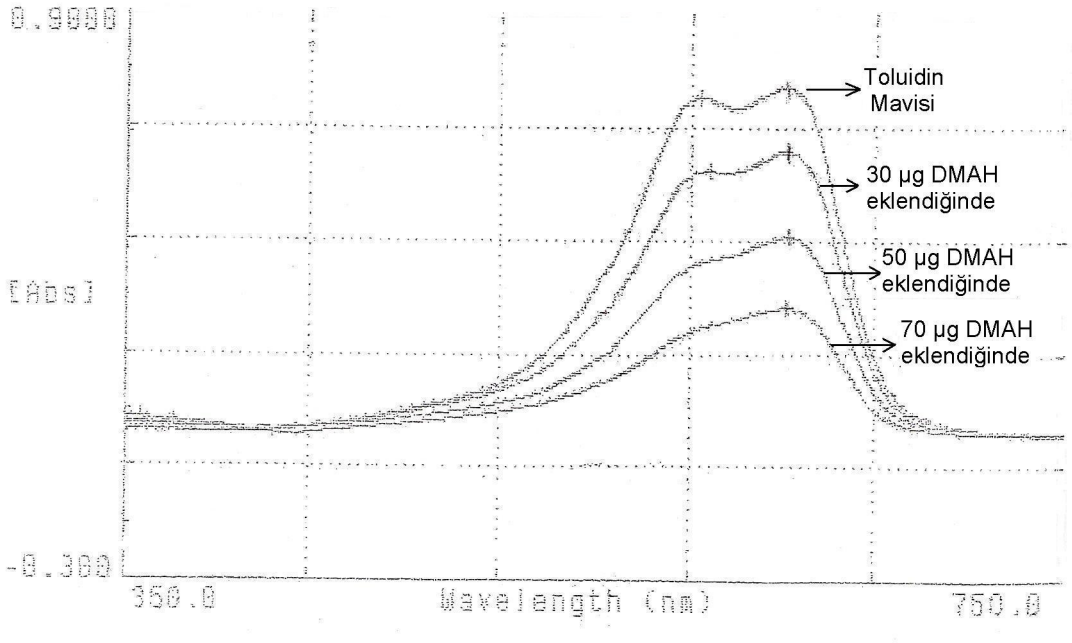
DMAH'e ait FT-IR spektrumu Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9. DMAH'e ait FT-IR spektrumu

D.1.4. Etkin Maddenin Spektrumu

DMAH'in spektrumu için 350-750 nm arasında 1 cm'lik kuvartz küvet kullanılarak, köre karşı spektrum taraması yapıldı ve λ_{maks} değeri saptandı (Şekil 10). Toluidin mavisi çözeltisinin 631 nm'de maksimum absorbans piki verdiği gözlendi. Toluidin mavisi çözeltisi ile farklı miktarlarda DMAH varlığında yine 631 nm'de maksimum absorbans piki gözlendi. Artan DMAH miktarına karşılık, boya ile kompleks oluşumu sonucu boyanın tek başına verdiği absorbans değerinin düştüğü belirlendi.



Şekil 10. DMAH'in UV spektrumu a) metakromatik boyanın (Toluidin mavisi) UV spektrumu, b) DMAH ile metakromatik boyanın UV spektrumu

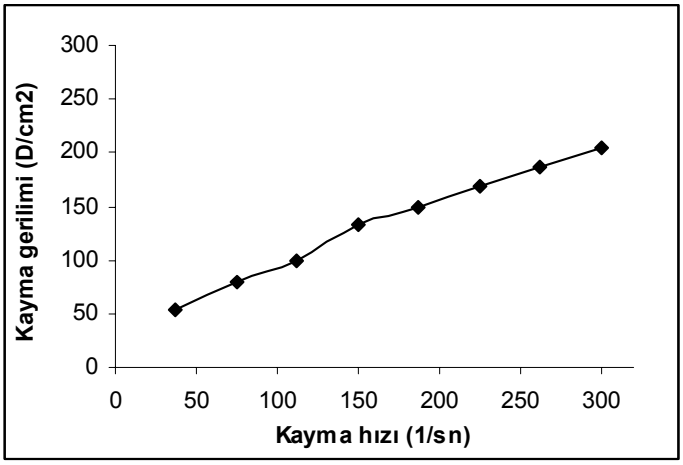
D.2. Kullanılan Polimerler Üzerinde Yapılan Çalışmalar

D.2.1. Aljinat ve Kitozanın Viskozite ve Akış Özelliklerinin Ölçülmesi

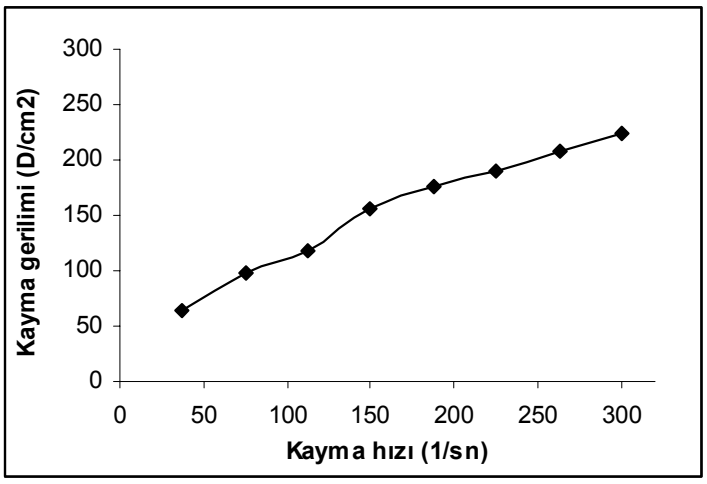
Aljinatların sudaki % 1'lik çözeltisinin reogramları (Protonal LF 120 M ve Protonal LF 240D, sırasıyla Şekil 11 ve Şekil 12) ve kitozanın % 1'lik çözeltisinin (% 2 asetik asit çözeltisindeki) reogramı (Şekil 13) gösterilmiştir. Polimerlerin farklı karıştırma hızındaki viskozite değerleri Tablo 14'de gösterilmiştir. Reogramlardan da anlaşıldığı üzere polimerlerin üçünün de Newtonian olmayan akış tiplerinden pseudoplastik akışa uydukları görülmektedir.

Tablo 14. Aljinatların % 1'lik çözeltilerinin ve kitozanın % 1'lik çözeltisinin (% 2 asetik asit çözeltisinde) viskozite değerleri.

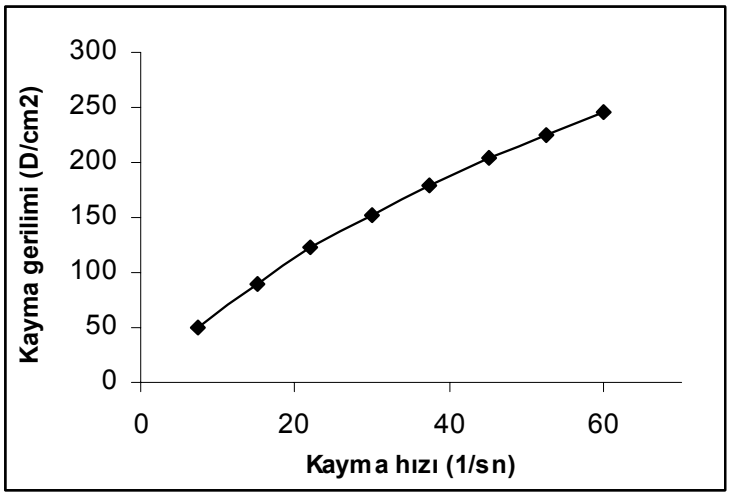
Hız (rpm)	Protonal LF 120M Viskozite (cP)	Protonal LF 240D Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kitozan Viskozite (cP)
5	139.96	169.39	1	663.81
10	106.93	129.82	2	596.78
15	88.29	105.08	3	545.00
20	87.29	103.82	4	510.12
25	79.92	93.65	5	478.73
30	74.99	84.58	6	452.35
35	71.19	79.51	7	430.24
40	68.10	74.96	8	411.20



Şekil 11. Sodyum aljinatın (Protonal LF 120 M) sudaki % 1'lik çözeltisinin reogramı



Şekil 12. Sodyum aljinatın (Protonal LF 240D) sudaki % 1'lik çözeltisinin reogramı



Şekil 13. Kitozanın % 1'lik çözeltisinin (% 2 asetik asit çözeltisinde) reogramı

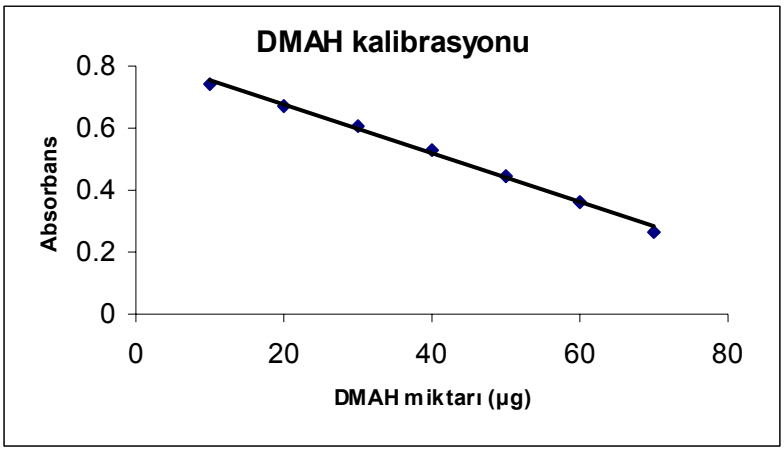
D.3. DMAH ile Standart Doğrunun Hazırlanması

Toluidin mavisi çözeltisi 631 nm'de maksimum absorbans verdi. Toluidin mavisi çözeltisine DMAH'in eklenmesiyle toluidin mavisi-DMAH kompleksi oluşumu sonucu yine 631 nm'de gözlenmekte olan maksimum absorbans pikinin değeri düştü (Şekil 10). Toluidin mavisi çözeltisinin DMAH eklenmeksizin verdiği absorbans değeri 0.811±0.078 bulundu. Çözeltiye eklenen DMAH miktarı arttıkça bu değer kompleks oluşumu nedeniyle orantılı olarak düştü.

Farklı miktarlarda DMAH içeren çözeltilerdeki DMAH miktarlarının (µg) absorbansa karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen doğru Şekil 14'de gösterilmiştir (n=6). Kalibrasyon denklemi ve parametreleri hesaplanarak Tablo 15'de gösterilmiştir.

Tablo 15. DMAH'in kalibrasyon parametreleri

Doğru denklemi (y=mx+n)	y= -0.00790x + 0.833
Eğim (m±GS)	0.00790±0.00110
Kesişim (n±GS)	0.833±0.083
Korelasyon katsayısı (r)	0.999±0.003
Determinasyon katsayısı (r^2)	0.998±0.006



Şekil 14. DMAH'in kalibrasyon grafiği

D. 4. Spektrofotometrik Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

D.4.1. Doğrusallık

Farklı miktarlarda DMAH içeren çözeltilerde artan miktarlara (µg) karşı azalan absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle doğru elde edildi. DMAH miktarı ile absorbanslar arasında doğrusal ilişki gözlendi. Deney sonuçları Tablo 16'da, kalibrasyon parametreleri Tablo 15'de gösterilmiştir.

Tablo 16. DMAH'in kalibrasyon verileri

Hazırlanan DMAH (µg)	Ort Abs	SS	SH	± GS
10	0.7432	0.0511	0.0209	0.1030
20	0.6706	0.0298	0.0122	0.0600
30	0.6072	0.0118	0.0048	0.0238
40	0.5275	0.0201	0.0082	0.0406
50	0.4456	0.0298	0.0122	0.0601
60	0.3620	0.0220	0.0090	0.0443
70	0.2664	0.0121	0.0050	0.0245

Tablolardada, SS: Standart sapma, SH: Standart hata, GS: Güven sınırı, BS: Bağıl sapma olarak verilmiştir. Güven sınırı % 95 olasılıklıdır.

D.4.2. Doğruluk ve Geri Elde

Üç farklı derişimde altışar kez tekrarlanan deneyin sonuçları değerlendirildi. % Geri eldeyi hesaplamak için standart doğru denklemi kullanıldı. Bağıl sapma, Eşitlik 4 kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar tablo 17'de verildi.

$$Bagil\ Sapma = \frac{Ölçülen\ miktar - Hazirlanan\ miktar}{Hazirlanan\ miktar} \times 100 \qquad \text{(Eşitlik 4)}$$

Tablo 17. DMAH'in geri elde hesapları

Hazırlanan DMAH miktarı (µg)	Ort. Absorbans	Ölçülen DMAH miktarı (µg)	SS	SH	± GS	BS (%)	% Geri elde
20	0.6806	19.3	0.0111	0.0079	0.0324	3.29	97
40	0.5287	38.6	0.0046	0.0032	0.0133	3.59	96
60	0.3581	60.2	0.0025	0.0018	0.0074	0.267	100

D.4.3. Kesinlik:

Aynı konsantrasyonda hazırlanan örneklerin ölçümü 10 kez tekrarlanarak istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı (Tablo 18).

Tablo 18. Kesinlik sonuçları

Örnek No	Hazırlanan DMAH miktarı (µg)	Ölçülen DMAH miktarı (µg)
1	60	59.9
2	60	60.0
3	60	60.0
4	60	60.0
5	60	60.0
6	60	60.0
7	60	59.9
8	60	59.8
9	60	59.8
10	60	59.9
	Ortalama:	59.9
	SS:	0.1
	SH:	0.0
	GS:	0.1
	BS (%):	0.170

Tekrar edilebilirlik:

1. Gün içi tekrarlanabilirlik: Aynı gün içinde üç farklı stoktan hazırlanan kalibrasyon örnekleri ölçüldü (Tablo 19).
2. Günlerarası tekrarlanabilirlik: Üç gün içinde üç farklı stoktan hazırlanan kalibrasyon örnekleri ölçüldü (Tablo 20).

Tablo 19. Gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları

Hazırlanan DMAH (µg)	Ölçülen Miktar-1	Ölçülen Miktar-2	Ölçülen Miktar-3	Ort	SS	SH	±GS	BS (%)
10	10.8	10.3	9.0	10.0	0.9	0.6	2.6	8.98
20	19.0	21.7	21.5	20.7	1.5	1.0	4.3	7.19
30	29.3	28.9	30.0	29.5	0.6	0.4	1.7	1.94
40	36.9	40.8	39.3	39.0	1.9	1.3	5.6	4.94
50	48.9	54.2	48.5	50.5	3.1	2.3	9.3	6.33
60	60.4	62.0	58.3	60.3	1.8	1.3	5.4	3.08
70	73.6	70.4	73.0	72.3	1.7	1.2	5.1	2.41

Tablo 20. Günlerarası tekrarlanabilirlik sonuçları

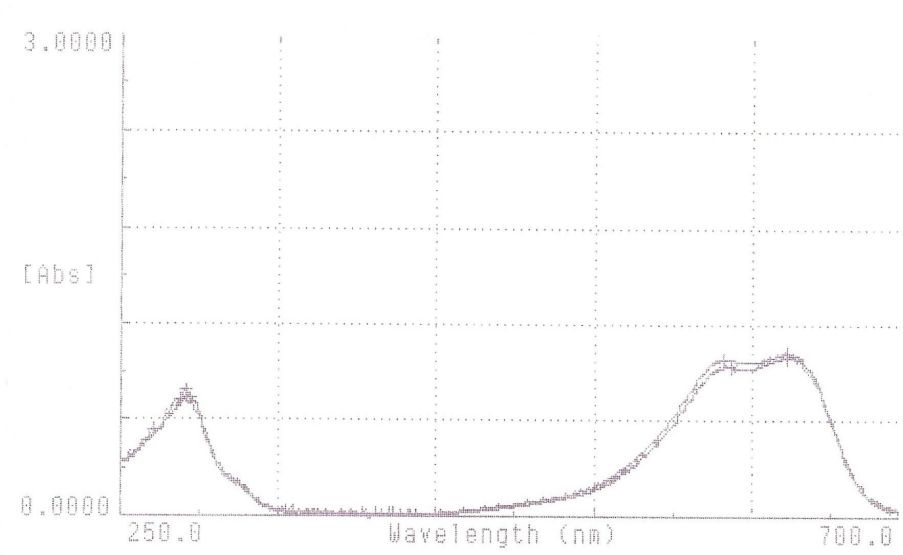
Hazırlanan DMAH (µg)	Ölçülen Miktar-1	Ölçülen Miktar-2	Ölçülen Miktar-3	Ort	SS	SH	±GS	BS (%)
10	11.1	9.3	10.6	10.3	0.9	0.7	2.8	9.19
20	21.7	18.1	20.9	20.2	1.9	1.3	5.5	9.36
30	28.9	30.0	33.8	30.9	2.5	1.7	7.3	8.16
40	40.8	40.5	42.4	41.2	1.1	0.7	2.9	2.44
50	54.2	50.6	50.8	51.9	2.0	1.4	5.9	3.93
60	62.0	61.9	62.9	62.3	0.5	0.3	1.5	0.836
70	70.4	76.5	76.3	74.4	3.5	2.5	10.2	4.68

D.4.4. Seçicilik Çalışmaları

DMAH'in tayini için kullanılan toluidin mavisi DMAH ile kompleks oluşturur ve rengin şiddeti azalır. Toluidin mavisi ile yapılan bu tayin yönteminin seçiciliğini kanıtlamak üzere formülasyonlarda varolan oranlarda yardımcı madde çözeltileri hazırlanarak maksimum dalga boyu taramaları ve miktar tayinleri yapıldı.

D.4.4.1. Kitozan-TPP Mikropartiküllerinde Seçicilik Çalışmaları

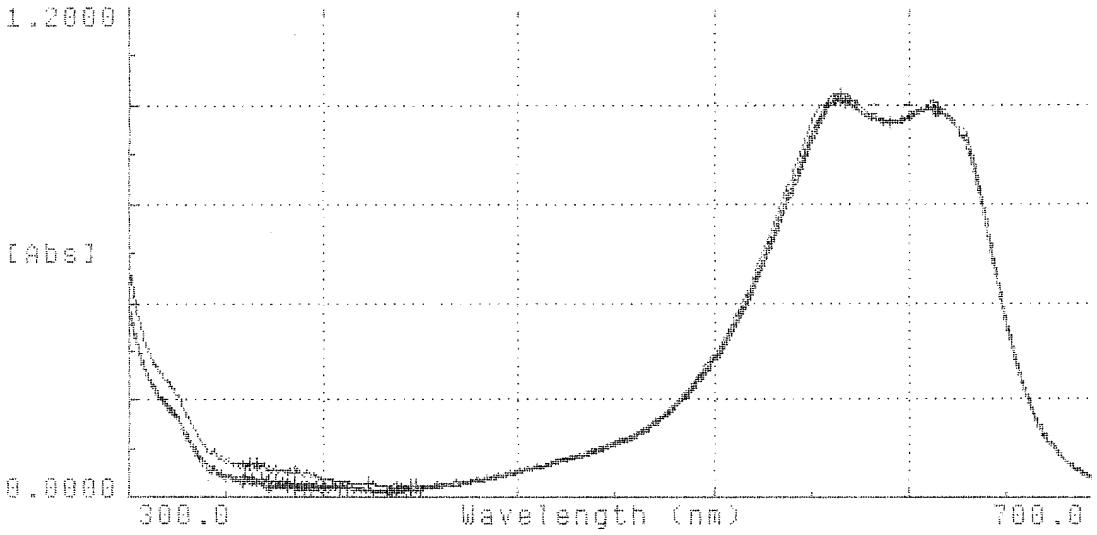
DMAH yüklenmemiş mikropartiküllerin pH 1.2'de ve pH 6.8'de 2 saat karıştırılmasıyla elde edilen çözeltilerden alınan örneklerin spektrumlarının taranması sonucunda piklerde kayma gözlenmedi ve absorbans değerlerinde değişim gözlenmedi. Sonuç olarak yüklenmemiş kitozan mikropartiküllerde etkileşim olmadığına karar verilmiştir (Şekil 15).



Şekil 15. Kitozan mikropartiküllerde pH 1.2 de ve pH 6.8 de absorbans taramaları (Toluidin mavisinin ve kitozan mikropartiküllerin spektrumları üstüste çıkmıştır)

D.4.4.2. Kitozan Tablet Formülasyonundaki Yardımcı Maddelerle Seçicilik Çalışmaları

Toluidin mavisi ile yapılan tayin yönteminin seçiciliğini kanıtlamak üzere tablette varolan oranlarda yardımcı madde çözeltileri hazırlanarak maksimum dalga boyu taramaları yapıldı. Piklerde kayma gözlenmemiştir. Absorbans değerlerinde değişim gözlenmemiştir. Toluidin mavisi ile yardımcı maddeler etkileşmemektedir (Şekil 16).

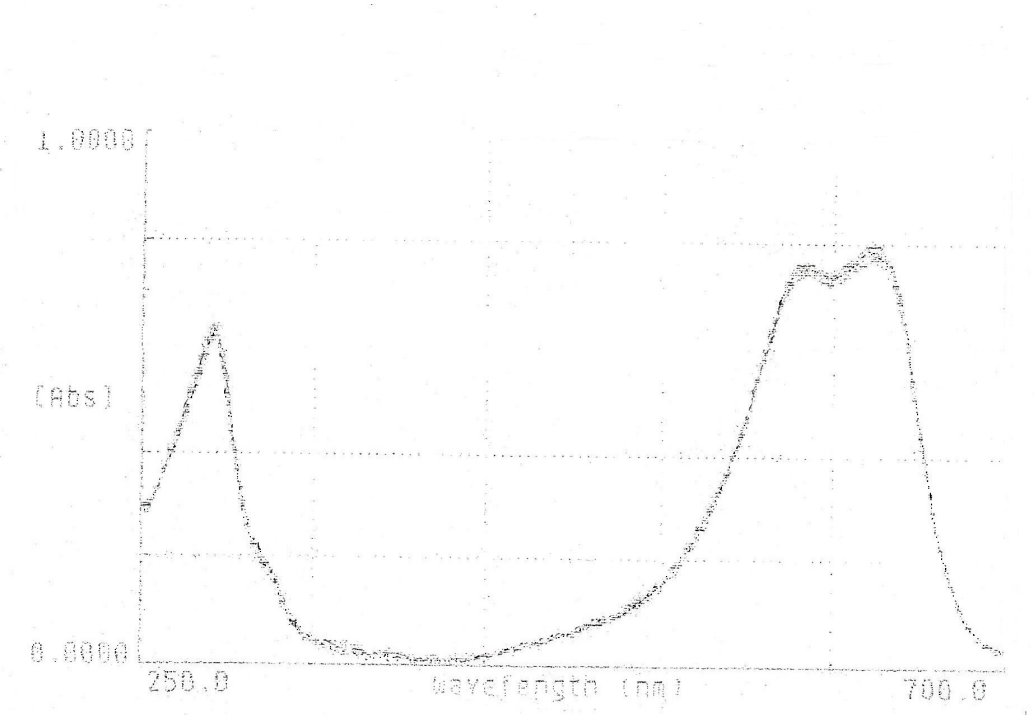


Şekil 16. Yardımcı maddelere ait spektrumlar a. Toluidin Mavisi, b. kitozan, Avicel®, laktoz, Crosscarmellose®, Mg stearat içeren çözelti (Toluidin mavisinin ve diğer tüm yardımcı maddelerin çözeltilerinin spektrumları üstüste çıkmıştır)

D.4.4.3. Aljinat Boncuklarda Seçicilik Çalışmaları

DMAH yüklenmemiş boncukların pH 1.2'de 2 saat ve pH 6.8'de 1 saat karıştırılmasıyla elde edilen çözeltiler maksimum dalga boyu ve absorbans değerleri açısından incelendi. DMAH yüklenmemiş boncuklardan alınan

örneklerin spektrumlarının taranması sonucunda, piklerde kayma ve absorbans değerinde değişim gözlenmedi. Sonuç olarak aljinat boncuklarda etkileşim olmadığına karar verilmiştir (Şekil 17).

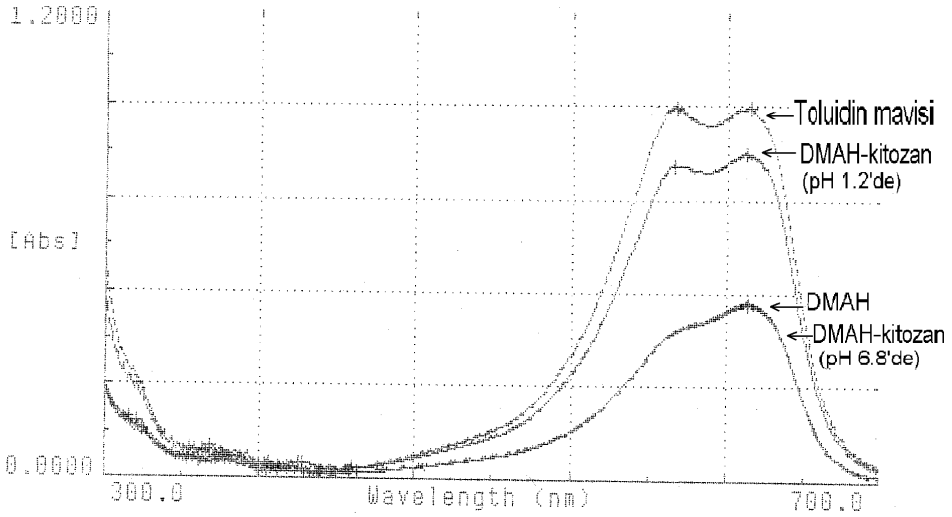


Şekil 17. Aljinat boncuklarda pH 1.2 de ve pH 6.8 de absorbans taramaları (Toluidin mavisinin, pH 1.2'de boncukların ve pH 6.8'de aljinat boncukların spektrumları üstüste çıkmıştır)

D.5. DMAH'nın Kitozanla Etkileşimini İnceleme Çalışmaları

D.5.1. DMAH-Kitozan Arasındaki Etkileşmenin Spektrofotometre ile İncelenmesi

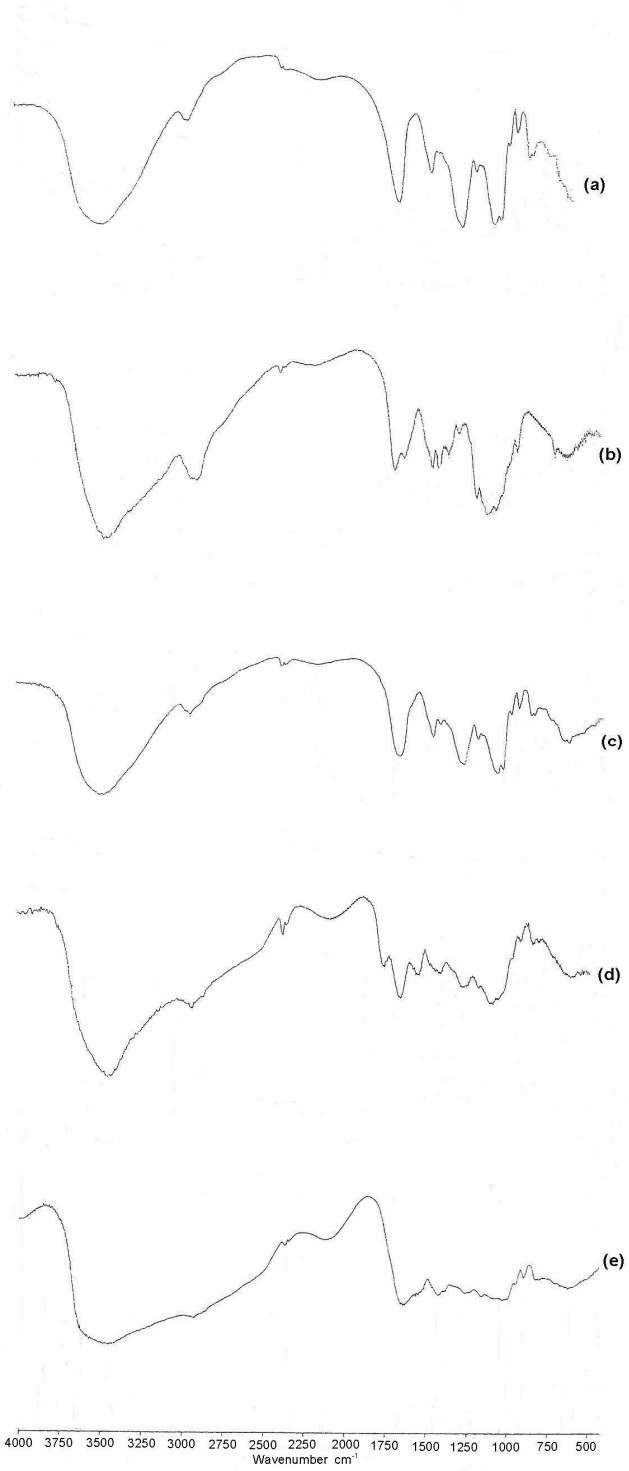
DMAH-kitozan içeren çözelti ile pH 1.2'de, DMAH'in kitozanla etkileştiği ve eklenen miktarın sadece bir kısmının okunduğu gözlenmektedir (Şekil 18). Kitozan pH 6.8'de çözünmemiştir dolayısıyla ortama eklenen DMAH miktarının tamamı ölçülebilmiştir ve DMAH-kitozan piki sadece DMAH içeren çözeltideki pikle üstüste çıkmıştır.



Şekil 18. DMAH-Kitozan etkileşmesinin spektrumları, Toluidin mavisi, DMAH, DMAH-Kitozan (pH 1.2'de ve pH 6.8'de)

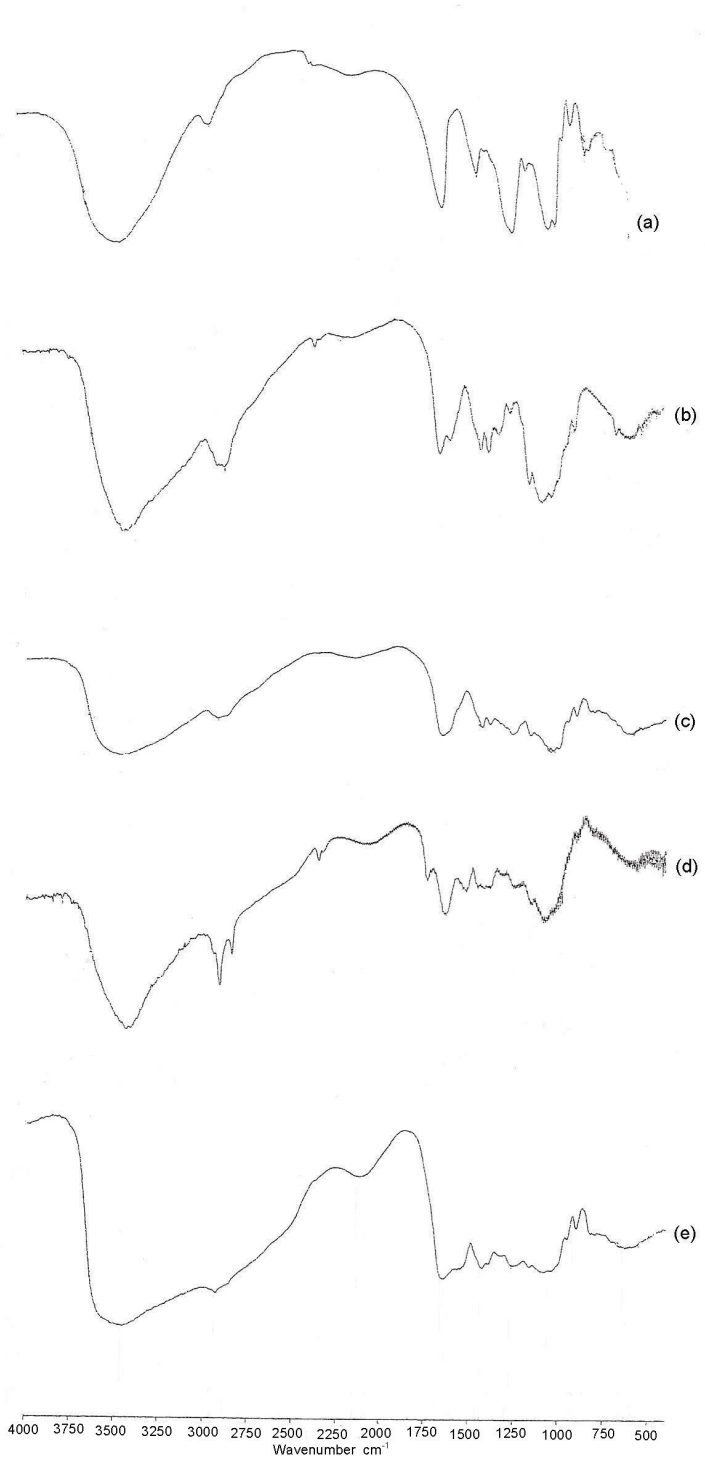
D.5.2. DMAH-Kitozan Arasındaki Etkileşmenin IR Spektrofotometresi ile İncelenmesi

DMAH-Kitozan arasındaki etkileşmenin IR spektrofotometresi ile incelenmesi amacıyla DMAH-Kitozan oranları 1:1 ve 1:2 olacak şekilde % 1'lik kitozan çözeltisine (% 1'lik asetik asitteki ve 0.1 N HCl'deki) DMAH eklendi ve oluşan kompleks analiz edildi (Şekil 19A ve 19B).



.

Şekil 19A. Kitozan-DMAH etkileşimlerinin IR spektrumları a. DMAH, b. Kitozan c. DMAH-Kitozan fiziksel karışım (1:1), d. DMAH-Kitozan (1:1), 0.1 N HCl'de, e. DMAH-Kitozan (1:1), % 1 asetik asitte.



Şekil 19B. Kitozan-DMAH etkileşimlerinin IR spektrumları a. DMAH, b. Kitozan c. DMAH-Kitozan fiziksel karışım (1:2), d. DMAH-Kitozan (1:2), 0.1 N HCl'de, e. DMAH-Kitozan (1:2), % 1 asetik asitte.

D.6.Formülasyon Çalışmaları

DMAH içeren oral uygulamaya yönelik ilaç şekilleri olarak kitozan mikropartikül, kitozan tablet, siklodekstrin çözelti ve aljinat boncuk formülasyonları hazırlandı. Bu amaçla yapılan önformülasyon ve formülasyon çalışmalarına ait bulgular aşağıda verilmiştir.

D.6.1. Kitozan Mikropartikül Hazırlamak İçin Önformülasyon Çalışmaları

Önformülasyon çalışmalarında etkin madde içermeyen ve içeren mikropartiküller hazırlamak amacıyla farklı yöntem ve farklı maddeler kullanıldı. Elde edilen bulgular aşağıda gösterilmiştir.

D.6.1.1. Doğrudan Sertleştirici İlavesiyle Kitozan Mikropartikülleri Hazırlama

TPP çözeltisinin (4 mL), % 1 (h/h) asetik asitte hazırlanmış olan kitozan çözeltisine (2 mL) damla damla eklenmesiyle elde edilen sonuçlar Tablo 21'de verilmiştir. Kaynak çalışmalarda da olduğu gibi aglomere olmayan ve berrak çözelti şeklinde kalmayan formülasyonlar amaçlandı[220,221]. Sadece "2" numaralı formülasyon opak süspansiyon şeklindedir ve istenilen özellikleri taşımaktadır. "Formülasyon 2" mikroskopta incelendi ve küçük partiküller gözlendi. Ancak küresel partiküllerin yanısıra çok sayıda iğsi ve ipliksi polimer parçaları gözlendi. Kuruduğunda şeffaf zarımsı bir yapı oluştu ve ürün homojen toz halde elde edilemedi. Mekanik karıştırıcıda deney tekrarlandığında 1000 devirde de aynı şekilde düzensiz polimer parçacıkları oluştu.

Tablo 21. Doğrudan Sertleştirici (TPP) ilavesiyle hazırlanan kitozan mikropartikül formülasyonları

Formülasyon	Kitozan Yüzdesi	TPP Yüzdesi	pH (başlangıç-sonuç)	Sonuç
1	0.2	0.1	3.6-3.7	Berrak çözelti
2	0.2	0.2	3.6-3.7	Opak süspansiyon
3	0.2	0.4	3.6-3.8	Opak süspansiyon/ aglomerasyon
4	0.5	0.1	3.8-4.3	Seyreltik opak süspansiyon
5	0.5	0.2	3.8-4.3	Opak süspansiyon/ aglomerasyon
6	0.5	0.4	3.8-4.3	Aglomerasyon
7	1	0.1	4.0-4.5	Aglomerasyon
8	1	0.2	4.0-4.5	Aglomerasyon
9	1	0.4	4.0-4.5	Aglomerasyon

D.6.1.2. Emülsiyon Oluşturup Sertleştirici Bir Madde İlavesiyle Kitozan Mikropartikül Hazırlama

Bu amaçla yapılan yedi grup 21 adet kitozan formülasyon denemesine (KFD) ait değişkenler daha önce bölüm C.2.6.1.1.2.'de Tablo 6'da gösterilmiştir. Bulgular aşağıdaki şekildedir:

KFD 1 grubunda 1000 devirde stabil emülsiyon oluşmadı, 8000 devirde agregasyon ve sertleşme problemleri gözlendi.

KFD 2 formülasyonlarında 1 mL glutaraldehit eklendiğinde mikropartiküllerde sertleşme olmazken, 2 mL ile mikropartikül elde edilmiştir . Glutaraldehit yerine toksik etkisi olmayan farklı bir sertleştirici için önformülasyon çalışmaları yapılmasına karar verildi.

KFD 3 grubunda sertleşmeme ve partiküllerin ara fazda kalıp ayrılamaması problemi gözlendi.
KFD 4 formülasyonlarında 700 devirde büyük damlacıklar gözlendi. Karıştırma hızını artırınca mikropartikül oluşumu ile ilgili problem ortadan kalktı, ancak yağlı faz ortamdan tam olarak uzaklaştırılamadı.
KFD 5 formülasyonlarında sadece 8000 devirde emülsiyon elde edilebildi. Ancak küçük ve homojen partiküllü görünen sistem daha sonra agrege oldu. Ayırmak mümkün olmadı. Süzüldüğünde kremsi bir yapı kaldı.
KFD 6 formülasyonlarında düşük karıştırma hızlarında emülsiyon oluşmadı. Ancak 6000 ve 8000 devirde emülsiyon oluştu. Bu formülasyonlarda da agregasyon ve ayırma problemleri gözlendi.
KFD 7 formülasyonunda emülsiyon oluştu. Mikropartiküller düzgün şekilli ve gözle görünür şekildedir.

Sonuçta kitozan mikropartikül hazırlamak için dış faz olarak sıvı parafin, emülgatör olarak Tween 80, sertleştirici olarak % 1 TPP çözeltisi kullanılarak 1200 devirde iyi sonuç alınmıştır. KFD 7 grubu ile çalışmalara devam edilmiştir.

D.6.1.3. Emülsiyon Yöntemiyle ve TPP kullanarak Kitozan Mikropartikülleri Hazırlamada Optimum Şartların Belirlenmesi

Kitozan, sıvı parafin, Tween 80 ve TPP kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait değişkenler bölüm C.2.6.1.1.2.1'de Tablo 7'de gösterilmiştir. Toplam çalışma miktarı, sertleştici madde miktarı, emülsiyon oluşturma devri, emülsiyon oluşturma süresi, sertleştirme devri, sertleştirme süresi, yıkama çözeltisinin bileşenlerinin oranı ve yıkama miktarının etkilerini incelemek için 10 formülasyon denemesi yapıldı. Bu formülasyonların hazırlanması sırasındaki gözlemler aşağıdadır:

K1: Emülsiyon oluştu. Kitozan çözeltisine -model madde olarak- eklenen metilen mavisi, TPP çözeltisinin ilavesinden sonra su fazına çıktı. Mikropartiküller düzgün şekilli gözle görünür büyüklüktedir.

K2: Emülsiyon oluştu. Çok küçük partiküller dipte çöktü. Mikroskop görüntüleri küresel ve düzgündür. Kuruduğunda zarımsı bir tabaka şeklinde yapı oluştu.
K3: Emülsiyon oluştu. TPP azaltıldığında kremsi viskoz bir yapı oluştu. Santrifüjle çok küçük partiküller dipte çöktü. Mikroskop görüntüleri küresel ve düzgün. Kuruduğunda zarımsı bir tabaka şeklinde yapı oluştu.
K4: Emülsiyon oluştu. TPP azaltıldığında kremsi viskoz bir yapı oluştuğundan ve miktar da fazla olduğundan (2 kat fazlası çalışıldı) sıvının hepsi homojen karışamadı.
K5: Emülsiyon oluştu. Verim düşük (% 50) bulundu.
K6: Emülsiyon oluştu. Verim düşük (% 53) bulundu.
K7: Emülsiyon oluştu. Verim % 67.5 bulundu. Kurutulmuş partiküller hafif yağlı görünmektedir.
K8: Emülsiyon oluştu. Verim % 65 bulundu. Partiküller yağdan arınmış görünmektedirler. Ancak yıkamalar sonunda partiküller gevşedi ve tanecikli yapı bozuldu.
K9: Emülsiyon oluştu. Verim % 57 bulundu . Yağlı görüntü oluşmadı. Santrifüj hızı 3000 g'den 2000'e indirildiğinde üstteki kısım bulanıktı, tam çökme olmayabilir düşüncesiyle hız değiştirilmedi.
K10: Emülsiyon oluştu. Kitozan oranının artırılması verimi (% 53) artırmadı.

Formülasyonlar emülsiyonun oluşması, emülsiyonun yapısı, partiküllerin şekli ve boyutu, yağlı fazı ayırabilme, mikropartikül verimi ve kuru partiküllerin şekli açısından değerlendirildiğinde DMAH içeren mikropartikül hazırlamak için K6 formülasyonu ile çalışmalara devam edilmesi kararlaştırıldı.

D.6.1.4. DMAH İçeren Mikropartikül Hazırlamak İçin Çalışmalar

D.6.1.4.1. Hazırlama Sırasında DMAH'i Yükleme Çalışmaları

D.6.1.4.1.1. İç Faza DMAH Ekleme Denemeleri

DMAH içeren kitozan mikropartikül hazırlamak amacıyla, kitozana doğrudan toz halde eklenen DMAH bulanıklık ve agregat oluşumuna neden olduğundan, DMAH çözeltisini düşük konsantrasyonlarda ekleyerek agregat oluşturmadan yüklenip yüklenemeyeceği araştırıldı.

DMAH çözeltisinin (% 0.4'lük, 1 mL) kitozan çözeltisine (% 2'lik, 10 g) eklenmesiyle agregasyon gözlendi. Bunun üzerine % 0.2, % 0.1, % 0.05 derişimlerde DMAH çözeltisi, bulanıklık oluşana kadar kitozan çözeltisine (% 2'lik, 5 g) eklendi ve DMAH yükleme kapasitesi titrasyonla araştırıldı. Elde edilen bulgular şu şekildedir:

- ✓ Kitozan çözeltisine (% 0.2) DMAH çözeltisi eklendiğinde 0.2 mL'de agregasyon gözlendi.
- ✓ Kitozan çözeltisine, (% 0.1) DMAH çözeltisi eklendiğinde 0.2 mL'de agregasyon gözlendi.
- ✓ Kitozan çözeltisine, (% 0.05) DMAH çözeltisi eklendiğinde 0.7 mL'de agregasyon gözlendi.

Sonuç olarak DMAH'i yüklemek için çok fazla DMAH çözeltisi harcanması gerekmektedir. Ayrıca bu sırada kitozanın derişimi de azalacaktır.

D.6.1.4.1.2. Oluşan Emülsiyona DMAH Ekleme

DMAH çözeltisinin eklenmesiyle önce hafif jelleşme gözlendi. TPP ilavesinden sonra da şekilsiz yumuşak damlacıklar gözlendi. Opak, kremsi ve kıvamlı yer yer agrege bir kütle oluştu. Partiküller kolayca ayrılmadı. Düzgün ve homojen dağılıma sahip olmayan partiküller bir miktar yağlı kaldı.

D.6.1.4.1.3. Sertleştirici Çözeltisine DMAH Ekleme

Etkin madde ve sertleştirici çözeltisi miktarı değiştirilerek yapılan dört farklı deneme bölüm C.2.6.1.3.1.3.'de Tablo 8'de gösterilmiştir. Bulgular şu şekildedir:

F1: İlk 50 mL TPP ilavesi ile jel damlacıklar sertleşmedi. İkinci 50 mL TPP ilavesi ile damlacıklar sertleşti. Mikropartikülden miktar tayini sonucu anlamlı çıkmadı.

F2: Emülsiyon oluştu. İlk 50 mL TPP ilavesi ile jel damlacıklar sertleşmedi . Mikroskoptaki görüntü çoklu emülsiyon şeklindedir. İkinci 50 mL TPP ilavesi kremsi ve opak, viskoz bir sıvı oluşmasına neden oldu. Partikül oluşumu

gözlenmedi. Faz değişimi olabileceği nedeniyle su fazının azaltılmasına karar verildi.

F3: Emülsiyon oluştu. Küçük (yaklaşık 300 μm) ve homojen partiküllü bir sistem elde edilmiştir. Mikroskop görüntüleri küresel ve homojendir. Sadece dış fazda kalan DMAH'in miktar tayinine göre, mikropartiküllere etkin madde yükleme oranı % 20 bulunmuştur .

F4: Emülsiyon oluşmuştur. Küçük (yaklaşık 300 μm) ve homojen partiküllü sistem elde edilmiştir. Mikroskop görüntüleri küresel ve homojendir. Dış fazdan miktar tayinine göre, DMAH % 80 yüklenmiş görünmektedir. Ancak aynı formülasyonda mikropartikülden DMAH tayinine göre % 0.5 yükleme hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, hazırlama sırasında mikropartiküllere DMAH yüklenmesinde ve yüklenen miktarın hesaplanmasında tutarlı sonuç alınamamıştır. Mikropartikülü hazırlama sırasında DMAH ile bir etkileşim veya kompleks oluşumu meydana gelmiş olabileceği düşüncesiyle hazır mikropartiküllere sonradan etkin madde yüklenmesine karar verilmiştir.

D.6.1.4.2.Hazırlanan Mikropartiküllere DMAH Yükleme Çalışmaları

DMAH yükleme çalışmasında, pH 1.2'de çözeltide başlangıçtaki DMAH miktarı ve yükleme işleminden sonra kalan DMAH miktarı ölçülerek yapılan yükleme verimi hesabına göre sonuç % 97 bulunmuştur. Yükleme pH 6.8'de % 2.5 ve pH 7.4'de % 73 bulunmuştur. Ancak mikropartiküllerden miktar tayini deneyleri sonucunda pH 1.2'de % 2, pH 6.8'de % 2.5 ve pH 7.4'de anlamsız (yaklaşık % 0) sonuç çıkmıştır. Mikropartikül formülasyonunda yükleme ve miktar tayini deneylerinde toluidin mavisi yöntemiyle sonuç alınamamıştır. Mikropartiküllere yüklenen DMAH tayininde, olası DMAH-Kitozan etkileşmesi nedeniyle problem yaşandığı düşünülmüştür. DMAH ile kitozanın etkileşmeye girmeden fiziksel karışım halinde tablet formülasyonları ile uygulanabileceği düşünülmüştür.

D.6.2. Kitozan Tabletlerde Formülasyon Çalışmaları

D.6.2.1. Tablet Formülasyonları

Tablet formülasyonları bölüm C.2.6.2.1'de anlatılan yöntemle ve Tablo 9'da verilen içerikte olacak şekilde hazırlanmıştır.

D.6.2.2. Tabletlere Uygulanan Testler

Tablet formülasyonlarına sırasıyla aşağıdaki testler uygulandı ve sonuçlar Tablo 22'de gösterildi.

D.6.2.2.1. Tabletlerin Çap ve Yüksekliği

Tabletlerin çap ve yükseklikleri Tablo 22'de gösterilmiştir.

D.6.2.2.2. Tabletlerin Ağırlık Sapması

Tabletlerin ağırlık sapması Tablo 22'de gösterilmiştir.

D.6.2.2.3. Tabletlerin Sertlikleri

Tabletlerin sertlikleri Tablo 22'de gösterilmiştir.

D.6.2.2.4. Tabletlerin Etkin Madde İçerikleri

Tabletlerin etkin madde içerikleri Tablo 22'de gösterilmiştir.

D.6.2.2.5. Tabletlerin Dağılma Süreleri

Tabletlerin dağılma süreleri Tablo 22'de gösterilmiştir.

D.6.2.2.6. Tabletlerde Çözünme Hızı

Tabletlerin çözünme hızı değerleri Tablo 23'de çözünme profilleri Şekil 20'de gösterilmiştir.

Tablo 22. Tablet formülasyonlarına uygulanan farmasötik kontrollerin sonuçları

	FORMÜLASYONLAR				
PARAMETRELER	**F1**	**F2**	**F3**	**F4**	**F5**
Çap (mm) ± GS	7.05 ± 0.00	7.05 ± 0.00	7.05 ± 0.00	7.05 ± 0.00	7.05 ± 0.00
Yükseklik (mm) ± GS	3.54 ± 0.03	3.55 ± 0.01	3.53 ± 0.05	3.53 ± 0.05	3.53 ± 0.04
Sertlik (N) ± GS	69.3 ± 7.5	72.3 ± 9.9	64.7 ± 9.5	62.7 ± 9.5	67.8 ± 8.5
Ağırlık (mg) ± GS	119 ± 4	120 ± 9	115 ± 9	108 ± 4	118 ± 5
% E.M. ± GS	33.0 ± 2.7	33.3 ± 1.3	32.5 ± 2.5	32.5 ± 2.1	32.2 ± 0.9
Dağılma (dk)	9.4 ± 0.2	30 ± 1*	-	-	-

*: F2 kısmen dağıldı
F3 ve F4 şişti, fakat dağılmadı
F5 dağılmadı ve şişmedi.

Tablo 23 . DMAH-Kitozan tabletlerde çözünme verileri

süre	**% Çözünen Etkin Madde**				
(dk)	**F1**	**F2**	**F3**	**F4**	**F5**
5	40.0 ± 1.1	37.7 ± 0.1	37.3 ± 0.1	26.0 ± 0.3	9.30 ± 0.80
15	63.0 ± 0.3	58.9 ± 1.7	61.2 ± 5.0	46.6 ± 1.0	7.80 ± 0.80
30	64.5 ± 0.1	61.5 ± 0.1	63.2 ± 0.9	62.0 ± 0.1	12.6 ± 0.5
60	90.8 ± 0.5	99.1 ± 6.0	64.6 ± 9.6	97.1 ± 1.3	21.2 ± 0.5
90	99.1 ± 3.0	104 ± 4	97.6 ± 0.7	97.9 ± 0.3	21.9 ± 0.3

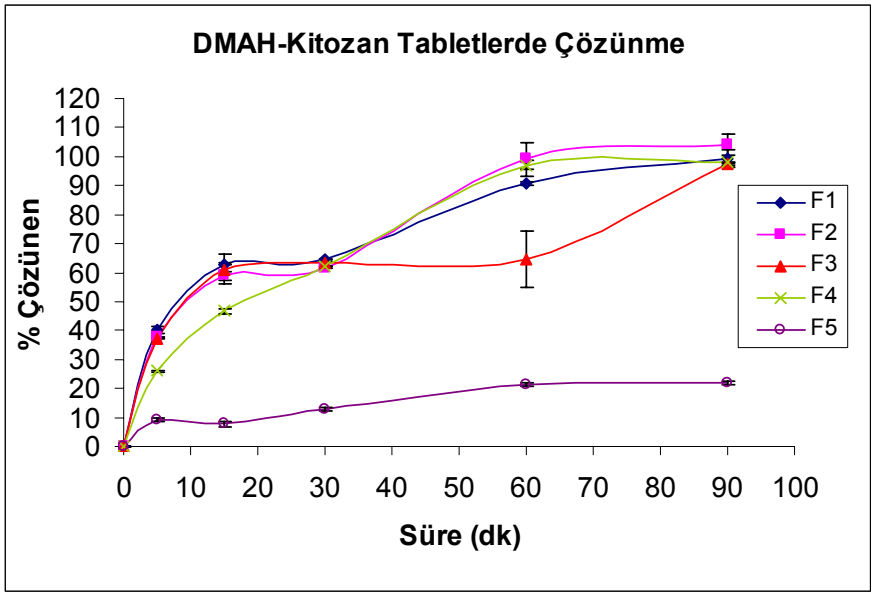
F1: (DMAH:K 1:0.65)

F2: (DMAH:K 1:0.75)

F3: (DMAH:K 1:1)

F4: (DMAH:K 1:1.25)

F5: (DMAH:KK 1:0.75)



Şekil 20. DMAH-Kitozan tabletlerde çözünme profilleri (pH 6.8'de)

D.6.3. Siklodekstrin İçeren Çözelti Formülasyonları

Siklodekstrin (% 5) ve 1500, 3000 ve 5000 IU/kg olacak şekilde DMAH havanda iyice karıştırılarak öğütüldükten sonra sonra distile suda çözüldü ve berrak çözeltiler elde edildi.

D.6.4. Aljinat Boncuk Önformülasyon Çalışmaları

Önformülasyon çalışmalarında DMAH içermeyen boncuklar hazırlanmıştır.

D.6.4.1. Aljinat- Sıvı Parafin İle Yüksek Devirde Emülsiyon Oluşturup $CaCl_2$ İle Sertleştirme

Tween 80 (% 2) içeren sıvı parafine aljinat çözeltisi eklenerek oluşan emülsiyona 0.5 M $CaCl_2$ ilave edilmesiyle çok koyu kıvamlı viskoz opak süspansiyon benzeri oluşum gözlenmiştir. Mikroskopta küçük ve küresele yakın partiküller gözlendi. Partiküller 3000 g'de 3 dk'da çökmedi. Santrifüjle 5000 g'de

5 dk altta kremsi koyu tabaka ayrıldı, üstte -bir miktar sıvı parafinden oluşan- şeffaf bir faz kaldı.

D.6.4.2. Aljinat-$CaCl_2$ İle İyonik Etkileşme ile Yüksek Devirde Boncuk Oluşturma

Aljinat çözeltisi (% 2, 10 mL). 5000 rpm'de karıştırılan 0.5 M $CaCl_2$ çözeltisine damla damla eklendiğinde damlalar $CaCl_2$ çözeltisiyle temas ettikten sonra sertleşmektedir ancak karıştırıcının ucuna takılıp kısa sürede büyük topaklar oluşturmaktadır.

D.6.4.3. Aljinat-$CaCl_2$ İyonik Etkileşme İle Boncuk Oluşturma

Aljinat ve $CaCl_2$ arasındaki iyonik etkileşme sonucu elde edilen boncuklarda değişik parametrelere göre elde edilen veriler Tablo 24'de gösterilmiştir. Bu deneyler sonunda polimer olarak Protonal LF 120 seçilmiştir. Etkin Madde:Polimer oranı, sertleştirme süresi ve $CaCl_2$ oranı değiştirilerek faktöriyel tasarım yapılmasına karar verilmiştir.

Tablo 24. Aljinat boncuk önformülasyonlarında (AÖF) değişkenler ve oranları

	% verim	**Kuru boncuk şekli**	**Damlatma kolaylığı / Süresi**
AÖF1	95.0	küresel	kolay (10 dk)
AÖF 2	98.0	küresel/yassı	kolay (10 dk)
AÖF 3	98.0	yassı, yamuk	kolay (10 dk)
AÖF 4	84.0	küresel	zor (30 dk)
AÖF 5	83.0	yassı, yamuk	kolay (10 dk)
AÖF 6	82.2	yassı, yamuk	kolay (10 dk)
AÖF 7	88.0	küresel	kolay (10 dk)
AÖF 8	60.0	küresel	kolay (10 dk)
AÖF 9	68.5	küresel	kolay (10 dk)

D.6.5. Faktöriyel Tasarımla Aljinat Boncuk Hazırlama

2^3 Faktöriyel tasarım için etkin madde:polimer oranı, sertleştirme süresi ve $CaCl_2$ oranı belirlenen faktörlerdir. Düşük ve yüksek olmak üzere iki seviyeli çalışılmıştır. Faktörler ve seviyeleri daha önce bölüm C.2.6.5., Tablo 11'de gösterilmiştir.

DMAH içeren aljinat boncuklara uygulanan 2^3 faktöriyel tasarım sonucu etkin madde:polimer oranı (X_1), $CaCl_2$ konsantrasyonu (X_2) ve sertleştirme süresi (X_3) bağımsız değişken olarak kullanıldığında elde edilen cevaplar, % tutulan etkin madde (Y_1), ve etkin maddenin % 50'sinin salımı için geçen süre ($t_{\%50,}$ saat -Y_2) Tablo 25'de gösterilmiştir.

Tablo 25. DMAH içeren aljinat boncuklarda faktöriyel tasarımda bağımsız değişkenlere (X_1: etkin madde:polimer oranı, X_2: $CaCl_2$ konsantrasyonu ve X_3: sertleştirme süresi) karşı elde edilen cevaplar (Y_1: % tutulan etkin madde, Y_2: ilacın % 50'sinin salımı için geçen süre , % ($t_{\%50,}$ dakika).

FORMÜLASYON	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2
FH1	1:1	0.1	15	58.6	93.7
FH2	1:1	0.1	30	55.8	54.7
FH3	1:1	0.5	15	64.9	95.0
FH4	1:1	0.5	30	57.2	122
FH5	1:2	0.1	15	69.5	131
FH6	1:2	0.1	30	68.0	125
FH7	1:2	0.5	15	85.4	72.7
FH8	1:2	0.5	30	79.0	85.7

Etkin madde: aljinat oranı (A), $CaCl_2$ konsantrasyonu (B) ve sertleştirme süresinin (C) etkin maddenin % 50'sinin salınması için geçen süre ($t_{\%50,}$ dakika) ve % tutulan etkin madde cevaplarına etkisi incelendi. Bu amaçla faktöriyel tasarım sonucu hazırlanan hazırlanan sekiz formülasyona ait $t_{\%50}$ ve % tutulan etkin madde cevaplarının toplamı (1), a, b, c, ab, ac, bc, abc konu kombinasyonlarına sırası ile yerleştirildi. Tabloda (1) sembolü tüm değişkenlerin

düşük değerde olduğunu göstermektedir. Örneğin (ac) sembolü a ve c değişkenlerinin yüksek değerde b değişkeninin düşük değerde olduğunu göstermektedir. Tablolardaki a, b, c temel etkiyi, ab, ac, bc, abc değişkenler arasında etkileşim olup olmadığını göstermektedir. Tablodaki (+) değişkenin kombinasyonda yüksek değerde, (-) düşük değerde olduğunu göstermektedir. Faktöriyel etki toplamları faktörlere ait (+) ve (-) işaretler doğrultusunda herbir % tutulan etkin madde cevabı ile toplanıp, çıkarılarak hesaplandı. Aynı işlemler $t_{\%50}$ cevabı için de yapıldı.

Bağımsız değişkenlerin her iki bağımlı değişkene (% tutulan etkin madde, $t_{\%50}$) olan etkisi varyans analizi tablosu oluşturularak değerlendirildi.

Etkin madde:polimer oranı (X_1), $CaCl_2$ konsantrasyonu (X_2) ve sertleştirme süresinin (X_3) bağımlı değişkenlere % tutulan etkin maddeye (Y_1) ve ($t_{\%50,}$ saat) (Y_2) karşı polinomyal denkleme uygunluğu araştırıldı, bulunan matematiksel eşitlikler Eşitlik 5 ve Eşitlik 6'da gösterilmiştir.

Etkin madde:polimer oranı, $CaCl_2$ konsantrasyonu ve sertleştirme süresi % tutulan etkin madde ve $t_{\%50}$ cevabına etkisini incelemek üzere oluşturulan hesap matris örneği Tablo 26'da ve Tablo 28'de gösterilmiştir. Faktöriyel tasarımda % tutulan etkin madde ve $t_{\%50}$ için varyans analizi sonuçları Tablo 27 ve Tablo 29'da gösterilmiştir.

Tablo 26. Etkin madde:polimer oranı, $CaCl_2$ konsantrasyonu ve sertleştirme süresinin % tutulan etkin madde cevabına etkisini incelemek üzere oluşturulan hesap matris örneği

Faktöriyel Etki	Konu Kombinasyonları								Faktöriyel Etki Toplamı
	1 175.70	a 208.56	b 194.69	c 167.36	ab 256.06	ac 203.96	bc 171.45	abc 237.12	
A	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	196.5
B	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	103.7
C	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	153.4
AB	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	57.6
AC	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	8.0
BC	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-29.3
ABC	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	0.6

Tablo 27. 2^3 Faktöriyel tasarımda % tutulan etkin madde için varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Deney1	Deney2	Deney3	Ort	Serbestlik Derecesi	Kare Ortalaması	F Oranı
1	57.9	58.8	59.0	58.6	-	-	-
a	69.5	68.8	70.3	69.5	1	1608.93	1860*
b	64.8	63.8	66.1	64.9	1	448.39	520*
c	55.7	56.4	55.3	55.8	1	981.01	114*
ab	85.8	85.7	84.6	85.3	1	138.17	160*
ac	68.0	68.0	67.9	67.9	1	2.70	3.13
bc	57.7	57.9	55.7	57.1	1	35.65	41.4*
abc	78.7	77.9	80.5	79.0	1	0.01	0.0150
Deneysel Hata					14	0.862185	
Serbestlik derecesine göre önemlilik seviyesi					1	*p<0.005	

$$Y_1 = -45.7 + 86.7X_1 + 273X_2 + 4.67X_3 - 208X_1X_2 - 3.60X_1X_3 - 13.2X_2X_3 + 9.88X_1X_2X_3 \quad \text{(Eşitlik 5)}$$

Tablo 28. Etkin madde:polimer oranı, $CaCl_2$ konsantrasyonu ve sertleştirme süresinin $t_{\%50}$'ye etkisini incelemek üzere oluşturulan hesap matris örneği

Faktöriyel Etki	Konu kombinasyonları								Faktöriyel Etki Toplamı
	1 281.0	a 392.0	b 285.0	c 164.0	ab 218.0	ac 375.0	bc 366.0	abc 257.0	
A	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	146.0
B	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-86.0
C	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	378.0
AB	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-498.0
AC	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	58.0
BC	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	254.0
ABC	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-142.0

Tablo 29. 2^3 Faktöriyel tasarımda $t_{\%50}$ için varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Deney1	Deney2	Deney3	Ort	Serbestlik Derecesi	Kare Ortalaması	F Oranı
1	94.0	93.0	94.0	93.7	-	-	-
a	131.0	132	129.0	130.7	1	888.2	72.0*
b	94.0	96.0	95.0	95.0	1	308.2	25.0*
c	59.0	50.0	55.0	54.7	1	5953.5	482*
ab	72.0	72.0	74.0	72.7	1	10333.5	837*
ac	125	125	125.0	125	1	140.2	11.4*
bc	122	122	122	122	1	2688.2	218*
abc	90.0	91.0	76.0	85.7	1	840.2	68.1*
Deneysel Hata					14	12.3	
Serbestlik derecesine göre önemlilik seviyesi					1	*p<0.005	

$$Y_2 = 85.9 - 48.9X_1 + 40.8X_2 + 2.75X_3 + 156X_1X_2 + 1.01X_1X_3 - 11.0X_2X_3 - 1.89X_1X_2X_3 \quad \text{(Eşitlik 6)}$$

D.7. Aljinat Boncuklarda Yapılan Denetimler

D.7.1. Aljinat Boncuklarda Veriminin ve Enkapsülasyon Etkinliğinin Tayini

Aljinat boncuklarda verim ve enkapsülasyon etkinliği hesaplanarak aşağıda Tablo 30'da gösterilmiştir.

Tablo 30. Aljinat boncuklarda verim ve enkapsülasyon etkinliği

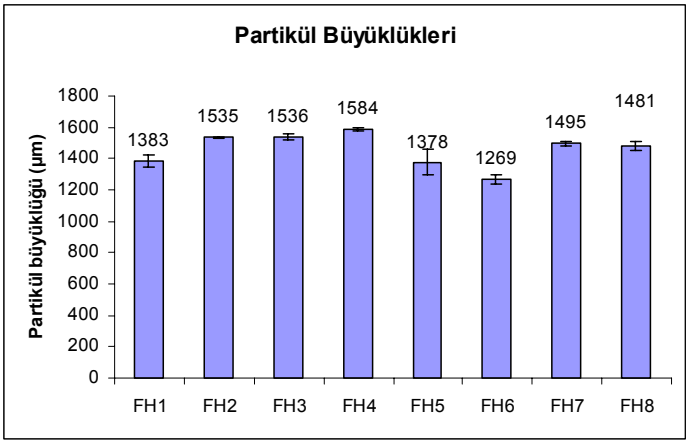
Formülasyon	Boncuk verimi	% Tutulan etkin madde
FH1	80.7	58.6
FH2	81.1	55.8
FH3	90.3	64.9
FH4	79.5	57.2
FH5	79.7	69.5
FH6	81.1	68.0
FH7	98.7	85.4
FH8	90.0	79.0

D.7.2. Aljinat Boncuklarda Partikül Büyüklüğü Tayini

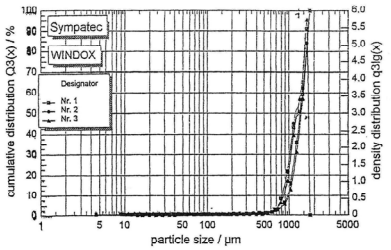
Aljinat boncuklarda partikül büyüklüğü tayini ‘laser diffraction particle sizer’ ile ölçülerek Tablo 31’de gösterilmiştir.

Tablo 31. Aljinat boncuklarının ortalama partikül büyüklüğü

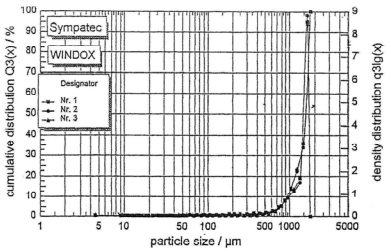
Formülasyon	Partikül boyutu (µm)± GS
FH 1	1383 ± 40
FH 2	1535 ± 40
FH 3	1536 ± 20
FH 4	1584 ± 90
FH 5	1325 ± 90
FH 6	1269 ± 30
FH 7	1496 ± 10
FH 8	1481 ± 30



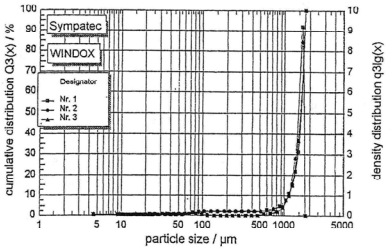
Şekil 21. Aljinat boncuklarda partikül büyüklüğü



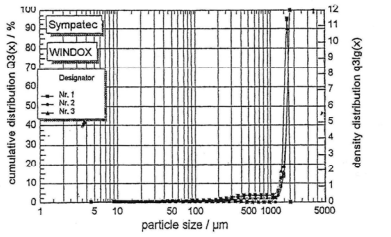
(FH1)



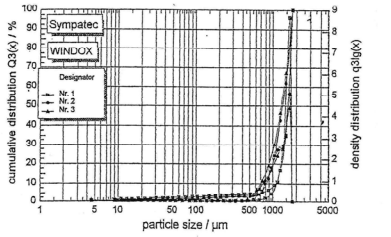
(FH2)



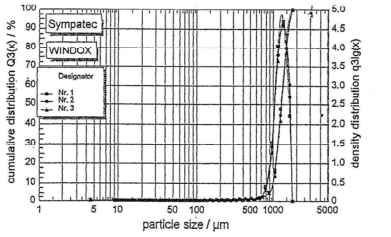
(FH3)



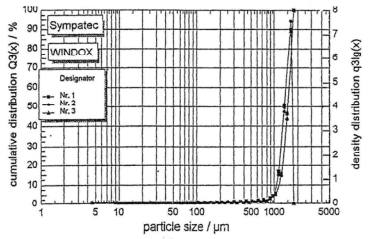
(FH4)



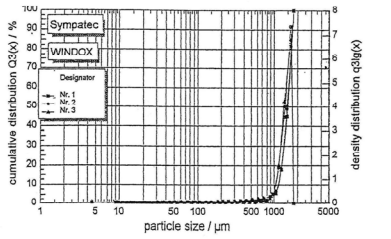
(FH5)



(FH6)



(FH7)

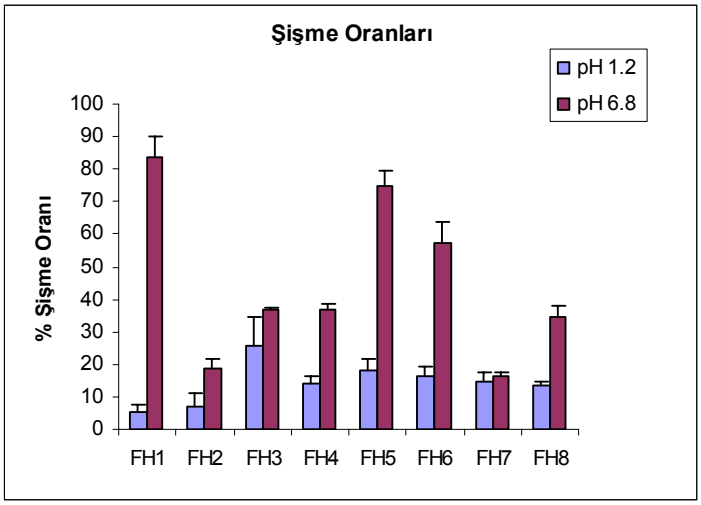


(FH8)

Şekil 22. Aljinat boncukların partikül büyüklüğü dağılımları

D.7.3. Aljinat Boncuklarda Şişme Deneyi

Aljinat boncuklarda pH 1.2 ve pH 6.8'de yapılan şişme deneyi sonuçları Şekil 23'de gösterilmiştir.



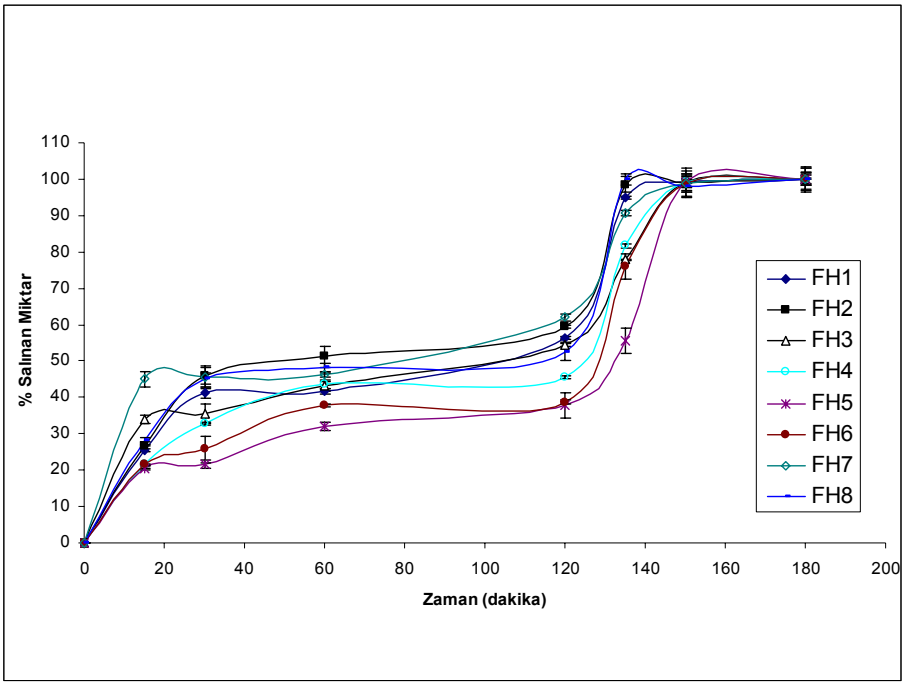
Sekil 23. Aljinat boncuklarının şişme oranları

D.7.4. Aljinat Boncuklarından Etkin Maddenin Çözünme Tayini

Aljinat boncuklarda çözünme hızı deneyi sonuçları Tablo 32'de, çözünme profilleri Şekil 24'de gösterilmiştir.

Tablo 32. Aljinat boncuklardan etkin maddenin çözünme bulguları

Süre (dk)	% Çözünen							
	FH1	FH2	FH3	FH4	FH5	FH6	FH7	FH8
15	25.4 ± 0.3	26.8 ± 0.3	33.8 ± 1.2	21.4 ± 0.3	20.4 ± 0.1	21.5 ± 0.1	45.0 ± 2.2	28.3 ± 0.6
30	41.3 ± 1.6	45.7 ± 2.9	35.5 ± 2.8	32.8 ± 0.5	21.5 ± 1.2	25.7 ± 3.6	45.4 ± 2.8	45.2 ± 1.6
60	41.7 ± 0.8	51.2 ± 2.8	43.2 ± 1.5	43.5 ± 1.0	32.0 ± 1.1	37.9 ± 0.4	46.3 ± 0.6	48.1 ± 1.3
120	56.4 ± 0.3	59.6 ± 0.4	54.5 ± 0.4	45.5 ± 0.4	37.7 ± 3.5	38.7 ± 0.7	62.0 ± 1.0	52.6 ± 2.5
135	94.9 ± 0.5	98.6 ± 2.1	77.8 ± 0.2	81.8 ± 0.6	55.7 ± 3.5	76.1 ± 3.4	90.7 ± 0.7	100 ± 1
150	99.4 ± 1.3	99.2 ± 0.4	99.2 ± 2.1	99.3 ± 2.9	99.3 ± 3.8	98.9 ± 2.6	98.9 ± 1.3	98.1 ± 3.3
180	100 ± 2	100 ± 2	100 ± 3	100 ± 4	100 ± 2	100 ± 0	100 ± 1	100 ± 3



Şekil 24. Aljinat boncuklardan DMAH'in çözünme profilleri

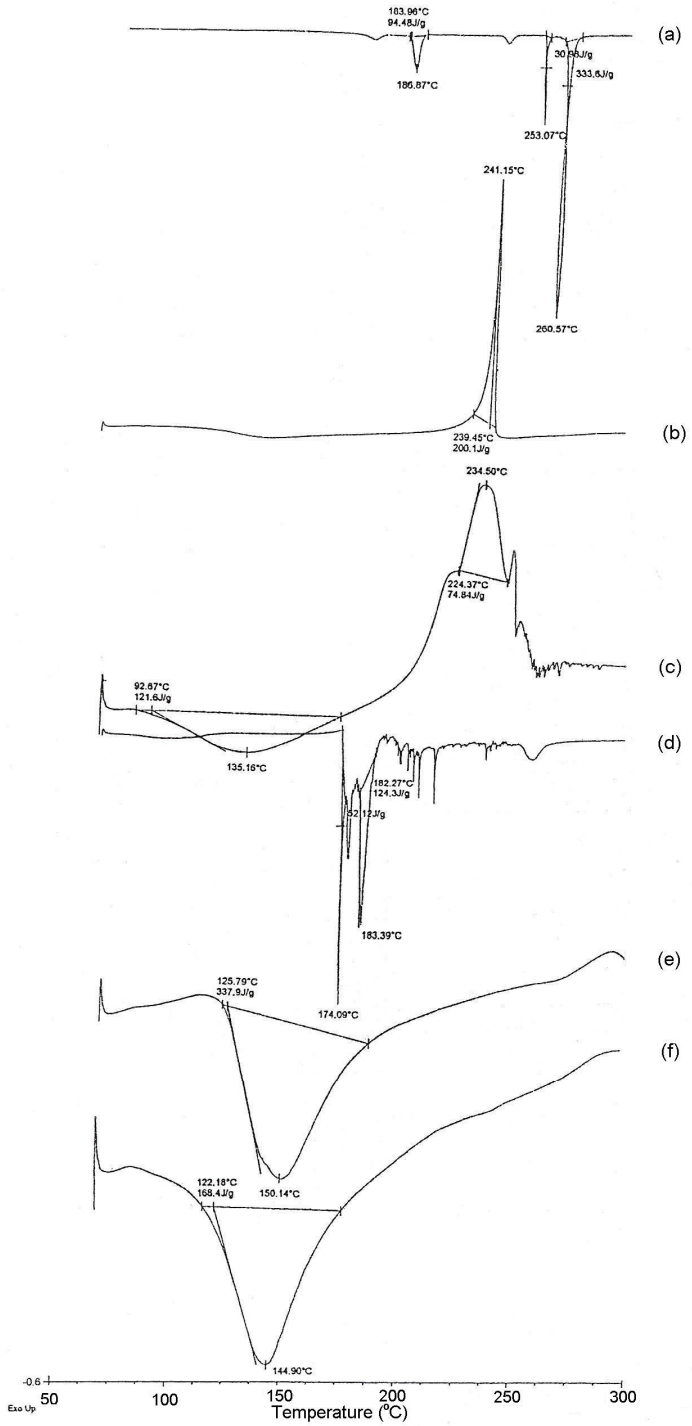
D.8. Aljinat Boncuklarda DMAH-Aljinat Etkileşimlerinin İncelenmesi

D.8.1. DSC Ölçümleri

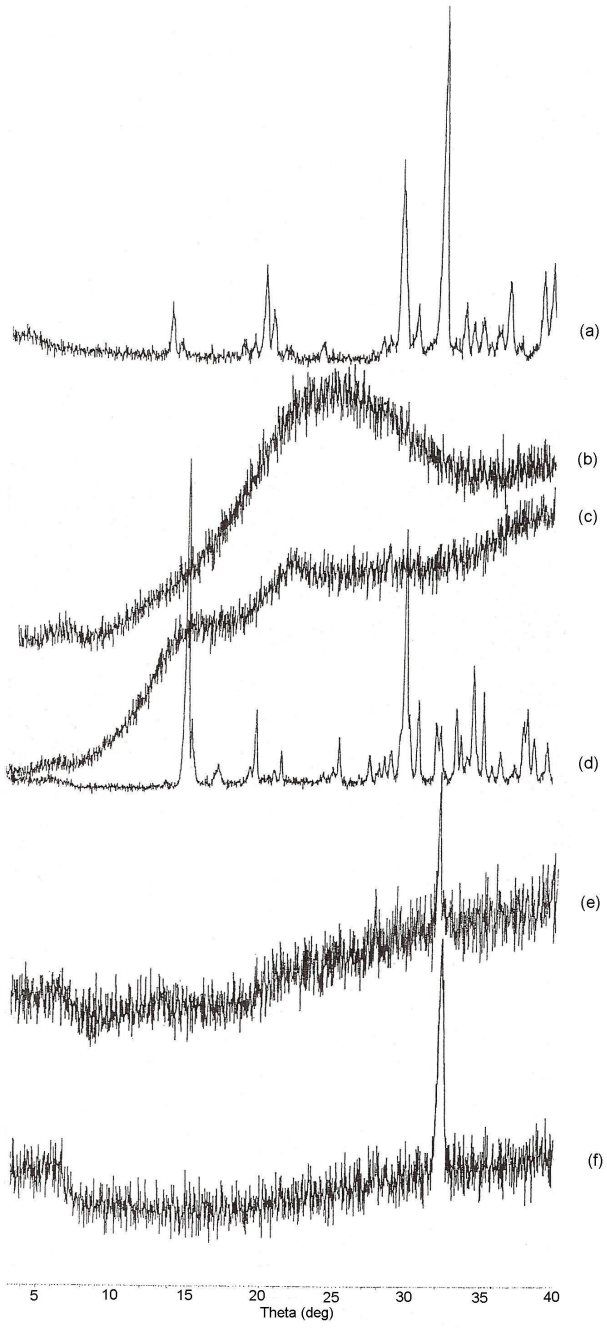
DMAH 239.45ºC'de başlayan ve 241.15ºC'de maksimuma ulaşan ekzotermik pik vererek dekompoze olmaktadır (Şekil 25). Aljinat ise 92.67ºC'de başlayan ve 135.16ºC'de maksimuma ulaşan endotermik erime piki vermektedir. Aljinat boncukta 150.14ºC endotermik pik oluşmuştur, DMAH içeren aljinat boncukta ise endotermik pik 144.90ºC'ye kaymıştır.

D.8.2. X-Işını Kırınımı

DMAH ve aljinatın X-Işını kırınımı örnekleri amorf yapıda olduklarını göstermektedir (Şekil 26). $CaCl_2$ ile kristal pikleri gözlenmektedir. Fiziksel karışım da kristal yapıya ait pikler vermiştir. Aljinat boncukta kristal piki gözlenmektedir. DMAH içeren aljinat boncukta ise kristal piki çok daha şiddetlidir.



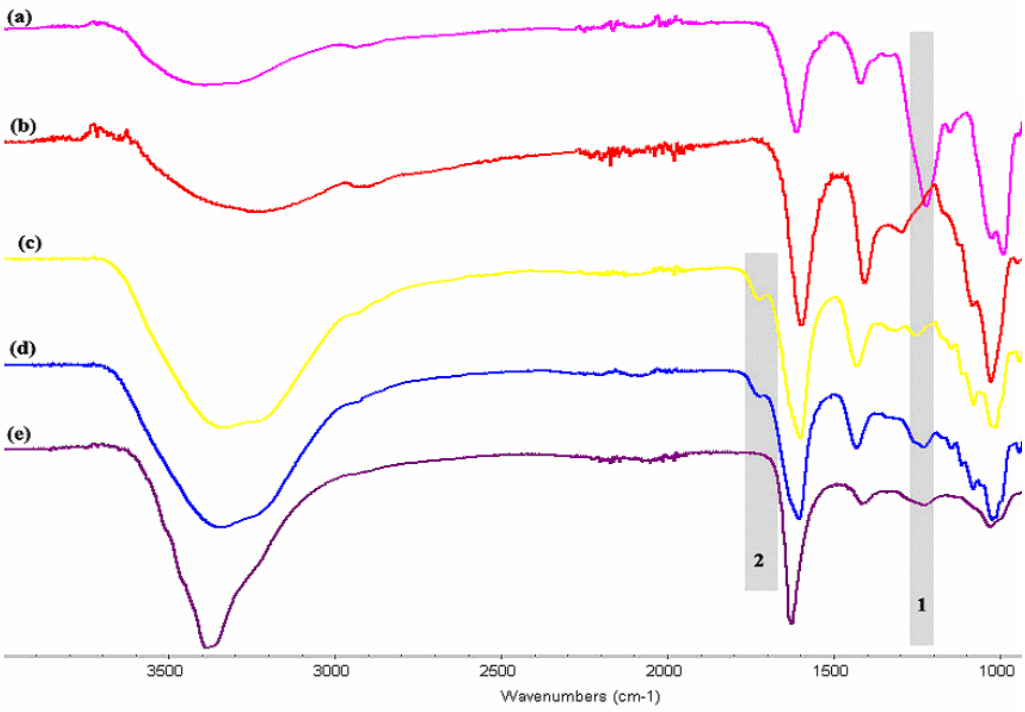
Şekil 25. DSC termogramları: a) $CaCl_2$, b) DMAH, c) Aljinat , d) Fiziksel karışım (DMAH:Aljinat). e) Boş aljinat boncuk f) DMAH içeren aljinat boncuk



Şekil 26. X-ışını kırınımı spektrumları: a) $CaCl_2$, b) DMAH, c) Aljinat , d) Fiziksel karışım (DMAH:Aljinat). e) Boş aljinat boncuk f) DMAH içeren aljinat boncuk

D.8.3. FT-IR ölçümleri

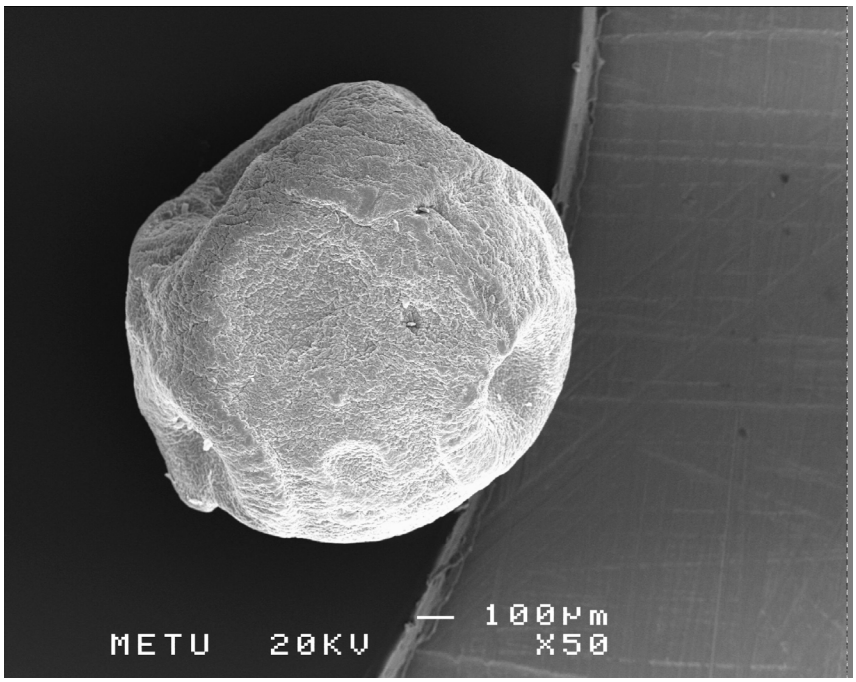
DMAH'deki sülfat ester gruplarına ait 1221 cm^{-1}'deki pik 1a, 1d, 1e'de gözlenmektedir. DMAH'a ait karbonil grubu 1611 cm^{-1} de, aljinata ait karbonil piki 1600 cm^{-1} de gözlenmektedir. DMAH içeren boncuklarda boş aljinat boncuklarda gözlenen omuz (2d) ile beraber DMAH'ın sülfat ester grubuna ait bant (1d) görülmektedir. DMAH'e ait karbonil piki 1603 cm^{-1} de gözlenmiştir. Fiziksel karışımda DMAH'den gelen sülfat ester grubuna ait bant görülmektedir (1e).



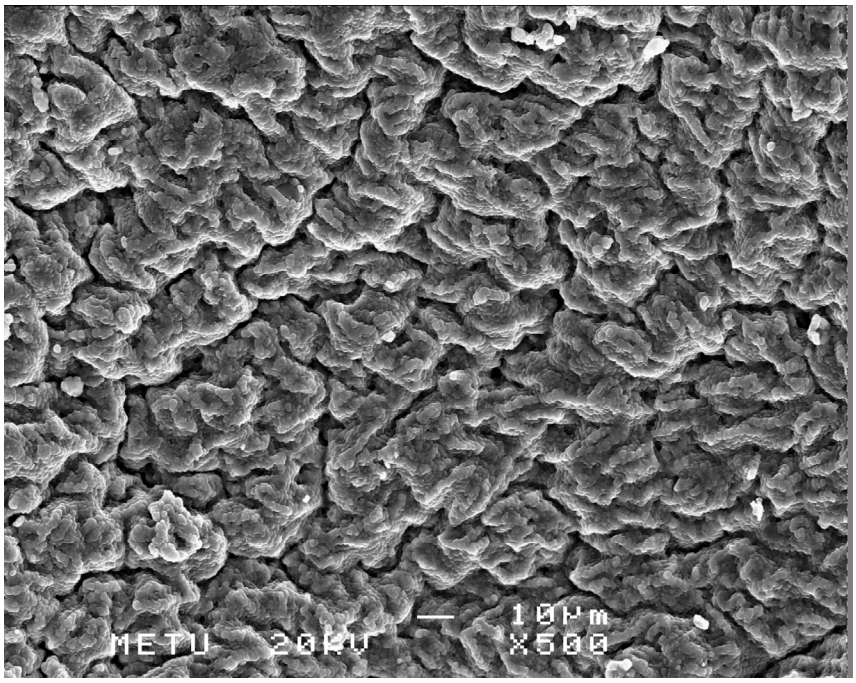
Şekil 27. FT-IR spektrumları: a) DMAH, b) Aljinat, c) Boş aljinat boncuk, d) DMAH içeren aljinat boncuk e) Fiziksel karışım

D.9. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Ölçümleri

Aljinat boncukların yüzey görüntüleri ve genel görüntüleri, pH 1.2'de 2 saat ve pH 6.8'de yarım saat sonraki görüntüleri Resim 1'de gösterilmiştir.

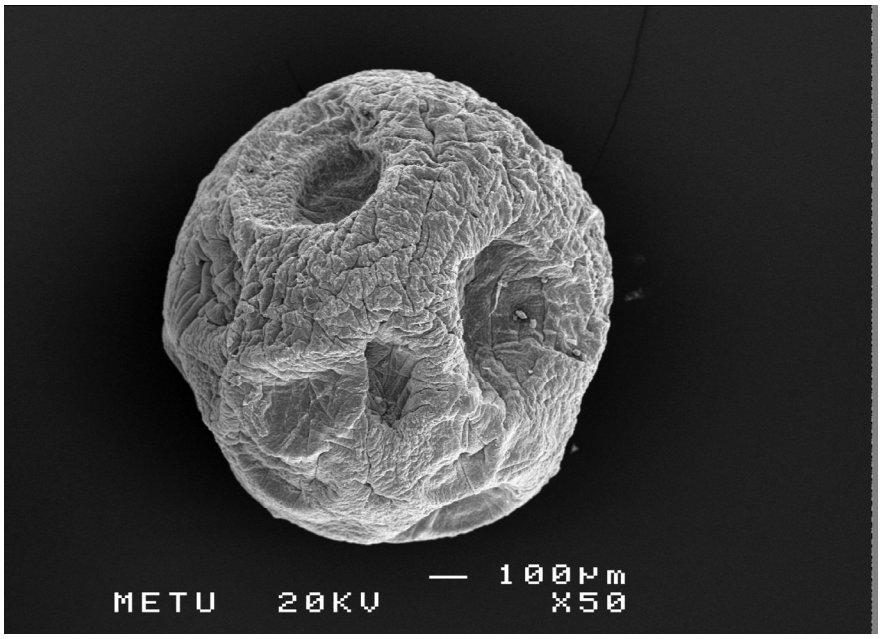


(1)

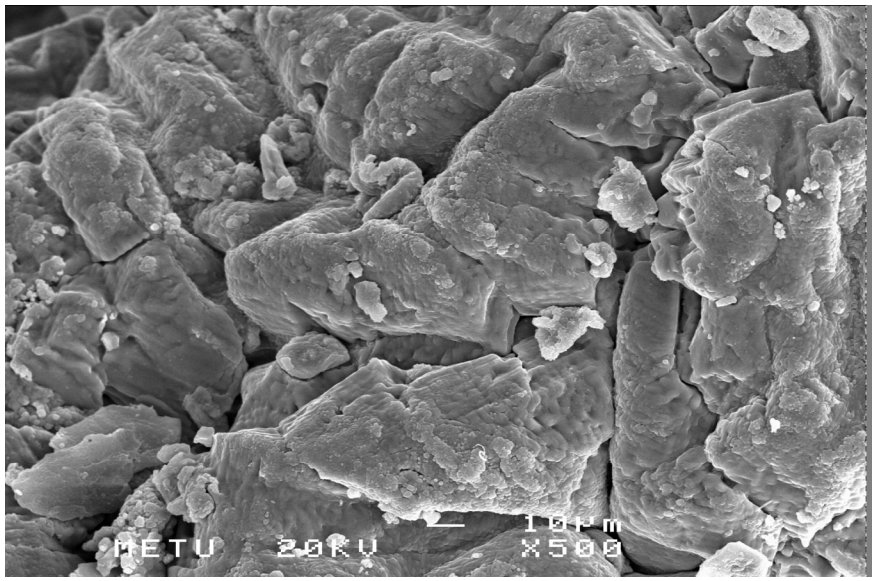


(2)

Resim 1a. SEM görüntüleri: Boş aljinat boncuk
(1) Genel görüntü (2) Yüzey görüntüsü

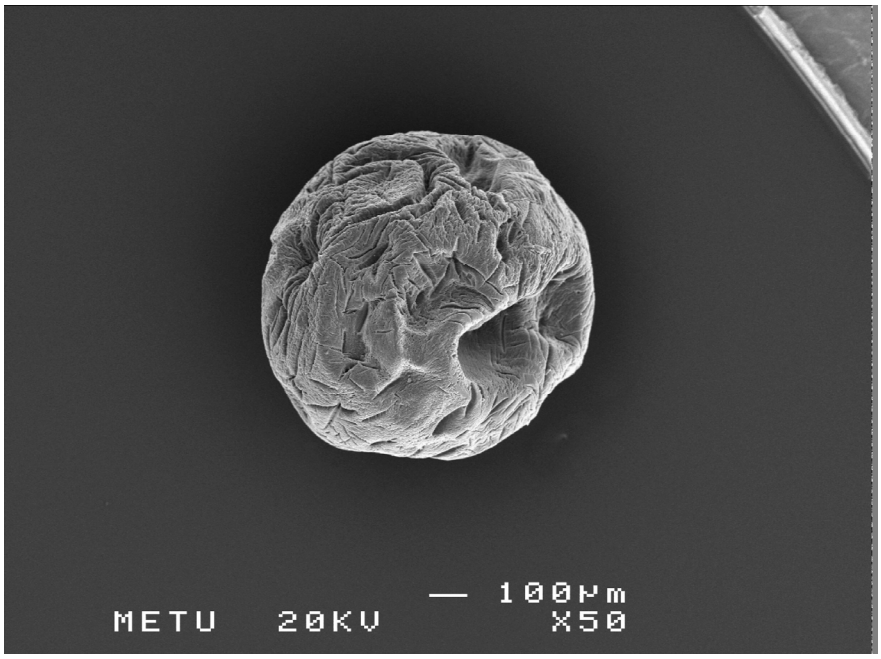


(1)

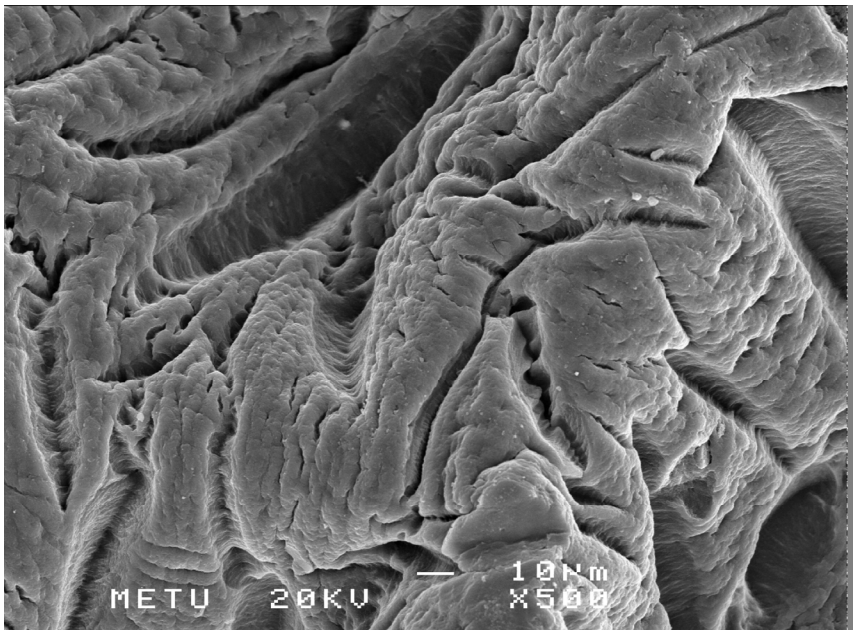


(2)

Resim 1b. SEM görüntüleri: DMAH içeren aljinat boncuk
(1) Genel görüntü (2) Yüzey görüntüsü

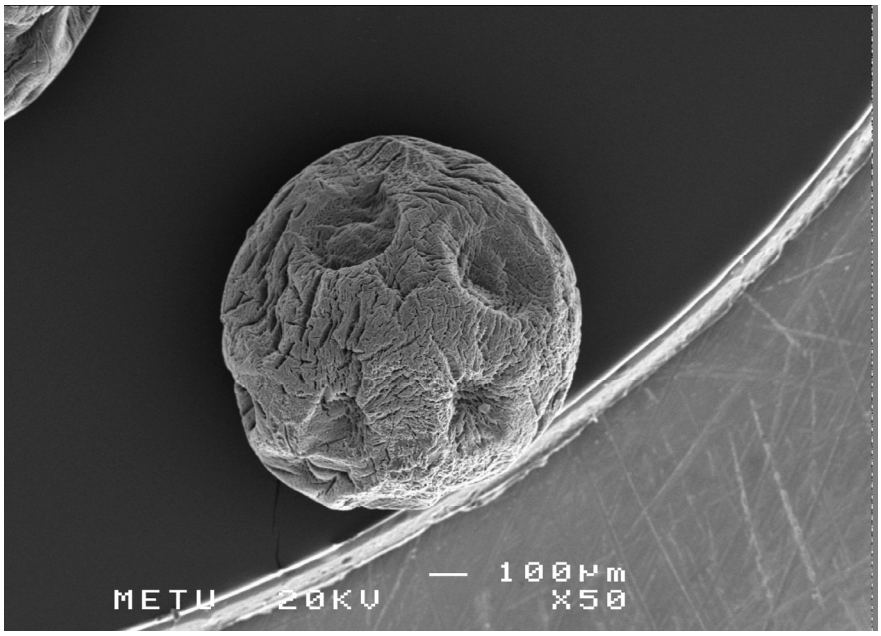


(1)

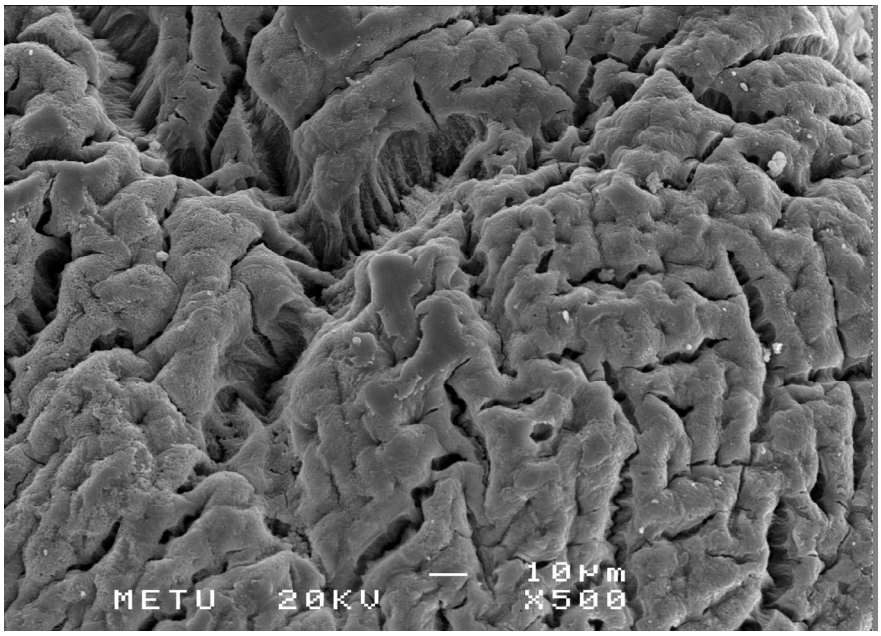


(2)

Resim 1c. SEM görüntüleri: DMAH içeren aljinat boncuk, pH 1.2'de 2 saat sonra (1) Genel görüntü (2) Yüzey görüntüsü

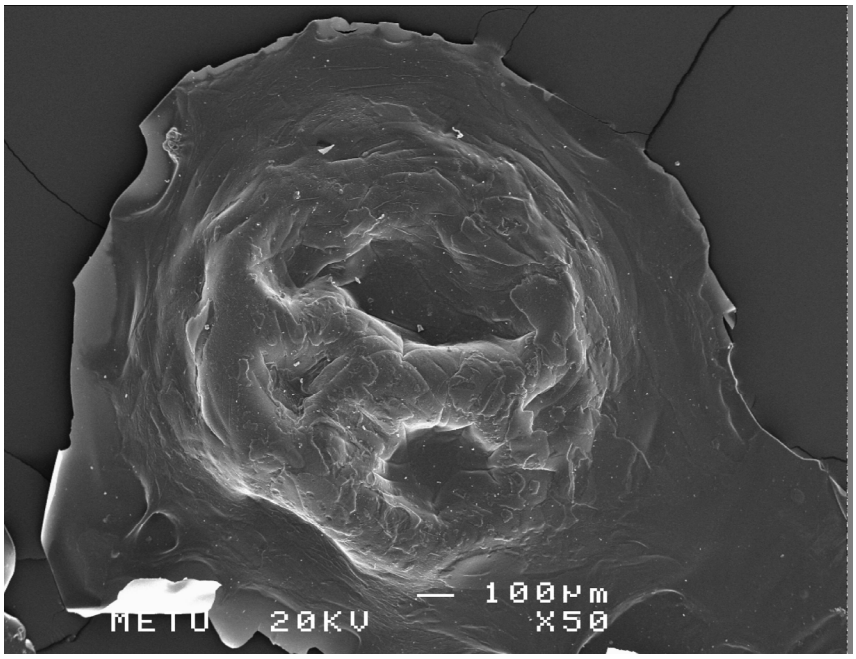


(1)

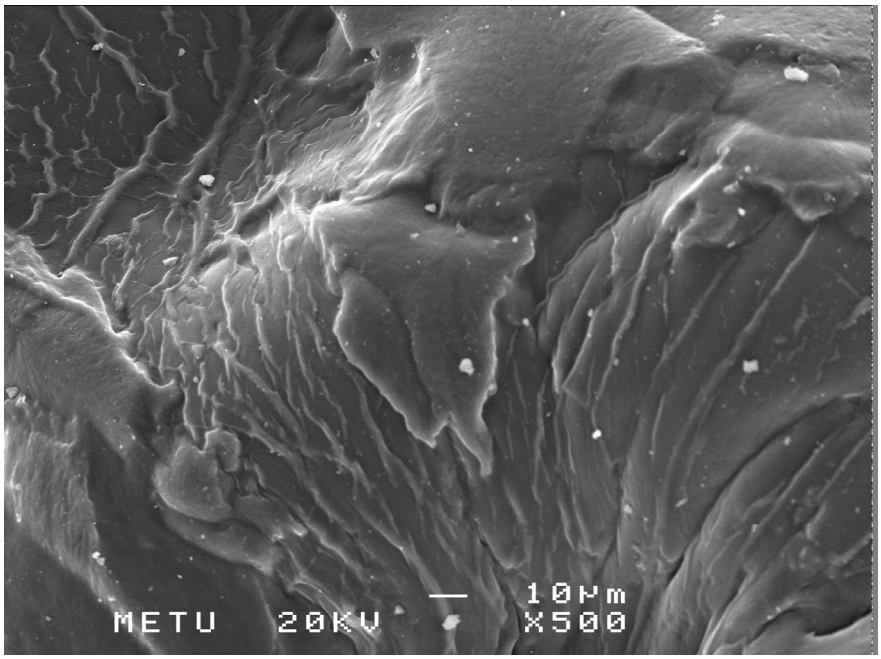


(2)

Resim 1d. SEM görüntüleri: DMAH içeren aljinat boncuk, pH 6.8'de 0.5 saat sonra (1) Genel görüntü (2) Yüzey görüntüsü



(1)



(2)

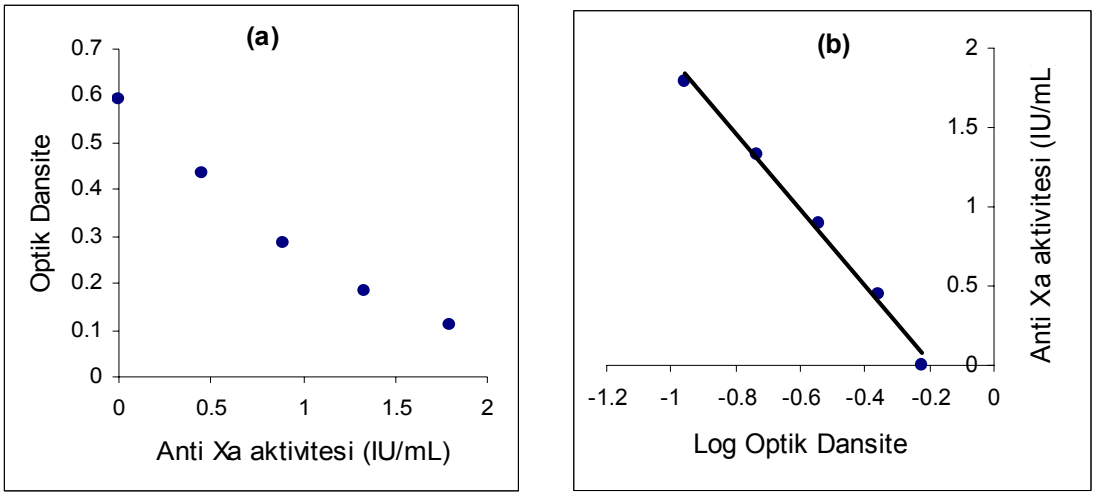
Resim 1e. SEM görüntüleri: DMAH içeren aljinat boncuk, pH 1.2'de 2 saat ve pH 6.8'de 0.5 saat sonra (1) Genel görüntü (2) Yüzey görüntüsü

D. 10. İn Vivo Deneyler

İn vivo deneylerde Yeni Zelanda cinsinde, 2.5-3 kg ağırlığında, erkek tavşanlar kullanıldı. Öncelikle tavşan plazması ile kalibrasyon yapıldı. Ardından oral formülasyonlar etkin madde içerecek ve içermeyecek şekilde kontrol amacıyla uygulandı. Ayrıca DMAH çözeltisi oral ve İV uygulandı. İn vivo deneylerde 0.2 IU/mL AXa plazma seviyesinin sağlanması etkinliğin kanıtıdır. Bu doğrultuda bulgular değerlendirildi. Kitozan tablet ve siklodekstrin çözelti formülasyonları ile doz artırılarak ön denemeler yapıldı. Ön denemelerde başarısız olan formülasyonlar ile daha fazla sayıda tavşanla deneye devam edilmedi. Etkinliğin elde edildiği aljinat boncuklar oral çözelti ile karşılaştırılarak etkinlik artırma oranı hesaplandı.

D.10.1. Tavşan Plazmasında DMAH ile Kalibrasyon

Elde edilen deneysel bulgulardan doğru denklemini tanımlayan kalibrasyon parametrelerinin bulunmasında doğrusal regresyon kullanıldı. Cihazın uyguladığı şekilde kalibrasyon denklemini hesaplarken optik dansitelerin logaritması alındı.



Şekil 28. Anti Xa ölçümü kalibrasyon grafiği (a) Anti Xa aktivitelerine karşılık cihazın okuduğu optik dansiteler (OD), (b) Optik dansitenin logaritmaları alınarak hazırlanmış kalibrasyon grafiği

Tablo 33. Anti Xa ölçümü kalibrasyonunda kullanılan veriler

	Anti Xa aktivitesi (IU/mL)	OD	Log OD
1	0	0.5940	-0.226
2	0.448	0.4365	-0.360
3	0.896	0.2870	-0.542
4	1.334	0.1855	-0.732
5	1.792	0.1115	-0.955

Denklem

$y = -2.43x - 0.472$ (Eşitlik 7)

$R^2 = 0.993$

Anti Xa aktivitesi (IU/mL) = (-2.43*Log OD) -0.472

D.10.2. Herhangi Bir Formülasyon Uygulanmamış Tavşanlarda Yapılan Ölçümler

Herhangi bir uygulama yapılmamış 24 tavşandan alınan kanlarda anti Xa seviyeleri “0” çıkmıştır. Ayrıca iki tavşanda, 6 saat boyunca Tablo 34’de gösterilen sürelerde yapılan ölçümlerde de anti Xa seviyeleri “0” çıkmıştır.

Tablo 34. DMAH verilmeksizin yapılan ölçüm sonuçları

Süre (s)	Tavşan 1 Anti Xa aktivitesi (IU/mL)	Tavşan 2 Anti Xa aktivitesi (IU/mL)	Ortalama Anti Xa aktivitesi (IU/mL)
0	0.00	0.00	0.00
0.5	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00

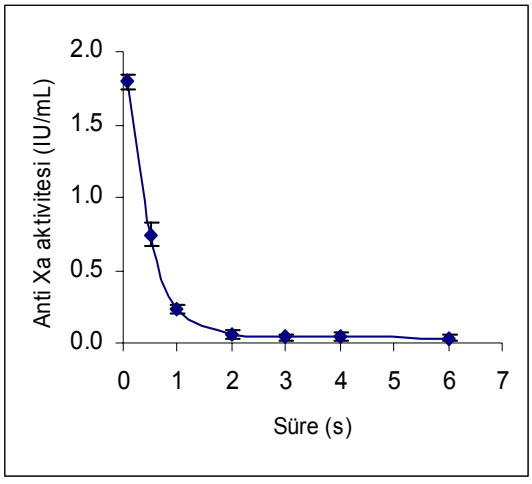
D.10.3. Tavşanlara Uygulanan DMAH Preparatları

D.10.3.1. DMAH Çözeltisinin İV Uygulanması

Tavşanlara 100 IU/kg DMAH'in İV olarak kulak veninden uygulanması sonucu elde edilen bulgular Tablo 35'de, plazma profili Şekil 29'da gösterilmiştir.

Tablo 35. Tavşanlara DMAH içeren (100 IU/kg) çözeltilerin İV uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar (n=5)

Süre (s)	Anti Xa aktivitesi (IU/mL)						SS	SH
	Tavşan1	Tavşan 2	Tavşan 3	Tavşan 4	Tavşan 5	Ort		
0	0.127	0.102	0.0840	0.0930	0.000	0.0814	0.0483	0.0242
0.083	1.76	1.90	1.85	1.63	1.80	1.79	0.10	0.05
0.5	0.661	0.674	0.899	0.931	0.561	0.745	0.161	0.080
1	0.262	0.227	0.269	0.113	0.284	0.231	0.069	0.034
2	0.0966	0.116	0.0787	0.000	0.0149	0.0604	0.0528	0.0264
3	0.0663	0.120	0.00330	0.000	0.000	0.0380	0.0540	0.0270
4	0.0900	0.116	0.00330	0.000	0.000	0.0420	0.0568	0.0284
6	0.0663	0.100	0.000	0.000	0.000	0.0323	0.0480	0.0240



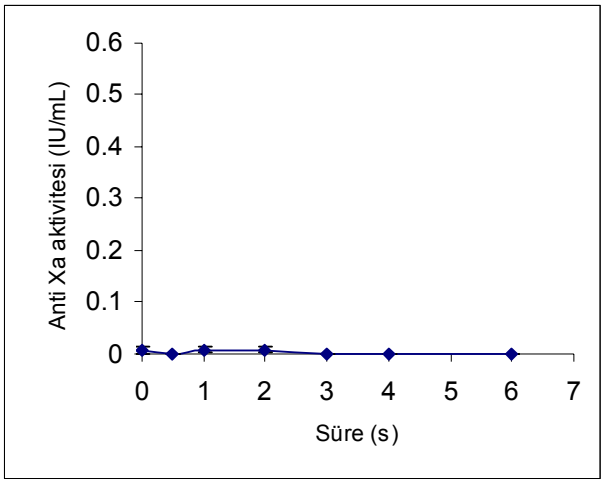
Şekil 29. DMAH içeren (100 IU/kg) çözeltilerin tavşanlara İV uygulanmasıyla elde edilen anti Xa seviyeleri (n=5)

D.10.3.2. DMAH İçeren Çözelti

DMAH (5000 IU/kg) çözeltisi oral yoldan tavşanlara verilmiştir ve sonuçlar Tablo 36'da ve Şekil 30'da gösterilmiştir.

Tablo 36. DMAH çözelti (5000 IU/kg) oral uygulama (n=5)

Süre (s)	Anti Xa aktivitesi (IU/mL)						SS	SH
	Tavşan1	Tavşan 2	Tavşan 3	Tavşan 4	Tavşan 5	Ort		
0	0.000	0.000	0.000	0.0386	0.000	0.00772	0.01726	0.00863
0.5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.000	0.000	0.0284	0.000	0.0166	0.00900	0.01300	0.00650
2	0.000	0.000	0.0149	0.000	0.0300	0.00898	0.01341	0.00670
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



Şekil 30. DMAH çözeltisinin (5000 IU/kg) oral uygulaması ile plazmadaki anti Xa seviyeleri (n=5).

D.10.3.3. Siklodekstrin İçeren Formülasyonlar

Ön deneme amacıyla siklodekstrin (% 5) içeren çözeltilere 1500 ve 3000 IU/kg DMAH eklenerek ve DMAH eklenmeden, tavşanlara oral yoldan gastrik lavajla uygulandı (sırasıyla n=3 ve n=2). Daha sonra 5000 IU/kg DMAH ile % 5 oranında siklodekstrin içeren çözelti (n=5) ve aynı oranda sadece siklodekstrin içeren çözelti (n=5) oral yoldan gastrik lavajla tavşanlara içirildi. Siklodekstrin içeren formülasyonlarla yapılan deneylere ait bulgular Tablo 37, Tablo 38, Tablo 39'da verilmiştir, plazma kan profilleri Şekil 31'de gösterilmiştir.

Tablo 37. Tavşanlara sadece siklodekstrin (% 5) içeren çözeltilerin (SDÇ) oral uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar(n=5)

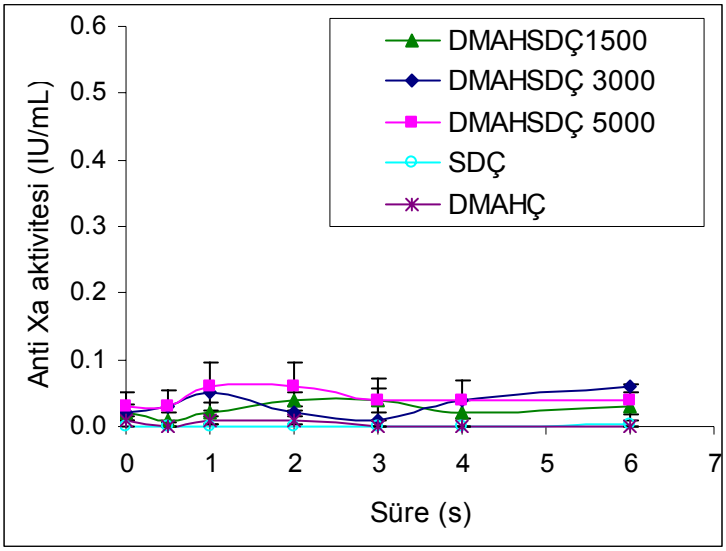
Süre (s)	Anti Xa aktivitesi (IU/mL)						SS	SH
	Tavşan1	Tavşan 2	Tavşan 3	Tavşan 4	Tavşan 5	Ort		
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Tablo 38. DMAH çözeltilerine siklodekstrin eklenmesiyle yapılan in vivo deney sonuçları. DMAH içeriğine göre: 1500 IU/kg (DMAHSDÇ 1500), 3000 IU/kg (DMAHSDÇ 3000), (sırasıyla n=3, n=2)

Süre (s)	Anti Xa aktivitesi (IU/mL)						
	DMAHSDÇ 1500				DMAHSDÇ 3000		
	1.	2.	3.	Ort	1.	2.	Ort
0	0.0386	0.0300	0.00493	0.0245	0.0318	0.000	0.0159
0.5	0.00162	0.0300	0.00493	0.0122	0.0663	0.000	0.0332
1	0.00162	0.0420	0.00493	0.0162	0.0930	0.000	0.0465
2	0.0300	0.0575	0.0317	0.0398	0.0335	0.000	0.0167
3	0.0149	0.0645	0.0317	0.0370	0.0284	0.000	0.0142
4	0.00493	0.0523	0.00493	0.0208	0.0876	0.000	0.0438
6	0.00493	0.0680	0.0317	0.0349	0.118	0.000	0.0593

Tablo 39. Tavşanlara % 5 siklodekstrin içeren DMAH çözeltilerinin (5000 IU/kg) oral uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar(n=5)

Süre (s)	DMAHSDÇ 5000, Anti Xa aktivitesi (IU/mL)						SS	SH
	Tavşan1	Tavşan 2	Tavşan 3	Tavşan 4	Tavşan 5	Ort		
0	0.0420	0.000	0.0284	0.00330	0.0966	0.0341	0.0391	0.0196
0.5	0.0472	0.000	0.000	0.000	0.106	0.0306	0.0467	0.0233
1	0.140	0.000	0.00490	0.000	0.132	0.0553	0.0735	0.0368
2	0.137	0.000	0.000	0.00330	0.135	0.0551	0.0740	0.0370
3	0.0400	0.000	0.000	0.000	0.145	0.0369	0.0627	0.0313
4	0.0352	0.000	0.000	0.0183	0.137	0.0381	0.0573	0.0286
6	0.0318	0.000	0.000	0.0593	0.104	0.0390	0.0439	0.0220



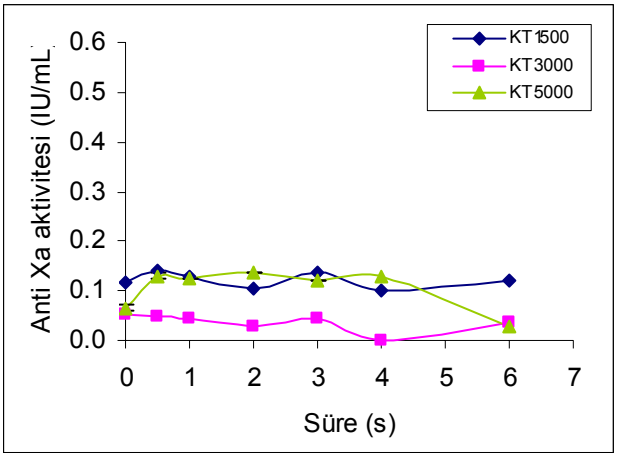
Şekil 31. DMAH çözeltisine % 5 siklodekstrin eklenerek hazırlanan formülasyonların, boş siklodekstrin çözeltisinin (SDÇ) ve DMAH çözeltisinin (DMAHÇ) oluşturduğu anti Xa düzeyleri, DMAH içeriğine göre: 1500 IU/kg (DMAHSDÇ 1500, n=3), 3000 IU/kg (DMAHSDÇ 3000, n=2), (5000 IU/kg) (DMAHSDÇ 5000, n=5) (DMAHSDÇ 3000 ile n düşük olduğundan hata sınırları gösterilmemiştir)

D.10.3.4. Kitozan Tablet Formülasyonları ile Ön deneyler

DMAH içeriği 1500 IU/kg (KT1500), 3000 IU/kg (KT3000), 5000 IU/kg (KT5000) olan tabletler ile ikişer tavşan kullanılarak yapılan ön denemelerde etkinlik gözlenememiştir. Ortalama anti Xa seviyesinin en fazla 0.14 IU/mL'ye çıktığı gözlenmiştir ve bu değerin etkinlik için yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır. Sonuçlar Tablo 40'da ve Şekil 32'de gösterilmiştir.

Tablo 40 . DMAH-Kitozan tabletlerde in vivo ön deneme sonuçları. DMAH içeriğine göre: 1500 IU/kg (KT1500), 3000 IU/kg (KT3000), 5000 IU/kg (KT5000).

Süre (s)	**Anti Xa aktivitesi (IU/mL)**								
	KT1500			**KT3000**			**KT5000**		
	1.	**2.**	**Ort**	**1.**	**2.**	**Ort**	**1.**	**2.**	**Ort**
0	0.160	0.0700	0.115	0.000	0.110	0.0550	0.000	0.130	0.0750
0.5	0.190	0.0912	0.146	0.000	0.090	0.0450	0.000	0.260	0.130
1	0.180	0.0800	0.130	0.000	0.0902	0.0451	0.000	0.250	0.125
2	0.140	0.0701	0.105	0.000	0.0605	0.0303	0.100	0.170	0.135
3	0.210	0.0602	0.135	0.000	0.0914	0.0457	0.0701	0.180	0.125
4	0.0301	0.170	0.100	0.000	0.000	0.000	0.0800	0.180	0.130
6	0.200	0.0801	0.140	0.000	0.170	0.0850	0.0500	0.000	0.0250



Şekil 32. DMAH-Kitozan tabletler ile plazma anti Xa seviyeleri (İkişer tavşanla denemeler yapıldığından hata sınırları verilmemiştir)

D.10.3.5. Aljinat Boncuk Formülasyonları ile Deneyler

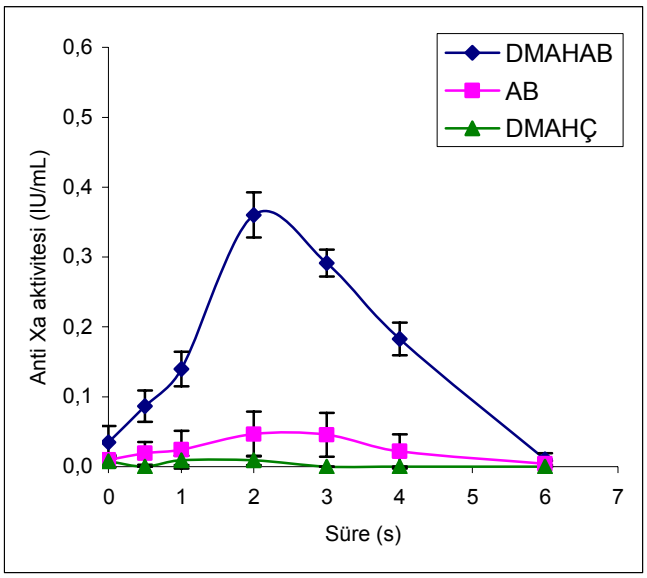
İn vitro deneyler sonucunda seçilen FH7 boncuk formülasyonu 5000 IU/kg DMAH içerecek miktarda ve DMAH içermeyen boncuklar (Tablo 41, Tablo 42 ve Şekil 33) tavşanlara oral yoldan verildi (n=5). Ayrıca DMAH boncuklarına (5000 IU/kg) karşılık, iv uygulanan DMAH çözeltisi (100 IU/kg) Şekil 34'de aynı grafikte karşılaştırılmıştır.

Tablo 41. Tavşanlara DMAH içermeyen aljinat boncukların (AB) oral uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar (n=5)

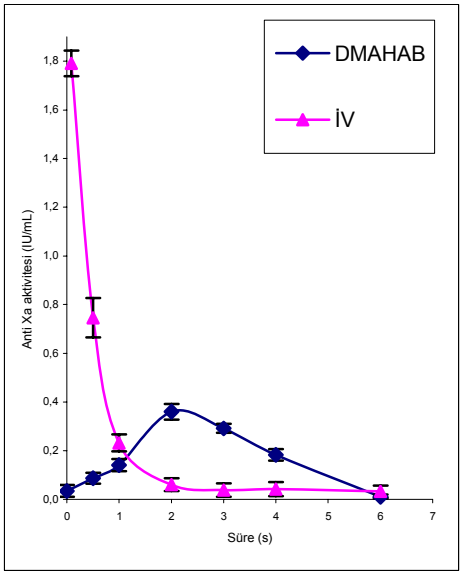
Süre (s)	Anti Xa aktivitesi (IU/mL)						SS	SH
	Tavşan1	Tavşan 2	Tavşan 3	Tavşan 4	Tavşan 5	Ort		
0	0.0200	0.000	0.000	0.0183	0.00990	0.00960	0.00969	0.00489
0.5	0.0200	0.000	0.000	0.0751	0.000	0.0190	0.0325	0.0163
1	0.000	0.000	0.000	0.121	0.000	0.0241	0.0538	0.0269
2	0.130	0.000	0.000	0.104	0.000	0.0468	0.0647	0.0324
3	0.128	0.000	0.000	0.100	0.000	0.0456	0.0632	0.0316
4	0.000	0.000	0.000	0.109	0.000	0.0219	0.0489	0.0244
6	0.000	0.000	0.000	0.0199	0.000	0.00400	0.00890	0.00450

Tablo 42. Tavşanlara DMAH içeren aljinat boncukların (DMAHAB, 5000 IU/kg) oral uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar (n=5)

Süre (s)	Anti Xa aktivitesi (IU/mL)						SS	SH
	Tavşan1	Tavşan 2	Tavşan 3	Tavşan 4	Tavşan 5	Ort		
0	0.0858	0.000	0.000	0.000	0.0876	0.0347	0.0475	0.0238
0.5	0.132	0.0558	0.139	0.047	0.0600	0.0867	0.0446	0.0223
1	0.217	0.0966	0.139	0.0966	0.150	0.139	0.049	0.025
2	0.342	0.301	0.427	0.301	0.429	0.360	0.064	0.032
3	0.324	0.263	0.342	0.263	0.267	0.292	0.038	0.019
4	0.217	0.145	0.217	0.120	0.215	0.183	0.047	0.023
6	0.000	0.0000	0.0149	0.0386	0.000	0.0107	0.0169	0.0084



Şekil 33. DMAHAB, AB ve DMAH formülasyonlarının oral yoldan uygulanmasıyla elde edilen anti Xa seviyeleri (n=5)



Şekil 34. DMAHAB ve İV formülasyonlarının tavşanlara uygulanmasıyla elde edilen anti Xa seviyeleri.

D.11. İn Vivo Deney Sonuçlarının Farmakokinetik ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

İn vivo deneyler sonucu bulunan anti Xa konsantrasyonları zamana karşı grafiğe geçirilerek eğri altına kalan alanlar (AUC), hesaplandı. Hesaplamalar için **BOOMER**[222] bilgisayar programı kullanıldı. Her tavşana ait AUC değerleri Tablo 43'de gösterilmiştir. Tablo 44'de ortalama AUC ve C_{maks} değerleri gösterilmiştir.

Tablo 43. Her tavşana uygulanan formülasyonlara ait AUC değerleri

	AUC 1	AUC 2	AUC 3	AUC 4	AUC 5	Ort AUC	SS	SH
İV[b]	1.20	1.53	1.18	0.948	0.948	1.16	0.24	0.12
DMAHÇ[a]	0.000	0.000	0.0330	0.0100	0.0450	0.0176	0.0204	0.0102
DMAHSDÇ[a]	0.618	0.000	0.00750	0.000	0.777	0.281	0.385	0.192
SDÇ	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
DMAHAB[a]	1.81	0.875	1.29	0.945	1.19	1.22	0.37	0.19
AB	0.275	0.000	0.000	0.554	0.00250	0.166	0.247	0.124

[a]: 5000 IU/kg dozda DMAH uygulandı
[b]: 100 IU/kg dozda DMAH uygulandı

İstatistiksel hesaplar için **SPSS 11.5**[219] bilgisayar programı kullanılmıştır. Tavşanlara uygulanan formülasyonlara ait AUC ve C_{maks} değerleri Tablo 42'de gösterilmiştir.

Tablo 44. Oral yoldan tavşanlara uygulanan formülasyonlara ait AUC ve C_{maks} değerleri

FORMÜLASYON	$AUC_{0-\infty}$	C_{maks} (IU/mL)
İV	1.16 ± 0.12[b]	1.79 ± 0.05
DMAHÇ	0.0176 ± 0.0102	0.00900 ± 0.00650
DMAHSDÇ	0.281 ± 0.192	0.0553 ± 0.0368
SDÇ	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
DMAHAB	1.22 ± 0.19 [a,b]	0.360 ± 0.032
AB	0.166 ± 0.124	0.0468 ± 0.0324

[a]: Bu grubun sonuçları kontrolden (DMAH) anlamlı farklıdır.

[b]: Bu grup diğer tüm gruplardan anlamlı farklıdır.

$p<0.05$

DMAH içeren aljinat boncukların DMAH içeren çözeltiye göre AUC'yi 69.3 kat artırdığı gözlendi. AUC'yi artırma oranı (AO_{AUC}) hesaplanırken aşağıdaki eşitlik 8 kullanıldı.

$$AO_{AUC} = \frac{AUC_{DMAHAB}}{AUC_{DMAHÇ}} \qquad \text{(Eşitlik 8)}$$

DMAH içeren aljinat boncuklarla bağıl ve mutlak biyoyararlanım hesaplandı.

$$Bagil\ Biyoyararlanim = \frac{AUC_{DMAHAB}}{AUC_{DMAHÇ}} \times 100 \qquad \text{(Eşitlik 9)}$$

$$Mutlak\ Biyoyararlanim = \frac{AUC_{DMAHAB}}{AUC_{İV}} \times \frac{Doz_{İV}}{Doz_{DMAHAB}} \times 100 \qquad \text{(Eşitlik 10)}$$

Bağıl biyoyararlanım % 6930 bulundu. Mutlak biyoyararlanım % 2.10 olarak hesaplandı.

DMAH çözelti ile mutlak biyoyararlanım % 0.0303 olarak hesaplandı.

D.12. Tavşan Midelerinin Histolojik Açıdan İncelenmesi

D.12.1. Tavşan Midelerine Ait Birinci Saatteki Bulgular

DMAH Çözeltisi

DMAH çözeltisinin uygulandığı 1. saat grubunda, açık ve koyu sitoplazmaya sahip yüzey epitel hücrelerinin gözlendiği, bu hücrelerde özellikle açık olanların son derece genişlemiş vakuollerle dolu olduğu, epitel salgı içeriklerinin azaldığı, yüzey zarının parçalandığı, hücre yan yüz bağlantı birimlerinin yer yer yok olduğu ve bağlantı birimlerinin yerinde interdijitasyon benzeri yapıların oluştuğu dikkati çekti. Mitokondriyonlar genelde normal

yapılarını korurken, dejenere olan açık hücrelerde yer yer kristolizis dikkati çekti. Daha ileri büyütmeli resimlerde de bu yapısal değişimler belirgin şekilde izlendi (Resim 2 ve Resim 3).

Boş aljinat boncuk

Boş aljinat boncuğun uygulandığı 1. saat grubunda yüzey epitel hücrelerinin oldukça aktif olduğu, biriken salgı granüllerinin oldukça çok olduğu ve hücre apikal yüzünde toplandığı, yer yer sıkı ve ara bağlantı bölgelerinde hafif bir açılma olup bu açıklığın oldukça yoğun bir madde ile dolu olduğu ancak bu açılmaların desmozom bölgelerinde gözlenmediği dikkati çekti. Apikal hücre zarına yakın yer yer küçük veziküllerin varlığı izlendi. Hücre apikal sitoplazmasında granül birikiminin yanı sıra, granüllü endoplazmik retikulum (GER) tubuluslarının genişlediği ve salgı içeriği ile dolu olduğu saptandı. Bu bulgu hücrelerin aktif salgılama döngüsüne girdiğinin bir göstergesi olarak değerlendirildi (Resim 4 ve Resim 5).

DMAH içeren aljinat boncuk

DMAH içeren aljinat boncuğun uygulandığı grupta, yapının korunduğu ve oral heparin uygulanan gruplarla oldukça benzer olduğu dikkati çekti. Küçük büyültmeli resimlerde heparinin etkisinin aljinat ile kısmen önlendiği belirlendi. Yüzey epitel hücrelerinde bağlantı birimleri normal yapıdaydı. Hücre yapısı oldukça korunmuştu, ancak yer yer çekirdek zarında açılmalar ilgiyi çekti. Mitokondriyonlar normal yapıdaydı. Büyük büyültmeli resimlerde normal yapıda bağlantı birimleri ve yüzey hücrelerindeki mukus granüllerinin özgün görünümü izlenirken, bazı hücrelerde otofajik vakuoller ilgiyi çekti (Resim 6 ve Resim 7).

İV DMAH

İV DMAH uygulanan grupta mide yapısının tümüyle normal olduğu ayırt ediliyordu (Resim 8 ve Resim 9).

D.12.2. Tavşan Midelerine Ait İkinci Saatteki Bulgular

DMAH çözelti

DMAH çözeltinin uygulandığı 2. saat grubunda ise yüzey epitel hücrelerinde yüzey zarının dejenerasyonuna koşut olarak salgı granüllerinin

oldukça az olduğu, yer yer vezikül ve vakuollerin sitoplazmada yayıldığı, Golgi sarnıçlarının oldukça genişlediği, yan yüz bağlantı birimlerinin yer yer açıldığı dikkati çekiyordu. Yine çekirdek zarında da belirgin açılmalar yaygındı. Hücre sitoplazmasında irili ufaklı otofajik vakuollerin görülmesi de yüzey epitel hücrelerinde yaygın organel dejenerasyonunun bir belirtisi olarak kabul edildi ve her hangi bir şekilde heparinin yüzey epitel hücrelerini etkilediği sonucuna varıldı (Resim 10 ve Resim 11).

Boş aljinat boncuk

Boş aljinat boncuğun uygulandığı 2. saat grubunda; aljinatın mide yüzey hücrelerinde az yoğun bir katman oluşturacak şekilde yayıldığı ve hücrelerde salgı birikimi olduğu belirgin olarak gözlendi. Yeni salgılama döngüsünün olduğunu simgeleyen çok küçük granüller, GER tubuluslarında genişleme belirgin olarak izlendi. Yan yüz bağlantı birimleri oldukça normal yapı sergilerken bazı bölgelerde açılmaların olduğu dikkati çekti (Resim 12 ve Resim 13).

DMAH içeren aljinat boncuk

DMAH içeren aljinat boncuğun uygulandığı grupta; koyu ve açık hücreler ayrıt ediliyordu. Koyu hücrelerde otofajik vakuoller oral heparin uygulanan gruba karşın daha azdı. Salgı içeriği ve hücre zarının oldukça korunduğu, ancak bazı yüzey hücrelerinde apikal sitoplazma yerleşimli vezikül ve vakuollerin yaygınlığı belirgindi. Çekirdek zarında açılmalar dikkat çekiciydi (Resim 14 ve Resim 15).

İV DMAH

İV heparinin uygulandığı 2. saat grubunda yapının oldukça normal olduğu dikkat çekiciydi (Resim 16 ve Resim 17).

D.12.3. Tavşan Midelerine Ait üçüncü Saatteki Bulgular

DMAH çözelti

DMAH çözeltinin uygulandığı 3. saat grubunda yüzey epitel hücrelerinde hücre dejenerasyonunun halen devam ettiği ilgiyi çekti. Yan yüz bağlantı birimleri açılmıştı. Bazal sitoplazmada daha iri olmak üzere yaygın vakuollerin varlığı dikkat çekti (Resim 18 ve Resim 19).

Boş aljinat boncuk

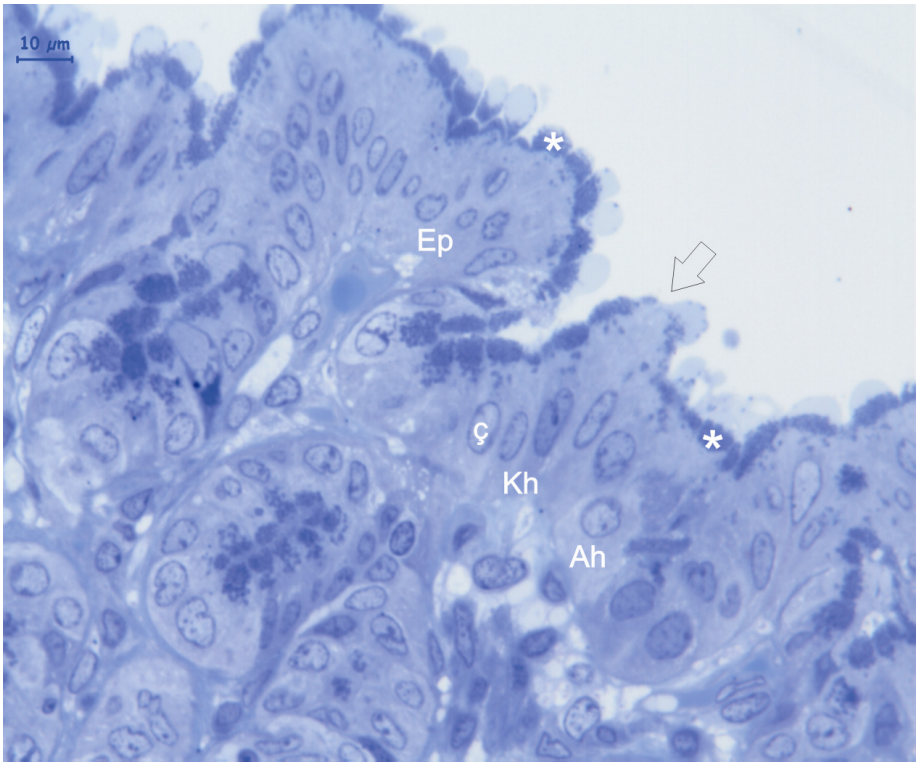
Boş aljinat boncuğun oral olarak uygulandığı 3. saat grubunda yapının oldukça korunduğu, mide yüzey epitelinin normal yapıda olduğu izlendi. Salgı biriktirme ve yeniden salgıya başlama döngülerinin hücrelerde yaygın olduğu aktif GER tubuluslarının varlığı ile belirlendi. Hücre yan yüz bağlantı birimleri ve hücre zarının normal olduğu ayırt edildi. Açık ve koyu hücreler belirgindi (Resim 20 ve Resim 21).

DMAH içeren aljinat boncuk

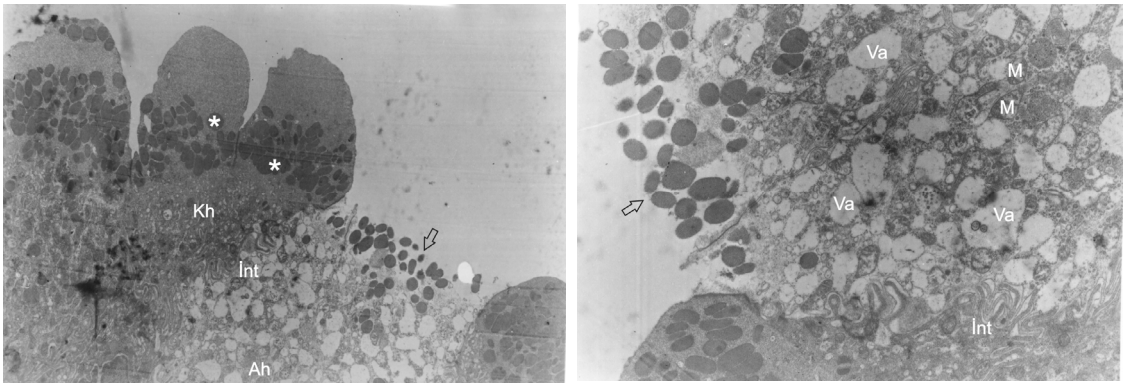
DMAH içeren aljinat boncuğun birlikte uygulandığı grupta açık ve koyu sitoplazmaya sahip yüzey epitel hücreleri yan yana izlendi. Koyu hücrelerde artan salgılamayı simgeleyen GER tubuluslarında genişleme, apikal sitoplazmada birikmiş veziküler ve vakuoler yapılar ile iri salgı granülleri, çekirdek zarı genişlemesi belirgindi. Mitokondrion yapısının normal olduğu izlendi. Açık renk hücrelerde vakuoller ve veziküllerin çok sayıda oldukları ve hücreyi tümüyle doldurdukları dikkati çekerken, apikal sitoplazmada birikmiş salgı granüllerinin diğerlerine karşın daha küçük olduğu ilgiyi çekti (Resim 22 ve Resim 23).

İV DMAH

Bu grupta yapının oldukça korunmuş olduğu ayırt ediliyordu (Resim 24 ve Resim 25).

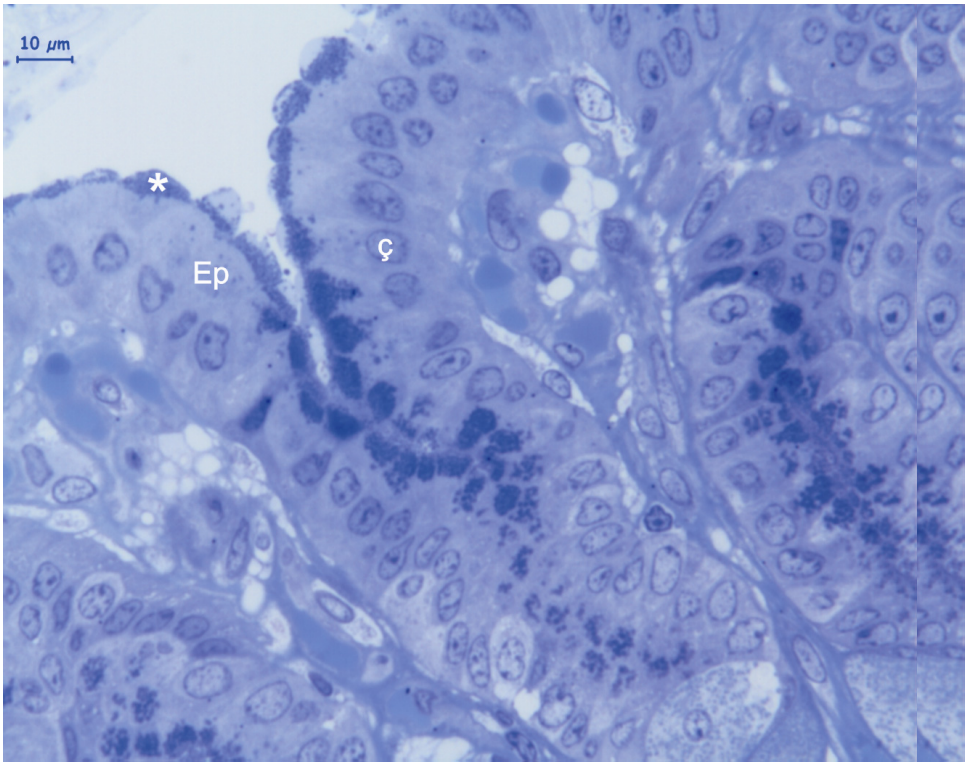


Resim 2. Oral DMAH çözelti (DMAHÇ) uygulanan grup,1. saat , yarı ince kesit. Mide yüzey epitel hücreleri (Ep), açık hücreler (Ah), koyu hücreler (Kh), yırtılmış olan yüzey zarı (⇨), çekirdek (Ç), salgı granülleri (*) izleniyor. (Toluidin mavisi, X400)

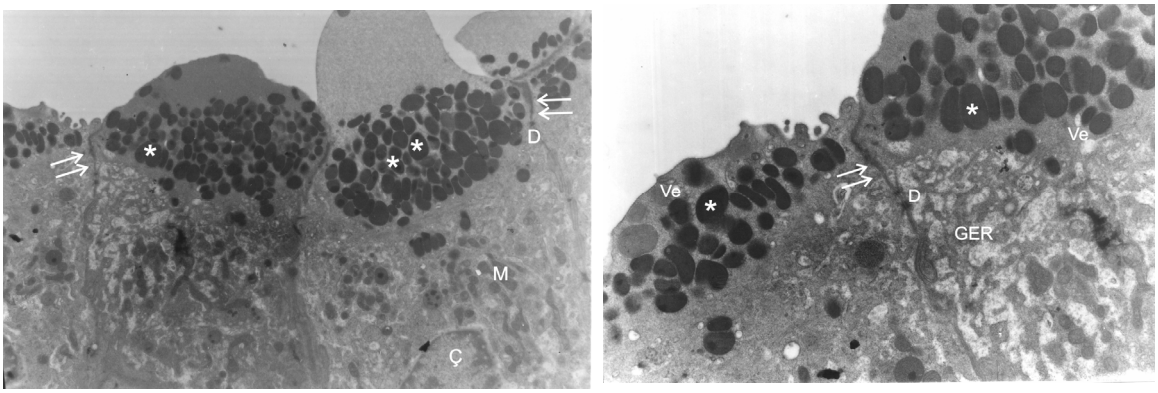


a b

Resim 3 a-b. Oral DMAH çözelti (DMAHÇ) uygulanan grup, 1. saat, açık hücreler (Ah), koyu hücreler (Kh), yırtılmış olan yüzey zarı (⇨), salgı granülleri (*), yan yüz bağlantı birimlerinin yerindeki interdijitasyonlar (İnt), mitokondriyonlar (M), vakuoller (Va) izleniyor. (Uranil asetat- Kurşun sitrat, **a)** X3000, **b)** X7000)

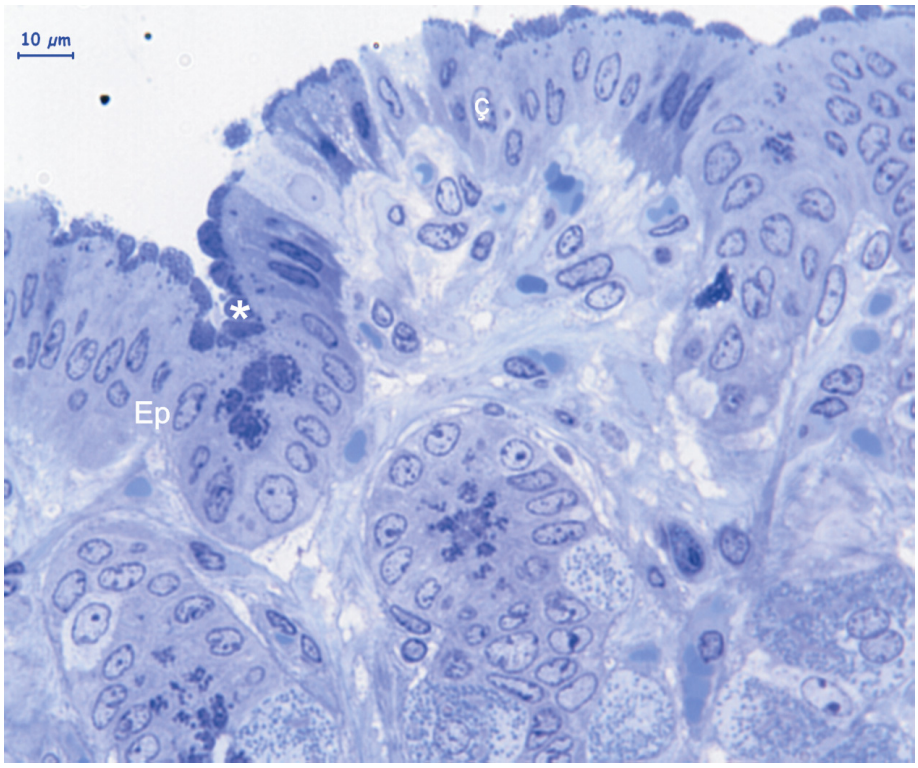


Resim 4. Oral boş aljinat boncuk (AB) uygulanan grup, 1. saat, yarı ince kesit. Mide yüzey epitel hücreleri (Ep), çekirdek (Ç), salgı granülleri (*) izleniyor. (Toluidin mavisi, X400)

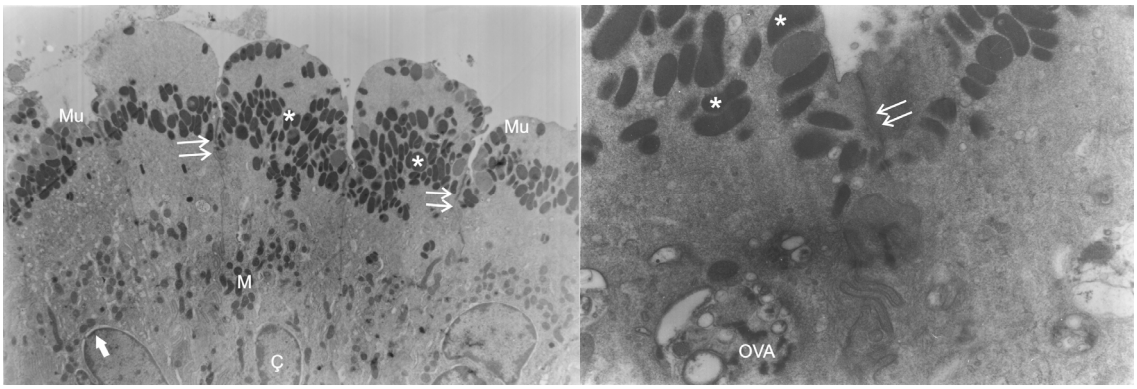


a b

Resim 5 a-b. Oral boş aljinat boncuk (AB) uygulanan grup, 1. saat, yüzey epitel hücreleri. Çekirdek (Ç), salgı granülleri (*), yan yüz bağlantı birimleri (Çift ok), desmozom (D), mitokondriyonlar (M), granüllü endoplazmik retikulum (GER), veziküller (Ve), salgı granülleri (*) izleniyor. (Uranil asetat- Kurşun sitrat, **a)** X3000, **b)** X7000)

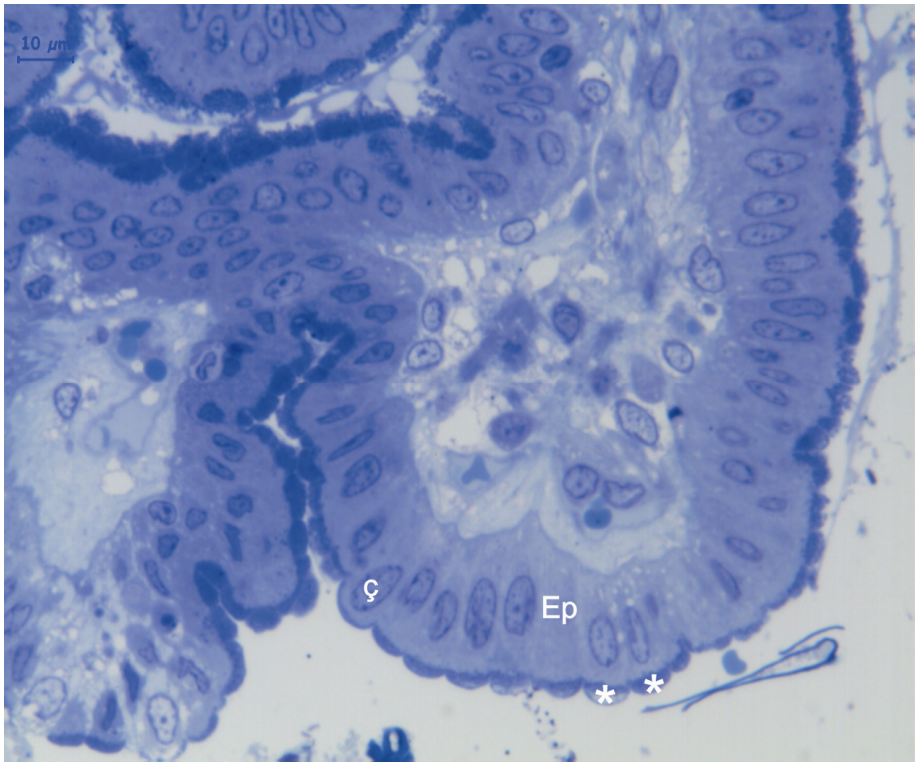


Resim 6. Oral DMAH-aljinat boncuk (DMAHAB) uygulanan grup**,** 1. saat, yarı ince kesit. Mide yüzey epitel hücreleri (Ep), çekirdek (Ç), salgı granülleri (*) izleniyor. (Toluidin mavisi, X400)

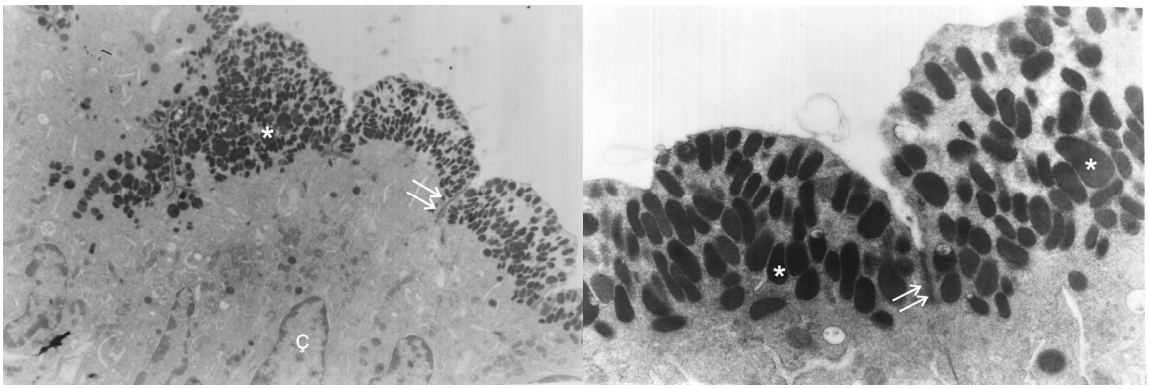


a b

Resim 7 a-b. Oral DMAH-aljinat boncuk (DMAHAB) uygulanan grup**,** 1. saat, Çekirdek (Ç), çekirdek zarında açılmalar (Kalın ok), salgı granülleri (*), yan yüz bağlantı birimleri (Çift ok), mitokondriyonlar (M), otofajik vakuoller (OVa), mukus granülleri (Mu) izleniyor. (Uranil asetat- Kurşun sitrat,
a) X3000, **b)** X12000)

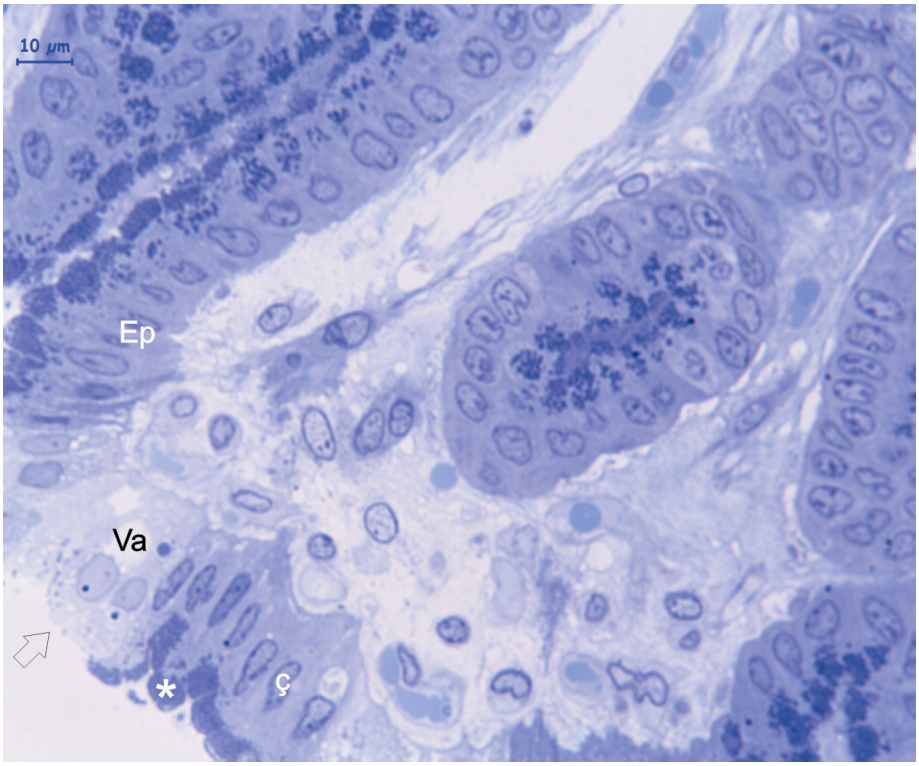


Resim 8. İV DMAH (İV) uygulanan grup, 1. saat, yarı ince kesit. Mide yüzey epitel hücreleri (Ep), çekirdek (Ç), salgı granülleri (*) izleniyor. (Toluidin mavisi, X400)

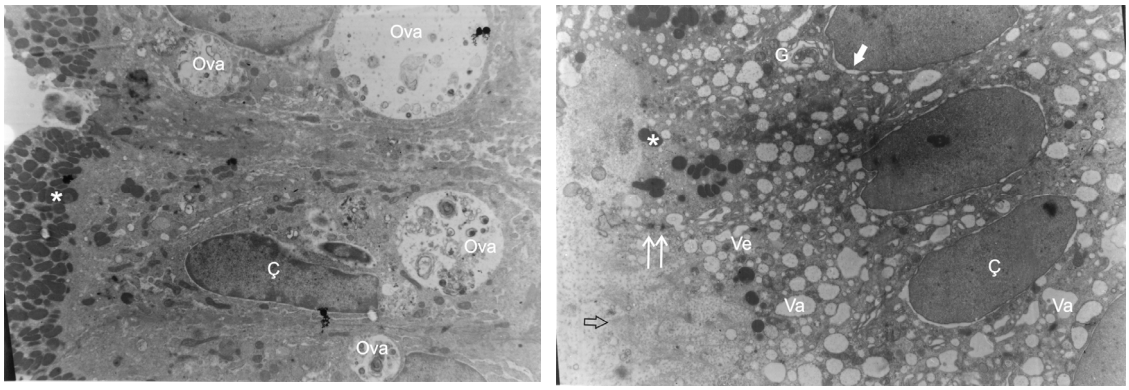


a b

Resim 9 a-b. İV DMAH (İV) uygulanan grup, 1. saat, yüzey epitel hücreleri. Çekirdek (Ç), salgı granülleri (*), bağlantı birimleri (Çift ok) izleniyor. (Uranil asetat- Kurşun sitrat, **a** X3000, **b** X12000)

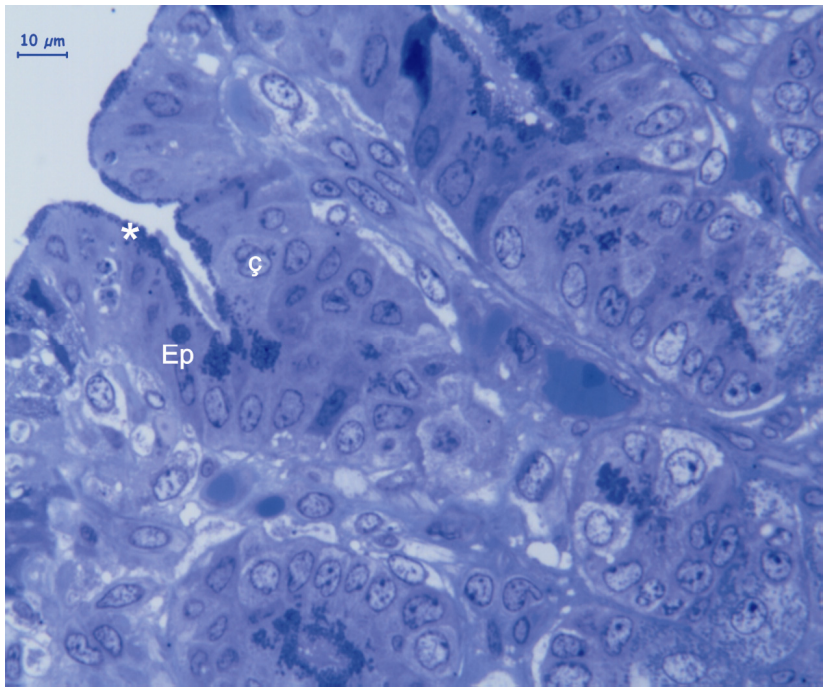


Resim 10. Oral DMAH çözelti (DMAHÇ) uygulanan grup, 2. saat, yarı ince kesit. Mide yüzey epitel hücreleri (Ep), çekirdek (Ç), salgı granülleri (*), vakuoller (Va), yüzey zarında harabiyet (⇨) izleniyor. (Toluidin mavisi, X400)

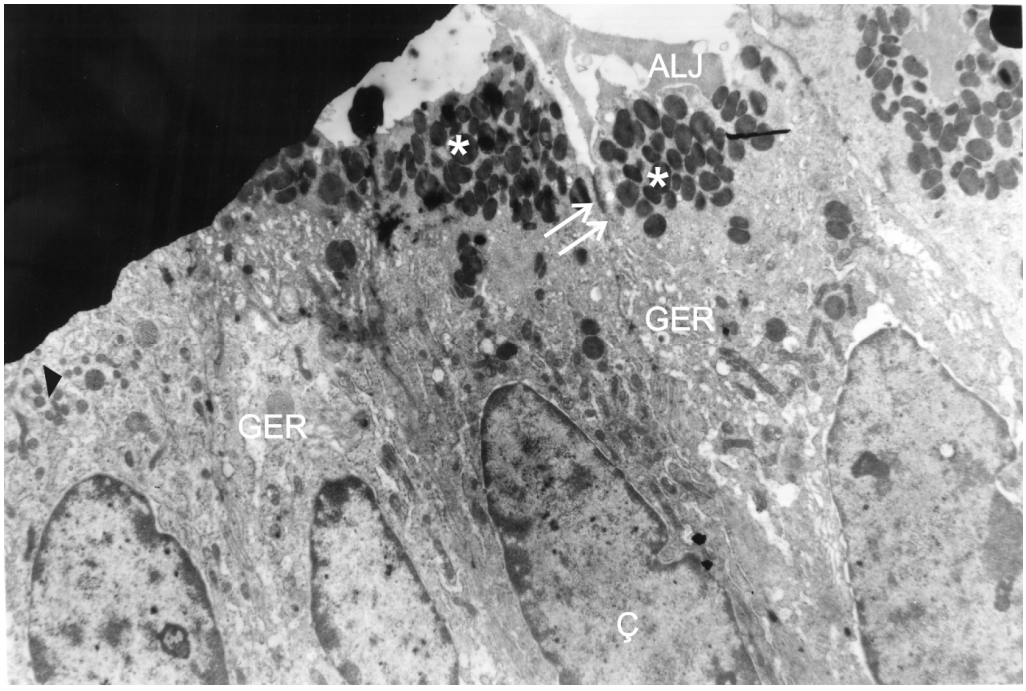


a b

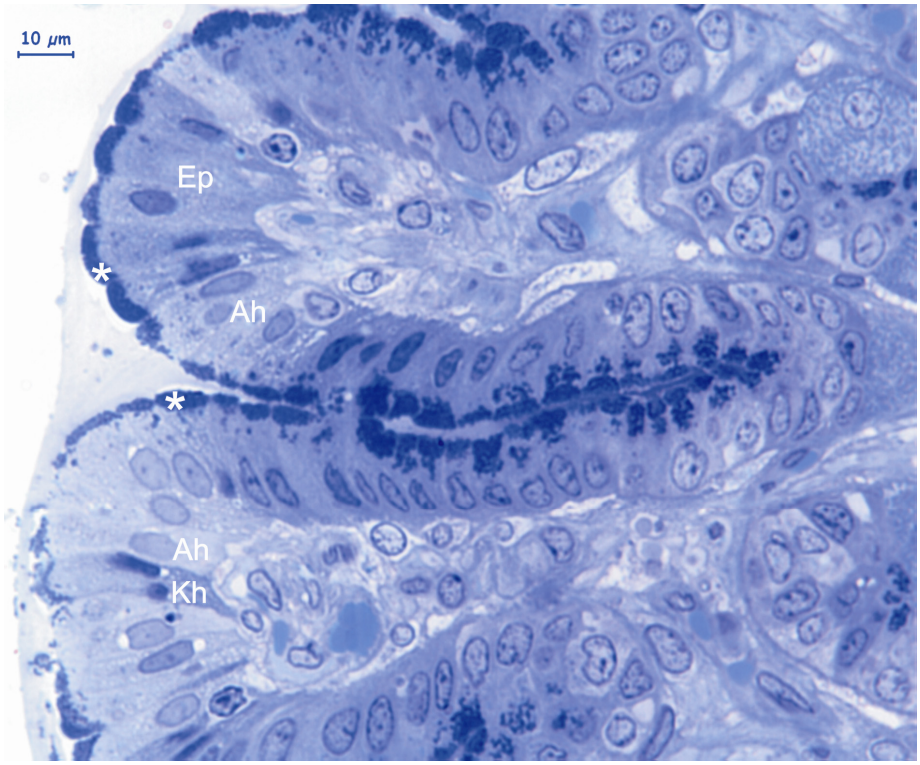
Resim 11 a –b. Oral DMAH çözelti (DMAHÇ) uygulanan grup, 2. saat, çekirdek (Ç), çekirdek zarında açılmalar(kalın ok) yüzey zarında harabiyet (⇨) , salgı granülleri (*), yan yüz bağlantı birimleri (Çift ok), veziküller (Ve), vakuoller (Va), otofajik vakuoller (OVa), Golgi sarnıçları (G) izleniyor. (Uranil asetat- Kurşun sitrat, **a –b)** X3000)



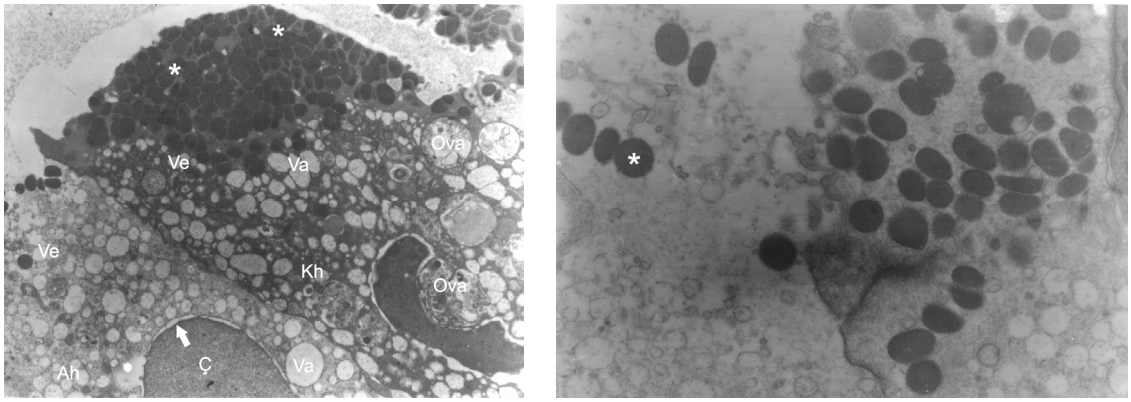
Resim 12. Oral boş aljinat boncuk (AB) uygulanan grup, 2. saat, yarı ince kesit. Mide yüzey epitel hücreleri (Ep), çekirdek (Ç), salgı granülleri (*) izleniyor. (Toluidin mavisi, X400)



Resim 13. Oral boş aljinat boncuk (AB) uygulanan grup, 2. saat. Çekirdek (Ç), salgı granülleri (*), aljinat katmanı (Alj), salgı granülleri (*), çok küçük granüller (ok başı), granüllü endoplazmik retikulum (GER), bağlantı birimleri (Çift ok) izleniyor. (Uranil asetat- Kurşun sitrat, X3000)

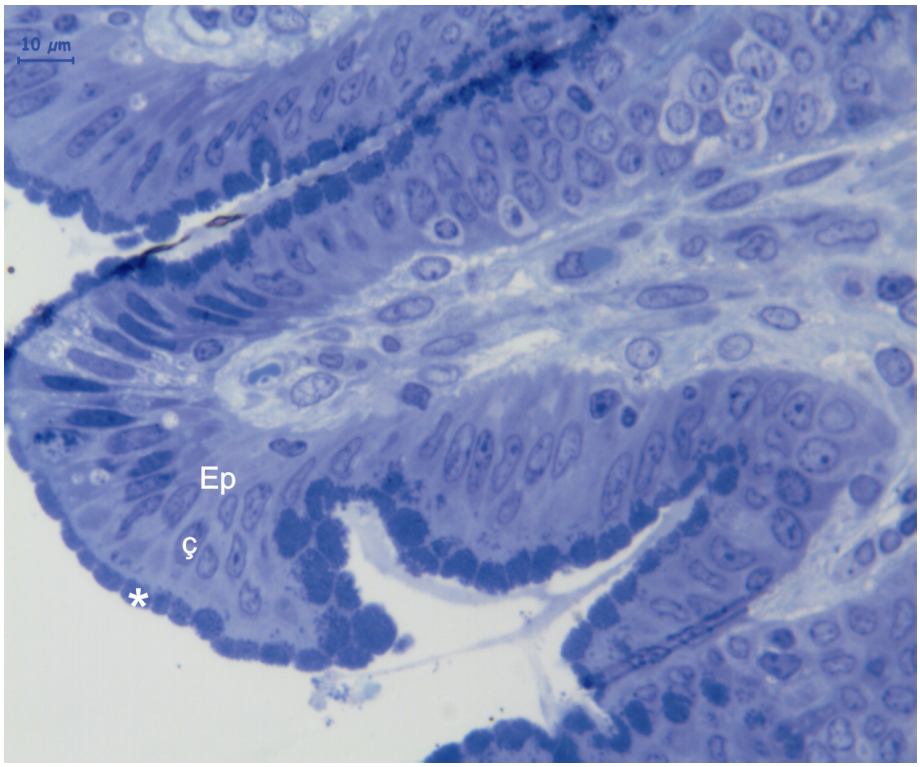


Resim 14. Oral DMAH-aljinat boncuk (DMAHAB) uygulanan grup**,** 2. saat, yarı ince kesit. Mide yüzey epitel hücreleri (Ep), açık hücreler (Ah), koyu hücreler (Kh), çekirdek (Ç), salgı granülleri (*) izleniyor. (Toluidin mavisi, X400)

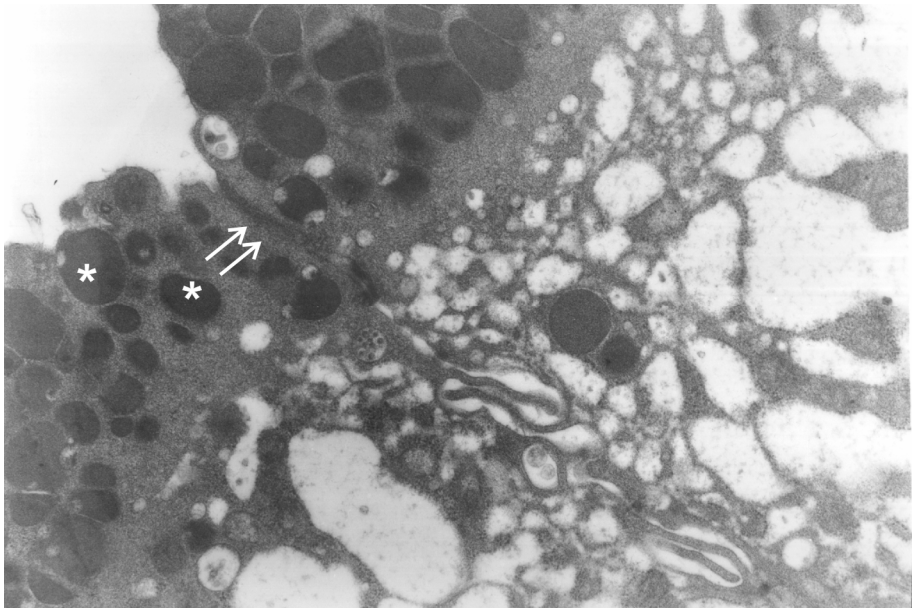


a b

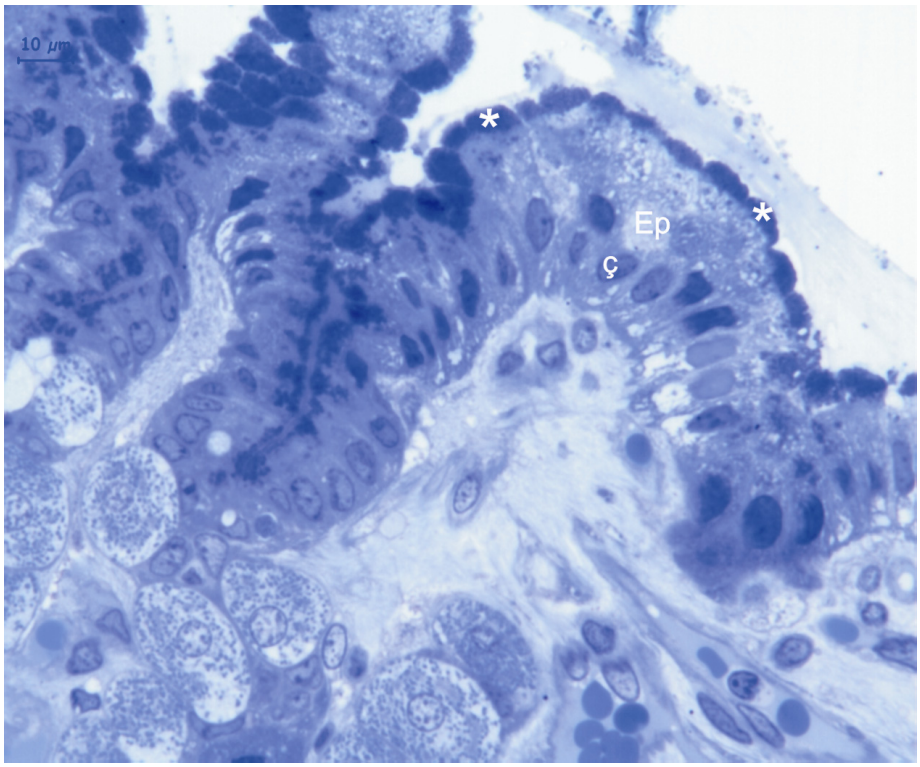
Resim 15 a-b. Oral DMAH-aljinat boncuk (DMAHAB) uygulanan grup**,** 2. saat, açık hücreler (Ah), koyu hücreler (Kh), çekirdek (Ç), otofajik vakuoller (OVa), apikal sitoplazma yerleşimli veziküller (Ve) ve vakuoller (Va), çekirdek zarında açılmalar (kalın ok) izleniyor. (Uranil asetat- Kurşun sitrat,
a) X4400, **b)** X12000)



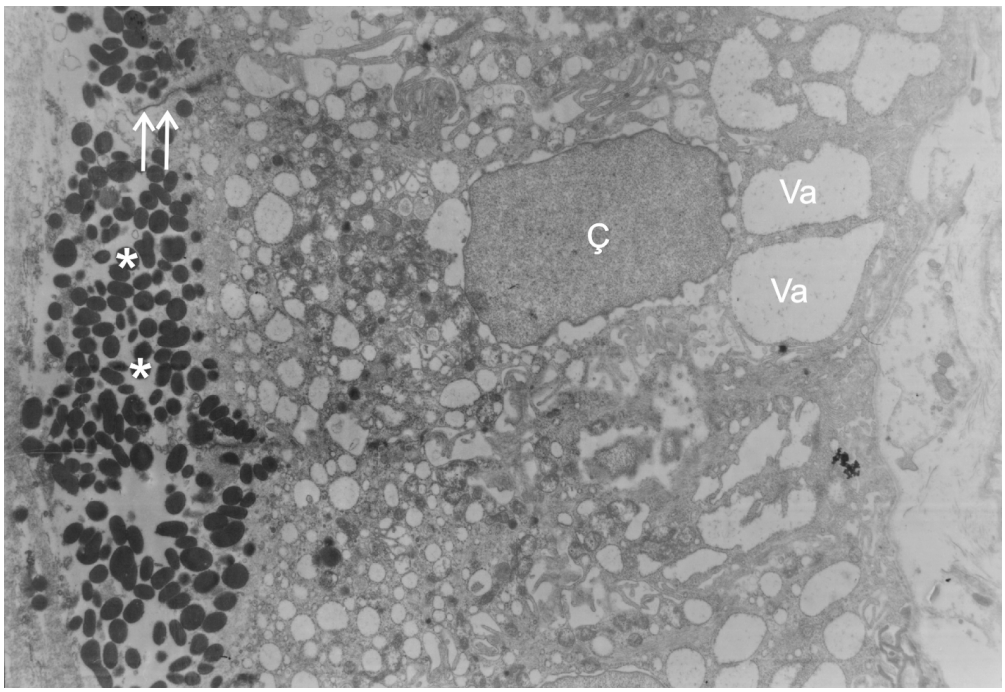
Resim 16. İV DMAH (İV) uygulanan grup, 2. saat, yarı ince kesit. Mide yüzey epitel hücreleri (Ep), çekirdek (Ç), salgı granülleri (*) izleniyor. (Toluidin mavisi, X400)



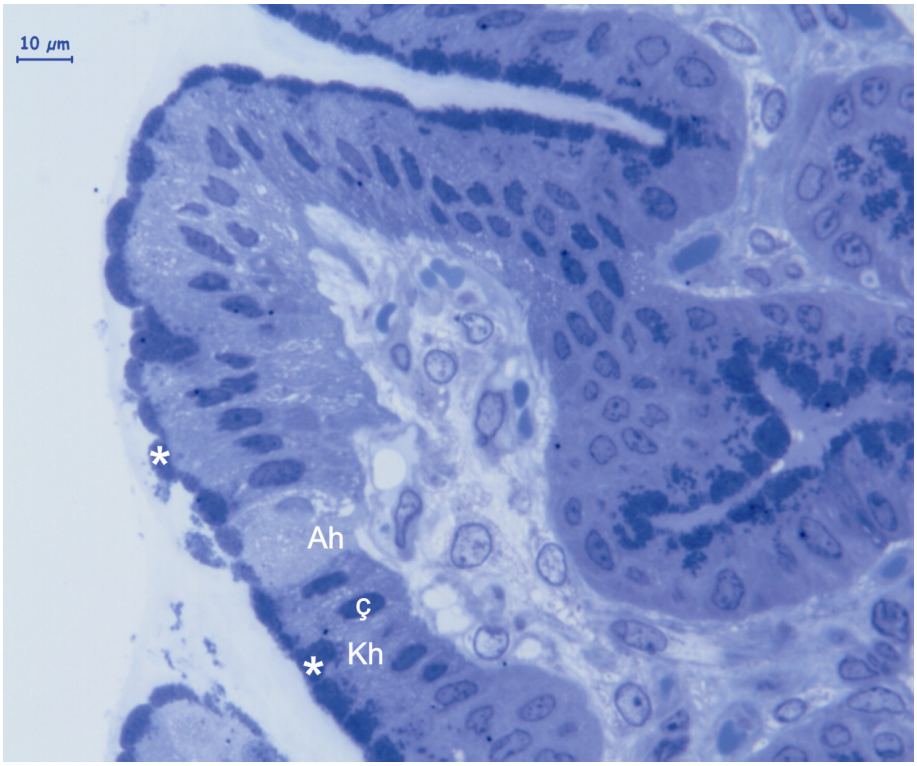
Resim 17. İV DMAH (İV) uygulanan grup, 2. saat, yüzey epitel hücreleri. Salgı granülleri (*), yan yüz bağlantı birimleri (Çift ok), izleniyor. (Uranil asetat- Kurşun sitrat, X12000)



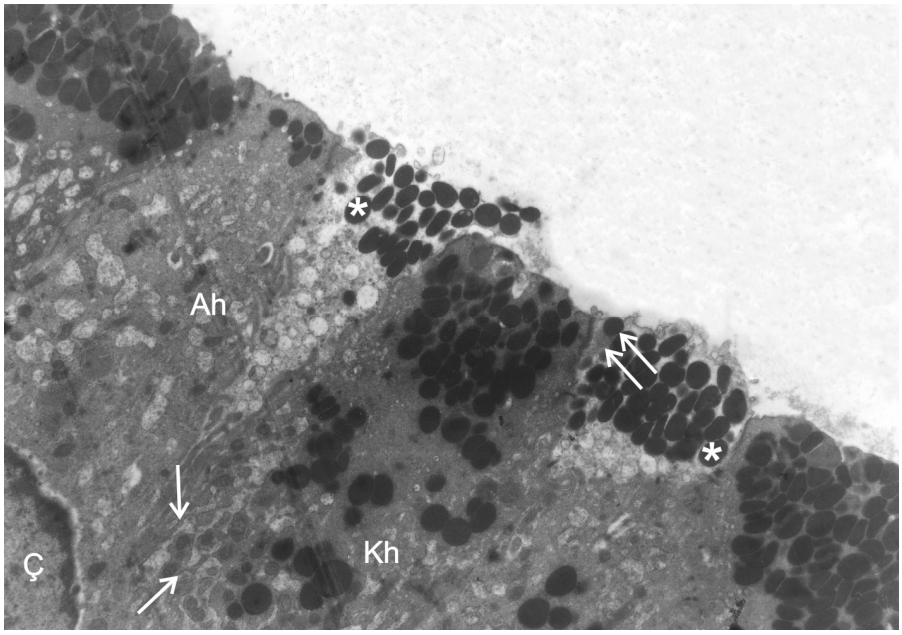
Resim 18. Oral DMAH çözelti (DMAHÇ) uygulanan grup, 3. saat, yarı ince kesit. Mide yüzey epitel hücreleri (Ep), çekirdek (Ç), salgı granülleri (*) izleniyor. (Toluidin mavisi, X400)



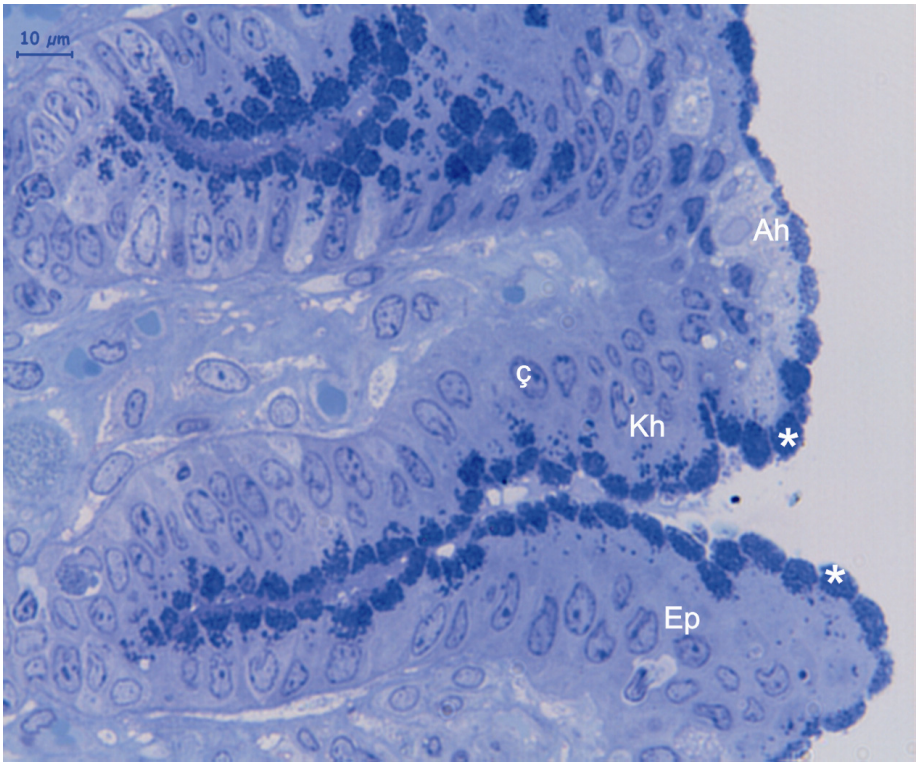
Resim 19. Oral DMAH çözelti (DMAHÇ) uygulanan grup, 3. saat, çekirdek (Ç), salgı granülleri (*), yan yüz bağlantı birimleri (Çift ok), vakuoller (Va), izleniyor. (Uranil asetat- Kurşun sitrat, X3000)



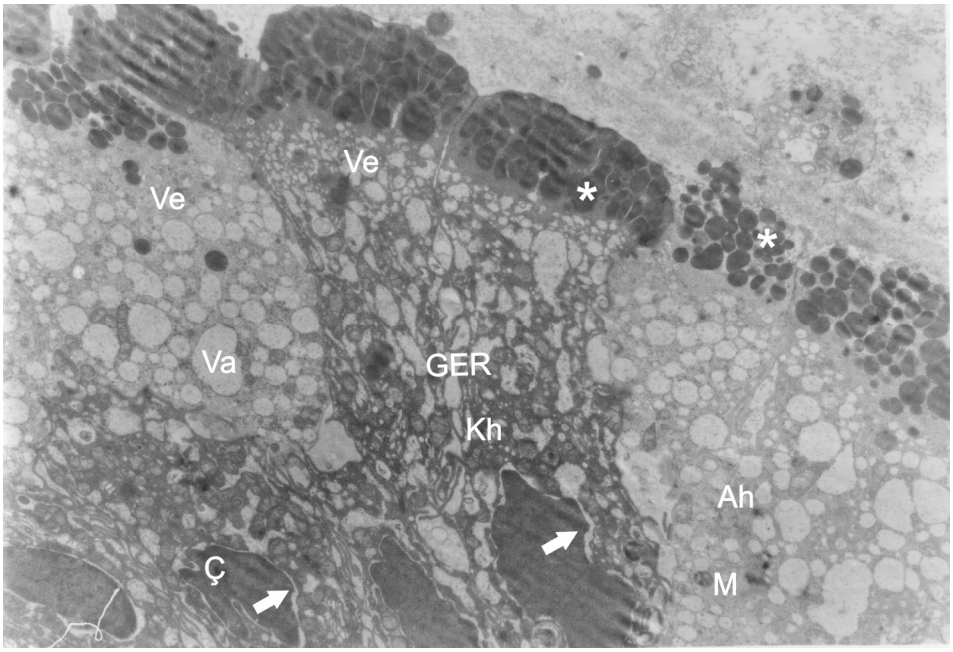
Resim 20. Oral boş aljinat boncuk (AB) uygulanan grup, 3. saat, yarı ince kesit. Açık (Ah) ve koyu hücreler (Kh), salgı granülleri (*), çekirdek (Ç) izleniyor. (Toluidin mavisi, X400)



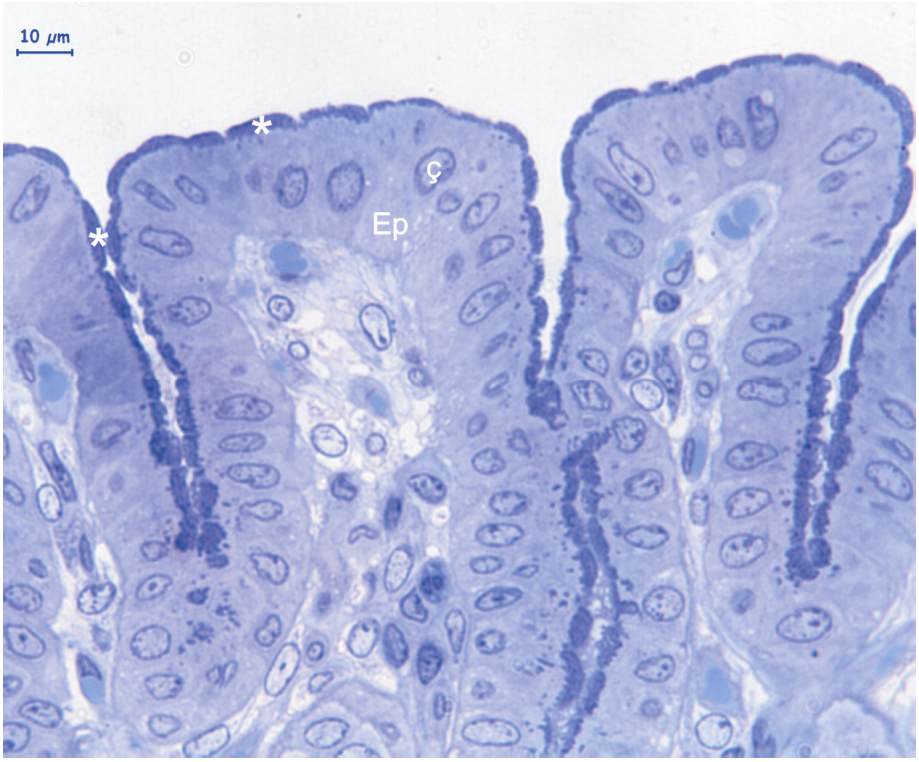
Resim 21. Oral boş aljinat boncuk (AB) uygulanan grup, 3. saat. Açık hücreler (Ah), koyu hücreler (Kh), çekirdek (Ç), salgı granülleri (*), aktif GER tubulusları ile karakterize sentez bölgesi ( ), yan yüz bağlantı birimleri (Çift ok) görülüyor. (Uranil asetat- Kurşun sitrat, X3000)



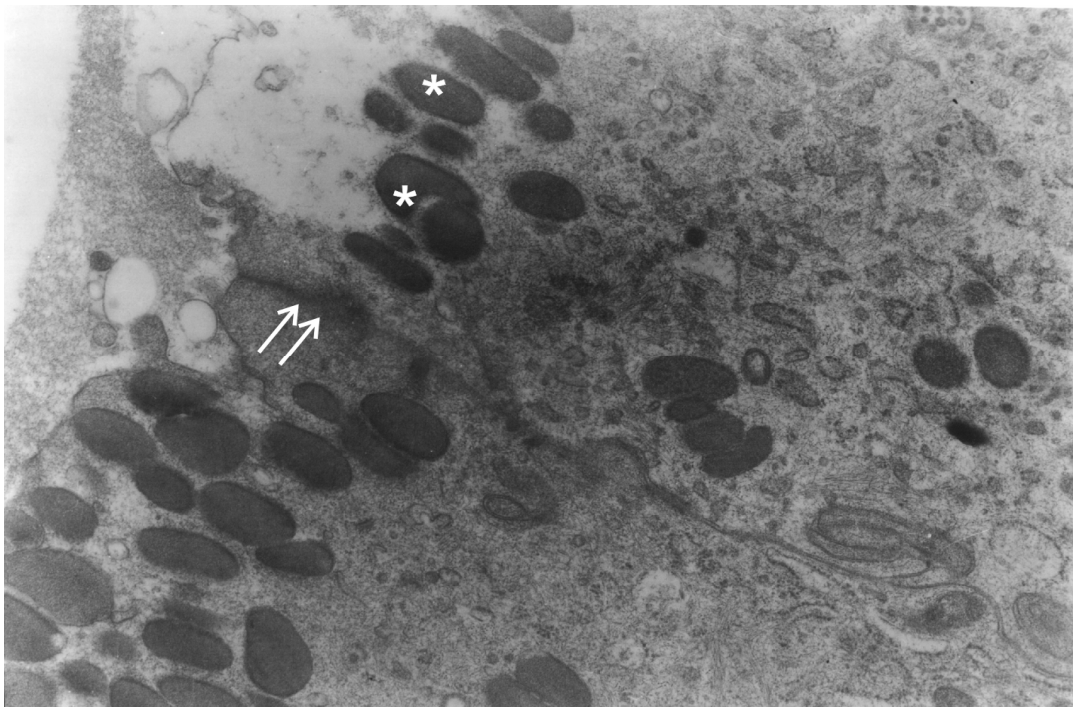
Resim 22. Oral DMAH-aljinat boncuk (DMAHAB) uygulanan grup**,** 3. saat, yarı ince kesit. Mide yüzey epitel hücreleri (Ep), açık hücreler (Ah), koyu hücreler (Kh), çekirdek (Ç), salgı granülleri (*) izleniyor. (Toluidin mavisi, X400)



Resim 23. Oral DMAH-aljinat boncuk (DMAHAB) uygulanan grup**,** 3. saat, açık hücreler (Ah), koyu hücreler (Kh), çekirdek (Ç), çekirdek zarında genişlemeler (kalın ok), veziküller (Ve), vakuoller (Va), salgı graülleri (*), granüllü endoplazmik retikulum (GER), mitokondriyon (M) görülüyor. (Uranil asetat- Kurşun sitrat, X3000)



Resim 24. İV DMAH (İV) uygulanan grup, 3. saat, yarı ince kesit. Mide yüzey epitel hücreleri (Ep), çekirdek (Ç), salgı granülleri (*) izleniyor. (Toluidin mavisi, X400)



Resim 25. İV DMAH (İV) uygulanan grup, 3. saat, yüzey epitel hücreleri. Salgı granülleri (*), yan yüz bağlantı birimleri (Çift ok) izleniyor. (Uranil asetat- Kurşun sitrat, X12000)

E. TARTIŞMA

E.1. Etkin Madde ve Polimerler Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

Etkin maddenin erime derecesi tayininde, 241-243ºC'de dekompoze olduğu gözlenmiştir. DMAH'in partikül büyüklüğü ölçülmüştür ve partikül büyüklüğü dağılımının dar olduğu gözlenmiştir.

DMAH'in ortalama partikül büyüklüğü 3.97±0.09 µm bulunmuştur. Etkin maddeye ait partikül büyüklüğü dağılımı Şekil 8'de gösterilmiştir. Dağılımın bifazik olduğu gözlenmektedir. Bu durum DMAH'lerin biyolojik kökenli olup, molekül ağırlığı dağılımlarının farklı gruplardan oluşmasından kaynaklanabilir.

Etkin maddenin IR spektrumunu incelemek amacıyla FT-IR kullanılmıştır. DMAH'deki sülfat ester gruplarına ait pik 1200 cm^{-1} civarında, karbonil grubuna ait pik 1600 cm^{-1} civarında gözlenmektedir. Literatür bulgusuyla uyumludur[18]. DMAH'in UV spektrumu literatür ile aynı çıkmıştır[32]. Maksimum absorbans verdiği dalga boyu 631 nm'dir, bu değer de literatürde verilenle aynıdır. Çalışmamızda DMAH'in in vitro ölçümü için toluidin mavisi ile metakromatik esasa dayalı spektrofotometrik yöntem[32] seçilmiştir. Bu yöntemde DMAH'in toluidin mavisi ile metakromazi göstermesi ve kompleks oluşumu sonucu boyanın renginin açılması esas alınarak ölçüm yapılır. Bölüm D.1.4., Şekil 10'da görüldüğü üzere toluidin mavisine artan miktarlarda DMAH eklenmesiyle çözeltinin rengi açılarak verdiği absorbans değeri düşmektedir.

Aljinatların ve kitozanın % 1'lik çözeltilerinin reogramları incelendiğinde, pseudoplastik akış özelliği gösterdikleri görülmektedir. Polimer çözeltilerinin "Newtonian olmayan" akış tiplerinden "pseudoplastik akışa" uyum gösterdikleri bilinmektedir. Newtonian olmayan akış tiplerinde viskozite kayma hızı ile değişir[224]. Bölüm D.2.1.'de polimerlere ait kayma hızı-viskozite tablosunda (Tablo 14) da görüldüğü üzere tipik pseudoplastik akış karakteristiğindeki gibi kayma hızının artmasıyla viskozite düşmektedir.

E.2. Analiz Yöntemlerinin Seçimi ve Validasyonunun Değerlendirilmesi

DMAH'in in vitro deneylerde miktar tayini için toluidin mavisi ile metakromatik[32] yöntem tercih edilmiştir. Literatürde toluidin mavisi ile metakromatik yöntemin[93] yanısıra türbidimetrik[99], nefelometrik[94], azure A[58] ve azure II[59] ile metakromatik yöntemler de kullanılmıştır. Güvenilirlik, tekrar edilebilirlik, ucuzluk ve kolay uygulanabilirlik açısından diğer araştırmacıların da sıklıkla tercih ettiği yöntem olan toluidin mavisi ile metakromatik yöntem seçilmiştir. Ayrıca kolorimetrik yöntemler karşılaştırıldığında, heparinin toluidin mavisi ile oluşturduğu kompleksin renk şiddetinin azure A'ya göre daha kuvvetli olduğu ve korelasyon katsayısının daha yüksek bulunduğu bilinmektedir[18]

Kullanılan yöntemin validasyon çalışmaları C.2.4'de anlatıldığı gibi yapılarak, güvenilirliği ve geçerliliği gösterilmiştir. Bölüm D.4.3'de gün içi ve günlerarası tekrarlanabilirlik deneylerinde düşük miktarda DMAH (10-30 µg) ile çalışıldığında bağıl sapmanın daha yüksek olduğu gözlendiğinden bütün miktar tayini deneylerinde seyreltmeler ve okumalar yüksek miktarlarda (40-70 µg aralığında) yapılmıştır. Ayrıca seçicilik çalışmalarıyla da her formülasyon için yöntemin seçici olduğu kanıtlanmıştır.

DMAH'in in vivo miktar tayini ise, rutin olarak kullanılan tek yöntem olan plazmadan anti Xa aktivitesi ölçümü yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümlerin geçerliliği ve güvenilirliğini sağlamak üzere C.2.10 ve C.2.10.1'de anlatılan şekilde aletin kalibrasyonu ve kontrolü yapılmaktadır. Her gün yapılan kontrol deneyleri ile ölçümlerin geçerliliği ve güvenilirliği ispatlanmıştır. DMAH'lerle tedavide hasta izlemede de rutin olarak kullanılan bu yöntemin etkinliğini ve güvenilirliğini kanıtlayan çalışmalar da mevcuttur[223].

E.3. Etkileşme Çalışmaları

DMAH ile kitozan arasındaki etkileşmeyi spektrofotometresinde incelemek için DMAH:kitozan (1:0.75) içeren çözelti pH 1.2'de ve pH 6.8'de, maksimum dalga boyu ve absorbans değerleri açısından sadece DMAH çözeltisi ile karşılaştırılmıştır. DMAH-kitozan içeren çözelti ile pH 1.2 iken, ortama eklenen DMAH'in sadece bir kısmı tayin edilebilirken, pH 6.8'de tamamı

tayin edilmiştir. (Şekil 18). Bu durum kitozanın pH 1.2'de çözünerek DMAH ile kompleks oluşturduğunun, pH 6.8'de kitozan çözünmediğinden etkileşimin gözlenmediğinin kanıtıdır.

Bu bulgu Gallo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın bulguları ile de desteklenmektedir[225]. *G*allo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada manyetik hedefleme ile kapiller endotel hücrelerin yüzeyindeki anyonik glikozaminoglikanlara bağlanmak üzere kitozan mikroküreler hazırlanmıştır. Bu çalışmada anyonik glikozaminoglikan olan heparin model madde olarak seçilmiştir. Çalışmamızda kullanılan toluidin mavisine benzer şekilde heparin ile kompleks yaparak rengi açılmak suretiyle miktar tayinini sağlayan boya maddesi olarak metilen mavisi kullanılmıştır. Metilen mavisinin renk şiddeti bu çözeltiye kitozan çözeltisinin ve mikroküresinin eklenmesiyle koyulaşmıştır. Bu da metilen mavisiyle kompleks yapan heparinin kitozan ilavesiyle ayrılarak kitozan ile kompleks yaptığının kanıtıdır. Bu araştırmada mikroküre üzerindeki yüklerin nötralizasyonu ile kompleks oluşumunun önlenmesi de etkileşmeyi kanıtlayan diğer bir bulgu olmuştur.

DMAH-Kitozan arasındaki etkileşmenin IR spektrofotometresi ile incelenmesi amacıyla 1:1 ve 1:2 oranlarında DMAH-Kitozan fiziksel karışımları % 1'lik asetik asitte ve 0.1 N HCl'de hazırlandı. Başlangıçtaki pik HCl'de keskinleşmiştir. Kompleks oluşumu vardır denilebilir, ancak asetik asitte bu keskinleşme gözlenmemiştir. Pikteki keskinleşme –OH gruplarının etkileşip hidrojen bağı yaptığının kanıtıdır. HCl ve asetik asitteki tuzu farklı olabilir, çünkü HCl daha güçlü bir asittir. Fakat asetik asitteki örnekte nem çekme gibi nedenler pikteki değişimi gözlememizi engellemiş olabilir. Fiziksel karışımlarda etkileşmeye dair net bir kanıt yoktur. Kitozan-DMAH etkileşmesinin in vivo deneylerde DMAH'nin oral absorpsiyonunu ve etkinliğini artırabileceği düşüncesiyle kitozan tabletlerle in vivo öndenemeler yapılmıştır ancak bölüm E.8.4'de görüldüğü üzere yeterli etkinlik elde edilememesi nedeniyle DMAH-kitozan etkileşiminin yapısını aydınlatmak için daha fazla deney yapılmamıştır.

E.4. Formülasyon Çalışmaları

E.4.1. Kitozanla Yapılan Önformülasyon ve Formülasyon Deneyleri

Doğal, biyogeçimli ve biyoparçalanır bir polimer olan kitozanın mukozal permeabiliteyi artırmak suretiyle ilaçların absorbsiyonunu artırdığı[89,226], ve ilacı enzimatik bozunmadan koruduğu[170,171] bilinmektedir. Ayrıca biyoadezif özelliği nedeniyle ilacın GIK'da kalış süresini artırdığı ve böylece emilimini de artırdığı bilinmektedir[148]. Bu nedenlerden dolayı mikropartikül ve tablet formülasyonlarımızda kitozan öncelikli olarak tercih edilmiştir.

Literatür araştırması sırasında DMAH-Kitozan etkileşmesine dair bulgulara[76,89, 225] rastlanmıştır, ancak etkileşimin in vivo ortamda olumlu sonuç verebileceği, kompleks oluşumunun DMAH'in oral biyoyararlanımını artırabileceği düşüncesi ile mikropartikül ve tablet formülasyonları tasarlanmıştır.

Nitekim heparin ve kitozan ve türevlerini içeren formülasyonlarla çeşitli çalışmalar mevcuttur. Yıldız ve arkadaşları DMAH ile kitozan ve sodyum aljinat kullanılarak hazırladıkları topikal jel formülasyonlarına[58] penetrasyon artırıcı olarak d-limonen eklemişlerdir. Formülasyonun selüloz asetat membrandan geçişi incelenerek, başarılı olduğu belirtilmiştir. Andersson ve arkadaşları[76] mikroemülsiyon (s/y) damlacıkları içinde nanopartikül boyutunda kitozan/heparin kompleksi hazırlamıştır. Chandy ve arkadaşları[93] heparin ve DMAH ile kitozan/PEG-aljinat mikroküre hazırlayıp yüzeyi kitozan ve selüloz asetat ftalat ile kaplamıştır. Kaplanmış mikrokürelerle kontrollü salım elde edilmiş ve in vitro antikoagülan aktivite gözlenmiştir. Thonou ve arkadaşları[89] ise sıçanlara intradoudenal olarak uygulamak üzere hazırladıkları jel formülasyonunda heparinle etkileşeceği nedeniyle kitozan yerine poliamfolitik türevi olan Mono-N-karboksimetil kitozanı tercih etmişlerdir. Çalışmamız planlanırken mevcut çalışmalar arasında DMAH ve kitozanın oral uygulamada in vivo olarak nasıl sonuç verdiğine dair bir çalışma bulunmadığı gözlenmiştir ve mikropartikül ve tablet önformülasyonları ve formülasyonları hazırlanmıştır. Ancak son yıllarda bir grup araştırmacının DMAH içeren kitozan nanopartikülleri hazırladıkları ve oral uygulama ile etkinlik sağladıkları görülmüştür[227].

E.4.1.1. Kitozan Mikropartikül Önformülasyonları

Doğrudan sertleştirici (TPP) ilavesiyle kitozan mikropartikülleri hazırlama:
Kitozan ve TPP % 0.2 oranında kullanıldığında opak mikropartikül süspansiyonu elde edilmiştir. Bu değerlerin altında mikropartikül oluşumu gözlenmemiştir. Üzerinde ise, homojen dağılıma sahip olmayan, kısmen aglomere olmuş süspansiyon elde edilmiştir. Kitozan ve TPP oranı daha da artırıldığında ise tamamen aglomerasyon gözlenmiştir. Kitozan ve TPP % 0.2 oranında kullanıldığında elde edilen opak mikropartikül süspansiyonu mikroskopta incelendiğinde ise homojen düzgün şekilli partiküllerin yanısıra çok sayıda iğsi ipliksi polimer parçaları gözlenmiştir. Bu nedenle daha homojen bir sistem elde etmek üzere formülasyon çalışmalarına emülsiyon oluşturduktan sertleştirmeye dayanan yöntem ile devam edilmiştir.

Emülsiyon oluşturup sertleştirici bir madde ilavesiyle kitozan mikropartikül hazırlama:

Kitozan mikropartikülleri hazırlamak için Lim ve arkadaşlarının[228] yönteminde olduğu gibi dış faz olarak izooktan seçildiğinde emülgatör olarak hidrofobik bir sürfaktan olan Span 85 ve sertleştirici olarak da NaOH seçilmiştir. Düşük devirde sistem stabil olmamıştır ve büyük polimer damlacıkları gözlenmiştir. Bu duruma, literatürde de belirtildiği gibi sertleştirme ajanı olarak kullanılan NaOH'in güçlü bazik bir madde olması nedeniyle destabilizan etki etmesi sebep olabilir. Lim ve arkadaşlarının[228] yaptığı çalışmada da bu nedenle NaOH'i çok yavaş ve uzun aralıklarla ekledikleri belirtilmiştir. Yüksek devirde stabil emülsiyon elde edilebilmiştir ancak agregasyon gözlenmiştir. Elde edilen küçük partiküller yüksek devirde oluşan türbülansın etkisiyle birbirine yapışarak agregasyona neden olmuş olabilir. Kullanılan 1 M NaOH'in etkin maddenin de stabilitesi ve aktivitesi üzerine olumsuz etki edebileceği düşünülerek alternatif sertleştiricilerle çalışmalar yapılmıştır.

Sertleştirici olarak gluteraldehit seçtiğimiz formülasyonlarda dış faz olarak sıvı parafin kullandık. Araştırmalarda sertleştirme ajanı olarak gluteraldehit kullanıldığında dış faz olarak çoğunlukla toluen[229], petrol eteri[230],

metilen klorür[231] gibi organik solvanlar seçilmiştir. Ancak çalışmamızda Akbuğa ve arkadaşları gibi toksisite açısından organik solvan yerine sıvı parafin tercih edilmiştir[163]. Sıvı parafin ile emülgatör olarak daha hidrofilik olan Tween 80'in uygun olacağı kararlaştırılmıştır. Bu yöntemle mikropartikül eldesinde başarılı olunmuş ancak mikropartikülde kalabilecek toksik gluteraldehit kalıntısı göz önüne alınarak başka alternatif sertleştiriciler de araştırılmıştır.

Kitozandaki pozitif yüklerle etkileşerek kompleks yapan multianyonlardan sodyum sitrat ile mikropartiküllerin sertleşmesi tam gerçekleşmezken TPP ile başarıya ulaşılmıştır. Emülgatör kullanmaksızın kolaylıkla emülsiyon oluşturulmuş ancak kullanılan zeytinyağı ortamdan tam olarak uzaklaştırılamamıştır. Mikropartiküllerin süzülerek veya santrifüj edilerek ayrılması tam olarak gerçekleştirilememiştir. Zeytinyağı yerine izooktan kullanıldığında ortama emülgatör olarak span 85 eklenmiştir. Bu formülasyonlarda da ancak yüksek devirde (8000 rpm) emülsiyon elde edilebilmiş ancak oluşan mikropartiküller sonradan agregasyona uğramıştır. Bu duruma yine yüksek devirde oluşan türbülans nedeniyle birbirine yapışan partiküllerin neden olabileceği düşünülmüştür.

Sonuçta kitozan mikropartikül hazırlamak amacıyla geliştirdiğimiz yöntemde, dış faz olarak sıvı parafin, emülgatör olarak Tween 80, sertleştirici olarak % 1 TPP çözeltisi kullanılarak 1200 devirde başarılı sonuç alınmıştır.

E.4.1.2. Kitozan Mikropartikülleri hazırlamada Optimum Şartların Belirlenmesi

Bu formülasyon ile optimum şartların belirlenmesi amacıyla bir seri deney daha yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda: Karıştırma hızının artırılması ile partikül boyutunun küçüldüğü ancak 5000 gibi yüksek devirde sertleşme işleminin tam gerçekleşememesi nedeniyle kuruma aşamasında partiküllerin yayılıp birleştiği ve zarımsı bir tabakaya dönüştüğü gözlenmiştir.

TPP çözeltisinin miktarının azaltılması ile viskoz bir sistem oluştuğu ve mikropartikülleri ayırmanın zorlaştığı ve bu nedenle verimin düşük olduğu gözlenmiştir.

Yıkamada kullanılan organik solvan oranı düşük olduğunda mikropartiküllerin yağlı kaldığı, çok artırıldığında ise mikropartiküllerin gevşeyerek yapılarının bozulduğu gözlenmiştir. Mikropartikülleri 50:50 oranında aseton:su ile ardından sadece su ile yıkamanın ideal olduğuna karar verilmiştir.

E.4.1.3. DMAH İçeren Kitozan Mikropartikül Hazırlama Çalışmaları

Kitozan çözeltisine DMAH ekleme çalışmaları çözeltinin bulanıklaşması ve agregasyon oluşumu ile sonuçlanmıştır. Asit pH'da çözünen kitozanın, pozitif yüklü amonyum gruplarının, DMAH'deki negatif yüklü sülfat grupları ile etkileşmesi sonucu kompleks oluşmuştur.

Thanou ve arkadaşları[89] da kitozanın DMAH ile güçlü bir etkileşime girdiği ve çözeltide fiberler oluşturarak çöktüğü yönünde bilgi vererek metil karboksi kitozan türevini kullanmışlardır. Metil karboksi kitozanın anyonik makromoleküller için daha iyi bir absorbsiyon artırıcı olduğu belirtilmiştir.

DMAH içeren kitozan mikropartikül hazırlamak için mikroküre hazırlama aşamasında % 1 asetik asitteki kitozan çözeltisinin Tween 80 içeren sıvı parafin ile oluşturduğu emülsiyona DMAH eklendikten sonra TPP ile sertleştirme yapılmıştır. Ancak yine kompleks oluşumu nedeniyle kısmen agregasyon meydana gelmiş ve oluşan mikropartiküllerin tam sertleşmediği gözlenmiştir. Burada sertleştirme amacı ile kullanılan TPP anyonik yapıdadır ve kitozan ile anyonik-katyonik etkileşmeye girerek partiküllerin sertleşmesini sağlamaktadır. DMAH'in de anyonik yapısı nedeniyle benzer bir etkileşmeye girdiği daha önce açıklanmıştı. Bu durumda ortamda DMAH'in varlığı kitozan-TPP etkileşimine engel olarak partiküllerin sertleşmesini önlemiş olabilir. Düşük devirde (1200 rpm) partiküllerin sertleşmesi için daha fazla miktarda TPP çözeltisi (100 mL) gerekmiştir. Partikül boyutunun küçültülmesi amacıyla deney yüksek devirde (5000 rpm) tekrarlandığında muhtemelen TPP çözeltisi miktarının yüksek olması nedeniyle faz değişimi sonucu su fazı dış faza geçmiştir ve s/y yerine y/s emülsiyonu meydana gelmiştir. Sonuçta kitozan damlacıkları oluşamamış ve sertleştirilememiştir. Deney düşük miktarda (25 mL) TPP çözeltisi ile yüksek devirde tekrarlanmıştır. Ancak dış fazdan kalan DMAH miktarından hareketle yapılan hesaba göre yükleme verimi düşük

bulunmuştur. Mikropartiküllerin belli bir yükleme kapasitesi olabileceği düşünülerek kullanılan DMAH miktarı 4 kat azaltılarak deney tekrarlanmıştır ve dış fazdan tayin ile yüklenen yüzde DMAH oranının 4 kat arttığı gözlenmiştir. Ancak mikropartikülden tayin yapıldığında DMAH yükleme oranı % 0.5 bulunmuştur. Bu durum kitozanın-DMAH kompleksinin oluştuğunu ve yüklenen DMAH'in miktar tayininin toluidin mavisi ile yapılamayacağını göstermektedir.

DMAH'in sonradan mikroküreye yüklenmesi durumunda DMAH'in yükleme verimini tayin etmemizi önleyecek şekilde etkileşim olup olmadığını araştırmak üzere DMAH'in hazırlanmış mikropartiküllere sonradan yüklenmesi düşünülmüştür. DMAH'in düşük pH'da (pH 1.2) yüklenmesi dış fazdan tayine göre % 97 çıkarken mikropartikülden tayine göre % 2.5 bulunmuştur. Asit ortamda kitozanın amonyum gruplarıyla DMAH'in sülfat gruplarının etkileşimi üst seviyede olacağından kompleks oluşumu çok güçlü olmuştur.

Yükleme çalışmaları asidik olmayan ortamda yapıldığında yine kompleks oluşumu nedeniyle mikropartikülden miktar tayini sonucu düşük çıkmıştır. Asit pH olmamasına rağmen etkileşim gözlenmiştir. Çünkü mikropartikül hazırlama aşamasında emülsifikasyondan önce kitozanın çözüldüğü asetik asit mikropartikül ile birleşerek daha sonra asit olmayan ortamda da amonyum iyonlarının açığa çıkmasını sağlamış olabilir. Gallo ve arkadaşları[225] da asidik olmayan pH'da kitozan mikropartiküllerinin heparin ile kompleks oluşturmasını, mikroküre hazırlama aşamasında içte kalan asetik asit kalıntısının açığa çıkıp çeperde asidik koşul sağlamasına bağlamışlardır.

Yang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada[232] kitozan ile salmon kalsitonin arasında benzer bir etkileşimden bahsedilmiştir. Kitozan kullanılarak hazırlanan püskürtülerek kurutulmuş, kuru toz formülasyonlardan salmon kalsitonin geri eldesi düşük bulunmuştur. Bu duruma kitozan ile salmon kalsitonin arasında oluşabilecek kısmen dönüşümsüz bir kompleksin sebep olabileceği belirtilmiştir.

Vila ve arkadaşları tarafından 2005 yılında sunulan bir çalışmada[227], DMAH içeren kitozan nanopartiküllerinin hazırlandığı ve DMAH-Kitozan etkileşmesine değinilmediği görülmüştür. Bu çalışmada in vitro ortamdaki miktar tayini deneyleri spektrofotometrik metodla değil, anti Xa kitleri kullanılarak anti

Xa etkinliği ölçülmek suretiyle gerçekleştirilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği % 99 bulunmuştur. Poloksamer 188 içeren ve içermeyen kitozan çözeltilerine DMAH içeren TPP çözeltisi eklenerek elde edilen nanopartiküller dondurarak kurutulmuş ve süspande edilip uygulanmıştır.

Sonuçta DMAH ile kitozan arasında oluşan kompleksin in vivo ortamda DMAH'in oral etkinliğini sağlayabileceği düşünülse de mikropartiküllerden miktar tayini net olarak ölçülemediğinden doz ayarlaması yapılamayacaktır.

DMAH'in, kitozan varlığında oral uygulanmasıyla etkinliğini kanıtlamak üzere DMAH-Kitozan tabletleri hazırlanarak in vivo ön denemeler yapılmasına karar verilmiştir. DMAH'in kitozan varlığında oral etkinliği kanıtlandıktan sonra mikropartikül formülasyonlarına yeniden dönülerek, çok pahalı bir yöntem olan kitlerle anti Xa etkinliğin ölçülmesi yoluyla miktar tayini ve salım çalışmaları yapılabileceği düşünülmüştür.

E.4.1.4. DMAH-Kitozan Tabletler

Kitozan ve kitozan klorür ile hazırlanan beş grup tablet formülasyonu da yapılan denetimler sonucunda çap, yükseklik, sertlik ve ağırlık sapması açısından uygun bulunmuştur. Tabletlerin mide ortamında asit pH'da dağılma süreleri incelendiğinde kitozan klorür içeren F5 formülasyonunun şişmediği ve dağılmadığı gözlenmiştir. Yüksek oranda kitozan içeren F3 ve F4 formülasyonlarının şiştiği fakat dağılmadığı gözlenmiştir. DMAH:Kitozan oranı 1:0.65 olan F1 formülasyonu 9.4±0.2 dakikada, 1:0.75 olan F2 formülasyonu ise 30 dakikada kısmen dağılmıştır ve 2 saatin sonuna kadar bu şekilde kalmıştır. Kitozanın absorbsiyon artırıcı ve adezif etkisinden faydalanmak istediğimizden kısmen yüksek olan 1:0.75 oranında DMAH:Kitozan içeren formülasyon seçilmiştir. Çözünme hızı deneyleri, pH 1.2'de DMAH-Kitozan kompleks oluşumu nedeniyle miktar tayini yapılamadığından pH 6.8'de yapılmıştır. Etkileşimle ilgili bilgiler Bölüm E.4.'de ayrıntılı olarak verildiğinden burada tekrarlanmayacaktır. Tabletlerden çözünen miktar 90 dakika sonunda sadece kitozan klorür içeren F5 formülasyonunda yaklaşık % 20'de kalırken diğer tüm formülasyonlarda % 100 civarında olmuştur. Ancak tabletler in vivo ortamda önce midenin asit pH'sı ile karşılaşacağından, burada DMAH-Kitozan kompleks

oluşumu meydana geleceği düşünülmektedir. DMAH-kitozan etkileşimi ile ilgili yorumlar daha önce "DMAH içeren Kitozan mikropartikül hazırlama çalışmaları" bölümünde ayrıntılı olarak verilmiştir.

Midede oluşan kompleksin daha sonra gastrointestinal sistemden emilip emilmeyeceği veya pH'sı daha yüksek bölgelere geçtikçe nasıl davranacağı ancak in vivo ön denemelerle anlaşılabilecektir.

E.4.2. Aljinat Boncuk Önformülasyon Çalışmaları

Aljinat- Sıvı parafin ile yüksek devirde emülsiyon oluşturup $CaCl_2$ ile sertleştirme

Sıvı parafin kullanılarak aljinat çözeltisiyle (% 2) emülsiyon oluşturduktan sonra $CaCl_2$ ilave edilmesiyle çok koyu kıvamlı viskoz opak süspansiyon benzeri oluşum gözlenmiştir. Mikoskopta incelendiğinde küçük ve küresele yakın partiküller gözlenmiştir, oluşan süspansiyon düşük devirde santrifüj edildiğinde çökmezken, yüksek devirde partiküllerin yapısı bozularak koyu kıvamlı bir tabaka ayrılmıştır. Oluşan koyu kıvamlı sıvı parafin tabakası $CaCl_2$'ün aljinatla tam olarak etkileşmesini önlemiş bu nedenle de sertleştirme iyi gerçekleşememiş olabilir. Emülsiyon tekniğiyle aljinat mikropartikül elde etmede sürfaktanın tipi, aljinatın molekül ağırlığı ve oranı[130] önemli rol aynamaktadır. Lemoine ve arkadaşlarının[130] dış faz olarak izooktan, sürfaktan olarak Tween 85 kullandıkları ve agregat oluşumu gözledikleri çalışmanın bulguları bizim bulgularımızla bu bakımdan uyum göstermektedir. Araştırmacılar sonikasyon varlığında agregat oluşumunun önlediğini belirtmişlerdir. Sözkonusu çalışmada da düşük oranda (% 2.5) aljinatla iyi sonuç alınamamıştır ve % 5 gibi yüksek bir aljinat oranı seçilmiştir.

Aljinat-$CaCl_2$ ile iyonik etkileşme ile yüksek devirde boncuk oluşturma

Yüksek devirde çalışarak daha küçük partiküller elde etmek amaçlanmıştır. Aljinat çözeltisi 5000 rpm'de karıştırılan $CaCl_2$ çözeltisine damla

damla eklendiğinde damlalar $CaCl_2$ çözeltisine düştükten sonra sertleşmektedir ancak karıştırıcının ucuna takılıp kısa sürede büyük topak haline gelmiştir. Hızlı karıştırmanın etkisiyle oluşan türbülans nedeniyle $CaCl_2$ çözeltisine düşen damlaların şeklinin bozulduğu ve birbirine yapışarak kütlelerinin büyüdüğü düşünülmektedir. Literatürde sadece aljinat ve $CaCl_2$ kullananılarak daha küçük partikül elde etmek amacıyla genellikle ekztrüzyon aleti veya küçük delik (orifice) kullanarak atomizasyon veya püskürtme (spreyleme) metodu kullanılmaktadır[129,130]. Klasik karıştırma yöntemiyle yüksek devirlerde başarı sağlanamamıştır.

Aljinat-$CaCl_2$ iyonik etkileşme ile boncuk oluşturma

Aljinat jel boncuklar sodyum aljinatın çok değerli katyonlarla iyonik çapraz bağ yapması esasına dayanarak hazırlanmaktadır. Çapraz bağlayıcı olarak Ca^{+2}, Ba^{+2} ve Sr^{+2} kullanılan çalışmalar da mevcuttur, fakat Ca^{+2} ile en iyi sonucun alındığı belirtilmiştir[110,124]. Bizim çalışmamızda da en çok tercih edilen sertleştirici olan $CaCl_2$ seçilmiştir.

Kullanılan sertleştirici tipinin yanısıra oranı ve sertleştirme süresi de boncukların özelliklerine etki eden faktörlerdendir[125]. Çalışmamızda sertleştirme süresi 15 dakikanın altına düşürüldüğünde sertleşmenin tam gerçekleşememesi nedeniyle oluşan partiküllerin deforme olduğu gözlenmiştir.

Aljinat boncuk hazırlarken düşük konsantrasyonda aljinat çözeltisi ile boncukların küresel olmadığı ve kurutma sırasında çabuk deforme olduğu, yüksek konsantrasyonda ise akış ve damlatma problemi yaşandığı bilinmektedir. Bazı araştırmalarda da aljinat konsantrasyonu % 1.8'in altında ve % 3'ün üzerinde iken bu tarz problemler yaşandığı kaydedilmiştir[103,233]. Çalışmamızda da aljinat oranı % 2'den % 3'e çıkarıldığında daha kıvamlı bir çözelti elde edildiğinden damlatma zorlaşmıştır. Ayrıca verimin de düştüğü gözlenmiştir. Kullanılan sodyum aljinat konsantrasyonununun % 4'e kadar çıktığı çalışmalara da rastlanmıştır[122,128]. Ancak bu çalışmalarda aljinat

konsantrasyonunun artmasıyla etkin madde salımının yavaşladığı ve azaldığı belirtilmiştir.

Araştırmalarda hazırlanan aljinat boncuk veya mikropartiküler sistemlerin yüksek sıcaklıkta, açık havada oda sıcaklığında veya dondurularak kurutma şeklinde çeşitli yollarla kurutulduğu bilinmektedir. Ancak bu yöntemlerin dezavantajlarından kaçınmak amacıyla ve daha standart sonuç vermesi nedeniyle 25ºC etüvde, vakumlu desikatörde kurutma yapılmıştır[233,234].

Çalışmamızda aljinatın düşük viskoziteli tipi (Protonal LF120) kullanıldığında yüksek viskoziteli tipe (Protonal LF 240) göre daha düzgün şekilli ve küresel partiküller elde edilmiştir.

Damlatma hızı yüksek olduğunda partiküllerin yassı ve yamuk şekilde oluştuğu, ayrıca verimin de düştüğü gözlenmiştir.

E.4.3. Faktöriyel Tasarımla Aljinat Boncuk Hazırlama ve Faktöriyel Tasarıma Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Boncuklar, % 2 oranında düşük viskoziteli aljinat (Protonal LF120) çözeltisi kullanılarak hazırlandı. Boncukların hazırlanmasında 2^3 faktöriyel deney tasarımı kullanıldı. Etkin madde:aljinat oranı, $CaCl_2$ konsantrasyonu ve sertleştirme süresi bağımsız değişken olarak seçildi ve bu değişkenlerin $t_{\%50}$ ve % tutulan etkin maddeye etkisi değerlendirildi.

E.4.3.1. Faktörlerin Tutulan Etkin Madde Oranına ve İn vitro Salım Bulgularına Etkileri

Aljinat boncukların in vitro salım deneyleri, in vivo koşullar taklit edilerek önce pH 1.2'de 2 saat sürdürülmüştür sonra pH 6.8'de deneye devam edilmiştir. Tüm boncuk formülasyonları pH 1.2'de 2 saat boyunca bir miktar şişerek – dağılmadan- etkin maddenin % 37.7-62.0'lık kısmını salmıştır. Boncuklar pH 6.8'e alındıklarında ise yarım saat içinde tüm etkin maddenin tamamen salındığı gözlenmiştir. Tutulan etkin madde oranının tüm formülasyonlarda % 55.8-85.4 arasında değiştiği gözlenmiştir. Bağımsız değişkenlerin in vitro salım bulgularına ve tutulan etkin madde oranına etkileri aşağıda ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir.

E.4.3.1.1. Etkin Madde: Aljinat Oranının Etkisi

Aljinat boncuklarda DMAH'in etkisini incelemek amacıyla 1:1 ve 1:2 oranlarında etkin madde:aljinat içeren formülasyonlar hazırlandı. Etkin madde:aljinat oranının in vitro salıma etkisinin diğer değişkenlerden bağımsız olarak değerlendirilemeyeceği gözlenmiştir. Formülasyonda kullanılan sertleştirici 0.1M iken, aljinat oranı arttığında DMAH'in % 50'sinin çözünmesi için geçen süre de artmıştır. Ancak 0.5 M $CaCl_2$ varlığında ise aljinat oranı arttığında, DMAH'in % 50 'sinin çözünmesi için geçen süre azalmıştır, yani daha hızlı salım gözlenmiştir. Etkin madde aljinat oranı 1:2 iken ve $CaCl_2$ oranı düşükken, Ca^{+2} ile bağlanmadan kalan aljinat boncuk çevresinde jel tabaka oluşturarak salımı yavaşlatmış olabilir. Etkin madde aljinat oranı 1:1 iken ve $CaCl_2$ oranı düşükken, ortamda daha az aljinat ve daha az Ca^{+2} bulunduğundan gevşek bağ oluşumu nedeniyle hızlı olan salımın, $CaCl_2$ oranının artmasıyla daha yoğun oluşan bağlanma nedeniyle yavaşladığı düşünülmektedir.

Aljinat oranı artırıldığında, sertleşme süresinin artması ve azalmasıyla çözünme süresinin artıp azalması yine $CaCl_2$ oranına bağlı olarak değişmiştir.

Etkin madde:aljinat oranının tutulan etkin madde yüzdesine etkisi incelenen diğer parametredir. Etkin madde:aljinat oranının artması tutulan etkin madde oranının da artmasını sağlamıştır. Gürel'in bulguları da bu yöndedir [106].

E.4.3.1.2. Sertleştirici Maddenin Etkisi

Deney tasarımında sertleştirici madde konsantrasyonu 0.1 M ve 0.5 M olarak seçildi ve $t_{\%50}$ ve % tutulan etkin maddeye etkisi değerlendirildi. Kullanılan sertleştirici konsantrasyonu artırıldığında etkin madde:aljinat oranı 1:1 iken salım süresi de uzamıştır. Ancak etkin madde aljinat oranı 1:2 iken sertleştirici konsantrasyonunun artması salımı hızlandırmıştır. $CaCl_2$ konsantrasyonunun etkisi etkin madde:aljinat oranına göre değiştiğinden bu duruma sebep olabilecek mekanizmalara E.4.3.1.1. bölümünde değinilmiştir burada tekrarlanmayacaktır. Takka ve arkadaşları da çalışmalarında sertleştirici

maddenin etkisinin etkin madde:aljinat oranına göre değiştiğini kaydetmiştir ancak bulguları zıt yöndedir[124].

Tutulan etkin madde oranı ise $CaCl_2$ konsantrasyonunun artışına bağlı olarak tüm formülasyonlarda artmıştır. Takka ve arkadaşlarının nikardipin HCl ile hazırladığı aljinat boncuklarda da aynı sonuç elde edilmiştir[235].

E.4.3.1.3. Sertleştirme Süresinin Etkisi

Oluşturulan aljinat boncukların kısa sürede –dakikalar içinde- tamamen sertleştiği bilinmektedir[111]. Bu nedenle sertleştirme süresi 15 ve 30 dakika olarak seçilmiştir. Sertleştirme süresinin salım hızına etkisi 0.1 M $CaCl_2$ ve 0.5 M $CaCl_2$ kullanıldığında farklı yönde bulunmuştur. Sertleştirici 0.1 M iken sertleştirme süresi artırıldığında salımın hızlandığı gözlenmiştir. Ancak sertleştirici 0.5 M iken sertleştirme süresi artırıldığında salım yavaşlamıştır. Bu etkiler özellikle 1:2 oranında etkin madde aljinat içeren formülasyonlarda az olmuştur.

Sertleştirme süresinin artırılmasıyla tutulan etkin madde oranı çok küçük miktarda azalmıştır. Bu durum aljinat oranından etkilenmemektedir. Bu olay DMAH'in suda çok çözünenen bir madde olması nedeniyle uzun süren sertleştirme işlemi sırasında boncuğu terkederek dışardaki sulu faza çıkmış olmasıyla açıklanabilir. Kim ve arkadaşları da hazırladıkları aljinat boncuklara model madde olarak seçtikleri dekstran yüklenmesinde sertleştirme süresinin önemli etkisinin olmadığını belirtmişlerdir[233].

E.4.3.2. Faktörlerin % Tutulan Etkin Madde ve $t_{\%50}$ Cevabına Etkisinin Varyans Analizi ile Değerlendirilmesi

Hazırlanan formülasyonlarda etkin madde:aljinat oranı, $CaCl_2$ konsantrasyonu, ve sertleştirme süresinin % tutulan etkin madde cevabına etkisi varyans analizi tablosu (Tablo 27) ile incelenmiştir. Etkin madde:aljinat oranının (a), $CaCl_2$ konsantrasyonunun (b), sertleştirme süresinin (c) ve bunların ikili etkileşimlerinden ab, bc'nin önemli olduğu ($p<0.005$) Tablo 27'te görülmektedir. Üç faktörün etkileşiminin (abc) ve ac etkileşiminin ise % tutulan etkin madde oranına etkisinin önemli olmadığı görülmektedir. Sonuçta etkin

madde:aljinat oranı, $CaCl_2$ konsantrasyonu, ve sertleştirme süresinin etkileri önemlidir ve birbirinden bağımsız değildir.

Hazırlanan formülasyonlarda etkin madde:aljinat oranı, $CaCl_2$ konsantrasyonu, ve sertleştirme süresinin $t_{\%50}$ cevabına etkisi varyans analizi tablosu (Tablo 29) ile incelenmiştir. Etkin madde:aljinat oranının (a), $CaCl_2$ konsantrasyonunun (b), sertleştirme süresinin (c) ve bunların ikili etkileşimlerinin (ab, ac, bc) ve üç faktörün etkileşimlerinin (abc) önemli olduğu ($p<0.005$) Tablo 29'da görülmektedir. Sonuçta etkin madde:aljinat oranı, $CaCl_2$ konsantrasyonu, ve sertleştirme süresinin etkileri önemlidir ve birbirinden bağımsız değildir.

Çalışmada 2^3 faktöriyel denemesi doğrusal modellere uygulanmıştır ve eşitlik 5 ve eşitlik 6 elde edilmiştir. Bu eşitliklerde görülmüştür ki % tutulan etkin madde oranı ve $t_{\%50}$ cevabı üzerinde etkin madde:aljinat oranı ve $CaCl_2$ konsantrasyonu, sertleştirme süresine kıyasla daha fazla etkilidir. Etkin madde:aljinat oranı yükseldiğinde sertleştirme süresinin etkisinin iyice düştüğü burada da görülmektedir.

Sonuç olarak hazırlanan formülasyonlarda % tutulan etkin madde oranı ve $t_{\%50}$ cevabı açısından en iyi sonucu, 1:2 oranında etkin madde:aljinat içeren 0.5 M $CaCl_2$ ile 15 dakika sertleştirilerek hazırlanan formülasyon vermiştir.

E.5. Aljinat Boncuklarda Yapılan Denetimler

Aljinat boncuklarda verim, enkapsülasyon oranı, partikül büyüklüğü, şişme, çözünme hızı tayin edilmiştir. Etkin madde-aljinat etkileşmesinin değerlendirilmesi amacıyla FT-IR ve DSC ile DMAH, aljinat, boş aljinat boncuk, DMAH içeren aljinat boncuk ve içerdiği maddelerin fiziksel karışımları incelenmiştir. Enkapsülasyon oranı ve in vitro salım bulguları bölüm E.4.3.1'de tartışıldığından burada tekrar edilmeyecektir.

E.5.1. Aljinat Boncukların Veriminin Tayini

Aljinat boncuklarda verimin tüm formülasyonlarda % 79.5-98.7 arasında değiştiği gözlenmiştir. Boncuk veriminin etkin madde:aljinat oranı 1:2 ve $CaCl_2$ konsantrasyonu 0.5 M iken yüksek olduğu gözlenmiştir. Sertleştirme süresinin boncuk verimine etkisi ise $CaCl_2$ konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir.

Sertleştirme süresinin artmasıyla 0.1 M $CaCl_2$ varlığında verimde çok az bir artış gözlenirken 0.5 M $CaCl_2$ varlığında ise verim azalmıştır. Sonuç olarak en iyi verim 0.5 M $CaCl_2$ varlığında, 1:2 oranında etkin madde:aljinat kullanıldığında ve 15 dakika sertleştirme yapıldığında gözlenmiştir.

E.5.2. Aljinat Boncuklarda Partikül Büyüklüğü Tayini

Aljinat boncuklarda partikül boyutu 1325-1584 µm bulunmuştur. Tüm formülasyonlarda çok büyük fark olmamakla beraber, etkin madde:aljinat oranı 1:2 olduğunda partikül boyutunun düştüğü görülmektedir. $CaCl_2$ konsantrasyonunun artması ise partikül boyutunu artırmıştır. Sertleştirme süresinin artması etkin madde:aljinat oranı 1:1 olduğunda partikül boyutunu artırırken, 1:2 olduğunda partikül boyutunu azaltmıştır.

E.5.3. Aljinat Boncuklarda Şişme Deneyi

Aljinat boncuklarda pH 1.2'de şişme oranı düşüktür ve şişme süreleri arasında anlamlı bir bağlantı gözlenmemiştir. Aljinat boncukların pH 6.8'de yüksek oranda şiştiği daha sonra da dağılarak çözündüğü gözlenmiştir. Şekil 23'de görüldüğü gibi pH 6.8'de $CaCl_2$ konsantrasyonu düşük olduğunda partiküller daha yüksek oranda şişmiştir. Bu durum düşük oranda $CaCl_2$ kullanıldığında, aljinat ile $CaCl_2$ arasındaki bağ oluşumunun yetersiz kalmasıyla açıklanabilir. Boncukta oluşan bağlar zayıf kaldığından sıvı ortam girişi kolaylaşmış ve daha fazla şişme gözlenmiştir. Şişme deneyi sonuçları in vitro salım sonuçları ile paralellik göstermektedir. Ancak sadece FH7 formülasyonunda bu durum gözlenmemektedir. FH7 formülasyonunda ilk yarım saat civarında pH 6.8'de de pH 1.2 kadar az bir şişme gözlendikten sonra 45 dakika sonunda birden parçalanmıştır. Bu SEM görüntüleri ile de uyumlu bir bulgudur.

E.6. Aljinat Boncuklarda DMAH-Aljinat Etkileşimlerinin İncelenmesi

E.6.1. DSC Ölçümleri

DMAH 239.45ºC'de başlayan ve 241.15ºC'de maksimuma ulaşan ekzotermik pik vererek dekompoze olmaktadır (Şekil 25). Bu durum daha önce bahsedilen erime derecesi tayini deneyindeki bulgularla uyumludur. Aljinat ise 92.67ºC'de başlayan ve 135.16ºC'de maksimuma ulaşan endotermik erime piki vermektedir, 224ºC'de ise dekompoze olmaktadır. Fiziksel karışımdaki piklerin, maddelerin tek başlarına verdiği piklerden biraz daha farklı olduğu gözlenmektedir, fiziksel karışım halinde de düşük oranda bir etkileşim olabilir. Aljinat boncukta 150.14ºC endotermik pik oluşmuştur, bu termogram aljinattan ve $CaCl_2$'den tamamen farklıdır. Bu durum aljinat ile $CaCl_2$'ün etkileşerek boncuk oluşturduğunun kanıtıdır. DMAH içeren aljinat boncukda ise aljinat boncukda gözlenen endotermik pik 144.90ºC'ye kaymıştır. Bu farklılık aljinat boncuklara DMAH yüklendiğinin kanıtıdır.

E.6.2. X-Işını Kırınımı

DMAH ve aljinatın X-Işını kırınımı spektrumları amorf yapıda olduklarını göstermektedir (Şekil 26). $CaCl_2$ ile kristal pikleri gözlenmektedir. Fiziksel karışım kristal yapıya ait spektrum vermiştir ancak spektrum, tek kristal bileşen olan $CaCl_2$'den de farklıdır dolayısıyla fiziksel karışım halinde de hafif bir etkileşim olabilir. Aljinattan farklı olarak aljinat boncukda kristal piki gözlenmesi $CaCl_2$ ile etkileşmenin kanıtıdır. DMAH içeren aljinat boncuk, aljinat boncukla benzer spektrumdadır farklı olarak kristal piki çok daha şiddetlidir. Bu farklılığın, DMAH'in yüklenmesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

E.6.3. FT-IR ölçümleri

Etkin madde ve polimerin tek olarak, toz karışım halindeki boncuk formülasyonunun içeriği ve boncuk formülasyonlarının öğütülmesiyle hazırlanan tozların FT-IR analiz sonuçları Şekil 27'de gösterilmiştir.

DMAH'deki sülfat ester gruplarına ait 1221 cm^{-1}'deki pik 1a, 1d, 1e'de gözlenmektedir. DMAH'a ait karbonil grubu 1611 cm^{-1} de, aljinata ait karbonil

piki 1600 cm^{-1} de gözlenmektedir. Aljinat, Ca^{+2} ile çapraz bağlanarak aljinat boncuk oluşturmaktadır. Bu sırada aljinatta yer alan gluronik asit gruplarındaki asidik gruplar birbirine bağlanır ve jel oluşturur, 1720cm^{-1} 'de bulunan omuz bu karbonil gruplarına aittir. Mannuronik asit gruplarında yer alan karboniller ise 1600 cm^{-1}'de gözlenmektedir.

DMAH içeren boncuklarda boş aljinat boncuklarda gözlenen omuz (2d) ile beraber DMAH'ın sülfat ester grubuna ait bant (1d) görülmektedir. DMAH'e ait karbonil piki 1603 cm^{-1} de gözlenmiştir. Burada bir etkileşimden ve kompleks oluşumundan söz edilebilir.

Fiziksel karışımda DMAH'den gelen sülfat ester grubuna ait bant görülmektedir (1e). Fiziksel karışım olduğu için aljinat, $CaCl_2$ ile bağ oluşturmadığından 1720 cm^{-1}'de bant gözlenmemiştir.

E.7. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Ölçümleri

Aljinat boncukların (Resim 1.a.1) ve DMAH içeren aljinat boncukların (Resim 1.b.1) genel görüntüleri incelendiğinde küresel biçimde oldukları gözlenmektedir. DMAH içeren aljinat boncukların yüzeyi, etkin madde içermeyen aljinat boncuklara göre daha pürüzlü ve girintili çıkıntılıdır.

DMAH içeren aljinat boncuklar pH 1.2'de 2 saat bekledikten sonra alınan görüntülerden (Resim 1.c) bu ortamda boncukların şekillerinin değişmediği, herhangi bir dağılma veya deformasyona uğramadığı görülmektedir. Yüzey görüntüleri incelendiğinde çok küçük ve yüzeysel yarıkların bulunduğu gözlenmektedir.

DMAH içeren aljinat boncuklar pH 1.2'de bekletilmeden doğrudan pH 6.8'e alındıklarında ise (Resim 1.d) bu ortamda boncukların şekillerinin değişmediği, herhangi bir dağılma veya deformasyona uğramadığı görülmektedir. Yüzey görüntüleri pH 1.2'de bekleyen boncuklar ile benzerlik göstermektedir.

DMAH içeren aljinat boncukların pH 1.2'de 2 saat bekledikten sonra ve pH 6.8'de yarım saat daha bekletilerek alınan görüntüleri Resim 1.e'de gösterilmiştir. Jel-matris yapının gevşediği, tabakalanma ve parçalanmaların oluşarak kütle kaybı yaşandığı gözlenmektedir. Aljinatın $CaCl_2$ ile bağ yapması

sonucu elde edilen boncukların fizyolojik koşullarda olduğu gibi önce pH 1.2 ile karşılaşmaları şişme ve dağılmaya katkıda bulunmuştur.

E.8. İn Vivo Verilerin Değerlendirilmesi

İn vivo verilerin değerlendirilmesi için öncelikle ilaç verilmemiş tavşanlarda AXa seviyelerinin bir "baseline" oluşturup oluşturmadığını görmek amacıyla ölçüm yapıldı. Hiçbir uygulama yapılmamış 24 tavşandan bir kez, 2 tavşandan 6 saat boyunca çeşitli zaman aralıklarında yedi kez örnek alınmıştır. Bu gruplara ilave olarak çeşitli zamanlarda yapılan farklı formülasyonların uygulandığı herbir tavşanda da ilaç verilmeden başlangıç noktasında alınan örnekler değerlendirildiğinde büyük çoğunluğu 0 olmak üzere 0'a çok yakın değerler gözlenmiştir. Sonuçta plazmada ilaç verilmeksizin AXa seviyelerinin bir "baseline" oluşturmadığı gözlenmiştir.

Hedeflenen C_{maks} değeri etkinliğin ölçütü olan 0.2 Axa IU/mL ve üzeridir[25-27]. Üst sınır olarak net bir değer olmamakla birlikte genellikle 0.5-1 AXa IU/mL'nin üzerine çıkmak tehlikeli olabilir çünkü kaynaklarda farklı DMAH'lere göre kanama riski için verilen limitler değişiklik göstermektedir[24].

DMAH'lerin oral uygulamasını sağlamak üzere yapılan çalışmalarda etkin seviyeye ulaşmak için yaklaşık 700 ile 15000 IU/kg gibi çok farklı dozlarda uygulamalar yapıldığı ve etkinliğe farklı dozlarda ulaşıldığı görülmüştür[9,84- 99]. Bu farklılıklar, değişik DMAH tipleri ile çalışılmasından kaynaklanabileceği gibi kullanılan denek türlerinin değişmesinden de kaynaklanmış olabilir. Çalışmamızda da farklı dozlarda in vivo ön denemeler ve denemeler yapılmıştır.

Bazı araştırmacılar heparinlerin mide ortamında bozunduğu düşüncesiyle intestinal formülasyonlarını hazırlamıştır[27,61,78,93,99]. Heparinin asit ortamda bazik ortama kıyasla daha dayanıksız olduğu bilinse de, yapılan araştırmalar asit ortamdaki bozunmanın kısa sürede olmadığını, yüksek sıcaklıkla beraber asit pH'nın bozunmada daha etkili olduğunu göstermektedir[236]. Çoğu araştırmacı heparinlerin büyük ve hidrofilik molekül yapısını, ayrıca yapıdaki negatif yük yoğunluğunu oral absorbsiyonu sınırlandıran etkenler olarak belirtmiştir[67,69,85,87,91,95]. Bu nedenlerle çalışmamızda intestinal uygulamaya veya

enterik kaplamaya gerek olmadığı düşünülerek ve formülasyonlar doğrudan oral yoldan uygulanmıştır.

Hidrofilik yapıları nedeniyle heparin ve DMAH paraselüler yoldan absorbe olabilirler ancak büyük moleküllü olmaları nedeniyle sıkı bağlanma noktalarından (tight junction) geçmeleri zordur[27]. Bu mekanizma üzerinde etkili absorbsiyon artırıcılarla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu gruba kitozan türevleri[89], Carbopol 934P[90], labrasol[88], EDTA[62], sodyum kaprat vb örnek verilebilir[27]. DMAH'in lipofilitesini artırarak transelüler geçişi sağlamak diğer bir yoldur. Bu amaçla yapılmış çalışmalara DMAH ile DOCA, DMSO konjugatları[64,85,86], SNAC ve SNAD içeren formülasyonlar[60,65-69,71,87] ve emülsiyon/mikroemülsiyon[75,76], lipozom[77] gibi farmasötik şekillerle yapılmış çalışmalar örnek verilebilir Hücre membranının permeabilitesi üzerine etkili safra asitleri ve polikatyonik lipofilik-çekirdek dendronlar kullanarak DMAH absorbsiyonunun sağlandığı çalışmalar da mevcuttur[91].

Kimyasal absorbsiyon artırıcı maddelerin birçoğunun toksik etkileri nedeniyle çok dikkatli kullanılmaları gerektiği bilinmektedir[237] . Bazı absorbsiyon artırıcılar da mide bulantısı gibi yan etkiler oluşturduğundan veya acı tada sahip olduklarından tedavinin yarıda kesilmesi problemi yaşanmaktadır[238]. Çalışmamızda bu tür bir kimyasal absorbsiyon artırıcı içeren formülasyon yerine doğal, biyogeçimli ve biyoparçalanır polimerlerden faydalanılmıştır. Düşük moleküllü yapıdaki penetrasyon artırıcıların tersine polimerik penetrasyon artırıcılar gastrointestinal kanaldan absorbe olmaz ve sistemik yan etki göstermezler[9]. Bu amaçla seçilen kitozan ve aljinat ile hazırlanan formülasyonlara ait bulgular ve etki mekanizmaları aşağıda tartışılacaktır.

E.8.1. Tavşanlara İntravenöz DMAH Uygulanması

Tavşanlara 100 IU/kg DMAH İV olarak kulak veninden uygulanması sonucu elde edilen bulgular Tablo 35'de, plazma profili Şekil 29'da gösterilmiştir. Tavşanlara DMAH'in İV uygulanmasında 100 IU/kg gibi düşük doz seçilmiştir. Bu doza 400 ve 200 IU/kg ile ikişer tavşanla yapılan ön denemeler sonucu karar verilmiştir. AXa ölçüm cihazında çok yüksek derişimler, okuma aralığı dışında kalmaktadır. Ön denemelerde 200 IU/kg dozda 400 IU/kg dozda

elde edilen en yüksek AXa seviyesi çok yakın bulunmuştur çünkü optik dansite belli değerden sonra hep aynı çıkmaktadır. Dolayısıyla AXa seviyesi de aynı çıkmaktadır. Bu nedenle Axa seviyesinin 2'nin altında elde edildiği doz olan 100 IU/kg seçilmiştir. Axa seviyesi 2-3 saat arasında minimum seviyeye inmiştir. AXa seviyesinin 4 saatte minimuma indiği çalışmalar da bulunmaktadır, ancak DMAH'lerin fizikokimyasal ve farmakokinetik parametrelerinin değiştiği ve birbirinin yerine kullanılamadığı göz önüne alınırsa beklenen bir durumdur[97].

E.8.2. DMAH İçeren Çözelti

DMAH (5000 IU/kg) çözeltisi oral yoldan tavşanlara uygulanmıştır ve sonuçlar Tablo 36'da verilmiştir. Şekil 30'da da gözlendiği üzere AXa seviyelerinde bir artış oluşmamıştır ve etkinlik gözlenmemiştir. DMAH çözeltisinin absorbe olmaması beklenen bir durumdur çünkü yüksek oranda negatif yük yoğunluğuna sahiptir, büyük moleküllü yapıdadır ve çok hidrofiliktir[27, 88,239] Doutremepuich ve arkadaşları 15000 IU/kg DMAH dozda bile etkili seviyeye ulaşamadıklarını belirtmiştir[239]. Diğer çalışmalarda da araştırmacıların DMAH'in absorbsiyonunu artırmak amacıyla hazırladıkları formülasyonlara karşılık sadece DMAH çözeltisinin (200 IU/kg[88], 279 IU/kg[97], 7500 IU/kg[91] dozlarda) oral uygulanmasıyla (deneklere içirilmesiyle) herhangi bir aktivite gözlenmemiştir. Diğer taraftan Hiebert ve arkadaşlarının DMAH tiplerinden reviparin sodyum, logiparin ve tinzaparinin sadece çözeltilerinin sıçanlara uygulanması şeklinde yaptığı çalışmalarda plazmada daha düşük olmak üzere plazma ve endotelde DMAH'in etkinliği gösterilmiştir[84,240,241]. Bu durum DMAH'lerin aktivitelerinin, fizikokimyasal ve farmakokinetik özelliklerinin farklı olmasıyla açıklanabilir, ancak tek başına DMAH çözeltisinin oral yoldan verilmesiyle etki gözlenen başka çalışmalara rastlanmamıştır.

E.8.3. Siklodekstrin Formülasyonları ile Deneyler

Siklodekstrin varlığında DMAH uygulamaktaki amaç dimetil-β-siklodekstrinin absorbsiyon artırıcı etkisinden faydalanmaktır. Çalışmamızda absorbsiyon artırıcı etkisi en yüksek olan dimetil-β-siklodekstrin seçilmiştir.

Siklodekstrinlerin etkinliği ve güvenilirliği kullanılan siklodekstrinin tipine ve derişimine bağlıdır, dozaj şekli de önemlidir[187].

Büyük moleküllü ve hidrofilik olan DMAH ile doğrudan etkileşim yerine membranları etkileyerek ya da lokal etkileşim oluşarak gastrintestinal kanaldan absorbsiyon sağlanması düşünülmüştür. Siklodekstrinler absorbsiyon artırıcı olarak genellikle % 5 oranında kullanılırlar. Absorbsiyon artıcı mekanizmaları için önerilen farklı yollar vardır. Biyolojik membrandan lipitleri ekstrakte ederek veya membrandan spesifik lipitleri (kolesterol, fosfolipit) çözerek membran geçirgenliğini artırıyor olabilirler[188,211]. "Tight junction"ları açtıkları da düşünülür[242]. İlaç molekülünü enzimatik bozunmadan koruyarak da biyoyararlanımı artırıcı olarak katkı sağladıkları düşünülmektedir. Birçok peptit protein hidrofilik yapıdadır ve siklodekstrin boşluğu için büyük hacimlidir. Bu durumda etkileşim lokal -sadece hidrofobik yan zincirle- olabilir. Bu da proteinin üç boyutlu yapısını değiştirerek fizikokimyasal parametrelerini değiştirebilir[243]. Benzer şekilde insülinin rektal absorbsiyonunun artırıldığı çalışmalar mevcuttur[197]. Yetkin ve arkadaşlarının salmon kalsitonini nazal yoldan tavşanlara uyguladıkları çalışmada da DM-β-CD'in "tight junction"ları açarak etki gösterdiği belirtilmiştir[193].

DMAH'in siklodekstrin kullanılarak nazal ve pulmoner yoldan uygulandığı çalışmalar mevcuttur[26,56]. DMAH'in nazal uygulandığı bir çalışmada, DM-β-CD, β-siklodekstrin ve hidroksi-propil-β-siklodekstrinden daha etkili bulunmuştur[56]. DMAH'in pulmoner uygulandığı çalışmada, DM-β-CD ile heparin ve DMAH kullanılmıştır ve 50 U/kg dozda heparinle etkinlik gözlenmezken DMAH ile etkinlik gözlenmiştir. Bu durumun nedeni olarak heparinin molekül ağırlığının daha büyük olması gösterilmiştir[26].

Çalışmamızda % 5 siklodekstrin içeren, 1500 ve 3000 ve 5000 IU/kg DMAH dozda oral uygulanan çözeltilerin hiçbiri ile etkinlik için eşik değer olan 0.2 IU/mL seviyesine ulaşılamadı. Sonuç olarak siklodekstrinler ile 5000 IU/kg DMAH doza kadar çıkılmış ancak etkinlik gözlenememiştir.

E.8.4. Kitozan Tablet Formülasyonları ile Ön Deneyler

Çalışmamızda DMAH-kitozan etkileşmesinin DMAH'in oral absorbsiyonunu artırabileceği düşünülmüştür. DMAH içeriği 1500 IU/kg (KT1500), 3000 IU/kg (KT3000), 5000 IU/kg (KT5000) olan tabletler ile yapılan denemelerde etkinlik gözlenememiştir.

Asit ortamda katyonik yapıdaki kitozanın çözünerek anyonik DMAH ile kompleks oluşturduğu ve fibriller şeklinde çöken bu büyük hacimli kompleksin mide mukozasından emilemediği düşünülmektedir. Kompleksin barsak pH'sında da ayrılmadığı ve emilmediği düşünülmektedir.

Chandy ve arkadaşları[93] heparin ve DMAH ile PEG-aljinat mikroküre hazırlayıp yüzeyi kitozan ve selüloz asetat ftalat ile kaplamıştır. Kaplanmış mikrokürelerle in vitro olarak antikoagülan aktivite gözlenmiştir. Ancak Thanou ve arkadaşları[89] pozitif yüklü kitozan ve türevlerinin negatif yüklü heparinle kompleks oluşturarak çökececeğini belirtmişler ve amfolitik bir kitozan türevi olan Mono-N-karboksimetil kitozan (MKK) ile DMAH çözeltisi hazırlamışlardır. DMAH, 7200 anti Xa $U.kg^{-1}$ dozda intradoudenal olarak sıçanlara uygulanmış, 3 saat sonunda terapötik seviyeye ulaşılmıştır. MKK'nın paraselüler geçişi artırarak etki ettiği belirtilmiştir.

Ancak Vila ve arkadaşlarının[227] Poloksamer 188 içeren ve içermeyen kitozan çözeltilerine DMAH içeren TPP çözeltisi ekleyerek elde ettikleri nanopartiküllerden poloksamer içerenleri, DMAH dozu 200 IU/mL/sıçan olacak şekilde sıçanlara vererek sınırda da olsa (0.2 IU/mL AXa) etkin seviyeye ulaştıkları görülmüştür.

Kitozan ile benzer bir etkileşimin salmon kalsitoninle de gözlendiği, oluşan kompleksin kısmen dönüşümsüz olduğu belirtilmiştir[232]. Sonuç olarak DMAH ile kitozanın asit ortamda doğrudan teması kompleks oluşumuna neden olmaktadır ve bu etkileşim beklendiği gibi DMAH'in absorbe olmasını sağlamamaktadır.

E.8.5. Aljinat Boncuk Formülasyonları ile Deneyler

Doğal, biyoparçalanır ve biyoadezif bir polimer olan aljinat kullanılarak DMAH içeren boncuk formülasyonu hazırlanarak tavşanlara oral yoldan uygulanmıştır. Bu şekilde etkin maddenin GIK'da kalış süresini artırmak, böylece ilacın emilimini artırmak hedeflenmiştir[10]. Doku yüzeyi ve ilaç taşıyıcı polimer arasında daha yüksek konsantrasyon farkı elde edileceğinden, etkin maddenin difüzyonu da artırabilir[109]. Ayrıca partiküler sistemlerde yüzey daha geniş olacağından gastrointestinal sistemle etkileşen alan daha fazladır[27].

İn vitro deneyler sonucunda seçilen FH7 boncuk formülasyonu 5000 IU/kg DMAH içerecek şekilde ve DMAH içermeyen boncuklar tavşanlara oral yoldan verildi. Kontrol amacıyla boş boncukların uygulandığı grupta AXa seviyesinde herhangi bir artış gözlenmedi (Tablo 41 ve Şekil 33). Ancak 5000 IU/kg dozda DMAH boncuk uygulanan tavşanlarda etkinlik gözlendi (Axa >0.2 IU/mL) AXa seviyesi 2 saatte maksimum seviyeye ulaştı. (0.360 IU/mL) ve altıncı saatte normal seviyeye indiği gözlendi (Tablo 42 ve Şekil 33).

Mide ortamında, düşük pH'da aljinat boncuk ve mikropartiküllerden makromoleküllerin salımının düşük olduğu bilinmektedir[109]. İn vivo bulgularımız bu bilgilerle ve in vitro çözünme hızı bulgularımızla uyum göstermektedir. Boncuklarda etkin madde salımı pH 1.2'de düşüktür fakat pH 6.8'e geçer geçmez birden artmıştır. İn vivo deneylerde de plazmada birinci saatte AXa seviyesinde bir artış görülse de tam olarak etkin seviyeye ulaşılamamıştır. Aljinat boncukların düşük pH'da yapısını korumasına rağmen plazma seviyesinde artış olması, ilaç moleküllerinin bir miktar da olsa salındığını gösterir bu in vitro bulgularla da uyumludur. Zaten kendisi de negatif yüklü olan aljinat ile hazırlanan negatif yüklü proteinlerin salımının daha hızlı olduğu bilinmektedir[109]. Ancak 2 saat civarında maksimum konsantrasyona ulaşılmıştır, 3 ve 4. saatte plazma seviyesi düşse de etkili seviyenin üzerinde kalmaya devam etmiştir. Bu durumun nedeni ise biyoadezyon sebebiyle aljinatın mukoza yüzeyinde tutunması olabilir. Atıncı saatte plazma seviyesinin tamamen düşerek sıfıra indiği gözlenmektedir. Aljinat anyonik bir polimerdir ve polianyon polimerlerin biyoadezif özelliğinin güçlü olduğu hatta kitozan gibi polikatyonik polimerlerden bile daha yüksek olduğu bilinmektedir[111].

Aljinatların Ca^{+2} ile çapraz bağlanma oluşturdukları matris yapıyla antijenleri oral uygulamada olumsuz şartlardan korudukları ve mukoadezif özelliğinden dolayı gastrointesinal sistemde kalış süresini ve mukozayla temas süresini artırdıkları binmektedir[130]. Ayrıca tutundukları mukozal yüzeyde yüksek oranda ilaç lokalizasyonu sağladıkları bilinmektedir[109].

Sonuç olarak çalışmamızda aljinat boncukların Ca^{+2} ile çapraz bağlanma sırasında yüklenen etkin maddeyi gastrointestinal kanalın olumsuz şartlarından koruyarak, mukoadezif özelliğinden dolayı gastrointesinal sistemde kalış süresini ve mukozayla temas süresini artırarak, tutundukları mukozal yüzeyde yüksek oranda ilaç lokalizasyonu sağlayıp konsantrasyon farkı nedeniyle geçişi artırarak etkili olabilecekleri düşünülmektedir.

E.9. İn Vivo Deney Sonuçlarının Farmakokinetik ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

İn vivo deneyler sonucu bulunan AXa konsantrasyonları zamana karşı grafiğe geçirilerek eğri altına kalan alanlar (AUC), hesaplandı. DMAH içeren aljinat boncuk (DMAHAB) formülasyonunun etkili olduğu gözlendi ve kontrol grubu olan DMAH çözeltisinden ve diğer tüm gruplardan anlamlı farklı bulundu ($p<0.05$).

Siklodekstrin içeren DMAH çözeltisi ve boş aljinat boncuğun oral uygulanması ile AUC değeri sırasıyla 0.281±0.192 ve 0.166±0.124 bulunmuştur. Bu değerlerin sadece siklodekstrin çözeltisi uygulandığındaki gibi "0" olmadığı, ancak standart hata değerlerinin yüksek olduğu gözlenmektedir. Ayrıca varyans analizi ile karşılaştırmalı test sonuçlarına göre DMAH boncukları hariç tüm oral grupların birbirinden anlamlı olarak farklı olmadıkları gözlendi ($p>0.05$). Siklodekstrin içeren DMAH çözeltisi ve boş aljinat boncuğun oral uygulanması ile C_{maks} değeri sırasıyla 0.0553±0.0368 ve 0.0468±0.0324 IU/mL bulunmuştur, bu değerler etkin seviyenin (0.2 IU/mL AXa) altındadır.

DMAH içeren aljinat boncuk formülasyonu oral çözelti formülasyonuna göre biyoyararlanımı 69.3 kat artırmıştır. Bağıl biyoyaralanım % 6930

bulunmuştur. Mutlak biyoyararlanım % 2.10 bulunmuştur. DMAH çözelti olarak oral yoldan verildiğinde ise mutlak biyoyararlanım % 0.0303 bulunmuştur.

Çeşitli hayvanlarla ve çeşitli absorbsiyon artırıcılarla veya lipofilik komplekslerle çözelti şeklinde DMAH uygulaması ile t_{max} 20 dakika ile 1 saat arasında değişmektedir[87,91,244]. Polimerik sistemlerde bu sürenin uzadığı görülmektedir. Örneğin tiyollenmiş polikarbofil tabletler ile oral DMAH uygulaması ile t_{max} 2 saate kadar çıkmıştır. Benzer şekilde çalışmamızda da t_{max} 2 saat bulunmuştur.

DMAH içeren aljinat boncuklarla elde edilen C_{maks} 0.360 IU/mL'dir; bu değer etkinlik ve kanama riski açısından uygun bir değerdir.

DMAH'lerin oral uygulandığı çeşitli çalışmalarda farklı farmakokinetik parametreler ve etkinlikler gözlenmiştir. Bu çalışmalarda fare, sıçan, tavşan, köpek, maymun, domuz ve insan gibi çok farklı türler kullanıldığı da düşünülerek buradan kaynaklanan farkların olabileceği göz önüne alınmalıdır. Hepsinden de önemlisi DMAH'lerin elde edilişlerine ve kaynaklarına göre fizikokimyasal ve farmakokinetik parametrelerinde değişiklikler olabileceği ve birbirlerinin yerine kullanılamayacakları göz önüne alındığında tüm çalışmaları doğrudan karşılaştırmanın çok doğru sonuç vermeyeceği düşünülmektedir.

Sonuçta DMAH'lerin oral uygulamasını sağlamak üzere yapılan çalışmalar araştırıldığında yaklaşık 700 ile 15000 IU/kg gibi çok farklı dozlarda uygulamalar yapıldığı görülmüştür. Çalışmamızda 5000 IU/kg gibi çok yüksek olmayan bir dozda etkinlik sağlanmıştır.

E.10. Tavşan Midelerinin Histolojik İncelenmesi

Çalışmamızda tek başına DMAH çözeltisi uygulanan deneklerde epitel hücrelerinin yüzey zarının parçalandığı, yan yüz bağlantı birimlerinin yer yer yok olduğu gözlenmiştir. Deformasyonun ikinci ve üçüncü saatlerde de devam ettiği dikkat çekmektedir.

Boş aljinat boncuk uygulanan deneklerde ise sıkı ve ara bağlantı bölgelerinde hafif bir açılma gözlenmektedir. İlerleyen süreyle beraber hücrelerde salgı birikiminin devam ettiği ve aljinatın mide yüzey hücrelerinde az

yoğun bir katman oluşturacak şekilde yayıldığı gözlenmektedir. Üçüncü saatte de salgı biriktirme ve yeniden salgıya başlama döngülerinin hücrelerde yaygın olduğu, ancak hücre yan yüz bağlantı birimleri ve hücre zarının normal olduğu ayırt edilmiştir.

DMAH içeren aljinat boncuk uygulanan deneklerde ise heparinin olumsuz etkisinin aljinat ile kısmen önlendiği belirlenmiştir. İkinci saatte de yüzey epitel hücrelerinde bağlantı birimleri normal yapıdadır. Hücre yapısı oldukça korunmuştur. Üçüncü saatte aljinatın etkilerinin devam ettiği gözlenmektedir. Bulgularımızla benzer olarak Arıca ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ibuprofenin farelere aljinat boncuklarda verilmesiyle gastrik lezyonların önlendiği gözlenmiştir[128]. İbuprofenin mide mukozasında yarattığı erozyon aljinat boncuk içinde verildiğinde önlenmiştir.

İntravenöz DMAH uygulamasında midenin histolojik açıdan normal yapıda olduğu gözlenmektedir.

Sonuç olarak tüm bu bulgular göstermektedir ki, aljinat formülasyonu biyoadezif özellik göstererek mide duvarını kaplamakta ve etkisi üç saat boyunca devam etmektedir. Ayrıca mide yüzeyindeki hücreleri DMAH'in oluşturduğu deformasyondan korumaktadır.

F. SONUÇ

DMAH'in oral yoldan etkili bir ilaç şeklinin geliştirilmesi amaçlanan bu çalışmada, kitozan mikropartikül, kitozan tablet, çözelti, siklodekstrinli çözelti ve aljinat boncuk formülasyonları hazırlanmıştır. Yapılan in vitro ve in vivo deneylerde bulunan sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

İn vitro deney sonuçları:

1. Kitozan ile mikropartikül formülasyonları hazırlanmıştır. DMAH-Kitozan etkileşimi nedeniyle bu formülasyonlar başarılı olmamıştır.

2. DMAH ile kitozan ve kitozan klorür ile tablet formülasyonları hazırlanmıştır ve tabletler üzerinde yapılan denetimler sonucunda, 1:0.75 oranında DMAH:Kitozan içeren tablet formülasyonu oral uygulama için seçilmiştir.

3. Aljinat kullanılarak $CaCl_2$ ile iyonik etkileşim sonucu boncuk hazırlamak üzere önformülasyon çalışmaları yapılarak düşük viskoziteli aljinatın (Protonal LF 120 M) % 2'lik çözeltisinin kullanılmasına karar verilmiştir. Faktörlerden:

-Etkin madde:polimer oranı 1:1 ve 1:2
-$CaCl_2$ derişimi 0.2 ve 0.5 M
-Sertleştirme süresi 15 ve 30 dk olarak belirlenmiştir.

4. DMAH içeren aljinat boncukların hazırlanmasında 2^3 faktöriyel deney tasarımı kullanılmıştır. Etkin madde:aljinat oranı, $CaCl_2$ konsantrasyonu ve sertleştirme süresi bağımsız değişken olarak seçilerek bu değişkenlerin salınan ilacın % 50'si için geçen süreye ($t_{\%50}$) ve % tutulan etkin maddeye etkisi değerlendirilmiştir.

5. Tutulan etkin madde oranı tüm formülasyonlarda % 55.8-85.4 arasındadır.

6. Tutulan etkin madde oranı, $CaCl_2$ derişiminin ve etkin madde:aljinat oranının artmasına bağlı olarak artmıştır, sertleştirme süresinin artırılmasıyla çok küçük miktarda azalmıştır.

7. Tüm boncuk formülasyonları pH 1.2'de 2 saat boyunca bir miktar şişerek –dağılmadan- etkin maddenin % 37.7-62.0'lık kısmını salmıştır, pH 6.8'e alındıklarında ise yarım saat içinde etkin maddenin tamamını salmıştır.

8. Sertleştirici konsantrasyonu artırıldığında etkin madde:aljinat oranı 1:1 iken salım süresi uzamıştır, ancak etkin madde aljinat oranı 1:2 iken salım hızlanmıştır.

9. Sertleştirme süresi artırıldığında, sertleştirici madde 0.1 M iken salım hızlanmıştır ancak sertleştirici madde 0.5 M iken salım yavaşlamıştır.

10. Tüm faktörlerin ve etkileşimlerinin $t_{\%50}$ cevabına etkisi önemli bulunmuştur ($p<0.005$). Üç faktörün etkileşimi (abc) ve ac etkileşimi hariç tüm faktörlerin ve etkileşimlerinin % tutulan etkin madde oranına etkisinin önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.005$). Faktörlerin etkileri birbirinden bağımsız değildir.

11. Çalışmada 2^3 faktöriyel denemesi doğrusal modellere uygulanmıştır. Elde edilen eşitliklerde % tutulan etkin madde oranı ve $t_{\%50}$ cevabı üzerinde etkin madde:aljinat oranı ve $CaCl_2$ konsantrasyonunun, sertleştirme süresine kıyasla daha fazla etkili olduğu gözlenmiştir.

12. Faktöriyel tasarım sonucu aljinat boncuklarda, % tutulan etkin madde oranı ve $t_{\%50}$ cevabı açısından, en iyi sonucu 1:2 oranında etkin madde:aljinat ve 0.5 M $CaCl_2$ ile 15 dakika sertleştirilerek hazırlanan formülasyon vermiştir.

13. DMAH içeren aljinat boncuklarda verim tüm formülasyonlarda % 79.5 ile % 98.7 arasındadır. En yüksek verim, 0.5 M $CaCl_2$ varlığında, 1:2 oranında etkin madde:aljinat kullanıldığında ve 15 dakika sertleştirme yapıldığında gözlenmiştir.

14. Aljinat boncuklarda partikül boyutu 1325-1584 μm bulunmuştur.

15. Şişme oranı pH 1.2'de düşüktür ve boncuklar dağılmamıştır ancak pH 6.8'e alındıklarında yüksek oranda şişerek dağılmışlardır.

16. DSC, X-Işını kırınımı, FT-IR ölçümleri incelemeleri sonucu DMAH içeren aljinat boncuklarda etkileşim ve kompleks oluşumuna dair kanıtlar gözlenmiştir.

17. Aljinat boncuklarda SEM ölçümleri sonucu aljinat boncukların ve DMAH içeren aljinat boncukların küresel biçimde oldukları, boncukların pH 1.2'de 2 saatte şekillerinin değişmediği, fakat pH 6.8'e alındıktan sonra yarım saatte jel-matris yapının gevşediği, tabakalanma ve parçalanmaların oluşarak kütle kaybının yaşandığını gözlenmiştir.

İn vivo deney sonuçları:

1. Kitozan tablet formülasyonları 1500, 3000, 5000 IU/kg DMAH dozunda az sayıda tavşana oral yoldan uygulanmıştır, etkinlik gözlenmemiştir.

2. Siklodekstrin içeren çözelti formülasyonları 1500, 3000, 5000 IU/kg DMAH dozunda tavşanlara oral uygulandığında etkinlik gözlenmemiştir.

3. DMAH içeren çözeltiyle (5000 IU/kg), boş boncuklarla ve sadece siklodekstrin içeren çözeltiyle oral uygulama sonucu herhangi bir etkinlik gözlenmemiştir.

4. Aljinat boncuklarla 5000 IU/kg dozda DMAH'in tavşanlara uygulanması sonucu iki saat sonunda anti Xa etkinliği seviyesi 0.360 IU/mL'ye ulaşmıştır ve antikoagülan etkinlik sağlanmıştır (>0.2 IU/kg).

5. DMAH içeren aljinat boncukların, DMAH çözeltiye göre biyoyararlanımı 69.3 kat artırdıkları bulunmuştur.

6. DMAH'in 100 IU/kg dozda İV olarak uygulanmıştır ve DMAH içeren aljinat boncukların biyoyararlanımı hesaplanmıştır. Mutlak biyoyararlanım % 2.10 bulunurken, bağıl biyoyararlanım % 6930 bulunmuştur. Oral uygulanan DMAH çözeltisinin mutlak biyoyararlanımı ise % 0.0303 bulunmuştur.

7. Tavşan mideleri histolojik olarak incelenmiştir ve aljinat boncukların mide duvarındaki etkilerinin üç saat boyunca devam ettiği gözlenmiştir. DMAH'in aljinat boncuk ile verilmesiyle, DMAH'in çözelti olarak uygulandığında neden olduğu deformasyonun kısmen önlendiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak sodyum aljinat ve $CaCl_2$ ile iyonik etkileşme esasına göre 2^3 faktöriyel deney tasarımı kullanılarak hazırlanan DMAH boncuklarının, tavşanlara oral yoldan uygulanması ile antikoagülan etkinlik sağlanmıştır.

G. ÖZET

Heparin ve düşük molekül ağırlıklı heparin (DMAH) derin ven trombozunun ve pulmoner embolinin önlenmesinde ve tedavisinde yaygın olarak kullanılan antikoagülanlardır. Heparin, oral antikoagülanlara göre tedavideki üstünlüğü ve daha güvenilir olması nedeniyle daha avantajlıdır. Ancak heparinin fraksiyonlanması veya depolimerizasyonu ile elde edilebilen DMAH'ler, heparine göre biyoyararlanımı daha yüksek, kanama yapma riski daha az olduğundan daha çok tercih edilmektedir.

DMAH preparatları sadece parenteral yoldan kullanılmaktadır. DMAH'ın yüksek oranda negatif yük yoğunluğuna sahip olması, çok hidrofilik olması ve büyük moleküllü yapıda olması oral biyoyararlanımını sınırlandırır. Ancak parenteral uygulama hasta için zahmetlidir ve parenteral preparatların hazırlanmasındaki işlemler ve maliyet fazladır. Bu nedenle alternatif uygulama yollarına yönelik çeşitli formülasyonlar araştırılmıştır.

Bu çalışmada da DMAH'in, en fazla tercih edilen uygulama yolu olan oral yolla uygulanacak bir formülasyonunun geliştirilmesi ve antikoagülan etkinliğin sağlanması amaçlanmıştır.

Bu amaçla kitozan mikropartikül ve tabletleri, çözelti, siklodekstrinli çözelti ve aljinat boncuklar hazırlanmıştır. Kitozan içeren formülasyonlar başarılı olmamıştır.

Aljinat boncuklarda 2^3 faktöriyel tasarım uygulanarak, etkin madde:polimer oranı, sertleştirici madde konsantrasyonu ve sertleştirme süresi gibi değişkenlerin salınan ilacın % 50'si için geçen süreye ($t_{\%50}$) ve % tutulan etkin maddeye etkisi değerlendirilmiştir.

Aljinat ile $CaCl_2$ arasındaki iyonik etkileşme sonucu boncuklar oluşturulmuştur. Aljinat derişimi % 2, etkin madde:polimer oranı 1:1 ve 1:2, $CaCl_2$ derişimi 0.2 ve 0.5 M ve sertleştirme süresi 15 ve 30 dk olarak seçilmiştir.

Tutulan etkin madde oranının, tüm formülasyonlarda % 55.8-85.4 arasında değiştiği gözlenmiştir. Tutulan etkin madde oranı, $CaCl_2$ derişiminin ve etkin

madde:aljinat oranının artmasına bağlı olarak artmıştır. Sertleştirme süresinin artırılmasıyla tutulan etkin madde oranı çok küçük miktarda azalmıştır.

Boncuklarda 2 saat pH 1.2'de ardından bir saat pH 6.8'de salım deneyi gerçekleştirilmiştir. Tüm boncuk formülasyonları pH 1.2'de 2 saat boyunca bir miktar şişerek –dağılmadan- etkin maddenin % 37.7-62.0'lık kısmını salmıştır. Boncuklar pH 6.8'e alındıklarında ise yarım saatte parçalanarak içinde tüm etkin maddenin tamamen salındığı gözlenmiştir.

$CaCl_2$ konsantrasyonu artırıldığında etkin madde:aljinat oranı 1:1 iken salım hızı da azalmıştır, ancak etkin madde aljinat oranı 1:2 iken salım hızı artmıştır.

Sertleştirme süresinin salım hızına etkisi düşük olmakla birlikte sertleştirici konsantrasyonuna göre değişmiştir.

Faktörlerin % tutululan etkin madde ve $t_{\%50}$ cevabına etkisinin varyans analizi ile değerlendirilmesi yapılmıştır, ayrıca 2^3 faktöriyel denemesi doğrusal modellere uygulanmıştır. Sonuçta etkin madde:aljinat oranı, $CaCl_2$ konsantrasyonu, ve sertleştirme süresinin etkilerinin önemli olduğu ve birbirinden bağımsız olmadığı gözlenmiştir. Etkin madde:aljinat oranı ve $CaCl_2$ konsantrasyonunun, sertleştirme süresine kıyasla daha fazla etkili olduğu görülmüştür.

Boncuk verimi, % tutulan etkin madde oranı ve $t_{\%50}$ cevabı açısından en iyi sonucu, 1:2 oranında etkin madde:aljinat ve 0.5 M $CaCl_2$ ile 15 dakika sertleştirilerek hazırlanan formülasyonun (FH7) verdiği gözlenmiştir.

Aljinat boncuklarda verimin % 79.5 ile % 98.7 arasında değiştiği gözlenmiştir. Partikül boyutu 1325-1584 µm bulunmuştur.

Aljinat boncuklarda DSC, X-ışını kırınımı ve FT-IR incelemeleri sonucu DMAH'in saf olduğu ve aljinat boncuğa yüklendiği gözlenmiştir. Aljinat boncuklarda SEM ölçümleri sonucu aljinat boncukların ve DMAH içeren aljinat boncukların küresel biçimde oldukları gözlenmiştir.

İn vivo deneylerde 2.5-3 kg ağırlığında Yeni Zellanda tipi tavşanlar kullanılarak, zamana karşı AXa seviyeleri tayin edilmiştir. AUC ve C_{maks} değerleri hesaplanmıştır.

Kitozan tablet formülasyonları (1500, 3000, 5000 IU/kg DMAH) tavşalara oral yoldan uygulanmıştır, etkinlik gözlenmemiştir.

Absorbsiyon artırıcı olarak dimetil-β-siklodekstrinin tercih edildiği ve %5 oranında kullanıldığı DMAH çözelti formülasyonu ile 5000 IU/kg doza çıkılmıştır ancak herhangi bir etkinlik gözlenememiştir.

DMAH içeren çözeltiyle (5000 IU/kg), boş mikropartiküllerle, sadece siklodekstrin içeren çözeltiyle oral uygulama sonucu herhangi bir etkinlik gözlenmemiştir.

Aljinat boncuklarla (FH7) 5000 IU/kg dozda DMAH'in tavşanlara uygulanması sonucu iki saat sonunda anti Xa etkinliği seviyesi 0.360 IU/mL'ye ulaşmıştır ve antikoagülan etkinlik sağlanmıştır (>0.2 IU/kg).

DMAH içeren aljinat boncukların DMAH çözeltisine göre biyoyararlanımı 69.3 kat artırdığı bulunmuştur. DMAH çözeltisi 100 IU/kg dozda iv olarak uygulanmıştır ve mutlak biyoyararlanım hesaplanmıştır. Mutlak biyoyararlanım % 2.10 bulunurken, bağıl biyoyararlanım DMAH çözeltisine göre % 6930 bulunmuştur. Oral uygulanan DMAH çözeltisinin mutlak biyoyararlanımı ise % 0.0303 olarak hesaplanmıştır.

Tavşan midelerinin histolojik olarak incelenmesi sonucu aljinat boncukların biyoadezif özellik göstererek mide duvarını kapladığı ve etkisinin üç saat devam ettiği gözlenmiştir. DMAH'in aljinat boncuk ile verilmesiyle, DMAH'in çözelti olarak uygulandığında neden olduğu deformasyonun kısmen önlendiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak DMAH içeren aljinat boncukların tavşanlara oral yoldan uygulanması ile antikoagülan etkinlik sağlanmıştır.

SUMMARY

Heparin and low molecular weight heparin (LMWH) are widely used anticoagulants for the treatment and prevention of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. Because heparin is safer and more effective than other oral anticoagulants, its use has certain advantages. However, because in comparison with heparin, LMWHs, which are obtained by fractioning or de-polymerization of heparin, have a higher bioavailability and lower risk of bleeding, they are chosen more frequently than heparin.

LMWH preparations are currently available to patients only by parenteral administration. Because LMWH is highly negatively charged, highly hydrophilic and has large a molecular structure, its oral bioavailability is limited. However, parenteral administration is painful for patients and parenteral preparations are more difficult and more expensive. Therefore, various formulations are being investigated for alternative routes of administration.

The aim of this study is to develop a formulation for the oral administration of LMWH, which would be effective as an anticoagulant. For this purpose, chitosan microparticles and tablets, solution with and without cyclodextrin and alginate beads were prepared. The formulations containing chitosan were unsuccessful.

Using 2^3 factorial design, the effect on the duration for 50 % of the drug to be released ($t_{50\%}$) and encapsulation efficiency of parameters such as active substance:polymer ratio, concentration of the hardening agent and hardening time was investigated.

Beads were formed based on the ionic interactions between alginate and $CaCl_2$. Concentration of alginate was 2 %, active substance:polymer ratio was 1:1 and 1:2, $CaCl_2$ concentration was 0.2 and 0.5 M and hardening duration was 15 and 30 minutes.

Through all formulations, encapsulation efficiencies varied between 55.8 and 85.4 %. The encapsulation efficiencies increased related to increasing $CaCl_2$ ratio and active substance/alginate ratio. With increasing hardening duration, encapsulation efficiency decreased to an insignificant degree.

Drug release studies were carried out on beads using pH 1.2 for 2 hours and then using pH 6.8 for one hour. All bead formulations, at pH 1.2, swelled slightly, but did not disintegrate and released 37.7-62.0 % of their active substance in 2 hours. On the other hand, when those beads were placed in pH 6.8 solutions, all the active substance was released in half an hour.

When the active substance:alginate ratio was 1:2, LMWH release rate increased with increasing $CaCl_2$ concentration. However, when the active substance:alginate ratio was 1:1, the release rate decreased with increasing $CaCl_2$ concentration.

Therefore, release rate was affected only to an insignificant degree by hardening duration but was affected by concentration of the hardening agent.

Variance analysis was used to establish the effect of independent factors on dependent factors such as encapsulation efficiency and $t_{50\%}$. In addition, 2^3 factorial design was applied to linear models. Therefore, we observed that active substance/alginate ratio, $CaCl_2$ concentration and hardening duration have a significant effect.

Active substance/alginate ratio and $CaCl_2$ concentration have a more significant effect than hardening duration.

The formulation (FH7) consisting of 1:2 active substance:alginate and hardened using 0.5 M $CaCl_2$ for 15 minutes gave the best result in terms of encapsulation efficiency, $t_{50\%}$ and bead yield. The yield of all formulations varied between 79.5 and 98.7 %. Alginate bead size measured 1325-1584 μm.

DSC, X-ray diffraction and FT-IR tests on alginate beads showed that LMWH was pure and that is was loaded on alginate beads.

On the basis of SEM measurements we observed that alginate beads and those carrying LMWH were spherical.

In in vivo experiments, New Zealand rabbits weighing 2,5–3 kg were used and their anti Xa levels were determined versus time. AUC and C_{max} values were calculated.

Chitosan tablet formulations (1500, 3000, 5000 IU/kg LMWH) were administered orally and had no observed activity.

Although 5 percent of dimethyl-β-cyclodextrin was used as an absorption enhancer in LMWH solution and the application dose was increased to 5000 IU/kg, no activity was observed.

LMWH solution (5000 IU/kg), alginate beads (without LMWH), and cyclodextrin solution (without LMWH) were administered orally and had no observed activity.

As a result of administration of alginate beads carrying LMWH (5000 IU/kg) to rabbits, the level of anti Xa effectivenesss reached 0.360 IU/mL and anticoagulant effect was achieved (>0.2 IU/kg).

It was observed that alginate beads carrying LMWH enhanced bioavailability to a level 69.3 times that of LMWH solution. The LMWH solution was administered IV at a dosage of 100 IU/kg and absolute bioavailability was calculated. Absolute bioavailability and relative bioavailability were found to be 2.10 % and 6930 % respectively. The absolute bioavailability of the oral solution was 0.0303 %.

According to histological evaluation of gastrointestinal tissues from the rabbits, it was observed that alginate beads due its bioadhesive properties cover the surface of the stomach. The effect of the beads continued for three hours and the deformation caused by LMWH solution was partially prevented by the use of alginate beads.

In conclusion, anticoagulant effectiveness was achieved using alginate beads carrying LMWH in oral administration to rabbits.

KAYNAKLAR

1. Bick RL. Proficient and cost effective approaches for the prevention and treatment of venous thrombosis and thromboembolism. Drugs 2000; 60: 575-595.
2. Majerus PW, Broze GJ, Miletich JP, Tollefsen DM. Anticoagulant, Thrombolytic and Antiplatelet Drugs. In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P, editörler. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Eight Edition. New York: Pergamon Press; 1990. 1311-1331.
3. Verstraete M, Wessler S. Heparins and anticoagulants. Fuster V, Verstraete M, editörler. Thrombosis in Cardiovascular Disorders. 9th Edition. Philedelphia: WB Saunders Company; 1992. 121-140.
4. O'Reilly RA. Pıhtılaşma bozukluklarında kullanılan ilaçlar. BG Katzung Editör, Çev: Özüner Z, Süzer Ö. Temel ve Klinik Farmakoloji, Cilt 2. 6 baskı. İstanbul: Barış Kitabevi; 1995. 672-690.
5. Goth A. Anticoagulant Drugs. Medical Pharmacology. Eight Edition. Saint Louis: The C V Company; 1976. 411-420.
6. Myeck MJ, Harvey RA, Champe PC. Lipincott's Illustrated Reviews: Pharmacology. 2nd edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1992. 193-206.
7. Hirsh J, Anand SS, Halperin JL, Fuster V. Guide to anticoagulant therapy: heparin, a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Circul 2001; 103: 2994-3018.
8. Linhardt RJ, Gunay NS. Production and chemical processing of low molecular weight heparins. Seminars in Thromb Hemost 1999; 25: 5-16.
9. Ross BP, Toth I. Gastrointestinal absorption of heparin by lipidization or coadministration with penetration enhancers. Curr Drug Del 2005; 2: 277-287.

10. Bernkop-Schnürch A, Egger C, Imam ME, Krauland AH. Preparation and in vitro characterization of poly(acrylic acid)- cysteine microparticles. J Control Rel 2003; 93: 29-38.
11. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Cilt 2. 6. Baskı. Ankara: Feryal Matbaacılık; 1992. 1386-1437.
12. Komsuoğlu B. Tuncer C, Kulan K. Klinik Kardiyoloji-Kardiyovasküler Farmakoloji-Kardiyovasküler İlaç Rehberi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2000. 405-416.
13. İliçin G. Kalp Hastalıklarında İlaç Tedavisi. Ankara: Güneş Kitabevi ; 1988, 243-250.
14. European Pharmacopoeia 5, Council of Europe. Strasbourg Cedex, France: 2005; 1717-1719.
15. Sweetman SC, Heparin. 35th Edition Martindale- The Complete Drug Reference. London: Pharmaceutical Press; 2007. 1168-1172.
16. Merck Index. 13th Edition. New Jersey: Merck&Co Inc; 2001. 830-831.
17. British Pharmacopoeia. London; London Her Majesty's Stationery Office: 2005: 965-966.
18. Nachtmann F, Atzl G, Roth WD. Heparin Sodium. Florey K, editör. Analytical Profiles of Drug Substances, 12. cilt. London: Academic Press; 1983. 215-276.
19. Folwaczny C, Fricke H, Endres S, Hartmann G, Jochum M, Loeschke K. Anti-inflammatory properties of unfractionated heparin in patients with highly active ulcerative colitis: a pilot study. Am J Gastroenterol 1997; 92: 911-912.
20. Li Y, Wang W, Wang H, Cho C. Intragastric administration of heparin enhances gastric ulcer healing through a nitric oxide–dependent mechanism in rats. Eur J Pharm 2000; 399: 205-214.

21. Panes J, Esteve M, Cabre E, Hinojoso J, Andreu M, Sans M, Fernandez-Banares F, Feu F, Gassull M, Pique JM. Comparison of heparin and steroids in the treatment of moderate and ulcerative colitis. Gastroent 2000; 119: 903-908.
22. Hirsh J, Levine MN. Low molecular weight heparin. Blood 1992; 79: 1-17.
23. McCart GM, Kayser SR. Therapeutic equivalency of low –molecular –weight heparins. Ann Pharmacother 2002; 36: 1042-1057.
24. Spinler SA, Wittkowsky AK, Nutescu EA, Smythe MA. Anticoagulation monitoring part 2: Unfractionated heparin and low –molecular –weight heparin. Ann Pharmacother 2005; 39: 1275-1285.
25. Arnold J, Ahsan F, Meezan E, Pillion DJ. Nasal administration of low molecular weight heparin. J Pharm Sci 2002; 91: 1707-1714.
26. Yang T, Mustafa F, Bai S, Ahsan F. Pulmonary delivery of low molecular weight heparin. Pharm Res 2004 ; 21: 2009-2016.
27. Motlekar NA, Srivenugopal KS, Wachtel MS, Youan BC. Oral delivery of low-molecular-weight heparin using sodium caprate as absorption enhancer reaches therapeutic levels. J Drug Targ 2005; 13: 573-585.
28. Simonneau G, Sors H, Charbonnier B, Page Y, Laaban EF, Azarian R, Laurent M, Hirsch J, Ferrari E, Bosson J, Mottier D, Beau B. A comparison of low-molecular-weight heparin with unfractionated heparin for acute pulmonary embolism. The New Eng J Med 1997; 337: 663-669.
29. Hull R, Raskob G, Pineo G, Rosenbloom D, Evans W, Mallory T, Anquist K, Smith F, Hughes G, Green D, Elliot G, Panju A, Brant R. A comparison of subcutaneous low-molecular-weight heparin with warfarin sodium for prophylaxis against deep-vein thrombosis after hip or knee implantation. The New Eng J Med 1993; 4: 1370-1376.
30. Hui-Fei C, Xue-Liang J. Treatment of corticosteroid-resistant ulcerative colitis with oral low molecular weight heparin. World J Gastroent 1999; 5: 448-450.

31. Güven KC, Ertan G. Metachromatic assay of heparin with different azure dyes. Acta Pharm Turc 1984; 26: 20-23.
32. Smith PK, Mallia AK, Hermanson GT. Colorimetric method for the assay of heparin content in immobilized heparin preparations. Anal Biochem 1980; 109: 466-473.
33. Özsoy Y. Heparin Üzerinde Çalışmalar. Doktora tezi. İstanbul: İÜ Ecz Fak; 1989.
34. Fareed J, Messmore HL, Bermes EW. New perspectives in coagulation testing. Clin Chem 1980; 26: 1380-1391.
35. STA Rotachrom Heparin, Colorimetric assay of heparins, UFH and LMWH, December, 2004.
36. Güven KC, Ertan G. The correlation equations for the assays of heparin by metachromatic and thrombin time methods I. Thromb Res 1984; 33: 197-201.
37. Güven KC, Ertan G. The correlation equations for the assay of heparin by metachromatic and thrombin time methods III with night blue. Acta Pharm Turc 1984; 26: 63-67.
38. Güven KC, Ertan G. The correlation equations for the assay of heparin by metachromatic and thrombin time methods IV with methylene blue. Acta Pharm Turc 1985; 26: 38-41.
39. Ziv E, Eldor A, Kleinman Bar-On H, Kidron M. Bile salts facilitate the absorption of heparin from the intestine. Biochem Pharm 1983; 32: 773-776.
40. Bonina FP, Montenegro, L. Vehicle effects on in vitro heparin release and skin penetration from different gels. Int J Pharm 1994; 102: 19-24.
41. Gutowska A, Bae YH, Feijen J, Kim SW. Heparin release from thermosensitive hydrogels. J Control Rel 1992; 22: 95-104.
42. Brazel CS, Peppas NA, Pulsatile local delivery of thrombolytic and antithrombotic agents using poly N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid hydrogels. J Control Rel 1996; 39: 57-64.

43. Kim TD, Sakon M, Kawasaki T, Kambayashi J, Oshiro T, Mori T. Studies on liposome-encapsulated heparin. Thromb Res 1986; 43: 603-612.
44. Betz G, Nowbakht P, Imboden R, Imanidis G. Heparin penetration into and permeation through human skin from aqueous and liposomal formulations in vitro. Int J Pharm 2001; 228: 147-159.
45. Kreitz MR, Domm JA, Mathiowitz E. Controlled delivery of therapeutics from microporous membranes II In vitro degradation and release of heparin-loaded poly (D,L-lactide-co-glycolide). Biomater 1997;18: 1645-1651.
46. Yang Z, Birkenhauer P, Julmy F, Chickering D, Ranieri JP, Merkle HP, Lüscher TF, Gander B. Sustained release of heparin from polymeric particles for inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation. J Control Rel 1999; 60: 269-277.
47. Yıldız A, Okyar A, Baktır G, Araman A, Özsoy Y. Nasal administration of heparin-loaded microspheres based on polylactic acid. Il Farmaco 2005; 60: 919-924.
48. Yıldız A, Özsoy Y, Araman A, Birchall J, Gumbleton M. Heparin microparticles for pulmonary administration. 33rd Annual Meeting&Exposition of the Controlled Release Society, Vienna, Austria: July 22-26; 2006.
49. Luo X, Qui D, He B, Wang L, Luo J. Biodegradable heparin-loaded microspheres: carrier molecular composition and microsphere structure. Macromol Biosci 2006; 6: 373-381.
50. Kwon IC, Bae YH, Kim SW . Heparin release from polymer complex. J Control Rel 1994; 30: 155-159.
51. Tan LP, Venkatraman SS, Sung PF, Wang XT. Effect of plasticization on heparin release from biodegradable matrices,. Int J Pharm 2004; 283: 89-96.
52. Edelman ER, Nathan A, Katada M, Gates J, Karnovsky M. Perivascular graft heparin delivery using biodegradable polymer wraps. Biomater 2000; 21; 2279-2286.

53. Zhu AP, Ming Z, Jian S. Blood compatibility of chitosan/heparin complex surface modified ePTFE vascular graft. Appl Surf Sci 2005; 241: 485-492.

54. Nissan A, Ziv E, Kidron M, Bar-on H, Friedman G, Hyam E, Eldor A. Intestinal absorption of low molecular weight heparin in animals and human subjects. Haemost 2000; 30: 225-232.

55. Mitragotri S, Kost J. Transdermal delivery of heparin and low-molecular weight heparin using low-frequency ultrasound. Pharm Res 2001; 18: 1151-1156.

56. Yang T, Hussain A, Paulson J, Abbsruscato TJ, Ahsan F. Cyclodextrins in nasal delivery of low-molecular-weight heparin in vivo and in vitro studies. Pharm Res 2004 ; 21: 1127-1136.

57. Xiong GL, Quan D, Maibach HI. Effects of penetration enhancers on in vitro percutaneous absorption of low molecular weight heparin through human skin. J Control Rel 1996; 42: 289-296.

58. Yıldız A, Güngör S, Özsoy Y, Araman A. In vitro studies on topical gel formulations of low molecular weight heparin. Symp Skin and Formulations, Paris, October 14. 2003; 23-24.

59. Song YK, Kim CK. Topical delivery of low-molecular-weight heparin with surface-charged flexible liposomes. Biomater 2006; 27: 271-280.

60. Rivera TM, Leone-Bay A, Paton DR, Leipold HR, Baughman RA. Oral delivery of heparin in combination with sodium n-[8-2-hydroxybenzoylamino] caprylate: pharmacological considerations. Pharm Res 1997; 14: 1830-1834.

61. Jiao Y, Ubrich N, Marchand-Arvier M, Vigneron C, Hofman M, Lecompte T, Maincent P. In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits. Circul 2002; 105: 230-235.

62. Winsdor E, Cronheim GE. Gastro-intestinal absorption of heparin and synthetic heparinoids. Nature 1961; 190: 263-264.

63. Leone-Bay A, Paton DR, Variano P, Leipold H, Rivera T, Miura-Fraboni J, Baughman RA, Santiago N. Acylated non-α-amino acids as novel agents for the oral delivery of heparin sodium, USP. J Control Rel 1998; 50: 41-49.

64. Lee Y, Kim SH, Byun Y. Orally delivery of new heparin derivates in rats. Pharm Res 2000; 17: 1259-1264.

65. Baughman RA, Kapoor SC, Agarwal RK, Kisicki J, Catella-Lawson F, Fitzgerald GA. Oral delivery of anticoagulant doses of heparin a randomized, double blind, controlled study in humans. Circul 1998; 98: 1610-1615.

66. Gonze MD, Manord JD, Leone-Bay A, Baughman RA, Garrard CL Strenbergh WC, Money SR. Orally administered heparin for preventing deep venous thrombosis. Amer J Surg 1998; 176: 176-178.

67. Gonze MD, Salartash K, Sternberg C, Baughman RA, Leone-Bay A, Money SR. Orally administered unfractionated heparin with carrier agent is therapeutic for deep venous thrombosis. Circul 2000; 101: 2658-2661.

68. Welt FGP, Woods TC, Edelman ER. Oral heparin prevents neointimal hyperplasia after arterial injury; inhibitory potential depends on type of vascular injury. Circul 2001; 104: 3121-3124.

69. Malkov D, Wang H, Dinh S, Gomez-Orellana I. Pathway of oral absorption of heparin with sodium n-[8- 2-hydroxybenzoylamino] caprylate. Pharm Res 2002; 19: 1180-1184.

70. Lawrence RN, News in Brief. Drug Disc Tod 2001; 6: 759-762.

71. emisphere.com (online) 2007 (cited 2007 Apr 18)

Available from : URL : http://www.emisphere.com/pc_oh.asp

72. Arbit E, Goldberg M, Gomez-Orellana I, Majuru S. Oral Heparin: Status Review. Thromb J 2006; 4: 1-7.

73. Sharma AN, Majuru S, Bhandarkar S, Agarwal R, Baughman RA. Effect of excipient concentration on the physical and mechanical properties of the oral heparin delivery agent SNAC. AAPS Annual Meeting and Exposition, Colorado. 2001; 4718.
74. Cavalla D. Improving medicines through drug delivery. THA News for the Med Res 2001; 7: 2-5.
75. Engel RH, Riggi SJ. Intestinal absorption of heparin: a study of the interactions of components of oil-in-water emulsions. J Pharm Sci 1969; 58: 1372-1375.
76. Andersson M, Löfroth JE. Small particles of a heparin/chitosan complex prepared from a pharmaceutically acceptable microemulsion. Int J Pharm 2003; 257: 305-309.
77. Ueno M, Nakasaki T, Adachi I, Sato K, Horikoshi I. Oral administration of liposomally-entrapped heparin: effect of surface charge of liposome on gastro-intestinal absorption. Archives of Pract Pharm 1987; 47: 56-60.
78. Jiao Y, Ubrich N, Marchand-Arvier M, Vigneron C, Hofman M, Lecompte T, Maincent P. In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits. Circul 2002; 105: 230-235.
79. Jiao YY, Ubrich N, Hoffart V, Marchand-Arvier M, Vigneron C, Hofman M, Maincent P. Preparation and characterization of heparin-loaded polymeric microparticles. Drug Dev Ind Pharm 2002; 28: 1033-1041.
80. Jiao YY, Ubrich N, Hoffart V, Marchand-Arvier M, Vigneron C, Hofman M, Maincent P. Anticoagulant activity of heparin following oral administration of heparin-loaded microparticles in rabbits. J Pharm Sci 2002; 91: 760-768.
81. Jiao YY, Ubrich N, Hoffart V, Marchand-Arvier M, Vigneron C, Hofman M, Maincent P. Preparation and in vitro evaluation of heparin loaded polymeric. Drug Del 2001; 8: 135-141.

82. Vasudev SC, Chandy T, Sharma CP. Development of chitosan/polyethylene vinyl acetate co-matrix: controlled release of aspirin–heparin for preventing cardiovascular thrombosis. Biomater 1997; 18: 375-381.
83. Vasudev SC, Chandy T, Sharma CP, Mohanty M, Umasankar PR. Synergistic effect of released aspirin–heparin for preventing bovine pericardial calcification. Artif Organs 2000; 24: 129-136.
84. Hiebert LM, Ping T, Wice SM. Antithrombotic activity of orally administered low molecular weight heparin (Logiparin) in a rat model. Haemost 2000; 30: 196-203.
85. Lee YK, Nam JH, Shin HC, Byun Y. Conjugation of low-molecular-weight heparin and deoxycholic acid for the development of a new oral anticoagulant agent. Circul 2001; 104: 3116-3120.
86. Kim SK, Vaishali B, Lee E, Lee S, Lee Y, Kumar TS, Moon HT, Byun Y. Oral delivery of chemical conjugates of heparin and deoxycholic acid in aqueous formulation. Thromb Res 2006; 117: 419-427.
87. Salartash K, Gonze MD, Leona-Bay A, Baughman R, Sternberg C, Money SM. Oral low-molecular weight heparin and delivery agent prevents jugular venous thrombosis in the rat. J Vasc Surg 1999; 30: 526-532.
88. Prasad YVR, Minamimoto T, Yoshikava YM, Shibata N, Mori S, Matsuura A, Takada K. In situ intestinal absorption studies on low molecular weight heparin in rats using Labrasol as absorption enhancer. Int J Pharm 2004; 271: 225-232.
89. Thanou M, Nihot MT, Jansen M, Verhoef JC, Junginger HE. Mono-N-Carboxymethyl chitosan (MCC), a polyampholytic chitosan derivative, enhances the intestinal absorption of low molecular weight heparin across intestinal epithelia in vitro and in vivo. J Pharm Sci 2001; 90:38-46.

90. Thanou M, Verhoef JC, Nihot MT, Verheijden JHM, Junginger HE. Enhancement of the intestinal absorption of low molecular weight heparin (LMWH) in rats and pigs using Carbopol® 934P. Pharm Res 2001; 18:1638-1641.

91. Hayes PY, Ross BP, Thomas BG, Toth I. Polycationic liphophilic-core dendrons as penetration enhancers for the oral administration of low molecular weight heparin. Bioorg Med Chem 2006; 14: 143-152.

92. Bohlinder K, Ollson B, Ragnarrson G, Singh SK, Öhman GS, Wadsten T, Carlsson A, Herslöf B. Use and characteristics of a novel lipid particle forming, matrix as a drug-carrier system. Eur J Pharm Sci 1994; 2: 271-279.

93. Chandy T, Rao GHR, Wilson RF, Das GS. Delivery of LMW Heparin via surface coated chitosan/PEG-alginate microspheres prevents thrombosis. Drug Del 2002; 9: 87-96.

94. Hoffart V, Ubrich N, Simonin C, Babak V, Vigneron C, Hofman M, Lecompte T, Maincent P. Low molecular weight heparin loaded polymeric nanoparticles: Formulation, characterization, and release characteristics. Drug Dev Ind Pharm. 2002; 28: 1091-1099.

95. Hoffart V, Ubrich N, Lamprecht A, Bachelier K, Vigneron C, Lecompte T, Hoffman M, Maincent P. Microencapsulation of low molecular weight heparin into polymeric particles designed with biodegradable and nonbiodegradable polycationic polymers. Drug Del 2003; 10: 1-7.

96. Hoffart V, Lamprecht A, Maincent P, Lecompte T, Vigneron C, Ubrich N. Oral bioavailability of low molecular weight heparin using a polymeric delivery system. J Control Rel 2006; 113: 38-42.

97. Kast CE, Guggi D, Langoth N, Bernkop-Schnürch A. Development and in vivo evaluation of an oral delivery system for low molecular weight heparin based on thiolated polycarbophil. Pharm Res 2003; 20: 931-936.

98. Schmitz T, Litner VM, Bernkop-Schnürch A. Oral Heparin Delivery: Design and in vivo evaluation of a stomach-targeted mucoadhesive delivery system. J Pharm Sci 2005; 94: 966-973.
99. Andriuoli G, Caramazza I, Galimberti G, Zoppetti G, Benedini F, Sala A, Del Soldato P. Intraduodenal absorption in the rabbit of a novel heparin salt. Haemost 1992; 22: 113-116.
100. Sweetman SC, Alginic acid, Sodium alginate, Propylene glycol alginate. 35th Edition Martindale- The Complete Drug Reference. London: Pharmaceutical Press; 2007. 1943-1944.
101. Alginates (online) 2007 (cited 2007 Apr 12)

Available from : URL :
http://www.fmcbiopolymer.com/Pharmaceuticals/Alginates

102. Cybercolloids (online) 2007 (cited 2007 Apr 12)

Available from : URL :
http://www.cybercolloids.net/manufacturers/listphp?submit=goandgum

103. Takka S. Doğal Polimer Kullanılarak Hazırlanan Boncuk Şeklindeki Kontrollü Salım Sistemlerinin Tasarımı ve Geliştirilmesi. Doktora Tezi. Ankara: GÜ Eczacılık Fakültesi, 1996.
104. Tønnesen HH, Karlsen J, Alginate in drug delivery systems. Drug Dev Ind Pharm 2002; 28, 621-630
105. Kibbe AH. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Third Edition. Washington: American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Pres; 2000. 10-12.
106. Gürel A, Sığır Serum Albumin Taşıyan Mikropartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: GÜ Eczacılık Fakültesi, 2005.

107. Kibbe AH. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Third Edition. Washington: American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Pres; 2000. 465-467.
108. pharmaquality (online) 2007 (cited 2007 Apr 12).

Available from : URL :
http://www.pharmaquality.com/mag/0327006/pfq-03272666_FO3htm

109. George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan- a review. J Control Rel 2006; 114: 1-14.
110. Mørch YA, Donati I, Strand BL, Skjak-Braek G. Effect of Ca^{2+}, Ba^{2+} and Sr^{2+} on alginate microbeads. Biomacromol 2006; 7: 1471-1480.
111. Gombotz WR, Wee SF. Protein release from alginate matrices. Adv Drug Del 1998; 31: 267-285.
112. Takeuchi H, Yasuji T, Hino T, Hiromitsu H, Yamamoto H, Kawashima Y. Spray-dried composite particles of lactose and sodium alginate for direct tabletting and controlled releasing. Int J Pharm 1998; 174: 91-100.
113. Shiraishi S, Imai T, Iwaoka D, Otagiri M. Improvement of absorption rate of indomethacin and reduction of stomach irritation by alginate dispersions. J Pharm Pharmacol 1991; 43: 615-620.
114. Miyazaki S, Kubo W, Attwood D. Oral sustained delivery of theophylline using in-situ gelation of sodium alginate. J Control Rel 2000; 67: 275-280.
115. Richardson JC, Dettmar PW, Hampson FC Melia CD. Oesophageal bioadhesion of sodium alginate suspensions 2. Suspension behaviour on oesophageal mucosa. Eur J Pharm Sci 2005; 24: 107-114.
116. Batchelor HK, Tang M, Dettmar PW, Hampson FC, Jolliffe IG, Craige DQM. Feasibility of a bioadhesive drug delivery system targeted to oesophageal tissue. Eur J Pharm Biopharm 2004; 57: 295-298.
117. Liew CV, Chan LW, Ching AL, Heng PWS. Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets. Int J Pharm 2006; 309: 25-37.

118. Nokhodchi A, Tailor A. In situ cross-linking of sodium alginate with calcium and aluminium ions to sustain release of theophylline from polymeric matrices. Il Farmaco 2004; 59: 999-1004.
119. İkinci G, Şenel S, Wilson CG, Şumnu M. Development of a buccal bioadhesive nicotine tablet formulation for smoking cessation. Int J Pharm 2004; 277: 173-178.
120. Veski P, Marvola M. Sodium alginates as diluents in hard gelatin capsules containing ibuprofen as a model drug. Pharmazie 1993; 48: 757-760.
121. Takka S, Acartürk F. Calcium alginate microparticles for oral administration: I: effect of sodium alginate type on drug release and drug entrapment efficiency. J Microencap 1999; 16: 275-290.
122. Yenice İ, Çalış S, Kaş HS, Özalp M, Ekizoğlu M, Hıncal AA. Biodegradable implantable teicoplanin beads for the treatment of bone infections. Int J Pharm 2002; 242: 271-275.
123. Arıca B, Çalış S, Kaş HS, Sargon MF, Hıncal AA. 5-Fluorouracil encapsulated alginate beads for the treatment of breast cancer. Int J Pharm 2002; 242: 267-269.
124. Takka S, Acartürk F. Calcium alginate microparticles for oral administration: III The effect of crosslink agents and various additive polymers on drug release and drug entrapment efficiency. Pharmazie 1999; 54: 137-141.
125. Acartürk F, Takka S. Calcium alginate microparticles for oral administration: II effect of formulation factors on drug release and drug entrapment efficiency. J Microencap 1999; 16: 291-301.
126. Tu J, Bolla S, Barr J, Miedema J, Li X, Jasti B. Alginate microparticles prepared by spray-coagulation method: Preparation, drug loading and release characterization. Int J Pharm 2005; 303: 171-181.
127. Whitehead L, Collett JH, Fell JT. Amoxycillin release from a floating dosage form based on alginates. Int J Pharm 2000; 210: 45-49.

128. Arıca B, Çalış S, Atilla P, Durlu NT, Çakar N, Kaş HS, Hıncal AA. In vitro and in vivo studies of ibuprofen-loaded biodegradable alginate beads. J Microencap 2005; 22: 153-165.
129. Kim B, Bowersock T, Griebel P, Kidane A, Babiuk LA, Sanchez M, Attah-Poku S, Kaushik RS, Mutwiri GK. Mucosal immune responses following oral immunization with rotavirus antigens encapsulated in alginate microspheres. J Control Rel 2002; 85: 191-202.
130. Lemoine D, Wauters F, Bouchend'homme S, Préat V. Preparation and characterization of alginate microspheres containing a model antigen. Int J Pharm 1998; 176: 9-19.
131. Yang F, Wang K, He Z. Two new plate nozzles for the production of alginate microspheres. Int J Pharm 2005; 298: 206-210.
132. Suckow MA, Jarvinen LZ, Hogenesch H, Park K, Bowersock TL. Immunization of rabbits against a bacterial pathogen with an alginate microparticle vaccine. J Control Rel 2002; 85: 227-235.
133. Kulkarni AR, Soppimath KS, Aminabhavi TM, Rudzinski WE. In vitro release kinetics of cefadroxil-loaded sodium alginate interpenetrating network beads. Eur J Pharm Biopharm 2001; 51: 127-133.
134. Sankalia MG, Mashru RC, Sankalia JM, Sutariya VB. Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: optimization and physicochemical characterization. Eur J Pharm Biopharm 2007; 65: 215-232.
135. Takahashi T, Takayama K, Machida Y, Nagai T. Characteristics of polyion complexes of chitosan with sodium alginate and sodium polyacrylate. Int J Pharm 1990; 61: 35-41.
136. Bardonnet PL, Faivre V, Pugh WJ, Piffaretti JC, Falson F. Gastroretentive dosage forms: Overview and special case of helicobacter pylori. J Control Rel 2006; 111: 1-18.

137. Hampson FC, Farndale A,Strugala V, Sykes J, Jolliffe IG, Dettmar PW. Alginate rafts and their characterization. Int J Pharm 2005; 294: 137-147.
138. Ye S, Wang C, Liu X, Tong Z. Deposition temperature effect on release rate of indomethacin microcrystals from microcapsules of layer-by-layer assembled chitosan and alginate multilayer films. J Control Rel 2005; 106: 319-328.
139. Kawashima S, Inoue Y, Shimeno T, Fujiwara H. Studies on sustained-release suppositoires III: Rectal absorption of morphine in rabbits and prolongation of its absorption by alginic acid addition. Chem Pharm Bull 1994; 382: 498-505.
140. Takagi I, Nakashima H, Takagi M, Yotsuyanagi T, Ikeda K. Application of alginate gel as a vehicle for liposomes II: Erosion of alginate gel beads and drug release of loaded liposomes. Chem Pharm Bull 1997; 45: 389-393.
141. Fritschy WM, Wolters GHJ, Schilfgaarde RV. Effect of alginate-polylysine-alginate microencapsulation on in vitro insulin release from rat pancreatic islets. Diabetes 1991; 40: 37-43.
142. Güneş ÜY, Eşer İ, Nemli yara iyileşmesi ve oklusif pansumanların nemli yara iyileşmesindeki önemi. CÜ Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi 2006; 102: 57-65.
143. Ovington LG. Advances in wound dressings. Clin Dermatol 2007; 25: 33-38.
144. Mısırlıoğlu A, Gideroğlu K, Akan M, Aköz T. Plastik cerrahi pratiğinde alternatif bir materyal,: kalsiyum aljinat. Türk Plast Rekonstr Est Cer Derg 2004; 12: 191-195.
145. Whitters CJ, Strang R, Brown D, Clarke RL, Curtis RV, Hatton PV, Ireland AJ, Lloyd CH, Nicholson JW, Scrimgeour SN, Setcos JC, Sherriff M, Noort R, Watts DC, Wood D. Dental materials: 1997 literature review. J Dent 1999; 27: 401-435.
146. Flanagan DA, Palenik CJ, Setcos JC, Miller CH. Antimicrobial activities of dental impression materials. Dent Mater 1998; 14: 399-404.

147. El-Molla MM, El-Sayad HS, Rheological behaviour of sodium alginate solutions with added divalent metal salts and their use as thickeners in cotton printing with reactive dyes. Adv Pol Tech 2001; 20: 58-71.
148. Hejazi R, Mansoor A. Chitosan-based delivery systems. J Control Rel 2003; 89: 151-165.
149. Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, Dhawan S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. Int J Pharm 2004; 274: 1-33.
150. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. Eur J Pharm Biopharm 2004; 57: 19-34.
151. Kotzé AF, Lueßen HL, Boer AG, Verhoef JC, Junginger HE. Chitosan for enhanced intestinal permeability: Prospects for derivatives soluble in neutral and basic environments. Eur J Pharm Sci 1998; 7: 145-151.
152. Dyer AM, Hinchcliffe M, Watts, P, Castile J, Jabbal-Gill I, Nankervis R, Smith A, Illum L. Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations:A comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles. Pharm Res 2002; 19: 998-1008.
153. Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, Junginger HE, Chitosan for mucosal vaccination. Adv Drug Del Rev; 2001; 52: 139-144.
154. Thanou M, Verhoef JC, Junginger HE, Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. Adv Drug Del Rev 2001; 52: 117-126.
155. Acartürk F, Şencan A, Çelebi N. Enhancement of the dissolution of spironolactone with chitosan and low-molecular weight gelatin. S.T.P. Pharma Sci 1993; 3: 369-373.
156. Zerrouk N, Menini N, Maestrelli F, Chemtob C, Mura P. Comparison of the effect of chitosan and polyvinylpyrrolidone on dissolution properties and analgesic effect of naproxen. Eur J Pharm Biopharm 2004; 57: 93-99.

157. Gavini E, Hegge AB, Rassu G, Sanna V, Testa C, Pirisino G, Karlsen J, Giunchedi P. Nasal administration of carbamazepine using chitosan microspheres: In vitro/in vivo studies. Int J Pharm 2006; 307: 9-15.
158. Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipients. Pharm Res 1998; 15: 1326-1331.
159. Aksungur P, Sungur A, Ünal S, İskit AB, Squier CA, Şenel S. Chitosan delivery systems for the treatment of oral mucositis: in vitro and in vivo studies. J Control Rel 2004; 98: 269-279.
160. Alemdaroğlu C, Değim Z, Çelebi N, Zor F, Öztürk S, Erdoğan D. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. Burns 2006; 32: 319-327.
161. Remuñán-López C, Bodmeier R. Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. J Control Rel 1997; 44: 215-225.
162. Acartürk F, Preparation of a prolonged-release tablet formulation of diclofenac sodium. Part 1:Using chitosan. Pharmazie 1989; 44: 547-549.
163. Akbuğa J, Durmaz G. Preparation and evaluation of cross-linked chitosan microspheres containing furosemide. Int J Pharm 1994; 111: 217-222.
164. Inoyatov N, Çelebi N, Acartürk F. Preparation and evaluation of a prolonged release pentoxifylline tablet with chitosan. Pharm Ind 1998; 60: 472-475.
165. Aral C, Akbuğa J. Alternative approach to the preparation of chitosan beads. Int J Pharm 1998; 168: 9-15.
166. Sezer AD, Akbuğa J, Release Characteristics of chitosan treated alginate beads: II. Sustained release of a low molecular drug from chitosan treated alginate beads . J Microencap 1999; 16, 687-696.
167. Yamaç K, Kaptan KM, Beyan C, Teksin ZŞ, Ağabeyoğlu İT, Gökgöz L. Comparison of hematological effects of a sustained release chitosan formulation of pentoxifylline with a commercial product. Arzneim Forsch/Drug Res 2000; 50: 827-831.

168. Ko JA, Park HJ, Hwang SJ, Park JB, Lee JS. Preparation and characterization of chitosan microsparticles intended for controlled drug delivery. Int J Pharm 2002; 249: 165-174.
169. Blanco MD, Gomez C, Olmo R, Muniz E, Teijon JM. Chitosan microspheres in PLG films as devices for cytarabine release. Int J Pharm 2000; 202: 29-39.
170. Bernkop-Schnürch A. Chitosan and its derivatives: potential excipient for peroral peptide delivery system. Int J Pharm 2000; 194: 1-13.
171. Bernkop-Schnürch A, Kast CE. Chemically modified chitosans as enzyme inhibitors. Adv Drug Del Rev 2001; 52: 127-137.
172. Merwe SM, Verhoef JC, Verheijden JHM, Kotzé AF, Junginger He. Trimethylated chitosan as polymeric absorption enhancer for improved peroral delivery of peptide drugs. Eur J Pharm Biopharm 2004; 58: 225-235.
173. Merwe SM, Verhoef JC, Kotzé AF, Junginger HE. N-trimethyl chitosan chloride as absorption enhancer in oral peptide drug delivery. Development and characterization of minitablet and granule formulations. Eur J Pharm Biopharm 2004; 57, 85-91.
174. Borges O, Cordeiro-da-Silva A, Romejin SG, Amidi M, Sousa A, Borchard G, Junginger HE. Uptake studies in rat Peyer's Patches, cytotoxic and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for oral mucosal vaccination. J Control Rel 2006; 114: 348-358.
175. Mao H, Roy K, Troung-Le VL, Janes KA, Lin Y, Wang Y, August JT, Leong KW. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. J Control Rel 2001; 70: 399-421.
176. Vila A, Sanchez A, Janes K, Behrens I, Kissel T, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice . Eur J Pharm Biopharm 2004; 57: 123-131.
177. Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, Junginger HE. Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. Eur J Pharm Sci 2001;14: 201-207.

178. Borchard G. Chitosans for gene delivery. Adv Drug Del Rev 2001; 52: 145-150.
179. Borchard G, Junginger HE. Modern drug delivery applications of chitosans. Adv Drug Del Rev 2001; 52: 103.
180. Özbaş-Turan S, Aral C, Kabasakal L, Keyer-Uysal M, Akbuğa J. Co-encapsulation of two plasmids in chitosan microspheres as a non-viral gene delivery vehicle. J Pharm Pharmaceut Sci 2003; 6; 27-32.
181. Bozkır A, Saka OM. Chitosan-DNA Nanoparticles: Effect on DNA integrity, bacterial transformation and transfection efficiency. J Drug Target 2004; 12: 281-288.
182. Bozkır A, Saka OM. Chitosan nanoparticles for plasmid DNA delivery: Effect of chitosan molecular structure on formulation and release characteristics. Drug Del 2004; 11: 107-112.
183. Jung U, Kim S, Kim C, Cho K, Kim C, Choi S. Effect of chitosan with absorbable collagen sponge carrier on bone regeneration in rat calvarial defect model. Curr App Phys 2007; 7S1; e68-e70.
184. Kim SE, Park JH, Cho YW, Chung H, Jeong SY, Lee EB, Kwon IC. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor-β1: implications for cartilage tissue engineering. J Control Rel 2003; 91: 365-374.
185. Jayakumar R, Prabaharan M, Reis RL, Mano JF. Graft copolymerized chitosan-present status and applications. Carbohyd Polym 2005; 62: 142-158.
186. Şenel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. Adv Drug Del 2004; 56: 1467-1480.
187. Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. Proc Biochem 2004; 39: 1033-1046.
188. Irie T, Uekama K. Cyclodextrins in peptide and protein delivery Adv Drug Del Rev 1999; 36: 101-123.

189. Pose-Vilarnovo B, Rodriguez-Tenreiro C, Santos JFR, Vázquez-Doval J, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C, Torrez-Labandeira JJ. Modulating drug release with cyclodextrins in hydroxypropyl methylcellulose gels and tablets. J Control Rel 2004; 94: 351-361.
190. Andersen FM, Bundgaard H, Mengel HB. Formation, bioavailability and organoleptic properties of a inclusion complex of femoxetine with β-cyclodextrin. Int J Pharm 1984; 21: 51-60.
191. Szejtli J. Szente L. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. Eur J Pharm Biopharm 2005; 61: 115-125.
192. Merkus FWHM, Verhoef JC, Marttin E, Romeijn SG, Kuy PHM, Hermens WAJJ, Schipper NGM. Cyclodextrins in nasal drug delivery. Adv Drug Del Rev 1999; 36: 41-57.
193. Yetkin G, Çelebi N, Özoğul C, Demiryürek AT. Enhancement of nasal absorption of salmon calcitonin in rabbits using absorption enhancer. STP Pharm Sci 2001; 11: 187-191.
194. Yetkin G, Çelebi N, Ağabeyoğlu İ, Gökçora N. The effect of dimethyl-β-cyclodextrin and sodium taurocholate on the nasal bioavailability of salmon calcitonin in rabbits. STP Pharm Sci 1999; 9: 249-252.
195. Hussain A, Yang T, Zaghlou A, Ahsan F. Pulmonary absorption of insulin mediated by tetradecyl-β-maltoside and dimethyl-β-cyclodextrin. Pharm Res 2003; 20: 1551-1557.
196. Loftsson T, Järvinen T. Cyclodextrins in ophtalmic drug delivery. Adv Drug Del Rev 1999; 36: 59-79.
197. Değim Z, Değim T, Acartürk F, Erdoğan D, Özoğul C, Köksal M. Rectal and vaginal administration of insulin-chitosan formulations: An experimental study in rabbits. J Drug Target 2005; 13: 563-572.
198. Matsuda H, Arima H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. Adv Drug Del Rev 1999; 36: 81-99.

199. Sridevi S, Diwan PVR. Optimized transdermal delivery of ketoprofen using pH and hydroxypropyl-β-cyclodextrin as co-enhancers. Eur J Pharm Biopharm 2002; 54: 151-154.
200. Loftsson T, Masson M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. Int J Pharm 2001; 225: 15-30.
201. Çelebi N, Nagai T. Enhancement of dissolution properties of nalidixic acid from ground mixtures with δ-Cyclodextrin. S.T.P. Pharma 1987; 3: 868-871.
202. Erden N, Çelebi N, A Study of the inclusion complex of naproxen with ß-Cyclodextrin. Int J Pharm 1988; 48: 83-89.
203. Acartürk F, Imai T, Saito H, Ishikawa M, Otagiri M, Comparative study on inclusion complexation of maltosyl-ß-Cyclodextrin, Heptakis(2,6-di-o-methyl)-ß-Cyclodextrin and ß-Cyclodextrin with fucosterol in aqueous and solid state. J Pharm Pharmacol 1993; 45: 1028-1032.
204. Çelebi N, Gül Zİ, Ocak F, Yıldız S, Acartürk F, Investigation of the effect of ß-CD on in vitro release of ketocanozole from different gel bases. Szejtli,J., Szente,L.(eds.), Proceed. 8th Symp. on Cyclodextrins 1996; 461-464.
205. Vila-Jato JL, Blanco J, Vilar JBA. Spironolactone/β-Cyclodextrin complex: Oral bioavaliability in humans. Acta Pharm Tech 1986; 32: 82-85.
206. Jug M, Bećirević-Laćan M. Influence of hydroxypropyl- β-Cyclodextrin complexation on piroxicam release from buccoadhesive tablets. Eur J Pharm Sci 2004; 21: 251-260.
207. Filipovic-Gricic J, Voinovich D, Moneghini M, Becirevic-Laćan M, Magarotto L, Jalšenjak I. Chitosan microspheres with hydrocortisone and hydrocortisone-hydroxypropyl- β-Cyclodextrin inclusion complex. Eur J. Pharm Sci 2000; 9: 373-379.
208. Uekama K, Fujinaga T, Hirayama F, Otagiri M, Kurono Y, Ikeda K. Effects of cyclodextrins on the acid hydrolysis of digoxin. J Pharm Pharmacol 1982; 34: 627-630.

209. Uekama K, Oh K, Irie T, Otagiri M, Nishimia Y, Nara T. Stabilization of isosorbide 5-mononitrate in solid state by β-cyclodextrin complexation. Int J Pharm 1985; 25: 339-346.
210. Boquet W, Ceelen W, Fritzinger B, Pattyn P, Peeters M, Remon JP, Vervaet C. Paclitaxel/β-Cyclodextrin complexes for hyperthermic peritoneal perfusion-formulation and stability. Eur J Pharm Biopharm 2007; Baskıda.
211. Uekama K, Otagiri M. Cyclodextrins in drug carrier systems. CRC Crit Rev Ther Drug Carr Syst 1987; 3: 1-40.
212. Zerrouk N, Corti G, Ancillotti S, Maestrelli F, Cirri M, Mura P. Influence of cyclodextrins and chitosan, separately or in combination, on glyburide solubility and permeability. Eur J Pharm Biopharm 2006; 62: 241-246.
213. Zecchi V, Orienti I, Fini A. Control of NSAI dissolution by β-Cyclodextrin complexation. Pharm Acta Helv 1988; 63: 299-302.
214. Rodriguez-Tenreiro C, Lorenzo CA, Rodriguez-Perez A, Concherio A, Tores-Labanderia JJ. Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels. Eur J Pharm Biopharm 2007; 66: 55-62.
215. Bulut P, Özer AY. Bir deney planlama yöntemi: Faktöriyel tasarım. FABAD Farm Bil Der 1991; 16: 89-97.
216. Öner L, Alpar R. Faktöriyel denemeler. FABAD Farm Bil Der. 1991; 16: 185-190.
217. Yurtsever N. Deneysel İstatistik Metodlar, Genel yayın no: 121, Ankara: Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları; 1984. 267-363
218. Kaye BH. Particle size characterization. In: Swarbrick J, Boylan JC, editörler. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Volume 2, Second Edition, Marcel Dekker Inc; 2005. 1997-2011.
219. SPSS. 11. 5. Chicago: SPSS Inc; 2002.
220. Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. J Appl Pol Sci 1997; 63, 125-132.

221. Pan Y, Li Y, Zhao H, Zheng J, Xu H, Wei G, Hao J, Cui F. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. Int J Pharm 2002; 249: 139-147.
222. Bourne DWA. Boomer Multiforte Manual Nonlineer, 2006.
223. Scully MF, Decousus HA, Ellis V, Parker C, Girard P, Kakkar VV. Measurement of heparin in plasma: influence of inter- subject and circadian variability in heparin sensivity according to method. Thromb Research 1987; 46: 447-455.
224. Çelebi N, Reoloji, Modern Farmasötik Teknoloji. Ankara: TEB Eczacılık Akademisi Yayını; 2006. 391-405.
225. Gallo JM, Hassan EE. Receptor-Mediated magnetic carriers: basis for targeting. Pharm Res 1988; 5: 300-304.
226. Kotze AF, Thanou M, Verhoef JC, Junginger HE. Chitosan and N-Trimetil chitosan chloride as absorption enhancer for nasal and rectal delivery of insulin. Proceed Int. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater. 1998, 25; 479-480.
227. Vila A, Ruiz L, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles as carriers for oral administration of low moleculer weight heparine. Proceed Int. Symp. Contr. Rel. 2005; 321-322.
228. Lim LY, Wan LSC, Thai PY. Chitosan microspheres prepared by emulsification and ionotropic gelation. Drug Dev Ind Pharm 1997; 23: 981-985.
229. Saha TK, Jono K, Ichikawa H, Fukumori Y. Preparation and evaluation of gluteraldehit cross-linked chitosan microspheres as a gadolinium reservoir for neutron-capture therapy. Chem Pharm Bull 1998; 46: 537-539.
230. Jameela SR, Kumary TV, Lal AV, Jayakrishnan A. Progesteron-loaded chitosan microspheres: A long acting biodegradable controlled delivery system. J Control Rel 1998; 52: 17-24.

231. Genta I, Perugini P, Conti B, Pavanetto F. A multiple emulsion method to entrap a lipophilic compound into chitosan microspheres. Int J Pharm 1997; 152: 237-246.
232. Yang M, Velaga S, Yamamoto H, Takeuchi H, Kawashima Y, Hovgaard L, Weert M, Frokjaer S. Characterization of salmon calcitonin in spray- dried powder for inhalation effect of chitosan. Int J Pharm 2007; 331: 176-181.
233. Kim C, Lee E. The controlled release of blue dextran from alginate beads. Int J Pharm 1992; 79: 11-19.
234. Tateshita K, Sugawara S, Imai T, Otagiri M. Preparation and evaluation of a controlled- release formulation of nifedipine using alginate gel beads. Biol Pharm Bull 1993; 16: 420-24.
235. Takka S, Ocak ÖH, Acartürk F. Formulation and investigation of nicardipine HCl-alginate gel beads with factorial design-based studies. Eur J Pharm Sci 1998; 6: 241-246.
236. Jandik KA, Kruep D, Cartier M, Linhardt RJ. Accelerated stability studies of heparin. J Pharm Sci 1996; 85, 45-51.
237. Junginger HE, Verhoef J. Macromolecules as safe penetration enhancers for hydrophilic drugs- a fiction? PSTT 1998; 1: 370-376.
238. Hiebert LM, Wice SM, Ping T. Increased plasma Anti-Xa activity and recovery of heparin from urine suggest absorption of orally administered unfractioned heparin in human subjects. J Lab Clin Med 2005; 145: 151-155.
239. Doutrempuich C, Toulemonde F, Lormeau JC. Oral administration of low molecular weight heparin fraction in rabbits. Semin Thromb Hem 1985; 11: 323-325.
240. Hiebert LM, Wice SM, Ping T, Herr D, Laux V. Antithrombotic efficacy in a rat model of the low molecular weight heparin, reviparin sodium, administrated by the oral route. Throm Haemost 2001; 85: 114-118.

241. Hiebert LM, Wice SM, Ping T. Tissue distribution of the low molecular weight heparin, tinzaparin, following administration to rats by the oral route. Biomed Pharmacother 2004; 58: 372-380.
242. Marttin E, Verhoef JC, Spies F, Meulen J, Nagelkerke JF, Koerten HK, Merkus FWHM. The effect of methylated β-Cyclodextrins on the tight junctions of the rat nasal respiratory epithelium: Electron microscopic and confocal laser scanning microscopic visualization studies. J Control Rel 1999; 57: 205-213.
243. Hussain A, Arnold JJ, Khan MA, Ahsan F. Absorption enhancer in pulmonary protein delivery. J Control Rel 2004; 94: 15-24.
244. Kim SK, Lee EH, Vaishali B, Lee S, Lee YK, Kim CY, Moon HT, Byun Y. Ticaprylin microemulsion for oral delivery of low molecular weight heparin conjugates. J Control Rel 2005; 105: 32-42.

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

12/12/2003

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/ 76-17291.
KONU:

Sayın
Prof.Dr.Füsun ACARTÜRK
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Eczacılık Teknolojisi Bölümü
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-03.015 kod numaralı ve *"Heparinin oral ilaç şekli üzerine araştırmalar"* başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanmıştır.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

I certify that the research project numbered G.Ü.ET-03.015 and entitled *"Studies on the oral dosage form of heparin"* is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards.

Prof.Dr.Emin TÜRKÖZ
Gazi Üniversitesi
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Adı : Canan

Soyadı : İSKENDEROĞLU

Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara, 1976

Eğitimi:

Yüksek Lisans : G.Ü. Eczacılık Fakültesi- 2001

Tezin Adı :Güç Çözünen Zayıf Asit Karakterdeki Etkin Maddelerin Hidrofilik Mikrokristallendirilmeleri Üzerine Çalışmalar

Lisans : G.Ü. Eczacılık Fakültesi- 1998

Yabancı dil : İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (TÜFTAD)

Halen Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, İlaç ve Kozmetik Araştırma Müdürlüğü'nde çalışmaktadır.

Bilimsel Etkinlikleri:

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen (SBE/11/2000-04 proje numarası) "Güç Çözünen Zayıf Asit Karakterdeki Etkin Maddelerin Hidrofilik Mikrokristallendirilmeleri Üzerine Çalışmalar" adlı projede çalışmıştır. Şimdiye kadar birer adet araştırma ve derleme makalesi, dört adet poster sunumu yapmıştır:

1. İSKENDEROĞLU Canan, ACARTÜRK Füsun. Heparin ve Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinin Alternatif Yollardan Uygulanması, A.Ü. Bilim ve Teknoloji Dergisi 7 (1), 83-95, 2006.

2. DİNÇ Erdal, SERİN Canan, TUĞCU-DEMİRÖZ Fatmanur, DOĞANAY Tanver. Dissolution and Assaying of Multicomponent Tablets By Chemometric Methods Using Computer Aided Spectrophotometer, Interaction, Inhibition Of Crystal Growth And Formation Of Microcrystals, International Journal of Pharmaceutics, 250, 339-350, 2003.

3. SERİN Canan, DOĞANAY Tanver, Hydrophylic Microcristallization of Naproxen With Polymers I: Interaction, Inhibition of Crystal Growth And Formation of Microcrystals, International Symposium on Scientific And Regulatory Aspects of Dissolution And Bioequivalance, Athens- Greece, 12-14 April, 2002.

4. DİNÇ Erdal., SERİN Canan, TUĞCU-DEMİRÖZ Fatmanur, DOĞANAY Tanver, Dissolution And Assaying of Multicomponent Tablets By Chemometric Methods Using Computer Aided Spectrophotometer, Interaction, Inhibition of Crystal Growth And Formation of Microcrystals, International Symposium on Scientific And Regulatory Aspects of Dissolution And Bioequivalance, Athens- Greece, 12-14 April, 2002.

5. İSKENDEROĞLU (SERİN), Canan, DOĞANAY Tanver, Hydrophilic Microcrystallization of Naproxen With Polymers II: Tablet Formulations, International Pharmaceutics Technology Symposium, İstanbul, 26-30 September, 2003.

6. İSKENDEROĞLU Canan, ACARTÜRK Füsun, Preparation and In Vitro Evaluation of Low Molecular Weight Heparin-Alginate Microparticles, 33th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Vien, Austuria, 2006.