



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



Mukozaya Uygulanabilen Antifungal Etkili Formülasyonların Hazırlanması In Vitro / Eks Vivo Karakterizasyonu

Doktora Tezi

Çağrı Çalışkan

Farmasötik Teknoloji

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Mukozaya Uygulanabilen Antifungal Etkili
Formülasyonların Hazırlanması In Vitro / Eks Vivo
Karakterizasyonu**

Çağrı Çalışkan

Danışman
Prof. Dr. Esra Baloğlu

Farmasötik Teknoloji

İzmir
2019

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

Adı Soyadı

:

Başkan(Danışman)

: Prof. Dr. Esra Baloğlu

Üye / İmza

: Prof. Dr. Özgen Özer

Üye / İmza

: Prof. Dr. Makbule Aşıkoğlu

Üye / İmza

: Prof. Dr. Yıldız Özsoy Erginer

Üye / İmza

: Prof. Dr. Yalçın Özkan

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: 04.09.2019

Bu doktora tez çalışması TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) tarafından 2214/A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

Bu doktora tez çalışması 16-ECZ-034 numaralı Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında desteklenmiştir.

Önsöz

Bilim ve teknolojinin birikimli olarak ilerlediği düşüncesiyle, bu doktora tez çalışmasının Farmasötik Teknoloji alanında literatüre katkı sağlamasını umuyorum.

İzmir, 19.09.2019

Çağrı Çalışkan



Özet

Mukozaya Uygulanabilen Antifungal Etkili Formülasyonların

Hazırlanması *in vitro* / *eks vivo* Karakterizasyonu

Bu tez çalışması kapsamında vajinal kandidiyazis tedavisi için suda çözünürlüğü düşük azol grubu bir antifungal olan posakonazol (POS) ile mukoadezif ve mukusa penetre olabilen iki farklı formülasyon hazırlanmış ve bu formülasyonlar *in vitro* / *eks vivo* karakterizasyonları yapılarak değerlendirilmiştir.

Tez çalışmasının ilk bölümünde, vajinaya uygulanacak mukoadezif bir formülasyon geliştirilmesi amacı ile suksinil-beta-siklodekstrin (Suc- β -CD) ile çalışılmıştır. Çok aşamalı bir reaksiyon yolağı izlenerek merkaptopnikotinamit'in (6-MNA) Suc- β -CD halkası üzerine konjugasyonu sağlanmış ve oligomer Suc- β -CD'e mukoadezif özellik kazandırılmıştır. Ardından elde edilen ürünlerin POS ile inklüzyon kompleksleri hazırlanarak etkin maddenin çözünürlük özellikleri iyileştirilmiştir. İki farklı modifikasyon oranı ile sentezlenen Suc- β -CD-MNA türevleri kimyasal olarak karakterize edildiğinde elde edilen verilerde Suc- β -CD-MNA₁ molekülüne 221,16±51,68 μ mol / g, Suc- β -CD-MNA₂ molekülüne ise 521,76±28,25 μ mol / g 6-MNA'nın konjuge olduğu görülmüştür. Yapılan dissolüsyon testinde Suc- β -CD-MNA₁'in POS'un laktat tampon içindeki dissolüsyonunu 49,13 kat arttırdığı, Suc- β -CD-MNA₂'nin ise 33,61 kat arttığı gözlenmiştir.

Mukoadezif özellikleri incelendiğinde, sentezlenen Suc- β -CD-MNA₁ ve Suc- β -CD-MNA₂ ile hazırlanan inklüzyon kompleksleri modifiye edilmemiş Suc- β -CD ile hazırlanan komplekslere kıyasla sırasıyla 21,574 ve 37,674 kat daha yüksek mukoadezyon sergilemiştir. Suc- β -CD-MNA türevleri ve POS ile hazırlanan inklüzyon komplekslerinin ayrıca sitotoksik profilleri ve antifungal etkileri araştırılmıştır.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde mukusa penetre olabilen bir formülasyon kullanılarak POS'un hidrofilik mukus engelini aşarak epitel tabakasına ulaşmasını sağlamak amaçlanmıştır.

SNEDDS'in (kendiliğinden emülsifiye olan nano ilaç taşıyıcı sistemler) mukozal ilaç uygulama için önemli bir potansiyel taşıdığı son yıllarda yapılan araştırmalarda ortaya çıkmıştır. SNEDDS damlacıkları deformasyon

yetenekleri ve yüzey özellikleri sayesinde mukus tabakasına penetre olabilirler. POS içeren SNEDDS damlacıklarının mukus penetrasyon özelliğini arttırmak amacıyla mukolitik ajan N-asetilsistein (NAC) ile katyonik polimer Eudragit RS 100 arasında iyonik bir kompleks (EU-NAC) hazırlanmış ve SNEDDS formülasyonuna eklenmiştir. Hazırlanan formülasyonlar, damlacık boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel açısından incelenmiş, kısa süreli ve uzun süreli stabilite testleri yapılmış, etkin madde salım çalışmaları gerçekleştirilmiş ayrıca mukus permeasyon ve mukolitik özellikleri araştırılmıştır. Elde edilen verilerde mukolitik EU-NAC kompleksi içeren POS-EU-NAC-SNEDDS formülasyonunun, mukus permeasyonunun mukolitik ajan içermeyen POS-SNEDDS formülasyonuna göre 55,042 kat fazla olduğu görülmüştür. Yapılan *in vitro* mukolitik aktivite testinde EU-NAC-SNEDDS formülasyonunun 4 saat sonunda mukus viskozitesinin başlangıç değerinin yaklaşık %5'ine kadar düşürdüğü gözlenmiştir. SNEDDS formülasyonlarının için antifungal etkileri ve sitotoksik özellikleri değerlendirilmiştir. Ayrıca SNEDDS formülasyonlarından NAC salımını belirleyebilmek için Ellman Testi prensiplerine dayanan yeni bir salım metodu geliştirilmiştir.

Mukozal dokuya ilaç uygulanmasında hem mukoadhezif hem de mukusa penetre olabilen sistemlerin kendilerine özgü avantajları vardır. Gelecekte mukozal uygulamalar için ilaç geliştirilmesindeki eğilimin her iki tip formülasyonun üstün özelliklerinin aynı formülasyonda kombine edilmesiyle yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarlanması yönünde olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler; mukus; mukoadhezif; antifungal; vajinal; SNEDDS; posakonazol

Abstract

Preparation and *in vitro* / *ex vivo* Characterization of Antifungal Formulations for Mucosal Application

Within the scope of this thesis, two different formulations; mucoadhesive and mucous penetrating formulations have been prepared for the treatment of vaginal candidiasis with posaconazole (POS), a low water soluble azole group antifungal. These two formulations were further evaluated by *in vitro* / *ex vivo* characterization.

In the first part of the thesis, succinyl- β -cyclodextrin (Suc- β -CD) was studied in order to develop mucoadhesive formulation to be applied to the vagina. Suc- β -CD was thiolated by pre-activation method to provide mucoadhesiveness to the oligomer, then inclusion complexes were prepared with POS to improve solubility properties of the active substance. Thiolated Suc- β -CD derivatives synthesized by two different modification rates have been chemically characterized. $521,76 \pm 28,25 \mu\text{mol} / \text{g}$ 6-MNA was conjugated to the molecule. Suc- β -CD-MNA₁ was found to increase the dissolution of POS in lactate buffer by 49,13 fold and Suc- β -CD-MNA₂ increased by 33,61 fold.

According to the results of mucoadhesion studies the inclusion complexes prepared with Suc- β -CD-MNA₁ and Suc- β -CD-MNA₂ exhibited 21,574 and 37,674 fold higher mucoadhesion than complexes prepared with unmodified Suc- β -CD, respectively. The cytotoxic profiles and antifungal effects of inclusion complexes prepared with Suc- β -CD-MNA derivatives and POS and derivatives were also investigated.

In the second part of the thesis, the aim was to prepare a mucus permeating formulation that can reach the epithelial layer by passing the hydrophilic mucus barrier.

Recently, studies showed that SNEDDS (self-nanoemulsifying drug delivery systems) have an important potential for mucosal drug administration. SNEDDS droplets are capable of penetrating the mucus layer due to their

formation properties. In order to increase the mucus penetration of the formulation, an ionic complex between the mucolytic agent N-acetylcysteine (NAC) and the cationic polymer Eudragit RS 100 was prepared and added to the SNEDDS. Prepared formulations were examined in terms of particle size, polydispersity index and zeta potential, active substance release studies were performed and mucus permeation and mucolytic properties were investigated. It was also observed that the SNEDDS formulation containing the EU-NAC complex reduced mucus viscosity to about 5% of the initial value after 4 hours. Antifungal efficacy and cytotoxicity tests were also performed for SNEDDS formulations. In addition, a new release method based on Ellman Test principles has been developed to determine NAC release from SNEDDS formulations.

Both mucoadhesive and mucosal penetrating systems have their own advantages when administering drugs to mucosal tissue. The trend in drug development for mucosal administration in the future is thought to be to design new drug delivery systems by combining the superior properties of both types of formulations in the same formulation.

Keywords; mucus; mucoadhesive; antifungals; vaginal; SNEDDS; posaconazole

İçindekiler

Önsöz	III
Özet.....	IV
Abstract	VI
İçindekiler	VIII
Tablolar Dizini	XIII
Şekiller Dizini	XIV
Denklemler Dizini.....	XVII
Kısaltma Listesi	XVIII
Giriş	1
Genel Bilgiler	9
1.1. Vajinal <i>Candida Sp.</i> Enfeksiyonları	9
1.2. Posakonazol	10
1.2.1. Fizikokimyasal Özellikleri, Etki Mekanizması ve Antifungal Spektrumu	10
1.2.2. Farmakokinetik, Farmakodinamik Özellikleri ve Yan etkileri	13
1.2.3. POS Müstahzarları.....	14
1.3. Mukus ve Mukoadesyon	15
1.4. Mukoadesif Formülasyonlar	16
1.4.1. Tiyoale ve Önceden Aktifleştirilmiş Polimerler	16
1.5. Siklodekstrinler	20
1.5.1. İnklüzyon Kompleksi Oluşumu	21
1.5.2. İlaç Çözünürlüğü Ve Dissolüsyon Üzerindeki Etkisi.....	23
1.5.3. CD'lerin İlaç Biyoyararlanımı Üzerindeki Etkisi	24
1.5.4. CD'lerin İlaç Stabilesine Etkisi	24
1.6. Mukusa Penetre Olabilen Formülasyonlar	24
1.7. SEDDS (Kendiliğinden Emülsifiye Olabilen İlaç Taşıyıcı Sistemler)	27
Gereç ve Yöntem.....	29
2.1. Gereç.....	29
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar.....	29
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	30
2.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler	31
2.2. Yöntem	32
2.2.1. Etkin Madde Karakterizasyonu, Miktar Tayini Yöntemi ve Analitik Yöntem Validasyonu	32
2.2.1.1. POS'un FT-IR Spektroskopisi	32
2.2.1.2. Miktar Tayini Yöntemi.....	32

2.2.1.3. Analitik Yöntem Validasyonu	33
2.2.2. Etkin Maddenin Çözünürlük Çalışmaları	34
2.2.3. Önceden Etkinleştirilmiş (Pre-activated) Mukoadezif Tiyomer Sentezi ve <i>in vitro</i> / <i>eks vivo</i> Karakterizasyonu.....	35
2.2.3.1. 6-merkaptonikotinamit (6-MNA) Sentezi ve Saflaştırılması.....	35
2.2.3.2. 6-merkaptonikotinamit Dimeri Olan 6,6'-ditiyonikotinamit'in (6,6'-DTNA) Sentezi ve Saflaştırılması	35
2.2.3.3. Sistein-6-Merkaptonikotinamit Ligandı (Cys-6-MNA) Sentezi ve Saflaştırılması	36
2.2.3.4. Reaksiyon Ara Ürünlerinin Karakterizasyonu	36
2.2.3.5. Suc- β -CD-MNA'in Sentezi Ve Saflaştırılması	37
2.2.3.6. Suc- β -CD-MNA'nın Karakterizasyonu	39
2.2.3.7. CD/POS İnklüzyon Komplekslerinin Hazırlanması	40
2.2.3.8. Hazırlanan İnklüzyon Komplekslerinin Yapısal Karakterizasyonu.....	40
2.2.3.9. Dissolüsyon Testi.....	41
2.2.3.10. İnklüzyon Komplekslerinin Mukoadezif Özelliklerinin Yarım Tüp Metodu Kullanılarak İncelenmesi	41
2.2.3.11. İnklüzyon Komplekslerinin Mukoadezif Özelliklerinin TA-XT cihazı Kullanılarak İncelenmesi	44
2.2.3.12. Sitotoksosite Çalışmaları.....	44
2.2.3.13. <i>In Vitro</i> Antifungal Çalışmalar	45
2.2.4. Mukusa Penetre Olan Formülasyonların Hazırlanması ve <i>in vitro</i> / <i>eks vivo</i> Karakterizasyonu	47
2.2.4.1. SNEDDS Formülasyonlarının Hazırlanması	47
2.2.4.2. Hazırlanan SNEDDS Formülasyonlarının Karakterizasyonu	48
2.2.4.3. Log D Hesaplanması	49
2.2.4.4. EU-NAC Kompleksinin Hazırlanması	49
2.2.4.5. EU-NAC Kompleksinin Karakterizasyonu.....	50
2.2.4.6. POS-EU-NAC-SNEDDS Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	51
2.2.4.7. SNEDDS Formülasyonlardan POS Salım Çalışmaları	53
2.2.4.8. Mukus Toplanması ve Temizlenmesi İşlemleri	54
2.2.4.9. SNEDDS Formülasyonlarının Mukusa Permeasyonlarının İncelenmesi.....	55
2.2.4.10. <i>In Vitro</i> Mukolitik Aktivite Deneyi	56
2.2.4.11. Sitotoksosite Çalışmaları.....	57
2.2.4.12. <i>In vitro</i> Antifungal Çalışmalar	58

2.2.5. SNEDDS formülasyonlarından NAC Salımının Belirlenmesi ve Yeni Salım Metodu Geliştirilmesi	59
2.2.5.1. Diyaliz Torbası Metoduyla NAC Salımının Belirlenmesi	59
2.2.5.2. NAC Salımının Belirlenmesi İçin Yeni Salım Metodu Geliştirme Çalışmaları ..	59
2.2.6. İstatistik Analiz	61
Bulgular	62
3.1. Etkin Madde Karakterizasyonu, Miktar Tayini Yöntemi ve Analitik Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular	62
3.1.1. POS'un FT-IR Spektrumuna Ait Bulgular	62
3.1.2. Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular	62
3.1.2.1. Miktar Tayini Yöntemine Ait Bulgular.....	62
3.1.2.2. Analitik Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular	64
3.2. Etkin Maddenin Çözünürlük Çalışmasına Ait Bulgular.....	68
3.3. Mukoadhezif Tiyomer Sentezi ve <i>in vitro</i> / <i>eks vivo</i> Karakterizasyonuna Ait Bulgular	69
3.3.1. Reaksiyon Ara Ürünlerinin Karakterizasyonuna Ait Bulgular	69
3.3.2. Suc- β -CD-MNA Sentezi ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular	71
3.3.2.1. FT-IR Spektrumuna Ait Bulgular	73
3.3.2.2. Kimyasal Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular (Ellman ve MNA testleri).....	74
3.3.3. Suc- β -CD-MNA/POS İnküzyon Komplekslerinin Hazırlanması ve Yapısal Analiz Çalışmalarına Ait Bulgular	74
3.3.3.1. FT-IR spektrometrisi Çalışmalarına Ait Bulgular.....	74
3.3.4. HR CS MAS analizi Çalışmalarına Ait Bulgular	76
3.3.5. Dissolüsyon Testi Çalışmalarına Ait Bulgular	78
3.3.6. Mukoadhezif Çalışmalarına Ait Bulgular.....	79
3.3.6.1. İnküzyon Komplekslerinin Mukoadhezif Özelliklerinin Yarım Tüp Metodu Kullanılarak İncelenmesine Ait Bulgular	79
3.3.6.2. İnküzyon Komplekslerinin Mukoadhezif Özelliklerinin TA-XT Cihazı Kullanılarak İncelenmesine Ait Bulgular	80
3.3.7. Sitotoksikite Çalışmalarına Ait Bulgular	81
3.3.8. <i>In Vitro</i> Antifungal Etkinlik Çalışmalarına Ait Bulgular.....	82
3.4. Mukusa Penetre Olan Formülasyonların Hazırlanması ve <i>in vitro</i> / <i>eks vivo</i> Karakterizasyonuna Ait Bulgular	83
3.4.1. SNEDDS Formülasyonların Hazırlanması Ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular ..	83
3.4.2. Log D Hesaplanması Çalışmalarına Ait Bulgular.....	85

3.4.3. EU-NAC Kompleksinin Hazırlanması ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular	87
3.4.4. POS ve EU-NAC yüklü SNEDDS (POS-EU-NAC-SNEDDS) formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular.....	88
3.4.4.1. Kısa Süreli Stabilitate Testine Ait Bulgular	88
3.4.4.2. Uzun Süreli Stabilitate Testine Ait Bulgular	89
3.4.4.3. Mikroskop Görüntüleme Çalışmalarına Ait Bulgular	89
3.4.5. POS Salım Çalışmalarına Ait Bulgular	92
3.4.6. Mukusa Permeasyon Deneyine Ait Bulgular	93
3.4.7. <i>In vitro</i> Mukolitik Aktivite Deneyine Ait Bulgular	94
3.4.8. Sitotoksosite Çalışmalarına Ait Bulgular	95
3.4.9. <i>In vitro</i> Antifungal Etkinlik Çalışmalarına Ait Bulgular	96
3.4.10. SNEDDS Formülasyonlarından NAC Salımının Belirlenmesi ve Yeni Salım Metodu Geliştirme Çalışmalarına Ait Bulgular	97
Tartışma	98
4.1. Etkin Madde Karakterizasyonu, Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Analitik Validasyonu	98
4.1.1. POS'un FT-IR spektrumu.....	98
4.1.2. Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Analitik Validasyonu	98
4.2. Çözünürlük Çalışması	99
4.3. Önceden Etkinleştirilmiş (Pre-activated) Mukoadeziv Tiyomer Sentezi ve <i>in vitro</i> / <i>eks vivo</i> Karakterizasyonu	100
4.3.1. Suc- β -CD-MNA Sentezi, Yapısal ve Kimyasal Karakterizasyonu	100
4.3.1.1. Reaksiyon ara ürünlerinin ^1H NMR Karakterizasyonu	101
4.3.1.2. Suc- β -CD-MNA'nın yapısal ve kimyasal karakterizasyonu	103
4.3.2. Suc- β -CD-MNA/POS İnklüzyon Komplekslerinin Hazırlanması ve Yapısal Analiz Çalışmaları.....	104
4.3.3. Dissolüsyon Testi.....	106
4.3.4. Mukoadezyon Çalışmaları.....	107
4.3.5. Sitotoksosite Çalışmaları	111
4.3.6. <i>In vitro</i> antifungal etkinlik çalışmaları.....	112
4.4. Mukusa Penetre Olabilen SNEDDS Formülasyonlarının Hazırlanması ve <i>in vitro</i> / <i>eks vivo</i> karakterizasyonu	114
4.4.1. SNEDDS Tipi Formülasyonların Hazırlanması ve Karakterizasyonu	114
4.4.2. Log D Hesaplanması	116
4.4.3. EU-NAC Kompleksinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	117
4.4.4. POS-EU-NAC-SNEDDS Hazırlanması ve Karakterizasyonu	119

4.4.5. POS Salım Çalışmaları	120
4.4.6. Mukusa Permeasyon Deneyi	121
4.4.7. <i>In Vitro</i> Mukolitik Etkinlik Deneyleri	125
4.4.8. Sitotoksisite Çalışmaları.....	127
4.4.9. <i>In Vitro</i> Antifungal Etkinlik Çalışmaları.....	129
4.4.10. SNEDDS formülasyonlarından NAC Salımı ve Yeni Salım Metodu Geliştirme Çalışmaları	130
Sonuç ve Öneriler	134
Kaynaklar	137
Ekler	151
Teşekkür.....	152
Özgeçmiş	153



Tablolar Dizini

Tablo 1 : POS ve diğer bazı azol sınıfı ajanların Antifungal Spektrumu (Schiller & Fung, 2007)	12
Tablo 2 : POS'un Yan Etkileri.....	13
Tablo 3 : POS – İlaç Etkileşimleri.....	14
Tablo 4 : POS'un dünyadaki ticari müstahzarları.....	14
Tablo 5 : CD'ler ve formülasyonlarında çözündürücü ajan olarak yer aldıkları ilaçlar	23
Tablo 6 : POS'un kalibrasyon doğrusunun çizilmesi için kullanılan konsantrasyonlar (µg/mL)	32
Tablo 7 : Hazırlanan SNEDDS formülasyonları ve bileşen yüzdeleri.....	47
Tablo 8 : F45'ten hareketle hazırlanan SNEDDS formülasyonlarının bileşenleri ve miktarları.....	51
Tablo 9 : Doğruluk ve geri elde edilebilirlik bulguları	65
Tablo 10 : Etkin madde miktar tayini yönteminin tekrar edilebilirlik çalışması sonucunda elde edilen eğri altı alan değerleri	66
Tablo 11: Etkin madde miktar tayini yönteminin tekrar elde edilebilirlik çalışması sonucunda elde edilen eğri altı alan değerleri	67
Tablo 12 : Suc-β-CD-MNA türevlerinin kimyasal karakterizasyona ait bulgular	74
Tablo 13 : 3 saat sonunda domuz vajinal mukozasında kalan Suc-β-CD-POS, Suc-β-CD-MNA ₁ /POS ve Suc-β-CD-MNA ₂ /POS'un karşılaştırmalı oranları.....	79
Tablo 14 : Suc-β-CD, Suc-β-CD-MNA ₁ ve Suc-β-CD-MNA ₂ 'nin mukoadhezif özellikleri.....	80
Tablo 15 : Formülasyonların damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri.....	84
Tablo 16 : POS yüklü formülasyonların 4 saatlik arayla ölçülen damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri.....	85
Tablo 17 : SNEDDS formülasyonlarında POS çözünürlük, D ve log D değerleri	86
Tablo 18 : F45'ten hareketle formüle edilen SNEDDS formülasyonlarının 4 saatlik arayla ölçülen damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri	88
Tablo 19 : Uzun süreli stabilite testinde elde edilen ölçülen damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri.....	89

Şekiller Dizini

Şekil 1 : Tiyoale CD - ilaç inklüzyon komplekslerinin mukustaki glikoprotein yapıları ile disülfid bağları aracılığıyla etkileşerek mukoadhezif özellik göstermesinin şematik gösterimi.....	4
Şekil 2 : Mukusa penetre olabilen POS içeren SNEDDS formülasyonlarının epitelde kolonize olan <i>Candida albicans</i> üzerindeki etkisinin şematik gösterimi	6
Şekil 3 : POS'un Kimyasal Yapısı	11
Şekil 4 : Tiyoale polimerlerin mukustaki sistein yapıları ile disülfid bağları oluşturmaları	17
Şekil 5 : Kitosan – Tiyoglikolik Asit konjugatının merkaptonikotinic asit ile ön aktivasyonu.....	19
Şekil 6 : Doğal CD'ler α -CD, β -CD ve γ -CD kimyasal yapıları	20
Şekil 7 : CD (konak) – İlaç (konuk) inklüzyon kompleksi oluşumu	22
Şekil 8 : Suc- β -CD-MNA sentez basamakları.....	38
Şekil 9: Suc- β -CD-MNA türevlerinin mukoadhezif özelliklerini incelemek için kurulan deney düzeneği	43
Şekil 10 : Eudragit RS 100 – NAC Kompleksi içeren SNEDDS formülasyonlarının hazırlanması	50
Şekil 11 : (I)ThinCert™ hücre kültürü inserti ile yapılan Transwell permeasyon testinin şematik anlatımı (A: alıcı kompartman, B: Yarı geçirgen membran üzerindeki mukus tabakası, C: Verici kompartman) (II) ThinCert™ hücre kültürü inserti	56
Şekil 12 : Ellman Testi protokolüne dayanan yeni geliştirilen salım metodunun şematik anlatımı.....	60
Şekil 13 : POS'un FT-IR spektrumu	62
Şekil 14 : POS'a ait 3 boyutlu florasan spektrumu taraması	63
Şekil 15 : POS'a ait kalibrasyon doğrusu	63
Şekil 16 : POS'un çeşitli yağ, surfaktan, kosolvan ve tampon çözeltilerdeki çözünürlüğü	68
Şekil 17 : Monomer 6-MNA'ya ait ^1H NMR spekturumu (DMSO-d ₆ .içinde)	69
Şekil 18 : Dimer 6,6'-ditiyonikotinamit (6,6'-DTNA) ait ^1H NMR spekturumu (DMSO-d ₆ .içinde).....	70
Şekil 19 : Aromatik ligand Cys-6-MNA'ya ait ^1H NMR spekturumu (DMSO-d ₆ .içinde)	70
Şekil 20 : L-sistein Hidroklorit'e ait ^1H NMR spekturumu (DMSO-d ₆ .içinde).....	71
Şekil 21: Suc- β -CD-MNA'nın kimyasal yapısı	72

Şekil 22 (a) Suc- β -CD (b) Suc- β -CD-MNA ₁ (c) Suc- β -CD-MNA ₂ 'ye ait FT-IR spektrumları.....	73
Şekil 23 : (a) POS, (b) Suc- β -CD, (c) Suc- β -CD /POS fiziksel karışımı, (d) Suc- β -CD/POS inklüzyon kompleksi, (e) Suc- β -CD-MNA ₁ , (f) Suc- β -CD-MNA ₁ /POS inklüzyon kompleksi, (g) Suc- β -CD-MNA ₂ , (h) Suc- β -CD-MNA ₂ /POS inklüzyon kompleksi.....	75
Şekil 24 : POS'a ait yüksek çözünürlüklü sürekli kaynaklı moleküler absorpsiyon spektroskopisi.....	76
Şekil 25 : Suc- β -CD/POS inklüzyon kompleksine ait yüksek çözünürlüklü sürekli kaynaklı moleküler absorpsiyon spektroskopisi.....	76
Şekil 26 : Suc- β -CD-MNA ₁ /POS inklüzyon kompleksine ait yüksek çözünürlüklü sürekli kaynaklı moleküler absorpsiyon spektroskopisi	77
Şekil 27 : Suc- β -CD-MNA ₂ /POS inklüzyon kompleksine ait yüksek çözünürlüklü sürekli kaynaklı moleküler absorpsiyon spektroskopisi	77
Şekil 28 : POS, Suc- β -CD-POS, Suc- β -CD-MNA ₁ /POS ve Suc- β -CD-MNA ₂ /POS'un pH 4.5 50 mM laktat tamponu içerisindeki dissolüsyon profilleri.....	78
Şekil 29 : Domuz mukozasında tutunan inklüzyon kompleksi miktarının zamana bağlı değişimi	79
Şekil 30 : Suc- β -CD, Suc- β -CD-MNA ₁ ve Suc- β -CD-MNA ₂ 'nin 4 saat sonunda HeLa hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi.....	81
Şekil 31 : Suc- β -CD/POS, Suc- β -CD-MNA ₁ /POS ve Suc- β -CD-MNA ₂ /POS inklüzyon kompleksleri ve POS çözeltisinin <i>Candida albicans</i> ATCC 1533 suşu üzerindeki zamana bağlı antifungal aktivitesi	82
Şekil 32 :POS'un seçilen SNEDDS yağlı fazları içindeki çözünürlük değerleri	85
Şekil 33 :EU-NAC kompleksi, Eudragit RS 100 ve NAC'a ait FT-IR spektrumları....	87
Şekil 34: Boş SNEDDS (F45) Formülasyonu (1:10000 seyreltme oranı).....	90
Şekil 35 : NAC-SNEDDS Formülasyonu (1:10000 seyreltme oranı).....	90
Şekil 36: EU-NAC- SNEDDS Formülasyonu (1:10000 seyreltme oranı).....	91
Şekil 37: POS-EU-NAC-SNEDDS Formülasyonu (1:10000 seyreltme oranı).....	91
Şekil 38 : SNEDDS formülasyonlarının diyaliz torbası yöntemiyle belirlenen POS salım profilleri	92
Şekil 39 : SNEDDS formülasyonlarının mukus permeasyon özellikleri.....	93
Şekil 40 : <i>In vitro</i> mukolitik aktivite deneyine ait sonuçlar	94
Şekil 41 : <i>In vitro</i> mukolitik aktivite deneyine ait sonuçlar	94
Şekil 42 : SNEDDS formülasyonlarının HeLa hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri	95

Şekil 43 : SNEDDS formülasyonlarının zamana bağlı fungisidal etkisi	96
Şekil 44 : SNEDDS formülasyonlarının diyaliz torbası yöntemiyle belirlenen NAC salım profilleri	97
Şekil 45 : SNEDDS formülasyonlarının simültane Ellman Testi yöntemiyle belirlenen NAC salım profilleri	97
Şekil 46 : Tiyole CD - ilaç inklüzyon komplekslerinin mukustaki glikoprotein yapıları ile disülfid bağları aracılığıyla etkileşerek mukoadezif özellik göstermesinin şematik gösterimi.....	109
Şekil 47 : Mukusa penetre olabilen SNEDDS formülasyonlarının epitelde kolonize olan <i>Candida albicans</i> üzerindeki etkisinin şematik gösterimi	123
Şekil 48 : NAC Molekülü	131
Şekil 49 : Ellman Reaksiyonu.....	132

Denklemler Dizini

Denklem 1 : % Geri elde edilebilirlik denklemi.....	33
Denklem 2 : Hücre Canlılığı Oranı	45
Denklem 3 : $\log D_{\text{SNEDDS} / \text{SO}}$	49
Denklem 4 : Nernstsches Dağılım Denklemi (CSNEDDS : SNEDDS içinde kalan ilaç konsantrasyonu, V_{so} : Salım ortamının hacmi, V_{SNEDDS} : SNEDDS hacmi, $D_{\text{SNEDDS}/\text{so}}$:İlacın SNEDDS ve salım ortamı için hesaplanan D değeri)	54
Denklem 5 : Hücre Canlılığı Oranı	57
Denklem 6 : Nernstsches Dağılım Denklemi (CSNEDDS : SNEDDS içinde kalan ilaç konsantrasyonu, V_{so} : Salım ortamının hacmi, V_{SNEDDS} : SNEDDS hacmi, $D_{\text{SNEDDS}/\text{so}}$:İlacın SNEDDS ve salım ortamı için hesaplanan D değeri)	61

Kısaltma Listesi

SEDDS	: Kendiliğinden Emülsifiye Olan İlaç Taşıyıcı Sistemler (Self Emulsifying Drug Delivery Systems)
SNEDDS	: Kendiliğinden Emülsifiye Olan Nano İlaç Taşıyıcı Sistemler (Self Nano-Emulsifying Drug Delivery Systems)
POS	: Posakonazol
CD	: CD
Suc- β -CD	: Suksinil Beta Siklodekstrin
6-MNA	: 6-merkaptonikotinamit
Suc- β -CD-MNA	: Önceden aktifleştirilmiş Suksinil Beta Siklodekstrin
Suc- β -CD-MNA/POS	: Önceden aktifleştirilmiş Suksinil Beta Siklodekstrin – Posakonazol İnklüzyon Kompleksi
6-6'-DTNA	: 6,6'-ditiyonikotinamit
EDAC	: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit
NHS	: N-Hidroksisukkinimit
DTNB	: 5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit)
TNB	: 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit
TGA	: Tiyoglikolik Asit
NAC	: N-asetilsistein
EU RS 100, EU	: Eudragit RS 100 Polimeri
EU-NAC	: Eudragit RS 100 Polimeri – N-asetilsistein Kompleksi
PEG	: Polietilen Glikol
UV	: Mor Ötesi (Ultra violet)
ICAM-1	: Hücreler Arası Adezyon Molekülü (Intercellular Adhesion Molecule 1)
BCS	: Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (Biopharmaceutics Classification System)
SO	: Salım Ortamı
mg	: Miligram
mL	: Mililitre

μL	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
V	: Volt
mV	: Milivolt
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu(polymerase chain reaction)
PDI	: Polidispersite İndeksi
MEM	: Minimum Essential Eagle's Medium
ORT	: Ortalama
SS	: Standart Sapma
VK	: Varyasyon katsayısı
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
HR CS MAS	: Yüksek çözünürlüklü sürekli kaynaklı moleküler absorpsiyon spektroskopisi
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
FT-IR	: Fourier Transform Infrared
h, sa	: Saat
dk	: Dakika
sn	: Saniye
POS SNEDDS	Posakonazol içeren SNEDDS formülasyonu
NAC SNEDDS	N-asetilsistein içeren SNEDDS formülasyonu
EU-NAC SNEDDS	EU-NAC kompleksi içeren SNEDDS formülasyonu
EU-NAC POS SNEDDS	EU-NAC kompleksi ve POS içeren SNEDDS formülasyonu

Giriş

Mukoza vücudtaki çeşitli boşlukları ve iç organların yüzeyini kaplayan bir zardır. Bağ dokusu üzerinde bir veya daha fazla epitel hücre katmanından oluşan mukozal yüzeyler pek çok patojene karşı vücudun ilk savunma hattıdır (Crater & Carrier, 2010).

Bağırsak, burun ve solunum yolları, mide, idrar yolu ve üreme organlarını oluşturan mukozal yüzeylerin ve mikrobiyota ile etkileşimi vücudun 2 dış yüzeyinden biri olması sebebiyle insan sağlığı açısından önem teşkil etmektedir (Wang vd., 2018).

Bağırsak, ağız boşluğu ve vajina gibi mukozal organlarda komensal organizmalar olarak bulunan *Candida* türleri, yerel immün savunma sistemlerinin baskılanması durumunda patojen olabilir. *Candida* türleri, dünyadaki milyonlarca kişide ciddi morbiditeye yol açan ve insanlarda en yaygın görülen mantar patojenlerdir. Sadece vajinal candida enfeksiyonları dünyada yılda 30 milyon kadını etkilemektedir (Sobel, 2016).

Vajinal kandidiyazis tüm vulvovajinal enfeksiyon vakalarının %30'unu oluşturan mukozal bir enfeksiyon hastalığıdır. Kadınların %75'i hayatları boyunca en az bir kez vulvovajinal kandidiyazis enfeksiyonu geçirirler (Ramírez-Santos, Pereiro, & Toribio, 2008). Bu enfeksiyonun kaynağında *Candida* türleri; en sık olarak da *Candida albicans* bulunmaktadır (Johal, Garg, Rath, & Goyal, 2016). Kolonizasyon, *Candida sp.*'nin vajinal epitelyal hücrelerde tutunması ile başlar (Sobel, 2016).

Vajinal kandidiyazis tedavisinde oral veya topikal olarak kullanılan ve farklı etkin maddeleri içeren çeşitli formülasyon seçenekleri bulunmaktadır. Oral yoldan uygulanan günlük 150 mg flukonazol veya intravajinal 100 mg klotrimazol ilk alternatifler arasındadır (Ramírez-Santos vd., 2008). Ancak, vulvovajinit tedavisinde birinci nesil antifungal ajan olarak bilinen klotrimazol ve flukonazole karşı artan *Candida albicans* direnci hastalığın yönetimini zorlaştırmakta ve yeni ilaç seçeneklerinin devreye girmesini gerektirmektedir (Crowley & Gallagher, 2014; Marchaim, Lemanek, Bheemreddy, Kaye, & Sobel, 2012). Birinci nesil azol grubu antifungal ilaçların eksikliklerinden yola çıkılarak daha geniş spektrumlu ve dirençli suşlarda etkili ikinci nesil

vorikonazol, POS gibi antifungaller geliştirilmiştir (Crowley & Gallagher, 2014).

Oral yoldan kullanılan azol grubu antifungal ajanların yan etkileri, düşük biyoyararlanımları, ilaç-ilaç etkileşimleri ayrıca ilerlemiş enfeksiyon vakalarında hastada semptomatik rahatlama yaratmaması sebebiyle lokal olarak kullanılabilen antifungal formülasyonlar tercih edilebilir (Johal vd., 2016).

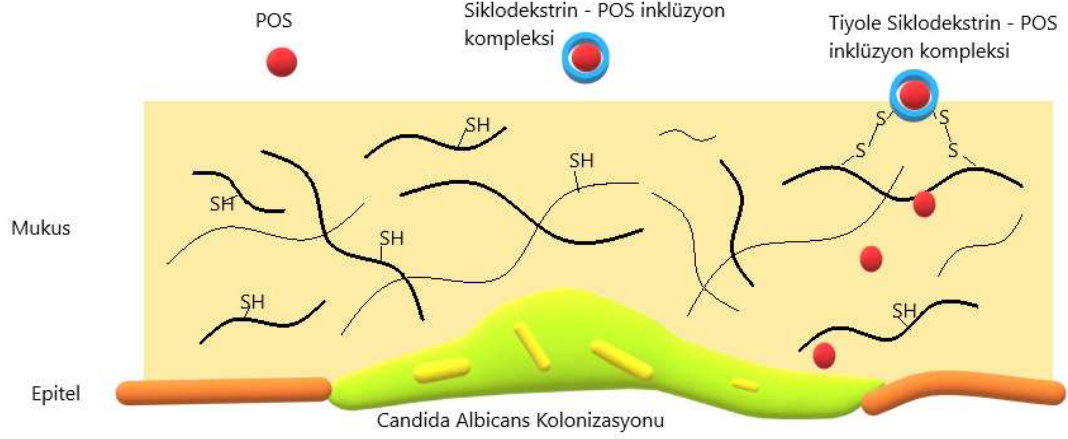
Krem, merhem, tablet gibi topikal ilaç taşıyıcı sistemlerin vajinada kalış süreleri vajinal sekresyondan dolayı kısıtlıdır ve etki yerinde uzun süre etkin konsantrasyonu sağlayamazlar. Geleneksel ilaç taşıyıcı sistemlerin bu sakıncalarının üstesinden gelebilmek için mukoadezif formülasyonlar geliştirilebilir. Mukoadezif polimerler ile vajinal olarak kullanılacak bir formülasyonun geliştirilmesi, ilacın vajinada kalış süresini ve mukoza ile temasını artırır, ilaç salım zamanını uzatarak etkinliğini güçlendirir (Acartürk, 2009; Bilensoy, Rouf, Vural, Sen, & Hincal, 2006; Mirza vd., 2013). Mukoadezif sistemler; formülasyonun mukusa yapışmasını sağlayarak, ilacın uzun süreli salımına olanak verirler ve bu sistemlerin temel ögesi polimerlerdir.

Son yıllarda mukoadezif özelliklerinin güçlü olması ve ilacın hedef bölgede kalışını belirgin olarak arttırması nedeniyle tiyole polimerlerle hazırlanan mukoadezif formülasyonlar üzerinde yoğun olarak çalışılmaktadır. Tiyole polimerler (tiyomerler); yan zincirlerinde tiyol grubu taşıyan hidrofilik polimerlerdir. Bu konjugatlar tiyole olmayan mukoadezif polimerlerden farklı olarak biyolojik membranlar ile kovalent disülfid bağları oluşturur ve böylece kuvvetli mukoadezif özellikler göstererek formülasyonun uygulama bölgesinde daha uzun süre kalmasını sağlarlar. Ayrıca tiyomerlerin polimerin kohezifliğini arttırıcı, enzim inhibe edici ve permeasyon arttırıcı özellikleri de vardır. Tiyomerler ile, farklı uygulamalar için (vajinal, bukkal, oral, intravezikal) farklı formlarda (tablet, nanopartikül, mikropartikül, emülsiyon) hazırlanan ve gösterdikleri yüksek mukoadezif özellik nedeniyle umut vadeditici olan pek çok ilaç taşıyıcı sisteme ait çalışma literatürde bulunmaktadır (Andreas Bernkop-Schnürch, 2005a, 2005b; Andreas Bernkop-Schnürch, Hoffer, & Kafedjiiski, 2004).

Mukozal uygulama için etkin bir formülasyon tasarlamak adına mukoadazyonun temel alınması literatürde oldukça sık incelenen bir yaklaşımdır ancak bu sistemlerin etkinliklerini kısıtlayabilecek bazı faktörler de vardır. Tiyomerler özellikle inert koşullar altında kalmadıkça özellikle pH 4,5 ve üstünde tiyol oksidasyonuna maruz kaldıklarından sulu çözeltilerde ve jellerde nispeten daha az kararlıdır. Polimer yapısına eklenmiş tiyol gruplarının mukus ile temas etmeden önceki bu erken oksidasyon, tiyomer ve mukus tabakası arasındaki etkileşimi bozabilir ve böylece tiyomerlerin etkinliğinin düşmesine neden olabilir (Iqbal vd., 2012).

Bu durum göz önünde bulundurularak ikinci nesil tiyomerler olarak adlandırılan önceden aktifleştirilmiş tiyomerler (Pre-activated Thiomers) geliştirilmiştir. Önceden aktifleştirilmiş tiyol gruplarının kullanımı, tiyomerlerin stabilitesini ve mukadezyon özelliklerini iyileştirerek daha etkin formülasyonlar tasarlanmasını sağlamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda hidrofilik polimerlerden hareketle pek çok önceden aktifleştirilmiş tiyomer sentezlenmiş, CD'ler de bu çalışmaların ilgi odağına girmiştir (Ijaz vd., 2017).

POS gibi suda çözünürlüğü çok düşük olan etkin maddelerin çözünürlüğünün artırılmasında sık başvurulan yöntemlerden biri CD'lerle inklüzyon komplekslerinin hazırlanmasıdır. CD'ler, ilaç moleküllerinin çözünürlük ve stabilite özelliklerini iyileştirirler fakat mukoadezif özellikleri yoktur. CD'lerin önceden aktifleştirilmiş tiyole konjugatları sentezlenerek ve bu konjugatlarla CD-ilaç inklüzyon kompleksleri hazırlanarak ilaçların aynı anda hem çözünürlüğünün artırılması hem de mukoadezif özellik göstermesi sağlanabilir (Ijaz, Griessinger, Mahmood, Laffleur, & Bernkop-Schnürch, 2016; Ijaz vd., 2015a). Buradan hareketle önceden aktifleştirilmiş tiyole CD'ler ve antifungal bir etkin madde ile tasarlanan mukoadezif bir formülasyonun vajinal kandidiyazis tedavisi için etkili bir seçenek olacağı düşünülebilir. Ayrıca, daha önce yapılan çalışmalarda kullanılan ve yüksek toksisite profiline sahip ürünler elde edilmesine sebep olan reaksiyon yolları yerine, farklı reaksiyon yolları izlenerek ürün sitotoksitesi düşürülebilir.



Şekil 1 : Tiyole CD - ilaç inklüzyon komplekslerinin mukustaki glikoprotein yapıları ile disülfid bağları aracılığıyla etkileşerek mukoadezif özellik göstermesinin şematik gösterimi

Diğer yandan, ilacın mukozada uzun süre kalmasını amaçlayan mukoadezif ilaç taşıyıcı sistemlere alternatif olarak geliştirilen mukusa penetre olabilen formülasyonlar mukoza üzerinde geniş bir yayılma sergilerler ve daha derin mucus bölgelerine nüfuz edebilirler.

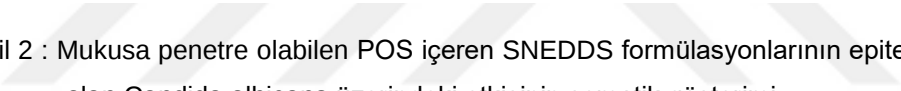
Mukusun yapısal, elektrostatik özellikleri ve sürekli yenileniyor oluşu patojenler ve yabancı partiküllerin epitele ulaşmasında bir engel oluşturmaktadır (Liu, Zhang, Shan, & Huang, 2015; Netsomboon & Bernkop-Schnürch, 2016). Bu nedenle; mucus insan sağlığı için hayati olmasıyla birlikte aynı zamanda mukozal yüzeylere hedeflenmiş ve kontrollü ilaç ve taşınması potansiyelini de önemli ölçüde sınırlamaktadır. Koruyucu özelliklerine zarar vermeden mucus bariyerinin derinliklerine nüfuz edebilen formülasyonların geliştirilmesi kistik fibroz, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar, dejeneratif göz hastalıkları, akciğer kanseri, irritabl bağırsak hastalığı ve mukozal enfeksiyonlar gibi hastalıklar için yeni tedavi seçenekleri sunabilir. Bu yüzden mukusa penetre olarak epitele ulaşabilen veya yaklaşabilen formülasyonlar geliştirebilmek etkin ilaç taşıyıcı sistemler tasarlamak adına önem teşkil etmektedir (Dünhaupt, Kammona, Waldner, Kiparissides, & Bernkop-Schnürch, 2015; Yang vd., 2011).

Mukusun, hidrofilik yapısı sebebiyle suda çözünürlüğü az olan BCS Sınıf II ve Sınıf IV ilaç moleküllerine karşı bir bariyer gibi davranarak epitele ulaşmalarını olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Mukusa penetre olabilen bir formülasyon hazırlanarak mukusun yapısal ve elektrostatik özellikleri

sebebiyle oluşan engelin aşılması halinde Çoğu BCS Sınıf II olan antifungal ilaç moleküllerinin bu yolla mukusu geçerek epitele ulaşabilmesi halinde vajinal enfeksiyonların da dahil olduğu pek çok mukozal hastalığın daha etkin tedavi edilebileceği düşünülmektedir (Lai, Wang, & Hanes, 2009; Yang vd., 2014).

Formülasyonların mukusa penetrasyonunu sağlamak için izlenebilecek stratejiler aktif yöntemler ve pasif yöntemler olmak üzere iki başlık altında toplanabilir. Pasif sistemlerin tasarlanması, formülasyonun mukus ile mümkün olduğunca az etkileşime girmesi temeline dayanır. Bu tip formülasyonlara örnek olarak nötral ve ya nötrale yakın negatif yüzey yüklü, mukus porlarından geçebilecek büyüklükte (<200 nm), kaygan yüzey özelliklerine sahip partiküller veya kendiliğinden emülsifiye olan nano ilaç taşıyıcı sistemler (SNEDDS) verilebilir. Aktif sistemlerin temel prensibi, formülasyonun mukus ile etkileşime girerek onu partiküllerin / damlacıkların daha iyi difüzyonu için daha az viskoz hale getirmesidir. Bu sistemler esas olarak N-asetilsistein (NAC) gibi disülfid bağlarını kırabilen aktif maddelerle veya proteolitik enzimlerle formüle edilebilir (Dünnhaupt vd., 2015; Netsomboon & Bernkop-Schnürch, 2016).

SNEDDS'in mukozal ilaç uygulama için önemli bir potansiyel taşıdığı son yıllarda yapılan araştırmalarda ortaya çıkmıştır. SNEDDS temelde yağ / surfaktan / çözücü karışımı olarak formüle edilir ve bağırsak, intraoral, oküler veya vajinal mukoza gibi hedef bölgede su içinde yağ (Y/S) mikro/nano emülsiyonlarına dönüşür. Azol grubu antifungaller gibi suda az çözünen ilaçların kolaylıkla formüle edilebilmesinin yanı sıra, SNEDDS deformasyon özellikleri sayesinde mukus tabakasına penetre olma kabiliyetine sahiptir. SNEDDS nanodamları, hidrofobik yüzey özellikleri ve mukus tabakası ile etkileşimlerinin şekil deformasyonu kabiliyetleri nedeniyle nispeten düşük olması sebebiyle, daha küçük ağ gözeneklerine sahip mukus jel tabakalarından bile difüze olabilirler (Netsomboon & Bernkop-Schnürch, 2016; Rohrer vd., 2016).



1. **Confidentiality** – The information that you provide to us will be held in confidence and will not be shared with any third party without your prior written consent.

İlacın salım ortamındaki çözünürlüğü gibi dış faktörlerin SNEDDS formülasyonlarından ilaç salımı üzerindeki etkisi formülasyonun kendisinin salım üzerindeki etkisinden daha fazladır. SNEDDS'den ilaç salımı, lipofilik bir yağlı fazdan sulu bir faza basit bir difüzyon işlemine dayandığından, salım davranışını karakterize etmenin muhtemelen daha anlamlı bir yolu, dağılım katsayısının ($\log D_{\text{SNEDDS}/\text{SO}}$) belirlenmesidir. Log D temel olarak, bir bileşiğin iki fazdaki çözünürlüğündeki farkın bir ölçümü olduğundan, SNEDDS yağlı fazı ve salım ortamında ilaç çözünürlüğünün ayrı ayrı ölçülmesiyle belirlenebilir, Dış etkenlerden bağımsız olarak kontrollü salım sağlayabilen SNEDDS formülasyonlarının geliştirilmesi hidrofobik veya iyonik polimer-ilaç etkileşimlerinin kullanılması ile sağlanabilir (Andreas Bernkop-Schnürch & Jalil, 2018).

Bu bilgiler ışığında, mukolitik ajan NAC ile katyonik polimer Eudragit RS 100 arasında bir iyonik kompleks hazırlanarak hem SNEDDS damlacıklarının mukusa penetrasyonlarının arttırılacağı hem de NAC'ın kontrollü salımının sağlanabileceği düşünülebilir. Ayrıca, SNEDDS formülasyonlarından NAC salımının belirlenmesi amacıyla membran ya da filtre kullanılan konvansiyonel metodlar yerine yeni bir metod geliştirilmesinin gerçeğe daha yakın sonuçlar elde edilmesi adına literature katkı vereceği söylenebilir.

Bu doğrultuda, bu tez çalışmasının genel amaçları;

- 1- Sık görülen bir mukozal enfeksiyon olan vajinal kandidiyazis tedavisinde, yeni nesil bir antifungal olan POS kullanılarak, mukozal dokuya ilaç uygulanmasında literatüre yakın zamanda girmiş iki yaklaşım (önceden aktive edilmiş tiyomerler ve mukusa penetre olabilen formülasyonlar) kullanılarak hazırlanan farklı tipte iki ilaç taşıyıcı sistemin;
 - a) Bir β -CD türevi olan Suc- β -CD'den hareketle sentezlenen Suc- β -CD-MNA kullanılarak hazırlanan mukoadezif inklüzyon komplekslerinin *in vitro* / *eks vivo* karakterizasyon ve sitotoksite çalışmalarının yapılması, değerlendirilmesi,
 - b) İyileştirilmiş mukusa penetre olabilme özellikleri elde etmek amacıyla mukolitik bir ajan NAC ile hazırlanmış bir iyonik kompleks içeren

SNEDDS hazırlanması, *in vitro* / *eks vivo* karakterize edilmesi, mukus permeasyon özelliklerinin belirlenmesi, sitotoksisite çalışmalarının yapılması ve değerlendirilmesi,

- 2- POS ile hazırlanmış bu formülasyonların antifungal etkinliklerinin *eks vivo* araştırılması,
- 3- SNEDDS formülasyonlarından NAC salımını belirleyebilmek için yeni bir salım metodu geliştirilmesidir.



Genel Bilgiler

1.1. Vajinal *Candida Sp.* Enfeksiyonları

Vajina fizyolojik koşullarda fazla miktarda (sekresyonda 10^9 cfu/g) komensal mikroorganizma içeren mukozal bir organdır. Bu komensal mikroorganizmaların başlıcası laktik asit salgılayarak vajinal pH'yı asidik (pH 4-5) tutan *Lactobacillus sp.*'dir. Vajinadaki komensal flora ekosistemi yaş, menstrüel döngü, seksüel aktivite, hamilelik, kontraseptif ajan kullanımı gibi sebeplerle değişiklik göstererek patojenik enfeksiyonlara yol açabilir (Johal vd., 2016; Ramsay, Astill, Shankland, & Winter, 2009).

Candida sp. kaynaklı vulvovajinit, sık görülen mukozal bir enfeksiyondur. Vulvovajinit vajinadaki enfeksiyon vakalarının %25'ini oluşturmaktadır. Sıklıkla tekrar eder ve bu nedenle de etkin bir tedaviye gereksinim duyulur. Vajinada *Candida sp.* kolonizasyonu mukus tabakasının altındaki epitel hücrelerde görülür (Sobel, 2016).

Enfeksiyonun rekürrensi yılda 4 veya daha fazla tekrar olarak tanımlanmıştır ve %40-50 oranında görülür. Tekrarlayan vulvovajinitin tedavisi genelde atipik (*non-albicans*) veya direnç kazanmış *Candida sp.* kaynaklı olması sebebiyle zaman alıcıdır (Ramsay vd., 2009).

Candida sp. kaynaklı vulvovajinitin başlıca semptomları, kaşıntı, irritasyon, ağrı ve vajinal akıntıdır. Klinik bulgulara vulva eritemi, ödem ve fissür görülebilir. Sarı-beyaz kokusuz akıntı ile karakterizedir. *Candida sp.* enfeksiyonlarında Vajinal pH neredeyse her zaman normal aralıktadır. Yüksek pH başka bir enfeksiyonun da var olabileceğinin işaretidir. Teşhiste klasik kültür yöntemleri yanı sıra polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR) yöntemi de kullanılmakta ve bu yöntem daha hassas sonuçlar elde edilmesine olanak sağlamaktadır (Palmeira-de-Oliveira, Palmeira-de-Oliveira, & Martinez-de-Oliveira, 2015; Sobel, 2016).

Tedavisinde uygulanabilecek birden fazla terapötik seçenek vardır. Oral yoldan günlük 150 mg flukonazol kullanımı ilk alternatifler arasındadır (Ramírez-Santos vd., 2008). Ancak, vulvovajinit tedavisinde birinci nesil antifungal ajanlara karşı artan *Candida albicans* direnci hastalığın yönetimini

zorlaştırmakta ve yeni ilaç ve formülasyon seçeneklerinin devreye girmesini gerektirmektedir (Crowley & Gallagher, 2014; Marchaim vd., 2012).

Diğer yandan *Candida sp.* enfeksiyonları sistemik olarak tedavi edilebiliyor olsa da kullanılan azol grubu antifungal ajanların yüksek toksisiteye ve düşük biyoyararlanıma sahip olması sebebiyle son yıllarda doğrudan vajinaya uygulanabilen formülasyonların geliştirilmesine ait çalışmalar hız kazanmıştır. Lokal terapide 1-14 gün arası mikonazol, klotrimazol, ekonazol gibi azol grubu antifungal ilaçların kullanımı yaygın tercih edilen bir seçenektir. Ancak lokal olarak uygulanan krem, merhem, vajinal suppozituar gibi geleneksel formülasyonların da vajinal *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde belirgin yetersizlikleri bulunmaktadır. Vajinal sekresyondan dolayı epitelde kalış sürelerinin kısa olması, düşük hasta uyuncu, sık uygulama ve dışarıya akma geleneksel formülasyon tiplerinde görülen başlıca problemlerdir (Baloglu vd., 2011; Ramsay vd., 2009; Rençber vd., 2017).

1.2. Posakonazol

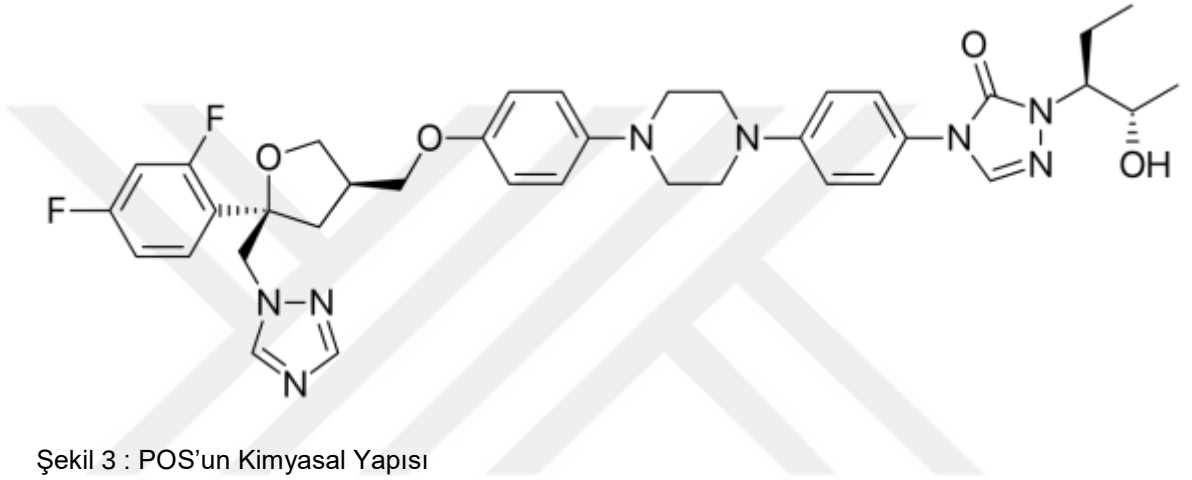
1.2.1. Fizikokimyasal Özellikleri, Etki Mekanizması ve Antifungal Spektrumu

Antimikotik ilaç sınıflarından, mantar enfeksiyonlarının tedavisinde en sık kullanılanlar azol sınıfı olanlardır (konazoller). Birinci nesil flukonazol ve itraconazol gibi azol grubu antifungal ilaçların eksikliklerinden yola çıkılarak daha geniş spektrumlu ve dirençli suşlarda etkili ikinci nesil vorikonazol, POS gibi antifungaller geliştirilmiştir (Crowley & Gallagher, 2014). İtraconazolün yapısal bir analogu olan POS, Avrupa Birliği ülkelerinde 2005'te ve A.B.D.'de ise 2006'da aspergilloz, kandidiyazis ve 13 yaşından büyük immün sistemi baskılanmış hastalarda diğer istilacı mantar enfeksiyonlarının tedavisi için onaylanarak klinikte kullanıma girmiştir. Şu anda oral süspansiyon, intravenöz enjeksiyonlar ve gecikmeli salımlı tabletleri içeren üç onaylanmış POS formülasyonu vardır (Torres, Hachem, Chemaly, Kontoyiannis, & Raad, 2005).

POS yapısal olarak daha eski nesil geniş spektrumlu triazol itraconazole benzer, ancak itraconazoldeki klor yerine flor substitusyonu ve dioksolan halkası yerine furan halkası taşımaktadır (Kujawski vd., 2019).

POS, düşük sulu çözünürlüğe sahip oldukça lipofilik, (log P = 5,5) zayıf alkali bir etkin maddedir. pKa 3,6 ve 4,6 değerlerine sahiptir. BCS Sınıf II (düşük çözünürlük, yüksek absorpsiyon) olarak kategorize edilmiştir. Moleküler ağırlığı 700,792 g/moldür. POS, dört kiral merkeze sahip enantiyomerik açıdan saf bir RRSS izomeridir (Kujawski vd., 2019).

POS'un IUPAC isimlendirmesine göre 4-{4-[4-(4- {(5R) -5- (2,4-diflorofenil) - 5- (1H-1,2,4-triazol-1-ilmethyl) oksolan-3-il] metoksi} fenil) piperazin-1-il] fenil} -1- [(2S,3S) -2-hidroksipentan-3-il] - 4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on olan kimyasal yapısı Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3 : POS'un Kimyasal Yapısı

Önceki nesil konazollere kıyasla, POS, mayalar, filamentli mantarlar ve *Candida* sp.'nin yanı sıra *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida dubliniensis* gibi flukonazole dirençli olanlar dahil genişletilmiş bir antimikotik aktivite spektrumuna sahiptir. POS'un aktivite spektrumu, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus spp.*, *Blastomyces dermatitidis*, *Trichosporon spp.* ve *Scedosporium spp.* gibi diğer patojenik mantarları da kapsar. Ayrıca, POS hayvan modellerinde protozoal parazitlere *Trypanosoma* ve *Leishmania*'ya karşı etkilidir ve bebeklerde hayatı tehdit eden beyin enfeksiyonlarından sorumlu bir virüs olan *Parechovirus A3*'e karşı antiviral aktivite sergiler POS fungisidal ve fungistatik olarak kullanılabilir (Leung vd., 2015; Sun, Fothergill, McCarthy, Rinaldi, & Graybill, 2002).

POS'un yakın zamanda antifungal etkin madde seçeneklerine eklenmesi, ilacın geniş spektrumlu ve bir dizi yaygın mantar patojenlerine ve özellikle de standart antifungal tedaviye direnç gösteren suşlara karşı güçlü aktivitesi

nedeniyle bu enfeksiyonların tedavisinde büyük avantaj sağlamıştır (Leung vd., 2015).

POS *in vitro* olarak oldukça etkindir. Dünya çapındaki 100'den fazla tıp merkezinden 2001 ve 2002 yıllarında elde edilen 3932 izolat izolatına karşı POS'un *in vitro* aktivitesi incelendiğinde POS'un *Candida* türlerinin % 97-98'e karşı aktif olduğu bulunmuştur (Schiller & Fung, 2007). POS'un antifungal spektrumu diğer bazı azol sınıfı ilaçlarla karşılaştırmalı olarak Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1 : POS ve diğer bazı azol sınıfı ajanların Antifungal Spektrumu (Schiller & Fung, 2007)

	Ketokonazol	Flukonazol	Itrakonazol	Vorikonazol	Posakonazol
<i>Candida albicans</i>	++	++	+++	+++	+++
<i>Candida glabrata</i>	-	++	++	+++	+++
<i>Candida krusei</i>	-	+	++	+++	+++
Dimorfik Mantarlar	-	++	++	+++	+++
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	++	++	+++	+++
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-	+++	+++
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	+++	+++
Demakitöz Mantarlar	-	-	-	++	++
<i>Zygomycetes</i>	-	-	-	+	++

POS'un genişletilmiş yan zincirleri, azol hedefi olan 14 α -demetilaz enziminin (CYP51) ile ek temas noktaları sağlar. CYP51, mantar hücre zarı ergosterolün ana sterolünün sentez yolunda 14-a-demetilaz olarak işlev gören bir entegral membran proteindir. POS, sitokrom P450'ye bağımlı bir enzim olan 14-alfa demetilazı kuvvetle inhibe eder. 14-alfa-demetilazın inhibisyonu, mantar hücresi duvarının önemli bir bileşeni olan lanosterolün ergosterol'e dönüşümünü önler. Ergosterol sentezinin inhibisyonu, mantar hücre zarı bileşimini ve bütünlüğünü ayrıca zar geçirgenliğini değiştirir ve sonunda mantar hücresi lizisine yol açar. Diğer azol antifungallerine kıyasla,

POS, sterol 14-alfa demetilazın önemli ölçüde daha güçlü bir inhibitörüdür (Carrillo-Muñoz vd., 2005; G. Krishna, Moton, Ma, Medlock, & McLeod, 2009).

1.2.2. Farmakokinetik, Farmakodinamik Özellikleri ve Yan etkileri

Lipofilitesi yüksek bir ilaç olan POS, oral kullanım sonrası % 98'den yüksek protein bağlanmasına rağmen geniş bir dağılım hacmine sahiptir. Kararlı hal konsantrasyonları 7-10 gün sonra elde edilir, bu noktada ortalama terminal eliminasyon yarı ömrü 35 saattir. Çalışmalar, Cmax ile birlikte doğrusal olmayan farmakokinetiği ve ilacın hem intravenöz hem de oral uygulama sonrasında dozla orantısız şekilde artan plazma konsantrasyon-zaman eğrisi göstermiştir. (R. Courtney, Pai, Laughlin, Lim, & Batra, 2003; G. Krishna vd., 2009).

POS'un oral Emilimi doz ile sınırlıdır ve yağlı yiyeceklerin alımı ile bağlantılıdır. Maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşma süresi, tek bir dozun uygulanmasından 5-8 saat sonradır. POS, 343–1341 L.'lik bir dağılım hacmiyle, dokulara dağılır. (Gopal Krishna, Ma, Martinho, & O'Mara, 2012).

POS'un tolere edilebilirliği flukonazolünkine benzer, en sık bildirilen advers etkiler gastrointestinal semptomlar ve baş ağrısıdır. POS hepatik sitokrom P 450 3A4'ü inhibe ettiği için, bu enzim tarafından metabolize edilen diğer ilaçlarla önemli ilaç etkileşimlerine neden olabilir (R. Courtney vd., 2003; Rachel Courtney, Wexler, Radwanski, Lim, & Laughlin, 2003).

Tablo 2 : POS'un Yan Etkileri

	Yan Etkiler
Gastrointestinal Sistem	Baş dönmesi, kusma, ishal, yüksek alkali fosfataz / aspartat aminotransferaz seviyeleri
Deri	Kızarıklık, kaşıntı
Kardiyovasküler Sistem	Hipertansiyon
Genel	Baş dönmesi, anoreksi / iştahsızlık, yorgunluk
Böbrekler	Kreatinin seviyesinde artış
Merkezi Sinir Sistemi	Baş ağrısı, titremeler

Tablo 3 : POS – İlaç Etkileşimleri

İlaç	Data
Siklosporin	Siklosporin dozu düşürülmeli
Takrolimus	Takrolimus dozu düşürülmeli
Rifabutin	Beraber kullanılması durumunda rifabutin seviyesi izlenmeli
Fenitoin	Fenitoin dozu düşürülmeli
Digoksin	İlaç seviyeleri İzlenmeli
Ergot Alkaloidleri	İlaç seviyeleri İzlenmeli
Kortikosteroid	İlaç seviyeleri İzlenmeli
Karbamazepin	İlaç seviyeleri İzlenmeli

1.2.3. POS Müstahzarları

POS'un dünyadaki ticari müstahzarları Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4 : POS'un dünyadaki ticari müstahzarları

Jenerik İsim	Preparat Tipi	Doz	Veriliş Yolu	Firma	Çıkış Tarihi
Noxafil	Enjeksiyonluk	300 mg	IV	Merck Sharp & Dohme Limited	2005-10-25
Noxafil	Tablet, geciktirilmiş salım	100 mg	Oral	Merck Sharp & Dohme Limited	2005-10-25
Noxafil	Çözelti	18 mg/mL	IV	Merck Sharp & Dohme Corp.	2014-03-13
Noxafil	Tablet, geciktirilmiş salım	100 mg	Oral	Merck Sharp & Dohme Limited	2005-10-25
Noxafil	Tablet, kaplı	100 mg	Oral	Merck Sharp & Dohme Corp.	2013-11-25
Noxafil	Suspansiyon	40 mg/mL	Oral	Merck Sharp & Dohme Limited	2005-10-25
Noxafil	Suspansiyon	40 mg/1mL	Oral	Merck Sharp & Dohme Corp.	2006-09-15
Posanol	Çözelti	18 mg	IV	Merck Ltd.	2014-11-24
Posanol	Tablet, geciktirilmiş salım	100 mg	Oral	Merck Ltd.	2014-05-21
Posanol	Suspansiyon	40 mg	Oral	Merck Ltd.	2007-06-06

1.3. Mukus ve Mukoadezyon

Vajina gibi mukozal dokuların lümen yüzeyi, yüksek viskoelastik ve yapışkan mukus tabakası ile korunmaktadır (Lai vd., 2009).

Mukus, vücuttaki epitelyal tabakaları kaplayan, onu yabancı ve patojen partiküllere karşı korumakla görevli viskoelastik ve adeziv jel yapıda bir tabakadır. Ana bileşeni su (%95) olup, iç içe geçmiş müsin fiberleri, tuzlar, proteinler, α -amilaz gibi enzimler, lipidler ve hücrel atıklar da içerir. Mukus içeriğindeki siyalik asit ve sülfonik asit yapıları sebebiyle negatif yüklüdür. Pozitif yüklü partiküller mukus ile elektrostatik etkileşimler kurarak mukusun üst tabakalarına tutunma eğilimindedirler (Boegh & Nielsen, 2015; Netsomboon & Bernkop-Schnürch, 2016).

Biyoadesyon, en az birisi biyolojik kaynaklı olmak üzere iki yüzeyin, yüzeyler arası kuvvetler aracılığı ile bir zaman dilimi boyunca bir arada kalması olarak tanımlanır. Söz konusu biyolojik yüzeylerden biri, mukoza olduğu zaman bu olgu mukoadesyon olarak adlandırılmaktadır. Mukoadesyon genel olarak 3 aşamada incelenebilir; polimerin ıslanması ve şişmesi, polimer zincirlerinin mukus içine interpenetrasyonu ve polimer müsin moleküllerinin etkileşimi ve bu etkileşim sırasında polimer ve mukus arasında kimyasal ya da fiziksel bağların oluşması (Smart, 2005).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda mukoadesyon mekanizmasını açıklamak için pek çok teori geliştirilmiştir.

1.Elektronik teori; mukoadesif polimerler ve mukusun farklı elektriksel yüklerinin sonucu olarak ara yüzeyde elektriksel çift tabaka oluştuğu hipotezine dayanır.

2.Adsorbsiyon teorisi; mukoadesif polimer ve mukus arasında oluşan bağın, Van der Waal's etkileşimleri, hidrojen bağları veya hidrofobik etkileşimlerden kaynaklandığını açıklar.

3.İslanma teorisi; mukoadesif polimerin yayılma ve mukus ile yakından temas oluşturma yeteneğine dayanan bir teoridir.

4.Difüzyon teorisi; mukoadesif polimer zincirlerinin müsin ağı ile yeterli derinlikteki interpenetrasyonu sonucu yarı-kararlı adeziv bağ oluşumuna dayanır. Bu girişimin ölçüsü difüzyon katsayılarıyla belirlenir. Polimerin difüzyon katsayısı molekül ağırlığına ve zincir esnekliğine bağlıdır.

5.Kopma teorisi; iki yüzeyin adezyondan sonra birbirinden ayrılması için gereken kuvvetin ölçülmesini inceler. Bu teori, adeziv bağların kopması sırasındaki gerilme direncinin ölçülmesine dayanır (Andrews, Laverty, & Jones, 2009; Carvalho, Bruschi, Evangelista, & Gremião, 2010; Smart, 2005).

1.4. Mukoadezif Formülasyonlar

Doğal veya sentetik polimerler kullanılarak hazırlanan mukoadezif ilaç taşıyıcı sistemler, polimer ve hedef doku arasında yakın temas sağlayan kontrollü bir ilaç salım sistemleridir (Carvalho vd., 2010).

Vücudun mukozal yüzeylerinin toplam alanı, cilt yüzeyininkinden daha fazladır; yalnızca ince bağırsak bölgesi, cilt yüzeyinden 100 kat daha büyüktür. Bu noktadan hareketle sistemik veya topikal mukoadezif ilaç formülasyonlarının geliştirilmesi son yıllarda büyük önem kazanmıştır (A Bernkop-Schnürch & Steininger, 2000; Andreas Bernkop-Schnürch & Dünhaupt, 2012).

Mukoadezif ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesinin lokal / bölgeye özgü ilaç salımı, daha az sistemik yan etki olasılığı, etki bölgesinde daha uzun kalma süresi, hedef yüzeye daha yakın temas, ilacın kontrollü / yavaş salımına bağlı olarak pik konsantrasyonlarından kaçınılması (sıfır dereceli kinetik) gibi birçok avantajı vardır (Smart, 2005).

Geleneksel topikal ilaç taşıyıcı sistemlerin vajinada kalış süreleri vajinal sekresyondan dolayı kısıtlıdır ve etki yerinde uzun süre etkin konsantrasyonu sağlayamazlar. Bu dezavantajların üstesinden gelebilmek için mukoadezif formülasyonlar geliştirilebilir. Mukoadezif polimerler ile vajinal olarak kullanılacak bir formülasyonun geliştirilmesi, ilacın vajinada kalış süresini ve mukoza ile temasını artırır, ilaç salım zamanını uzatarak etkinliğini güçlendirir (Acartürk, 2009; Bilensoy vd., 2006; Mirza vd., 2013).

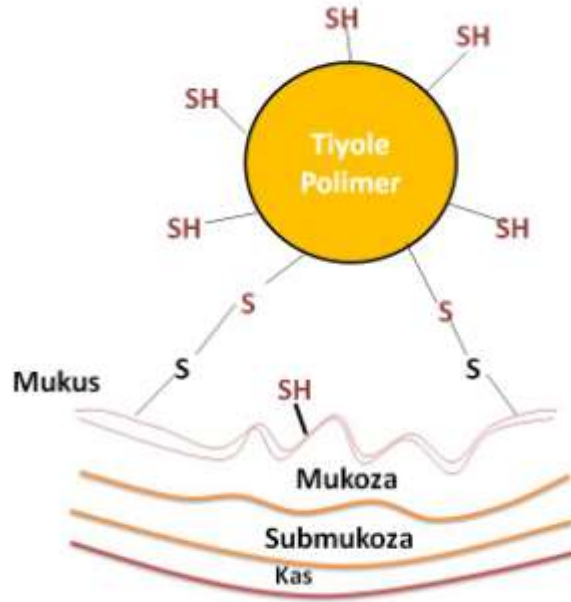
1.4.1. Tiyole ve Önceden Aktifleştirilmiş Polimerler

1999 yılında ilk kez Andreas Bernkop-Schnürch tarafından sentezlenen tiyomerler, mukoadezif formülasyonlarda kullanılan diğer polimerlerin aksine mukustaki yapılarla non-kovalent değil, kovalent bağlar kurarak uzun süre

mukozada kalabilir. Bu kovalent bağların, hidrojen bağları, van der Waal kuvvetleri ve polimerin iyonik etkileşimleri ile mukus tabakasının anyonik alt yapıları gibi kovalent olmayan etkileşimlerden daha güçlü olduğu varsayılmaktadır (Kast & Bernkop-Schnürch, 2001; Leitner, Walker, & Bernkop-Schnürch, 2003).

Bu kovalent bağların, hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri ve polimerin iyonik etkileşimleri gibi kovalent olmayan etkileşimlerden daha güçlü olduğu varsayılmaktadır. (Andreas Bernkop-Schnürch, Hornof, & Zoidl, 2003; Partenhauser & Bernkop-Schnürch, 2016).

Doğal mukoadezif polimerlerin tiyollenmesiyle mukoadezif özellikleri büyük ölçüde iyileştirilmiş ve adezyon özelliklerinde 140 kata kadar artış sağlanmıştır (Bernkop-Schnürch, 2005). Bunun nedeni tiyole polimerin mukozal tabakanın sistein bakımından zengin bölgeleri ile disülfid köprüleri oluşturmasıdır. Polimer yapısına eklenen tiyol ($-SH$) grupları sayesinde gösterdikleri güçlü mukoadezyon ve enzim inhibisyonu gibi üstünlükleri sebebiyle mukoadezif formülasyonların tasarlanmasında sıklıkla tercih edilirler (Andreas Bernkop-Schnürch, 2005a; Iqbal vd., 2012)



Şekil 4 : Tiyole polimerlerin mukustaki sistein yapıları ile disülfid bağları oluşturması

Tiyomerler, nispeten basit ve sert olmayan reaksiyon koşulları altında -SH grubu taşıyan ligandların polimerlerin omurgasına kovalent olarak bağlanmasıyla sentezlenir. Bu modifiye edilmiş polimerler, ana polimerlerinin kimyasal yapısı temelinde katyonik, anyonik ve iyonik olmayan tiyomerler halinde gruplandırılır. 2000'li yılların başından beri üzerine çalışılan tiyomerler, 2015 yılında kuru göz sendromunun tedavisinde kullanılan Lacrimera (CROMA-PHARMA, Leobendorf, Avusturya) preparatıyla ilk defa ticari ürün olarak ilaç piyasasına sürülmüştür.

Tiyomerler ayrıca enzim inhibe edici, geçirgenliği artırıcı ve akışlı pompa inhibe edici özellikler sergilerler . Ayrıca, tiyomerler, özellikle bağırsaklarda peptitler ve proteinler dahil ilaçlar için enzimatik koruyucu görevi görür. Belirtilen tüm avantajları ile tiyomerler, kontrollü ilaç salımında kullanılan ilaç taşıyıcı sistemler için oldukça uygun formülasyon bileşenleridir (Şenyiğit vd., 2015).

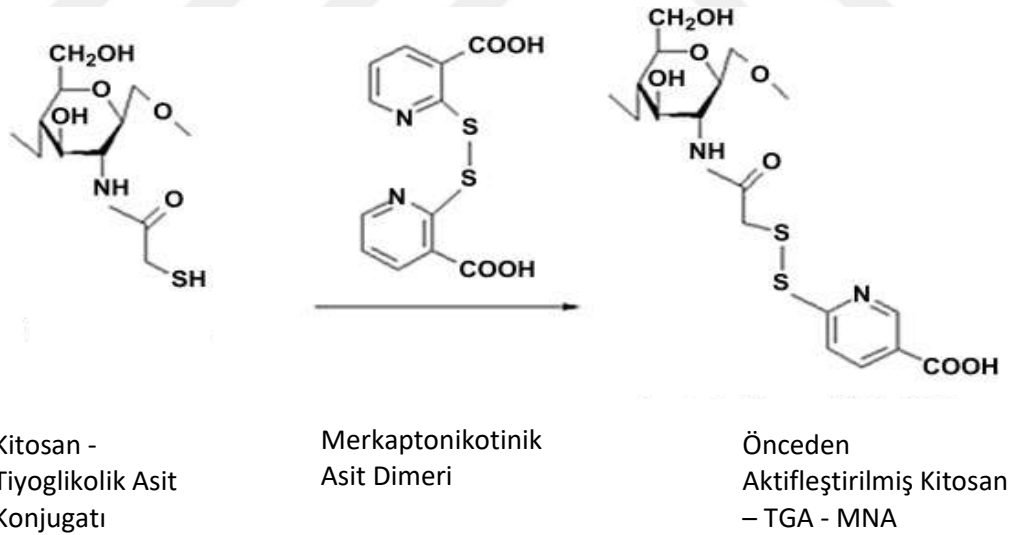
Tüm bu tercih sebebi özelliklerine rağmen, tiyomerler özellikle inert koşullar altında kalmadıkça pH-5 ve üstünde tiyol oksidasyonuna maruz kaldıklarından sulu çözeltilerde ve jellerde nispeten daha az karardır. Tiyol gruplarının mukus tabakası ile temas etmeden önceki bu çok erken oksidasyonu, tiyomer ve mukus tabakası arasındaki etkileşimi bozabilir ve böylece tiyomerlerin etkinliğinin düşmesine neden olabilir (Friedl, Dünnhaupt, Waldner, & Bernkop-Schnürch, 2013).

Bu gibi dezavantajlar önceden aktifleştirilmiş tiyomerler olarak adlandırılan ikinci nesil tiyole polimerlerin kullanılmaya başlanmasına kapı açmıştır. Önceden aktifleştirilmiş tiyol gruplarının kullanımının, tiyomerlerin stabilitesini ve mukadezyonunu özelliklerini arttırmak için etkili bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir. (Laffleur & Röttges, 2019)

Önceden aktifleştirilmiş tiyomerler; serbest tiyol gruplarının aromatik piridil yapıları yoluyla korunduğu tiyomerlerdir. Önceden aktif hale getirilmiş tiyomerlerin sentezi için kullanılan konsept, kovalent kromatografide uzun zamandır kullanımda olan tekniklere dayanmaktadır. Amino asit sekanslarında en az bir sistein alt birimi içeren peptitler ve proteinler piridil yapısı taşıyan tiyol reçinelerine kantitatif olarak ve çok hızlı şekilde tutunur. Bunun sonucunda oluşan piridil disülfidler geniş bir pH aralığında sülfhidril

grupları ile disülfid bağları oluşturmak üzere çok hızlı reaksiyona girerler. Bu reaksiyon esnasında piridile bağlı tiyol grubu ile molekülün tiyol grubu arasında bir disülfid değişimi görülür (Ijaz & Bernkop-Schnürch, 2015; Nowak, Laffleur, & Bernkop-Schnürch, 2015).

Ancak piridil'in toksik profili nedeniyle, bu teknoloji şu ana kadar yeni tiyomerlerin sentezi için pragmatik olarak kullanıma girememiştir. Bu durumun üstesinden gelmek için sentezde piridil grubuna bir alternatif olarak nikotinamid türevleri (vitamin B3) kullanılarak, ürünün toksik profili önlenabilir. Örneğin 6-merkaptonikotinamid (6-MNA) farmasötik formülasyonlarda kullanılmak için oldukça uygun bir toksisite profiline sahiptir. Eğer tiyomerlerde bulunan tiyol gruplarının hepsi nikotinamitil disülfidlere dönüştürülür ise bu artık oksidasyondan tamamen korunacakları anlamına gelir. Nikotinamid türevlerinin sentezde kullanılmaya başlanması ile ikinci kuşak tiyomerler ortaya çıkmıştır ve tiyomerlerin daha reaktif ve daha geniş pH aralığında stabil olması sağlanabilmiştir (Ijaz & Bernkop-Schnürch, 2015; Lupo vd., 2017).



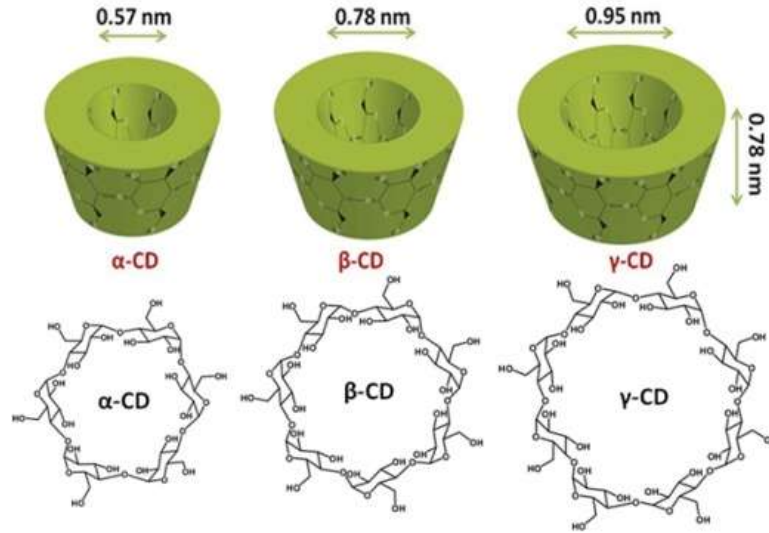
Şekil 5 : Kitosan – Tiyoglikolik Asit konjugatının merkaptotonikotinik asit ile ön aktivasyonu

Oksidasyona karşı stabilitenin sağlanması, kararlı sıvı ve yarı katı formülasyonların tasarlanmasına, ve bu formülasyonların doğrudan mukoza üzerinde reaktif hale gelmesine olanak tanımaktadır. Ayrıca birinci

jenerasyon tiyomerler için sulu ortamlarda oksidasyona karşı tiyol grubu stabilitesi sağlamak çok zorken önceden aktifleştirilmiş tiyomerler uygulamada böyle bir sorun görülmemektedir .Bu özellikleriyle önceden aktifleştirilmiş tiyomerler, muhtemelen kuru göz, ağız kuruluğu ve kuru vajinal sendrom tedavisi için, örneğin sıvı formülasyonların en büyük potansiyele sahip olduğu çeşitli ürünler tasarlanmasına imkan sağlayacaktır (Iqbal vd., 2012; Partenhauser & Bernkop-Schnürch, 2016).

1.5. Siklodekstrinler

CD'ler, (α -1,4) bağlı D-glukopiranoz birimlerinden oluşan halkasal oligosakkaritlerdir. Farmasötik ürünlerde en çok kullanılan CD'ler aynı zamanda doğal CD'ler olarak da bilinen α -CD, β -CD ve γ -CD'dir. Doğal CD'ler olarak bilinen bu üç CD sırasıyla 6,7 ve 8 D-glukopiranoz biriminden oluşmaktadır. Daha büyük halkalı CD'ler bulunmasına rağmen üretimleri zordur ve inklüzyon kompleksi oluşturma kabiliyetleri sınırlıdır. α -CD, β -CD ve γ -CD kesik koni biçimli hidrofilik dış yüzey ve hidrofobik iç boşluğa sahip moleküllerdir (Harangi, Béke, Harangi, & Mótyán, 2012).



Şekil 6 : Doğal CD'ler α -CD, β -CD ve γ -CD kimyasal yapıları

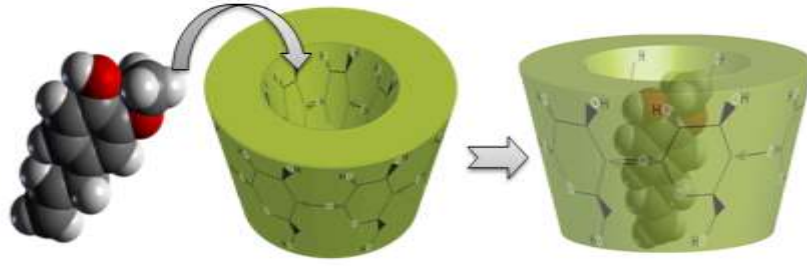
Doğal CD'ler olan α -CD, β -CD ve γ -CD'in, ilaç endüstrisinde ilaç molekülleri ile suda çözünen inklüzyon kompleksi yapıcı maddeler olarak uygulamalarını sınırlayan, bu halkasal oligosakkaritlerin suda çözünürlüklerinin düşük olmasıdır. Tıpkı bir diğer doğal oligosakkarit olan nişasta gibi CD'ler de, suda

çözünür türevler elde etmek için çok çeşitli reaktiflerle reaksiyona sokulabilir. Örneğin, hidroksipropillenmiş CD türevleri (HP- β -CD ve HP- γ -CD), doğal CD'lerin propilen oksit, karboksimetillenmiş CD'ler (örneğin, CM- β -CD), doğal CD'lerin monokloroasetik asit ile reaksiyona sokulması sonucu elde edilir. Doğal CD türevlerinin, metil iyodür ile reaksiyonu sonucu rastgele metillenmiş CD'ler (örn., RM- β -CD), 4-butan sulton ile reaksiyonu sonucu ise sülfobutileter CD'ler içeren (örn., SBE- β -CD ve SBE- γ -CD) elde edilebilir (Harangi vd., 2012; Miranda, Martins, Veiga, & Ferraz, 2011).

Doğal CD'lerdeki hidroksi gruplarının substitüsyonu ile, CD'lerin sudaki çözünürlüğü 500 mg / mL'nin üzerinde olan izomerik karışımlar elde edilebilir. Hidrofilik hidroksi gruplarının, RM- β -CD'de olduğu gibi daha fazla lipofilik metoksi grubu ile rastgele substitüsyonu bile modifiye edilmemiş CD halkalarına kıyasla çözünürlük özelliklerinde dramatik artışlar sağlamıştır. Rastgele substitüsyon, doğal CD'leri kristal katılardan, fiziksel olarak stabil, amorf izomer karışımlarına dönüştürür. Kristal yapıdaki doğal CD'lerin amorf izomerler karışımına dönüştürülmesi, sadece CD'lerin çözünürlük özelliklerini değil, aynı zamanda bunlar ile hazırlanan inklüzyon komplekslerinin çözünürlük özelliklerini iyileştirir. (Harangi vd., 2012; T Loftsson, Sigurdsson, Másson, & Schipper, 2004).

1.5.1. Inklüzyon Kompleksi Oluşumu

CD'lerin en dikkat çekici özelliği, moleküler bir kompleksleşmeyle çok çeşitli katı, sıvı ve gaz bileşikleriyle inklüzyon kompleksleri (konak-konuk kompleksleri) oluşturma kabiliyetleridir. Bu komplekslerde, CD (konak) molekülünün boşluğu içinde bir konuk molekül tutulur. Kompleks oluşumu, konak boşluğu ve konuk molekül arasında üç boyutlu geometrik bir uyuma dayanır. CD moleküllerinin lipofilik boşluğu, içine uygun boyutlarda polar olmayan moleküllerin inklüzyon kompleksleri oluşturmak üzere girebileceği bir mikro-ortam sağlar. Inklüzyon kompleksi oluşumu sırasında hiçbir kovalent bağ kopmaz veya oluşmaz. (Brewster & Loftsson, 2007; Del Valle, 2004).



Şekil 7 : CD (konak) – İlaç (konuk) inklüzyon kompleksi oluşumu

Ortamda CD / ilaç inklüzyon kompleksleri sürekli olarak oluşmakta ve ayrılmaktadır. Bunun bir sonucu olarak, ilaç molekülleri, ortam seyreltilmesinin etkisi ya da gastrointestinal sistemdeki safra asitleri gibi ilaç molekülü ile CD hidrofobik boşluğuna inklüze olmak için rekabet eden moleküllerin etkisiyle kompleksten hızlı bir şekilde salınırlar (Uekama & Otagiri, 1987)

Konuk moleküllerin konak CD içindeki bağlanması sabit veya kalıcı değildir, daha çok dinamik bir dengeye dayanmaktadır. Bağlanma kuvveti, 'konak-konuk' kompleksinin yapısal olarak birbirine ne kadar iyi uyduğuna ve yüzey atomları arasındaki belirli yerel etkileşimlere bağlıdır. (Jansook, Ogawa, & Loftsson, 2018; Uekama & Otagiri, 1987).

CD'ler ile konuk moleküllerin oluşturduğu inklüzyon kompleksleri, konuk molekülün fizikokimyasal özellikleri üzerinde önemli değişimler sağlar. Bunlardan başlıcaları çözünürlüğü düşük moleküllerin çözünürlüklerinin iyileştirilmesi, kararsız moleküllerin oksidasyonu, görünür veya UV ışığının ve ısıнын bozucu etkilerine karşı stabilizasyonu, uçuculuğun ve süblimleşmenin kontrolü, uyumsuz bileşiklerin fiziksel izolasyonu, kromatografik ayırmalar, maskeleyme yoluyla hoş olmayan koku ve tat modifikasyonu ve ilaçların kontrollü salımıdır. (Brewster & Loftsson, 2007).

CD'ler ile inklüzyon kompleksi oluşturabilecek, moleküler kapsülleme için uygun potansiyel konuk molekül listesi oldukça çeşitlidir. Bunlar arasında düz veya dallı zincirli alifatikler, aldehitler, ketonlar, alkoller, organik asitler, yağ asitleri, aromatik bileşikler, gazlar ve halojenler ve aminler gibi polar bileşikler gibi bileşikler yer alır. Çok sayıda reaktif hidroksil gruplarının mevcudiyeti nedeniyle, CD'lerin işlevselliği, kimyasal modifikasyonla büyük ölçüde artırılmıştır.

Bir CD'in bir konuk molekül ile bir inklüzyon kompleksi oluşturma yeteneği iki temel faktöre bağlıdır. Bunlardan ilki steriktir ve CD ile konuk molekülün büyüklüğüne veya konuk içindeki belirli kilit fonksiyonel grupların boyutuna bağlıdır. Konuğun boyutu uygun değil ise, CD boşluğuna tam olarak oturmayacaktır. İkinci kritik faktör, sistemin farklı bileşenleri (CD, konuk, çözücü) arasındaki termodinamik etkileşimlerdir. Bir kompleksin oluşması için konuğu CD içine çeken uygun bir net enerjik itici güç olmalıdır (Jansook vd., 2018; Thorsteinn Loftsson, 2014).

Kullanılan teknikler arasında basit kuru karıştırma, çözelti ve süspansiyonlarda karıştırma, ardından uygun bir ayırma, macun hazırlama ve termo-mekanik teknikler vardır. Inklüzyon kompleksinin ayrışması, genellikle ortamdaki su moleküllerinin sayısındaki artışla görülen hızlı bir işlemdir. Vücut gibi yüksek oranda seyreltilmiş ve dinamik sistemlerde, konuk molekül, kompleksi yeniden oluşturmak için başka bir CD bulmakta zorlanır ve çözelti içinde serbest bırakılır (Kurkov, 2013; Thorsteinn Loftsson, Saokham, & Sá Couto, 2019).

1.5.2. İlaç Çözünürlüğü Ve Dissolüsyon Üzerindeki Etkisi

CD'ler, suda çözülebilen ilaçların formüle edilmesinde, çözücü içinde veya katı dispersiyon yoluyla ilaç çözünürlüğünü ve / veya dissolüsyonunu belirgin şekilde iyileştirerek, önemli bir rol oynamaktadır. Çözündürücü ajan olarak CD uygulamaları Tablo 5'te özetlenmiştir(Brewster & Loftsson, 2007).

Tablo 5 : CD'ler ve formülasyonlarında çözündürücü ajan olarak yer aldıkları ilaçlar

CD	İlaç
α- CD	Praziquantel
β-CD	Nimesulid, Sulfometiyazol, Lorezepam, Etodolak,Ibuprofen
γ – CD	Praziquantel, Omeprazol, Digoksin
HP-β-CD	Albendazol, Zolpidem, Rutin, Griseofulvin, Itrakonazol
DM-β-CD	Naproksen, Kampotesin
SBE-β-CD	Danazol
RM- β-CD	Takrolimus

1.5.3. CD'lerin İlaç Biyoyararlanımı Üzerindeki Etkisi

CD'ler, ilaç dissolüsyonunu iyileştirerek ve / veya ilaç geçirgenliğini artırarak çözünmeyen ilaçların biyoyararlanımını artırır. CD'ler, hidrofobik ve suda çözünürlüğü düşük olan ilaçları deri, mukoza veya kornea gibi biyolojik bariyerlerin yüzeyinde, bu bariyerleri oluşturan lipid tabakalarının koruyucu özelliklerini bozmadan, çözünür hale getirerek geçirgenliklerini artırır. Suda çözünür ilaçlar söz konusu olduğunda, CD'ler mukozal membranlar üzerine doğrudan etki yaparak ilaç geçirgenliğini artırır ve ilaç emilimini ve / veya biyoyararlanımı iyileştirir.(Thorsteinn Loftsson vd., 2019)

1.5.4. CD'lerin İlaç Stabilitesine Etkisi

CD'ler, bazı kararsız ilaçların dehidrasyon, hidroliz, oksidasyona karşı stabilitesini artırabilir ve böylece ilaçların raf ömrünü uzatabilir. CD ile indüklenen ilaç stabilitesinin artırılmasının, absorpsiyon bölgesinde ilaçlarla etkileşimin inhibe edilmesinin ve / veya ilaç biyolojik dönüşümünün inhibe edilmesinin bir sonucu olabileceği bildirilmiştir. Bir moleküler kalkan temin ederek, CD kompleksi kararsız ilaç moleküllerini moleküler seviyede enkapsüle eder ve böylece onları çeşitli bozulma işlemlerine karşı yalıtır (Giordano, Novak, & Moyano, 2001; T Loftsson vd., 2004).

1.6. Mukusa Penetre Olabilen Formülasyonlar

İlaç veya gen taşıyan nano taşıyıcı sistemler mukozal dokulara lokal ve uzatılmış ilaç salımı potansiyeline sahiptir. Fakat partiküler ilaç taşıyıcı sistemler, mukus katmanlarında sterik engeller ile karşılaşır veya yapışma işlemleri ile yakalanır ve daha sonra anatomik bölgeye bağlı olarak saniyeler ile birkaç saat arasında olan mukus yenilenme süreci ile mukozadan uzaklaştırılır. Nano ilaç taşıyıcı sistemlerin mukozal uygulamadaki potansiyelleri mukusun bu bariyer görevi nedeniyle sınırlıdır. Mukozal yüzeylere uzun süreli veya hedeflenmiş ilaç salımı için, nano taşıyıcıların, mukus jel katmanına hızla penetre olması gerekir. Bu nedenle, en kısa sürede mukus jel katmanını aşarak ve epitele / absorpsiyon membranına ulaşan partikül taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi son yıllarda ortak ilgi alanıdır.

Mukusun bariyer mekanizması; yapısal özelliklerine, elektrostatik özelliklerine ve sürekli salgılanarak yenileniyor olmasına dayanır (Liu vd., 2015; Netsomboon & Bernkop-Schnürch, 2016).

Mukusun bariyer özellikleri 3 ana başlık altında incelenebilir.

Mukusun Yapısal Özellikleri

Mukus, çeşitli büyüklüklerdeki porlar ve kanallardan oluşan bir yapıya sahiptir. Bu nedenle formülasyonun damlacık büyüklüğü mukusa penetrasyonda önemli bir parametredir. Partikül büyüklüklerine göre, nanosistemler mukus içindeki değişik çaplara sahip por ve kanallara girerek hareket edebilirler. Mikron üstü boyutlardaki partiküller ise kanallardan geçemeyecek kadar büyük oldukları için mukusun üst katmanlarına yapışarak orada kalma eğilimindedirler. Bunun sonucunda taşıdıkları ilaç moleküllerini epitelyal tabakaya ulaştıramazlar (das Neves, Amiji, & Sarmiento, 2011).

Mukusun Elektrostatik Özellikleri

Mukus ve formülasyon arasındaki ilişki elektrostatik açıdan da önemlidir. Mukus içeriğindeki siyalik asit ve sülfonik asit yapıları sebebiyle negatif yüklüdür. Pozitif yüklü partiküller mukus ile elektrostatik etkileşimler kurarak mukusun üst tabakalarına tutunurlar ve alt tabakalara penetre olamazlar. Virüslerin mukus içinde serum fizyolojikte olduğu kadar hızlı difüze olduğu görülmüş ve bu yetenekleri yüzeylerinin elektriksel özellikleri ile ilişkilendirilmiştir. Virüsler yüzeylerinde aynı büyüklükteki pozitif ve negatif yükleri taşırlar ve fizyolojik pH da nötr veya çok düşük negatif yüklüdürler. Yüksek ve eşit miktarda pozitif ve negatif yük içeren hidrofil yüzeyli – virüs yüzey özelliklerini taklit eden - partiküllerin mukusa elektrostatik etkileşimlerden etkilenmeden penetre olabileceği belirtilmiştir. Buradan hareketle anyonik ve katyonik polimerlerin kombinasyonu ile hazırlanan polielektrolit kompleksler ile mukoza içinde kolayca hareket edebilen ‘kaygan’ nanopartiküler sistemler formüle edilmesi mümkündür (Dünnhaupt vd., 2015; Lai vd., 2009).

Mukusun Yenilenmesi

Epitele ulaşabilmek için partiküllerin karşılaştığı bir diğer engel de mukozal yüzeylerdeki mukusun yenilenmesidir. Epitelyal bölgeye ve mukusun toplam

kalınlığına göre farklılık göstermekle beraber mukus sürekli yenilenen bir hidrojel yapısıdır. Mukus içinde penetre olma kabiliyeti az olan partiküller mukusun yenilenmesi sebebiyle kolayca ortamdan uzaklaştırılır (Netsomboon & Bernkop-Schnürch, 2016).

Mukusun, hidrofilik yapısı sebebiyle suda çözünürlüğü az olan BCS Sınıf II ve Sınıf IV ilaç moleküllerine karşı bir bariyer gibi davranarak epitele ulaşmalarını olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Çoğu BCS Sınıf II olan antifungal ilaç moleküllerinin bu yolla mukusu geçerek epitele ulaşabilmesi halinde vajinal enfeksiyonların da dahil olduğu pek çok mukozal hastalığın daha etkin tedavi edilebileceği düşünülmektedir (Lai vd., 2009; Yang vd., 2014).

Mukusa penetre olabilen formülasyonlar kolayca mukus tabakasını aşarak epitele ulaşabilirler. Bu sistemlerin tasarlanmasında kullanılan ana fikir ve çözülmesi gereken esas problem; partiküller ile mukus arasındaki etkileşimleri minimuma indirmektir (Dünnhaupt vd., 2015; Netsomboon & Bernkop-Schnürch, 2016).

Partiküller ve mukus arasındaki etkileşimi azaltmak için kullanılan yöntemler 'aktif yöntemler' ve 'pasif yöntemler' olmak üzere 2 ana gruba ayrılabilir. Aktif yöntemlerde amaç N-asetil sistein, papain, bromelain gibi mukolitik maddeler kullanılarak mukus bariyerinin zayıflatılması ve aşılmasıdır. Pasif yöntemlerde ise amaç; mukus ile etkileşimini en aza indirmek için partikülün ideal yüzey özelliklerine sahip olmasını sağlamaktır. Mukusa penetre olabilen formülasyonlarında kullanılan pasif yöntemlerden bir diğeri net yükü sıfır veya sıfıra yakın hidrofil yüzeyli partiküller hazırlanmasıdır. Anyonik ve katyonik polimerler beraber kullanılarak sonuçta mukoza içinde kolayca hareket edebilen elektriksel yükü sıfır nanopartiküller sistemler elde edilmiştir. Son yıllarda ağırlık kazanan çalışmalarda SNEDDS'in mukozal ilaç taşıyıcı sistemler geliştirmek için yüksek potansiyele sahip bir ilaç taşıyıcı sistem olduğu kabul edilmektedir (Leichner, Menzel, Laffleur, & Bernkop-Schnürch, 2017).

1.7. SEDDS (Kendiliğinden Emülsifiye Olabilen İlaç Taşıyıcı Sistemler)

Kendiliğinden emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemler (SEDDS) yağ, sürfaktan, yardımcı çözücü / yardımcı sürfaktan ve ilaç bileşenlerinden oluşan, su ile düşük hızda karıştırıldıklarında yağ/su mikroemülsiyonu oluşturabilen izotropik ve termodinamik açıdan dayanıklı sistemlerdir. *In vivo* ortamda ise gastrointestinal sıvılar gibi sulu ortamlarda seyreltilmeleri sonucunda, mikroemülsiyon damlacıkları oluşmaktadır (Chatterjee, Hamed Almurisi, Ahmed Mahdi Dukhan, Mandal, & Sengupta, 2016). Kendiliğinden emülsifikasyon dışarıdan enerji desteği olmadan, birbiri ile karışmayan iki sıvının temas halinde emülsiyon oluşturması esasına dayanan süreçtir. 20-200 nm arasında boyutlara sahip damlacıklara sahip sistemler ise kendiliğinden emülsifiye olabilen nano ilaç taşıyıcı sistemler (SNEDDS) olarak adlandırılır.

SNEDDS'ler, her türlü düşük çözünürlükteki etken madde için avantaj sağlayan, nispeten hazırlaması basit bir ilaç taşıyıcı sistem tasarlama fırsatı sunar. SNEDDS'lerde çözündürülen ilaçlar, oluşan nanoemülsiyonların büyük yüzey alanı nedeniyle yüksek çözünme hızına sahiptir (Dünnhaupt vd., 2015).

SNEDDS mukusa penetre olabilen ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmesinde önemli avantajları vardır. SNEDDS nanodamlacıklarının hidrofobik yüzey özellikleri ve mukus tabakası ile etkileşimlerinin şekil deformasyonu kabiliyetleri nedeniyle nispeten düşük olması ve sebebiyle, daha küçük ağ gözeneklerine sahip mukus jel tabakalarından bile difüze olabilirler.

Lipozomlar ve katı lipit nanopartiküller gibi diğer nanokariyer sistemlerine kıyasla SNEDDS, mukusun daha derin tabakalarına nüfuz etme eğilimindedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, SNEDDS'in mukus permeasyon özellikleri, formülasyonlarına fonksiyonel maddeler eklenmesiyle daha da geliştirilmiştir (Dünnhaupt vd., 2015; Leichner vd., 2017; Rohrer vd., 2016).

SNEDDS formülasyonları tasarlanırken mukusa penetrasyon özelliklerini geliştirmek için farklı yaklaşımlar izlenebilir. Bunlardan biri yapısında polietilenglikol (PEG) altyapıları taşıyan ekspiyanlar kullanmaktır. Çok az istisna dışında, kendi kendine emülsifiye edici özellikleri için gerekli olan

sümfaktanlar PEG-lenmiş yüzey özellikleri taşırlar. PEG alt yapıları, yağlı damlacıkların yüzeyinde bir muko-inert kaplama ve sonuç olarak yüksek mukus geçirgenliği özellikleri sağlar. (Grießinger vd., 2015; S. Zaichik, Steinbring, Caliskan, & Bernkop-Schnürch, 2019).

Mukus içine penetre olabilen SNEDDS formülasyonları geliştirilmesinde, kritik bir diğer husus, damlacıkların yüzey yüküdür. Mukusun kendisi, özellikle siyalik ve sülfonik asit olmak üzere anyonik alt-yapılar nedeniyle net bir negatif yüke sahiptir. Pozitif yükü olan damlacıklar, iyonik etkileşimlerden dolayı mukus içerisinde tutulur. Buna karşılık, nötral ve negatif yüklü damlacıklar mukus tabakası boyunca hareket edebilir. Epitele ulaşan negatif yüklü damlacıkların temel sorunu, hücre zarı veya endositoz ile füzyonun ilk basamağını temsil eden epitel hücreleri ile zayıf etkileşimleridir. Hücre yüzeyi, heparan sülfat alt yapıları nedeniyle negatif bir yüke sahip olduğundan, damlacıkların pozitif bir yükü şimdi avantajlı olacaktır. Bu doğrultuda, mukoza içindeki iyonik etkileşimlerden kaçmak için negatif yüklü ve emme absorpsiyon membranına ulaştıktan sonra pozitif yüklü hale gelen zeta potansiyel değıştirebilen SNEDDS formülasyonları etkin formülasyonlar olabilir (Dünnhaupt vd., 2015; Suchaoın vd., 2016).

SNEDDS'in mukus penetrasyon özellikleri mukolitik ajanlar kullanılarak da arttırılabilir. Mukolitik ajanlarla yüklenmiş SNEDDS formülasyonlarının kullanımı mukus ağının disülfid bağlarını kopmasının sonucu olarak mukus viskozitesinde azalma ve mukus jel tabakası boyunca arttırılmış bir geçirgenlik ile sonuçlanır (Rohrer vd., 2016).

Gereç ve Yöntem

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Eudragit RS 100	Evonik, Darmstadt, Almanya
POS	Abdi İbrahim İlaç, Türkiye
Tiyoüre	Sigma – Aldrich, Avusturya
Hidrojen Peroksit	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya
L-sistein hidroklorit	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya
(5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit))	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya
N-hidrosisuksinimit (NHS)	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya
N-asetilsistein	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya
Sodyum Hidroksit	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya
Hidroklorik Asit	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya
Etanol	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya
DMSO	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya
Miglyol 840	Gattefosse, Fransa
Polietilen Glikol 400 (PEG 400)	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya
Kolliphor EL	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya
Acconon MC 8-2 EP/NF	Abitec, Ohio, A.B.D.
Capmul MCM	Gattefosse, Fransa
Kolliphor RH 40	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya
Capmul 908P	Gattefosse, Fransa
Capmul 907P	Gattefosse, Fransa
Propilen Glikol	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya
Tween 80	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya
Maisine 35-1	Gattefosse, Fransa
Labrafil M 1944	Gattefosse, Fransa
Labrasol	Gattefosse, Fransa
Labrafac PG	Gattefosse, Fransa
Captex 8000	Abitec, Ohio, A.B.D.
Captex 200	Abitec, Ohio, A.B.D.
Captex355 EP/NF	Abitec, Ohio, A.B.D.
Triacetin	Gattefosse, Fransa

Sodyum borohidrit	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya
Trizma Baz	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya
Tris - HCl	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya
Resazurin Sodyum	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya
Minimum Essential Medium (MEM)	Sigma – Aldrich, Steinheim, Almanya

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Varian Gemini 200, ¹H NMR spektroskopetresi	Varian, A.B.D.
Tecan Infinite, M200, spektrofotometre,	Tecan, Avusturya
Tecan Infinite, spektrofotometre	Tecan, Avusturya
Christ Gamma 1-16 LSC Freeze, liyofilizatör	Christ, A.B.D.
Eppendorf Thermomixer Comfort, Isıtıcı karıştırıcı	Eppendorf, Almanya
Alfa FT-IR Spektrometresi	Bruker Billerica, A.B.D.
Aspect CS ContrAA 700, sürekli kaynaklı atomik absorpsiyon spektrometresi	Analytik Jena AG, Almanya
WASP 2, otomatik spiral ekim makinesi	800 EZ Micro, İngiltere
TA-XT Plus Software Kontrollü Penetrometre	Stable Micro System, İngiltere
Zetasizer Nano ZSP, Zetaölçer	Malvern, A.B.D.
Lumencor Spectra X floresan aydınlatma sistemi	Olympus, A.B.D.
sCMOS Hamamatsu dijital kamera C11440	ORCA-flash 4.0, Japonya
Countess™ otomasyonlu hücre sayacı	Invitrogen, Kore
0,45 µm por çaplı membran filtre	Millipore, A.B.D.
Greiner Flat siyah 96 kuyucuklu plaka	Greiner, Avusturya
Greiner Flat 12 kuyucuklu plaka	Greiner, Avusturya
Greiner Flat 24 kuyucuklu plaka	Greiner, Avusturya
24-kuyucuklu plaka için ThinCert hücre kültürü insertü	Greiner, Avusturya
Diyaliz Kiti, 0.1-0.5 kD Molekül Ağırlığı, 31 mm genişlik	Biotech CE, A.B.D.
Eppendorf Minispin, Mini Santrifüj	Eppendorf, Almanya
Sigma 3-18KS, Soğutmalı Santrifüj	Sigma, Almanya
µ-Slide 8 oyuklu cam alt numune tutucu	Ibidi, Almanya
Float-a-lyser®, MWCO = 100 kDa diyaliz tüpü	Spectrum Labs, A.B.D.

2.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler

50 mM Laktat Tamponu (pH 4,5)

Laktik Asit	0,270 g
Na-Laktat	4,928 g
Distile su km	500 mL

0.5 M fosfat tamponu (Ellman tamponu) (pH 8)

KH_2PO_4	4,75 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	77,04 g
Distile su	km 500 mL

50 mM Tris tamponu (pH 7.6)

Tris HCl	0,788 g
Trizma Baz	0,606 g
Distile su	km 100 mL

2.2. Yöntem

2.2.1. Etkin Madde Karakterizasyonu, Miktar Tayini Yöntemi ve Analitik Yöntem Validasyonu

2.2.1.1. POS'un FT-IR Spektroskopisi

POS'un yapısal karakterizasyonu için FT-IR spektrumu tarandı. Ölçümler, Alfa FT-IR Spektrometresi cihazında 32 tarama ile 4000 cm^{-1} ila 400 cm^{-1} dalga boyu arasında gerçekleştirildi ve 4 cm^{-1} çözünürlük uygulandı. Tüm ölçümler 22° C'de kaydedildi.

2.2.1.2. Miktar Tayini Yöntemi

Formülasyonlarda kullanılan etkin madde POS'un floresans emisyon ve eksitasyon dalga boylarının karakterizasyonu ve miktar tayini yönteminin geliştirilmesi için ilk olarak Tecan Spark Multimod mikropilaka okuyucu (Tecan GmbH, İsviçre) kullanılarak floresans spektrum taraması yapıldı. Greiner Flat siyah 96 kuyucuklu plaka kullanılarak eksitasyon dalga boyları 230-300 nm, emisyon dalga boyları 330-410 nm arasında 3 boyutlu olarak tarandı.

Miktar tayini yönteminde kullanılacak kalibrasyon doğru denkleminin çizilmesi için POS'un DMSO içinde çözündürülmesi ile hazırlanan 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyondaki stok çözeltiden hareketle 0 $\mu\text{g/mL}$ – 125 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında örnekler hazırlandı ve floresans şiddeti değerleri Tecan Spark Multimod Mikropilaka Okuyucu kullanılarak okundu. DMSO'ya ait arkaplan floresans değerleri bulunan değerlerden çıkarılarak kalibrasyon doğrusu çizildi. POS'un kalibrasyon doğrusunun çizilmesi için kullanılan konsantrasyonlar Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6 : POS'un kalibrasyon doğrusunun çizilmesi için kullanılan konsantrasyonlar ($\mu\text{g/mL}$)

0	1,953	3,906	7,813	15,625	31,250	62,5	125
---	-------	-------	-------	--------	--------	------	-----

2.2.1.3. Analitik Yöntem Validasyonu

POS'un miktar tayini yöntemi için aşağıda verilen validasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Doğrusallık

Miktar tayini yönteminin doğrusallığını belirlemek için POS'un DMSO içindeki 1000 µg/mL konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle 0 µg/mL – 125 µg/mL konsantrasyon aralığında örnekler hazırlandı ve floresans şiddeti değerleri Tecan Spark Multimod cihazı kullanılarak okundu. Konsantrasyonlara karşılık gelen alan değerleri yardımıyla standart doğrunun denklemi bulundu. Determinasyon katsayısı ile doğrusallık değeri tayin edildi.

Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik

Miktar tayini yönteminin doğruluğunu belirlemek için stok POS çözeltisinden 5, 10 ve 25 µg/mL olacak şekilde 3 farklı konsantrasyonda 6'şar paralel örnek hazırlandı. Tecan Spark Multimod Mikroplaka Okuyucu ile kullanılarak hesaplanan eğri altı alan değerlerinden hareketle % geri elde değerleri aşağıdaki eşitlik yardımıyla bulundu.

Denklem 1 : % Geri elde edilebilirlik denklemi

$$\% \text{ Geri elde edilebilirlik} = C_{\text{Pratik}} / C_{\text{Teorik}} \times 100$$

C_{Pratik} : Etkin maddelerin standart doğru denkleminde elde edilen konsantrasyon değerleri

C_{Teorik} : 5, 10 ve 25 µg/mL

Keskinlik

Analitik yöntemin keskinliği için stok POS çözeltisinden hazırlanan 5, 10 ve 25 µg/mL lik örnekler, arka arkaya altı kez ölçülerek aritmetik ortalama, standart sapma (SS) hesaplandı.

Tekrar Edilebilirlik

Standart doğru denklemi oluşturmak için hazırlanan POS stok çözeltisinden seçilen konsantrasyondaki (25 µg/mL) örnek için eğri altı değeri 6 kez hesaplandı. Eğri altı alan değerine karşılık gelen konsantrasyonların ortalaması bulundu ve SS hesaplandı.

Tekrar Elde Edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirliğin hesaplanması için, aynı stoktan hareketle hazırlanan 6 adet aynı konsantrasyondaki (25 µg/mL) örneğin eğri altı alan değerleri hesaplandı, ortalama ve SS değerleri bulundu.

2.2.2. Etkin Maddenin Çözünürlük Çalışmaları

Antifungal etkin madde POS'un mukusa penetre olabilen SNEDDS formülasyonlarında kullanılacak lipid, surfaktan, ko-surfaktanlar, distile su ve laktat tamponundaki çözünürlüğünü belirlemek için 1 mL lipid, surfaktan, ko-surfaktan, distile su veya tampon çözelti içeren eppendorf tüpler içerisine fazla miktarda POS eklenerek mekanik karıştırıcıda 300 rpm devirde, oda sıcaklığında 24 saat karıştırıldı. Bu süre sonunda eppendorf tüpler 13400 rpm devirle santrifüjlenerek süpernatant ve çökelti (çözünmemiş POS) ayrıştırıldı. Süpernatantlar süzüldükten sonra DMSO içinde 1:100 oranında seyreltildi ve Tecan Spark Multimod kullanılarak floresans şiddetleri 360 nm emisyon ve 260 nm eksitasyon değerlerinde okundu. Etkin Madde Karakterizasyonu, Miktar Tayini Yöntemi bölümü'nde verilen kalibrasyon denklemi yardımıyla miktar tayini yapılarak POS'un çeşitli lipid, surfaktan, ko-surfaktan, laktat tamponu ve sudaki çözünürlüğü saptandı. (n=3)

2.2.3. Önceden Etkinleştirilmiş (Pre-activated) Mukoadezif Tiyomer Sentezi ve *in vitro* / *eks vivo* Karakterizasyonu

Önceden etkinleştirilmiş suksinil-beta-CD (Suc- β -CD-MNA) sentezi çok aşamalı bir reaksiyon izlenerek gerçekleştirildi. Reaksiyon basamakları aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

2.2.3.1. 6-merkaptonikotinamit (6-MNA) Sentezi ve Saflaştırılması

İlk aşamada, ticari olarak satışa sunulmayan ancak Suc- β -CD oligomeri üzerine konjuge edilecek ligandın sentezi için gerekli olan 6-merkaptonikotinamitin (6-MNA) sentezi gerçekleştirildi. 6-MNA, laboratuvar ortamında 6-kloronikotinamitten hareketle sentezlendi. İlk olarak 31.9 mmol 6-kloronikotinamit ve 38.36 mmol tiyoüre 70 mL etanol içinde süspande edildi ve azot gazı ortamında 6 saat karıştırıldı. Bu işlem sonunda süspansiyon renginin açık sarıya döndüğü gözlemlendi. Reaksiyon ürünü olan S-(5-karbamil-2-piridil)-tiyoüronyum klorür tuzu evaporatör kullanılarak kurutuldu. Elde edilen tuz 50 mL demineralize su içinde süspande edildi ve ortama 5 M NaOH eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika karıştırıldı. Asetik asit kullanarak ortam pH'sı 4.9'a ayarlandığında süspansiyonun tiyoüronyum tuzundan kaynaklanan açık sarı renginin, ortamda oluşan 6-MNA dan kaynaklanan koyu sarıya döndüğü gözlemlendi. Oluşan 6-MNA vakum filtrasyonu ile ortamdan ayrıştırıldı ve su ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakıldı (Lupo vd., 2017).

2.2.3.2. 6-merkaptonikotinamit Dimeri Olan 6,6'-ditiyonikotinamit'in (6,6'-DTNA) Sentezi ve Saflaştırılması

Kurutma işleminden sonra, 6-MNA'nın dimeri olan 6,6'-ditiyonikotinamit'in (6,6'-DTNA) sentezine başlandı. Bunun için 6-MNA, 100 mL su içinde süspande edildikten sonra ortama damla damla 3.5 mL (50% h/h) hidrojen peroksit eklendi ve 1M NaOH ilavesi ile 8.5'ta sabit tutuldu. 1 saat karıştırıldıktan sonra süspansiyon renginin koyu sarıdan beyaza döndüğü gözlemlendi. Oluşan 6,6'-DTNA vakum filtrasyonu ile izole edildikten sonra demineralize su ile yıkandı ve kurutuldu (Lupo vd., 2017).

2.2.3.3. Sistein-6-Merkaptonikotinamit Ligandı (Cys-6-MNA) Sentezi ve Saflaştırılması

Suc- β -CD oligomeri üzerine konjuge edilecek Sistein-6-merkaptonikotinamit (Cys -6-MNA) ligandının sentezinin son basamağında; 250 mg 6,6'-DTNA 10 mL DMSO içinde çözündürüldü. Dimerin tamamen çözünmesi beklendikten sonra başka bir eppendorf tüpte 2 mL DMSO içinde çözündürülen 114 mg L-sistein, dimer solüsyonuna damla damla eklendi. Karışım oda sıcaklığında ve 24 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak bekletildi. 24. saatin sonunda karışıma reaksiyona girmemiş dimerin çökmesi için 28 mL su eklenerek 6 saat daha oda sıcaklığında karıştırmaya devam edildi (Lupo vd., 2017).

6. saatin sonunda karışım süzüldü ve ligandı (Cys-6-MNA) içeren süzüntü ile reaksiyonun son aşamasına devam edildi. Bu aşamadan önce, ara basamaklarda sentezlenen ürünler ^1H NMR kullanılarak karakterize edildi.

2.2.3.4. Reaksiyon Ara Ürünlerinin Karakterizasyonu

NMR spektroskopisi

Reaksiyon ara ürünlerinin yapısal karakterizasyonu için, bölüm 2.2.3.1'te anlatıldığı gibi sentezlenen 6-MNA monomeri ve bölüm 2.2.3.2'de anlatıldığı gibi sentezlenen dimer 6,6'-DTNA ve bölüm 2.2.3.3'te anlatıldığı gibi sentezlenen aromatik ligand Cys-6-MNA ve L-sistein yapıları ^1H NMR spektroskopisi (^1H :199.98 MHz) kullanılarak analiz edildi.

Solvan çarpanının merkezi (DMSO - d_6), standard 2.49 ppm ile ilgili olan iç standart olarak (δ ppm'deki kimyasal kaymalar) kullanıldı.

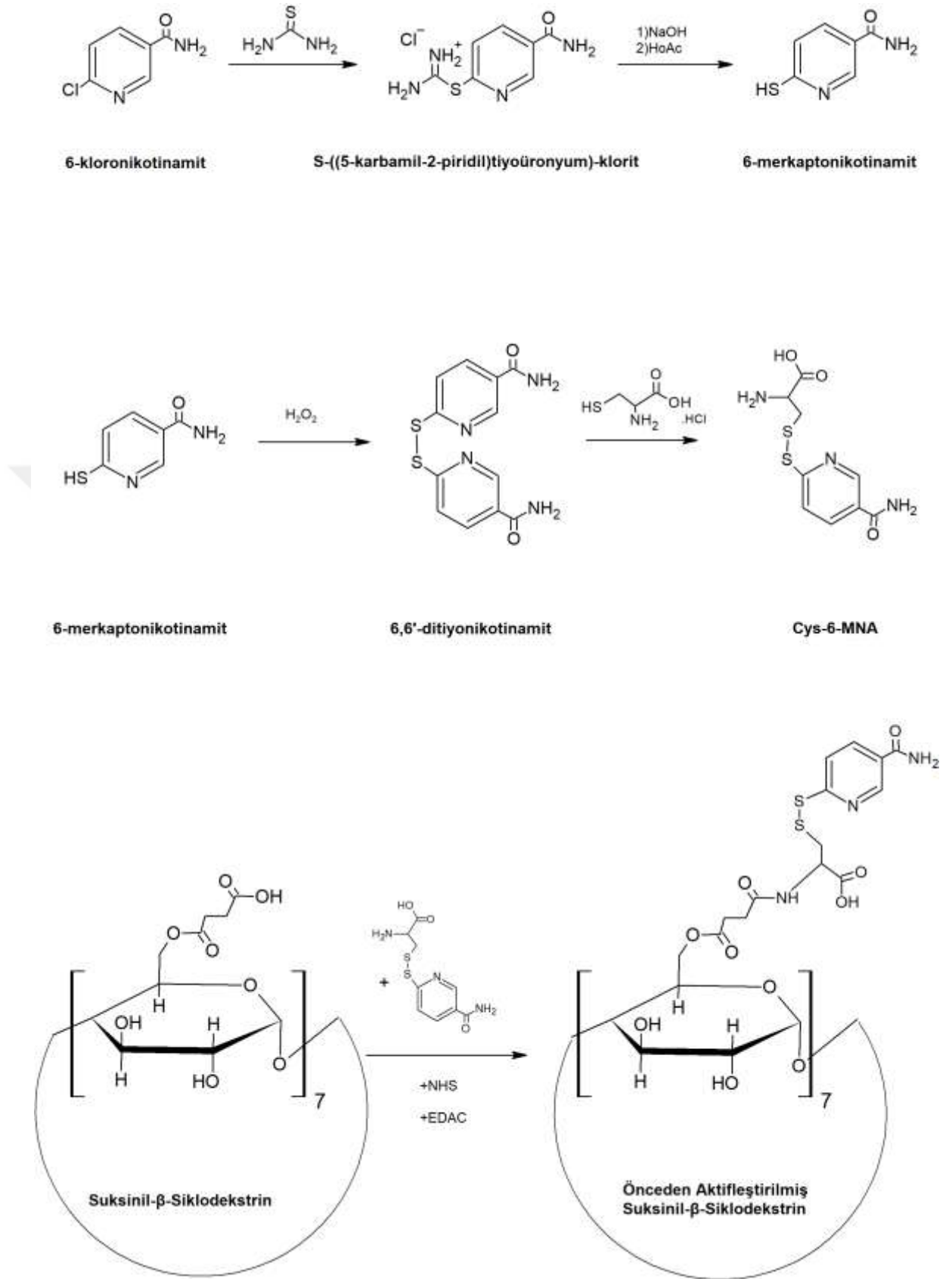
Spektrumu alınacak ligand Cys-6-MNA bölüm 2.2.3.3'te anlatılan yöntemin modifikasyonu ile sentezlendi. Bu amaçla Cys ve 6,6'-DTNA dimeri arasındaki reaksiyonun d_6 -DMSO içerisinde gerçekleştirildiği ve salınan monomer ile reaksiyona girmemiş dimerin D_2O ile çökeltildi. Daha sonra, çözelti süzüldü, çökelti atıldı ve süzüntüdeki D_2O kısmen buharlaştırıldı. Elde edilen çözelti, ^1H NMR spektroskopisi ile analiz edildi (Elbahwy vd., 2018).

2.2.3.5. Suc- β -CD-MNA'in Sentezi Ve Saflaştırılması

Mukoadezif son ürün Suc- β -CD-MNA, Suc- β -CD'nin karboksilik grubu ile aromatik ligand Cys-6-MNA'nın amino grubu arasında amit bağı oluşumu yoluyla sentezlendi. Suc- β -CD-MNA, daha önce yayınlanmış bir metodun modifikasyonu ile üretildi (Lupo vd., 2017)

Bunun için Suc- β -CD 32 mL demineralize su içinde çözöldü. Çözeltinin pH'ı, 5M NaOH ile 7'ye ayarlandı. Suc- β -CD molekülü üzerindeki karboksilik asit grupları, sırasıyla 150 mM EDAC ve 40mM NHS'nin eklenmesiyle aktive edildi. Manyetik karıştırıcıda 20 dakika karıştırıldıktan sonra pH'ı 7'ye ayarlanan ligand 2 farklı konsantrasyonda Cys-6-MNA çözeltisi Suc- β -CD çözeltisine damla damla eklendi. Karışım 6 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Konjugatları saflaştırmak için, reaksiyona girmemiş ligandı ortadan kaldırmak amacıyla 8 kez %4 (h/h) DMSO'ya karşı diyaliz tüplerinde (Biotech CE Dialysis Deneme Kiti, 0.1-0.5 kD MWCO, 31 mm Düz genişlik) diyaliz edildi. Diyaliz ortamı her 12 saatte bir değiştirildi. Son olarak, diyalize edilmiş ürün, - 80 °C'de donduruldu, ardından 0,005 mBar basınçta liyofilize edildi (Christ Gamma 1-16 LSC liyofilizatör) ve kullanılana kadar kuru koşullar altında saklandı.

Önceden etkinleştirilmiş tiyomer sentezinin reaksiyon basamakları Şekil 8'de verilmektedir.



Şekil 8 : Suc-β-CD-MNA sentez basamakları

2.2.3.6. Suc-β-CD-MNA'nın Karakterizasyonu

FT-IR Spektroskopisi

Suc-β-CD'nin ile Cys-6-MNA'nın farklı kovalent bağlanma dereceleriyle elde edilen reaksiyon ürünleri (Suc-β-CD-MNA₁ ve Suc-β-CD-MNA₂)'nin yapılarının doğrulanması için FT-IR spektroskopisi kullanıldı. Ölçümler, 32 tarama ile 4000 cm⁻¹ ila 400 cm⁻¹ dalga boyu arasında gerçekleştirildi ve 4 cm⁻¹ çözünürlük uygulandı. Tüm ölçümler 22° C'de kaydedildi.

Konjuge MNA miktarının bulunması (MNA Testi)

MNA testi sentezlenen mukoadezif polimer üzerine konjüge olmuş 6-MNA miktarını bulmak için kullanılan fotometrik bir testtir (Lupo vd., 2017). Önceden aktifleştirilmiş Suc-β-CD'ye konjüge edilmiş MNA miktarı, daha önce yayınlanmış bir metoda göre yapılan MNA testi ile hesaplandı (Lupo vd., 2017) Sentez sonucu elde edilen 0.5mg Suc-β-CD-MNA, 30 dk boyunca Ellman tamponunda (0.5 M fosfat tamponu). bekletildi Daha sonra, karışım, moleküle konjüge edilmiş 6-MNA'yı serbest bırakmak üzere, 500 µL taze hazırlanmış indirgenmiş glutatyon çözeltisi (% 0.2 a / h) ile oda sıcaklığında 120 dakika boyunca inkübe edildi. Serbest 6-MNA'nın absorbansı, Tecan Infinite M200 cihazında 307nm'de fotometrik olarak ölçüldü. 0.0203-0.648 µmol / mL konsantrasyon aralığında 6-MNA kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve hesaplamalarda kullanıldı.

Ellman Testi

Ellman testi fotometrik olarak alkali ortamdaki tiyol gruplarının miktar tayinini yapmaya yarayan bir testtir.Tiyol gruplarının ve disülfid bağlarının kantifikasyonu daha önce yayınlanmış bir metoda göre gerçekleştirildi (Hintzen, Hauptstein, Perera, & Bernkop-Schnürch, 2013). Serbest tiyol gruplarının belirlenmesi için, yaklaşık 0.5-1.0 mg ağırlığında örnek tartıldı. Tam tartılan örnek fosfat tamponu 0.5 M, pH 8.0 (500 µL) içinde oda sıcaklığında 30 dakika süreyle inkübe edildi. Ardından eppendorf tüp içindeki örneğe, 500 µL Ellman reaktifi eklendi. Karışım, 120 dakika boyunca ışıktan korunarak oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında karışım santrifüjlendi

ve süpernatant absorpsansı 405 nm dalga boyunda ölçüldü. L-sistein kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre tiyol gruplarının miktarı hesaplandı. Deney üç tekrar ile gerçekleştirildi (n = 3).

Disülfid bağları dahil toplam tiyol gruplarının miktarını belirlemek için, 0.5-1.0 mg konjugat 500 µL 50 mM Tris tamponu (pH 7.6) içinde 30 dakika ısıtıldı. Daha sonra, numuneye % 4 sodyum borohidrit çözeltisi (1 mL) ilave edildi ve 37 ° C'de 60 dakika süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, örneği içeren eppendorf tüpe 250 µL 5 M HCl ve 1 mL 1 M fosfat tamponu (pH 8.0) yavaş yavaş ilave edildi. Ellman reaktifi (100 µL) eklendi ve örnek, oda sıcaklığında 90 dakika daha inkübe edildi. Kalibrasyon eğrisi için L-Sistein kullanıldı. Karışımın absorpsansı 405 nm'de ölçüldü. Deney üç tekrar ile gerçekleştirildi (n = 3).

2.2.3.7. CD/POS Inklüzyon Komplekslerinin Hazırlanması

Suc-β-CD/POS, Suc-β-CD-MNA₁/POS ve Suc-β-CD-MNA₂/POS inklüzyon kompleksleri liyofilizasyon metodu kullanılarak 1:1 molar oran olacak şekilde ayrı ayrı hazırlandı (Peixiao Tang vd., 2016). Bu amaçla 14 mg POS 5 mL etanol içinde çözündürüldükten sonra bu çözelti, 10 mL distile su içinde çözündürülmüş hesaplı miktar Suc-β-CD veya Suc-β-CD-MNA içeren beherlere eklendi ve oda sıcaklığında 24 saat karıştırıldı. Sonrasında 0,45 µm por çaplı membran filtrelerden (Millipore, A.B.D.) süzüldü ve sonrasında liyofilize edildi (-80 °C, 0,005 mBar).

2.2.3.8. Hazırlanan Inklüzyon Komplekslerinin Yapısal Karakterizasyonu

Fourier Transform Infra Red FT-IR Spektroskopisi

Suc-β-CD, Suc-β-CD-MNA₁ ve Suc-β-CD-MNA₂'nin POS ile birlikte oluşturdukları ilgili inklüzyon komplekslerinin (Suc-β-CD/POS, Suc-β-CD-MNA₁/POS ve Suc-β-CD-MNA₂/POS) yapılarını doğrulamak için FT-IR spektrometresi kullanıldı. Ölçümler, 32 tarama ile 4000 cm⁻¹ ila 400 cm⁻¹ dalga boyu arasında gerçekleştirildi ve 4 cm⁻¹ çözünürlük uygulandı. Tüm ölçümler 22° C'de kaydedildi.

Yüksek çözünürlüklü sürekli kaynaklı moleküler absorpsiyon spektroskopisi (HR CS MAS)

Suc- β -CD Suc- β -CD-MNA₁ ve Suc- β -CD-MNA₂ 'nin her birinin POS ile oluşturduğu inklüzyon komplekslerindeki florür tespiti, literatürde yer alan bir yöntemi (Würtenberger & Gust, 2014) takiben , ilgili yazılımı Aspect CS ile birlikte bir ContrAA 700 yüksek çözünürlüklü sürekli kaynaklı atomik absorpsiyon spektrometresi (Analytik Jena AG) kullanılarak yapıldı. Örnekler DMSO içinde çözündürüldü ve tantalyum folyo ile kaplı standart bir grafit tüpte (Analytik Jena AG) doğrudan enjeksiyondan önce% 0,1 (ağırlık / hacim) Triton X-100 içeren sulu bir çözelti ile uygun şekilde seyreltildi. Tüm ölçümler 22 ° C'de kaydedildi.

2.2.3.9. Dissolüsyon Testi

Etkin madde POS, Suc- β -CD/POS kompleksi ve Suc- β -CD-MNA/POS komplekslerinin dissolüsyon özellikleri daha önce yayınlanmış bir metoda göre yapılan dissolüsyon testi ile incelendi (Ijaz vd., 2017). Bu metoda göre, 14 mg POS ve ekimolar miktarlarda Suc- β -CD, Suc- β -CD-MNA₁ veya Suc- β -CD-MNA₂ 35 mL laktat tamponu (0,05 M, pH 4,5) içeren tüplere eklendi. Tüpler 50 rpm hızla 37 °C sıcaklıkta karıştırılırken belirlenmiş zaman aralıklarında tüplerden 0,5 mL örnekler alındı. Alınan örneklerin yerine tüplere aynı hacimde laktat tamponu eklendi. Örnekler 0.45 μ m por çaplı membran filtreden geçirildikten sonra uygun oranda seyreltilerek içerdikleri POS miktarı floresans spektrometre kullanılarak hesaplandı.

2.2.3.10. Inklüzyon Komplekslerinin Mukoadezif Özelliklerinin Yarım

Tüp Metodu Kullanılarak İncelenmesi

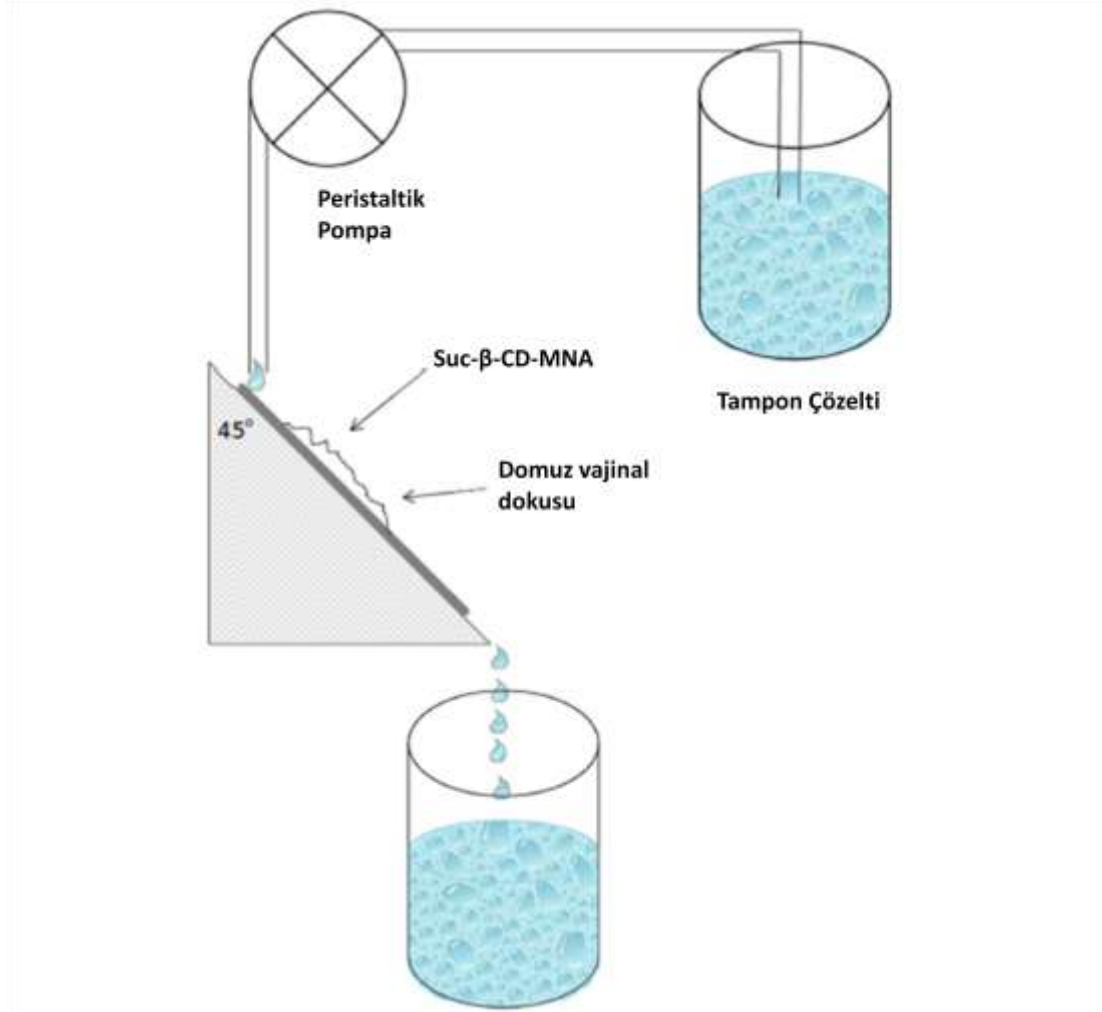
Suc- β -CD/POS, Suc- β -CD-MNA₁/POS ve Suc- β -CD-MNA₂/POS inklüzyon komplekslerinin *in vitro* mukoadezif özelliklerini değerlendirmek için daha önce yayınlanmış bir çalışmadaki deneysel düzenek kullanılmıştır. Bunun için, yerel bir mezbahadan taze olarak temin edilen ve buz üzerinde laboratuara getirilen domuz vajinal dokusu kullanıldı. Vajinal mukoza çevre dokulardan ayrıldı, serum fizyolojik çözeltisi ile yıkandı, uzunlamasına açıldı, uygun boyutta (yaklaşık 2x3 cm) parçalar halinde kesildi.

Suc- β -CD ve Suc- β -CD-MNA türevlerinin vajinal dokuda kalma süresinin değerlendirilmesi için 3 x 2 cm büyüklüğündeki mukozal dokular yarıya kesilmiş ve 45 ° açı ile sabitlenmiş 50 mL falkon tüplere monte edildi.

Daha sonra bu düzenek % 100 bağıl nem ve 37 °C'ye ayarlanmış bir inkübasyon makinesine yerleştirildi. Tüpler üzerindeki mukozal yüzeyler, deneyden önce peristaltik pompa ile 5 dakika boyunca sürekli olarak 0.05 M laktat tamponu (pH 4.5) ile yıkandı. Bunun hemen ardından 30 mg Suc- β -CD/POS ve Suc- β -CD-MNA/POS kompleksleri tüplerdeki vajinal mukoza örneklerinin üzerine yerleştirildi.

Adezyon için 10 dakika beklendikten sonra, peristaltik pompanın sabit akış hızı, 0,1 mL / dk'ya ayarlandı ve vajinal mukoza örneklerinden aşağı akan laktat tamponu önceden belirlenmiş zaman noktalarında toplandı.

Suc- β -CD-MNA türevlerinin mukoadesyon özelliklerinin modifiye edilmemiş Suc- β -CD'ye göre ne kadar iyileştiğinin oranı, test sonunda mukoza üzerinde kaldığı hesaplanan inklüzyon kompleksi oranlarının birbirlerine bölünmesi ile elde edildi.



Şekil 9: Suc-β-CD-MNA türevlerinin mukoadezif özelliklerini incelemek için kurulan deney düzeneği

Her örnekten alınan 100 µL, mikropilaka okuyucusuna (Tecan Spark Multimod) aktarıldı ve floresan yoğunluğu, 360 nm'lik emisyon ve 260 nm'lik eksitasyon dalga boyunda ölçüldü. Tüm ölçümler üç tekrar olarak gerçekleştirildi (n=3).

Son olarak, 30 mg ilgili örneğin toplanan tamponun aynı hacmi içinde çözündürülmesiyle kontrol örnekleri (%100 kontrol) hazırlandı ve mukoza üzerinde kalan % POS bu örneklerle göre hesaplandı.

2.2.3.11. İnküzyon Komplekslerinin Mukoadezif Özelliklerinin TA-XT cihazı Kullanılarak İncelenmesi

Suc- β -CD-MNA türevlerinin mukoadezif özellikleri, 5 kg yük hücresi ile donatılmış Software Kontrollü Penetrometre (TA-XT Plus, Texture Analyser, Stable Micro System, İngiltere) kullanılarak tayin edildi. Yaklaşık 2 mm kalınlıkta kesilmiş vajinal mukoza örnekleri doku analizörü sondasının 10 mm çapındaki alt ucuna sabitlendi. Suc- β -CD, Suc- β -CD-MNA₁ ve Suc- β -CD-MNA₂, mukoza örnekleri üzerine yerleştirildi. Prob, vajina mukozasının yüzeyine 0.1 mm / s sabit hızla indirildi ve 10 dakika boyunca 0.05 N'lik bir temas kuvveti uygulandı. Temas yüzeyinde 10 dakika bekletildikten sonra, prob 0.1 mm / s sabit bir hızda yukarı doğru hareket ettirildi. Kuvvet-mesafe grafiğinden maksimum kopma kuvveti (F) elde edildi. Eğri altındaki alan (AUC), mukoadezyon (M) olarak kuvvet-mesafe grafiğinden hesaplandı. Testler 37°C'de gerçekleştirildi ve her ölçüm beş kez tekrarlandı (n=5) (Baus, Innerhofer, Rohrer, Lupo, & Bernkop-Schnürch, 2018; Tuncay Tanrıverdi, Hilmioğlu Polat, Yeşim Metin, Kandiloğlu, & Özer, 2016).

2.2.3.12. Sitotoksikite Çalışmaları

Suc- β -CD Suc- β -CD-MNA₁ ve Suc- β -CD-MNA₂'in model hücre hattı HeLa hücreleri üzerindeki konsantrasyona bağlı potansiyel sitotoksik etkilerini araştırmak için resazurin (Alamar mavisi) testi yapıldı.

HeLa hücreleri, Avrupa Onaylı Hücre Kültürleri Koleksiyonu (Wiltshire, İngiltere)'den temin edildi. Hücreler, 12 kuyucuklu plakalara (Greiner Bio-One, Almanya) 4×10^4 / kuyucuk konsantrasyonunda ekildi. Hücrelerin konsantrasyonu, Countess™ otomasyonlu hücre sayacı (Invitrogen, Kore) ile belirlendi. HeLa hücreleri 37 ° C'de % 10 (h / h) FBS ve penisilin / streptomisin (100 birim / 0.1 mg / L) içeren "Minimum Essential Eagle's Medium" (MEM) içinde 37 ° C'de% 95 nem altında% 5 CO₂ atmosferinde 7 gün boyunca inkübe edildi.

Suc-β-CD ve Suc-β-CD-MNA türevlerini içeren örnekler örneklerinin her biri, üçer farklı konsantrasyonda (0,1%, 1%, 5% a / h) MEM içerisinde ayrı ayrı çözündürüldü ve 1 mL hacimde kuyucuklara ilave edildi. Hücreler 3 saat 37 °C'de inkübe edildi. Fenol kırmızısı içermeyen MEM negatif kontrol olarak kullanılırken, pozitif kontrol için % 4 (a / h) Triton X 100 kullanıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, besiyerleri kuyucuklardan vakum yardımı ile temizlendi ve hücreler iki kez pH 7.4 PBS (500 µL) ile yıkandı. Her bir kuyucuğa 1 mL resazurin çözeltisi (MEM içinde 2.2 µM konsantrasyonda) ilave edildi ve HeLa hücreleri 3 saat daha inkübe edildi. Deney sonunda kuyucuklardan alınan 100 µL örnek, 96 kuyucuklu bir mikrotitrasyon plakasına aktarıldı ve indirgenmiş rezorufinin floresans yoğunluğu, spektrofotometre kullanılarak 540 nm eksitasyon ve 590 nm emisyon dalga boyunda arka plan değerleri çıkarılarak ölçüldü (Sergey Zaichik vd., 2018).

Canlılık yüzdesi, her numune için aşağıda verilen denkleme göre hesaplandı:

Denklem 2 : Hücre Canlılığı Oranı

$$\text{Hücre Canlılığı Oranı} = (\text{Floresans yoğunluğu}_{\text{işlem görmüş}} / \text{Floresans yoğunluğu}_{\text{kontrol}}) \times 100$$

2.2.3.13. *In Vitro* Antifungal Çalışmalar

Suc-β-CD/POS, Suc-β-CD-MNA₁/POS ve Suc-β-CD-MNA₂/POS inklüzyon komplekslerinin zamana bağlı antifungal aktivitesini araştırmak için bir zaman - öldürme deneyi (kill-time assay) yapıldı (Sergey Zaichik vd., 2018) Kısaca, önceden hazırlanmış *Candida albicans* ATCC 1533 inokulum süspansiyonları, sırasıyla; Suc-β-CD/POS, Suc-β-CD-MNA₁/POS ve Suc-β-CD-MNA₂/POS kompleksi ve birlikte serbest POS çözeltisi içeren önceden 37 ° C'ye ısıtılmış formülasyonlara eklendi. Kullanılan tüm örnekler için POS konsantrasyonu, 1 µg / mL olarak ayarlandı.

Son ekim konsantrasyonu, 1: 10000 seyreltme ile sağlandı. İnkübasyon süreleri 37 ° C'de 2, 6 ve 24 saat olarak belirlendi. Her bir zaman noktasında, test numuneleri otomatik spiral plater (WASP 2, Don Whitley, Shipley, İngiltere) kullanılarak Mueller-Hinton agar besiyeri içeren üç farklı petri kabına ekildi. Daha sonra, plakalar 37 ° C'de 48 saat süreyle inkübe edildi ve

bu süre sonunda CFU sayısı hesaplandı. Negatif kontrol olarak, inokulum süspansiyonu, antifungal ilaç POS olmadan steril su (1:10 h / h) içinde Mueller-Hinton agar besiyeri içeren plakalarda inkübe edildi.



2.2.4. Mukusa Penetre Olan Formülasyonların Hazırlanması ve *in vitro* / *eks vivo* Karakterizasyonu

2.2.4.1. SNEDDS Formülasyonlarının Hazırlanması

Mukusa penetre olabilen SNEDDS formülasyonlarının hazırlanması için; yapılan çözünürlük çalışması sonucunda etkin madde POS'un yüksek çözünürlük gösterdiği belirlenen yağ, surfaktan ve kosolvanlar arasından seçilen ekspiyanların çeşitli kombinasyonları kullanıldı.

Bileşenler,

Tablo 7'de belirtilen oranlarda 2 mL hacimdeki eppendorf tüplere toplam 1 mL (h / h) olacak şekilde ilave edildi ve bir ısıtıcılı karıştırıcı kullanılarak 40 °C ve 800 rpm'de karıştırılarak SNEDDS yağlı fazları hazırlandı.

Tablo 7 : Hazırlanan SNEDDS formülasyonları ve bileşen yüzdeleri

	Capmul MCM	Kolliphor RH40	Transcutol	Capmul 908p	Kolliphor EL	PEG 400	Capmul 907p	DMSO	Acconon MC 82 NF
F1	45	40	15						
F2	40	40	20						
F3	35	50	15						
F4	30	50	20						
F5	25	60	15						
F6	20	60	20						
F7		40	15	45					
F8		40	20	40					
F9		50	15	35					
F10		50	20	30					
F11		60	15	25					
F12		60	20	20					
F13	45	40				15			
F14	40	40				20			
F15	35	50				15			
F16	30	50				20			
F17	25	60				15			
F18	20	60				20			
F19	45				40	15			
F20	40				40	20			
F21	35				50	15			
F22	30				50	20			
F23	25				60	15			
F24	20				60	20			

Tablo 7 (devamı) : Hazırlanan SNEDDS formülasyonları ve bileşen yüzdeleri

	Capmul MCM	Kolliphor RH40	Transcutol	Capmul 908p	Kolliphor EL	PEG 400	Capmul 907p	DMSO	Acconon MC 82 NF
F25				45	40	15			
F26				40	40	20			
F27				35	50	15			
F28				30	50	20			
F29				25	60	15			
F30				20	60	20			
F31	45	40						15	
F32	40	40						20	
F33	35	50						15	
F34	30	50						20	
F35	25	60						15	
F36	20	60						20	
F37		15					50	15	20
F38		20					30	20	30
F39		25					30	25	20
F40		15					40	15	30
F41		20					40	20	20
F42		25					30	25	20
F43					10		30	15	45
F44					20		15	20	45
F45					10		20	25	45
F46					20		35	15	30
F47					10		40	20	30
F48					20		25	25	30

SNEDDS formülasyonları tüm çalışmalarda yağlı fazların 1+10'luk bir seyreltme oranında mekanik karıştırıcıda emülsifikasyonu ile hazırlandı. Tüm karakterizasyon çalışmaları ve sonraki tüm deneyler için SNEDDS bu seyreltme oranında kullanıldı.

2.2.4.2. Hazırlanan SNEDDS Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Damlacık boyutu, Zeta Potansiyel ve Polidispersite İndeksi Belirlenmesi

Bölüm 2.2.4.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan emülsiyonların ortalama damlacık büyüklükleri, polidispersite indeksleri ve zeta potansiyelleri, Zetasizer Nano ZSP (Malvern, ABD) cihazı ile 650 nm lazer dalga boyunda ve 10 V / cm E⁻ alan kuvvetinde foton korelasyon spektroskopisi ile belirlendi. Ortalama damlacık boyutu ve çoklu dağılıma indeksi ölçümleri yağlı fazın 1+10

oranında laktat tamponu içinde dağıtılmasıyla gerçekleştirilirken; zeta potansiyel ölçümleri yağlı fazın 1+10 oranında distile su içinde disperse edilmesiyle gerçekleştirildi.. Tüm ölçümler üç tekrar ile gerçekleştirildi (n = 3).

Ön denemelerden sonra seçilen formülasyonlara % 1 (a/h) POS yüklenerek elde edilen SNEDDS'lere ait damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri yağlı fazın 1+10 oranında distile su içinde disperse edilmesiyle gerçekleştirildi. Tüm ölçümler üç tekrar ile gerçekleştirildi (n = 3) (Köllner vd., 2017a; Zupančič, Griebinger, vd., 2016).

2.2.4.3. Log D Hesaplanması

Log D bir maddenin iki farklı fazdaki maksimum çözünürlüklerinin birbirine oranıdır. Log D temel olarak, bir bileşiğin iki fazdaki çözünürlüğündeki farkın bir ölçümü olduğundan, SNEDDS yağlı fazı ve salım ortamında ilaç veya ilaç kompleksinin çözünürlüğünün ayrı ayrı ölçülmesiyle belirlenebilir.

SNEDDS yağlı fazı ve salım ortamı (SO) arasındaki ilacın dağılım katsayısının ($\log D_{\text{SNEDDS} / \text{SO}}$) belirlenmesi için POS'un yağlı faz ve laktat tamponundaki çözünürlük değerleri Bölüm 2.2.2 Etkin madde çözünürlük çalışmaları'nda anlatıldığı gibi çalışılarak hesaplandı.

POS'a ait Log D değeri Denklem 3'te verilen eşitlik kullanılarak hesaplandı (Bernkop-Schnürch ve Jalil, 2018).

Denklem 3 : $\log D_{\text{SNEDDS} / \text{SO}}$

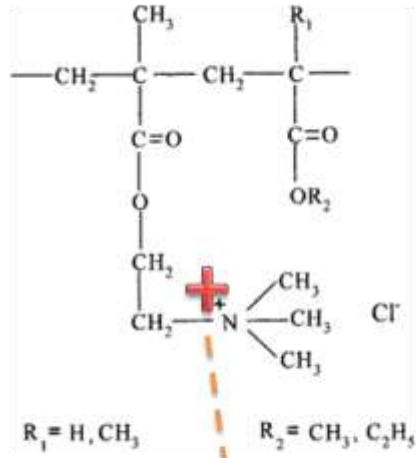
$\log D_{\text{SNEDDS} / \text{SO}} = \text{Yağlı fazdaki maksimum çözünürlük} / \text{Salım ortamındaki maksimum çözünürlük}$

2.2.4.4. EU-NAC Kompleksinin Hazırlanması

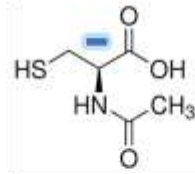
SNEDDS formülasyonlarından mukolitik ajan NAC'ın kontrollü salımını sağlamak için önce NAC ile katyonik polimer EU RS 100 arasındaki elektriksel etkileşimine dayanan bir iyonik kompleks hazırlandı.

EU-NAC kompleksi için 400 mg EU RS 100, 20 mL etanol içinde çözündürülürken başka bir tüpte 160 mg NAC 5 mL distile su içinde çözündürüldü. NAC çözeltisinin pH'sı 1M NaOH çözeltisinin damla damla ilave edilmesiyle 4'e ayarlandı. NAC çözeltisi daha sonra EU RS 100 çözeltisine damla damla ilave edildi ve karışım 300 rpm'de 24 saat karışmaya bırakıldı. Bu süre sonunda liyofilize edildi (-80 °C, 0,005 mBar) ve distile su ile 2 kez yıkandıktan sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kompleksin oluşumu Şekil 10'da şematik olarak sunulmuştur.

Eudragit RS 100



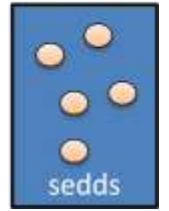
N-asetilsistein



Yağlı Faza
yükleme



Emülsifikasyon



Şekil 10 : Eudragit RS 100 – NAC Kompleksi içeren SNEDDS formülasyonlarının hazırlanması

2.2.4.5. EU-NAC Kompleksinin Karakterizasyonu

EU-NAC kompleksleşmesini doğrulamak için FT-IR spektrometresi (Alfa FT-IR Spektrometresi) kullanıldı. Ölçümler, 32 tarama ile 4000 cm^{-1} ila 400 cm^{-1} dalga boyu arasında gerçekleştirildi ve 4 cm^{-1} çözünürlük uygulandı. Tüm ölçümler 22° C'de kaydedildi.

Kompleksin içerdiği NAC miktarı, kompleksin etanol içinde dissosiasyonundan sonra bölüm 2.2.3.6'da anlatıldığı gibi Ellman Testi uygulanması ile hesaplandı ve ilgili çalışmalarda %100 kontrol olarak kullanıldı.

2.2.4.6. POS-EU-NAC-SNEDDS Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Etkin madde (POS) ve mukolitik kompleks (EU-NAC) yüklü SNEDDS hazırlanması için, boş SNEDDS formülasyonlarının karakterizasyon çalışmalarından sonra seçilen optimum formülasyon F45 kullanıldı. Etkin madde yüklü formülasyonlar için POS, 1 mL optimum formülasyon yağlı fazı içeren Eppendorf tüplerine 10 mg / mL konsantrasyonda ilave edildikten sonra homojenizasyon için 4 saat 800 rpm'de termomikserde karıştırıldı.

Mukolitik EU-NAC kompleksini içeren SNEDDS formülasyonunun hazırlanması için kompleks 1 mL optimum formülasyon yağlı fazı içeren Eppendorf tüplerine ilave edildikten sonra tüpler homojenizasyon için 15 dakika 800 rpm'de karıştırıldı.

POS-EU-NAC-SNEDDS ve deneylerde kullanılan diğer tüm SNEDDS formülasyonlarının içerdikleri maddeler ve miktarları Tablo 8'de verilmektedir.

Tablo 8 : F45'ten hareketle hazırlanan SNEDDS formülasyonlarının bileşenleri ve miktarları

	POS	EU	NAC	EU-NAC
SNEDDS (F45)	-	-	-	-
EU SNEDDS	-	60 mg	-	-
NAC SNEDDS	-	-	20 mg	-
EU-NAC SNEDDS	-	-	-	80 mg
POS SNEDDS	10 mg	-	-	-
POS-EU-NAC SNEDDS	10 mg	-	-	80 mg
POS-NAC-SNEDDS	10 mg		20 mg	-
POS-EU-SNEDDS	10 mg	60 mg	-	-

Tüm SNEDDS formülasyonları yağlı fazlardan hareketle, 1+10'luk bir seyreltme oranında distile su veya laktat tamponu ile mekanik karıştırıcıda emülsifikasyonu ile hazırlandı.

SNEDDS formülasyonlarının karakterizasyonu için kısa süreli stabilite testleri, uzun süreli stabilite testleri ve mikroskop görüntüleme çalışmaları gerçekleştirildi.

Kısa Süreli Stabilite Testleri

SNEDDS formülasyonlarının fiziksel özelliklerinde meydana gelen değişiklikleri anlamak için stabilite testleri yapıldı (Sergey Zaichik vd., 2018) Formülasyonlar laktat tamponunda 1:10 seyreltme oranında seyreltili ve 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde mukus yenilenme süresi olduğu kabul edilen 4 saat boyunca tutuldu. SNEDDS formülasyonunun ortalama damlacık büyüklüğü, çoklu dağılma indisi ve zeta potansiyeli, bölüm 2.2.4.2'de anlatıldığı gibi hazırlanmasından hemen ardından (sıfırıncı saat) ve bunu izleyen 1 saatlik aralıklarla ölçüldü. Tüm ölçümler üç tekrar ile gerçekleştirildi (n = 3).

Uzun Süreli Stabilite Testleri

SNEDDS yağlı fazlarından uzun süreli saklamadan sonra hazırlanan formülasyonlarının fiziksel özelliklerinde meydana gelebilecek değişiklikleri anlamak için stabilite testleri yapıldı 25 ± 2°C ve 65 ± 5% bağıl nemde tutulan yağlı fazlar başlangıçta ve hazırlandıktan 3 ay sonra laktat tamponunda 1:10 seyreltme oranında seyreltili ve 37 °C'ye ayarlanmış mukus yenilenme süresi olduğu SNEDDS formülasyonunun ortalama damlacık büyüklüğü, çoklu dağılma indisi ve zeta potansiyeli, bölüm 2.2.4.2'de anlatıldığı gibi ölçüldü. Tüm ölçümler üç tekrar ile gerçekleştirildi (n = 3).

Mikroskop Görüntüleme Çalışmaları

SNEDDS formülasyonlarının morfolojik özelliklerini görüntülemek amacı ile SNEDDS damlacıkları, 63 × / 1.2NA objektifli bir ters geniş alan mikroskobuna (Dmi8, Leica, Almanya) monte edilmiş bir sCMOS kamera

(Hamamatsu dijital kamera C11440, ORCA-flash 4.0, Japonya) kullanılarak, uygun filtreler ve ekli bir Lumencor Spectra X floresan aydınlatma sistemi (Olympus, ABD) ile görüntülendi.

SNEDDS formülasyonları görüntülenmeden önce laktat tamponu içinde 1:10000 oranında emülsifiye edildi ve daha sonra μ -Slide 8 oyuklu cam alt numune tutucu (Ibidi, Almanya) içerisinde mikroskopa yerleştirildi. Formülasyonlara ait görüntüler LASX yazılımı (Leica) ile elde edildi.

2.2.4.7. SNEDDS Formülasyonlardan POS Salım Çalışmaları

SNEDDS formülasyonlarından POS salım profilini tespit etmek için yapılan çalışmalar, salım ortamı olan pH 4.5 laktat tamponu içinde ısıtılmış ve dengeye ulaşmış bir diyaliz tüpü kullanılarak 37 °C'de gerçekleştirildi (Float-a-lyser®, MWCO = 100 kDa). Bu çalışmada kullanılacak POS stok çözeltisi, 10 mg / mL konsantrasyonda % 10 (h / h) DMSO/laktat tamponu karışımı kullanılarak hazırlandı. Diyaliz tüpleri, aynı konsantrasyonda POS içeren, 1 mL POS stok çözeltisi, 1 mL POS-SNEDDS emülsiyonu veya POS-EU-NAC-SNEDDS emülsiyonu ile dolduruldu. Burada kullanılan SNEDDS emülsiyonları 1 mL distile suda 0,1 mL yağlı fazın emülsifiye edilmesiyle hazırlandı.

Bütün örnekler bir mekanik karıştırıcı üzerinde 300 rpm'de karıştırılarak 37 °C'de 25 mL % 10 DMSO / laktat tampona karşı diyaliz edildi.

Önceden belirlenmiş zaman noktalarında (15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 ve 1440 dk.), 1mL'lik hacimdeki örnekler ortamdaki çekildi ve aynı miktardaki laktat tamponu ortama eklendi (Spósito vd., 2017). Bu örneklerdeki POS miktarı, bölüm 2.2.1'de anlatıldığı gibi Tecan Spark Multimod kullanılarak floresans yoğunluğu ölçümleri ile hesaplandı. Bütün ölçümler 3 paralel grup ile yapıldı. (n=3)

Salım çalışmalarının sonuçları, Bölüm 2.2.4.3'te anlatıldığı gibi hesaplanan log D değerlerinin Nernstsches Dağılım Denkleminde yerine konulması ile

elde edilen teorik olarak damlacıkların içinde kalması gereken POS miktarı değeri ile karşılaştırıldı (Andreas Bernkop-Schnürch & Jalil, 2018).

$$C_{SNEDDS} = \frac{100 \%}{1 + \frac{V_{so}}{V_{SNEDDS} \times D_{SNEDDS/so}}}$$

Denklem 4 : Nernstsches Dağılım Denklemi (CSNEDDS : SNEDDS içinde kalan ilaç konsantrasyonu, V_{so}: Salım ortamının hacmi, V_{SNEDDS}: SNEDDS hacmi, D_{SNEDDS/so} :İlacın SNEDDS ve salım ortamı için hesaplanan D değeri)

2.2.4.8. Mukus Toplanması ve Temizlenmesi İşlemleri

Deneylerde kullanılacak mukus örnekleri, yerel kesimevindeki (Natters, Innsbruck) hayvan kesim işleminin hemen ardından alınan domuz vajinalarından toplandı. Ayrıca domuz vajinasından toplanabilen mukus miktarının az olması ve yeterli miktarda mukus elde etmek için tedarik edilebilenden çok daha fazla sayıda domuz vajinasına ihtiyaç olması sebebiyle, vajinal mukus ile benzer yapısal özellikler gösteren ve daha fazla miktarda toplanabilen intestinal mukus da kullanıldı (Lupo vd., 2017). Organlar kesimevinden laboratuara buz üzerinde getirildi.

Kesimevinden alınan domuz vajinaları etrafındaki diğer dokulardan temizlenip serum fizyolojikle yıkandıktan sonra bisturi yardımıyla uzunlamasına açıldı ve mikroskop lamı ile mukus toplandı ve tüplere aktarıldı.

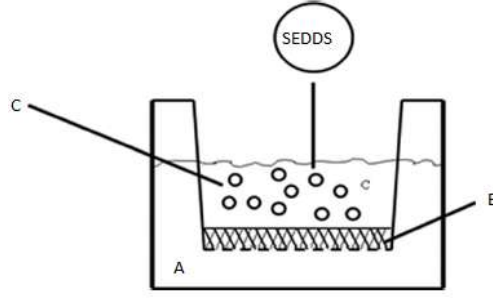
İntestinal mukus için ise domuz ince bağırsakları 10 – 15 cm uzunlukta parçalar halinde kesildi ve bir makas yardımıyla uzunlamasına açıldı. Kirlilik ve artıklar serum fizyolojikle yıkandıktan sonra mikroskop lamı kullanılarak bağırsak iç duvarındaki mukus toplandı.

Mukusun kan, organik artıklar, ve diğer istenmeyen parçacıklardan temizlenmesi için toplanan mukus bir behere aktarılıp tartıldıktan sonra, her 1 g mukus için 5 mL 0.1 M NaCl çözeltisi eklenerek 4 °C sıcaklıkta manyetik karıştırıcıda 1 saat boyunca mukus yapısını bozmamak için dakikada en fazla 40 rpm hızla karıştırıldı (Lupo vd., 2017). Bu süre sonunda mukus santrifüj tüplerine aktarıldı ve 9000 rpm devirde (10,400 G) 10 °C sıcaklıkta 2 saat boyunca santrifüje edildi. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant ve dibe çöken organik kalıntılardan ayrıştırılan mukus, 1 g mukus için 5 mL 0.1 M NaCl çözeltisi eklenerek 4 °C sıcaklıkta tekrar 1 saat karıştırıldı ve santrifüj işlemi tekrarlandı. Mukus, süpernatanttan ayrıştırıldıktan sonra tüplere alınarak kullanılacağı zamana kadar -20 °C sıcaklıkta tutuldu.

2.2.4.9. SNEDDS Formülasyonlarının Mukusa Permeasyonlarının İncelenmesi

SNEDDS formülasyonlarının mukusa permeasyon özelliklerini incelemek için yapılan deneylerde kullanılan mukus bölüm 2.2.4.8'de anlatıldığı şekilde toplandı ve işleminden geçirildi.

Transwell permeasyon testi için 24-kuyucuklu insertli plakalar (24-kuyucuklu plaka için ThinCert™ hücre kültürü inserti, transparan membran (Polietilen terfitalat), yüzey alanı: 33.6 mm², por çapı: 3.0 µm, Greiner-Bio One, Avusturya) 60 mg mukus ile dolduruldu. Formülasyon örnekleri verici kompartmana eklenmeden önce plakalar ısıtıcılı karıştırıcıda (Vibramax 100, Heidolph Instruments, Schwabach, Almanya) 37 °C sıcaklık ve 300 rpm hızla 15 dakika karıştırılarak mukusun homojen olması ve her kompartmanda eşit kalınlıkta bir tabaka oluşturması sağlandı. Sonrasında alıcı kompartmanlara önceden 37 °C'ye ısıtılmış 750 µL 50mM pH 4.5 laktat tamponu eklenirken verici kompartmanlara 250 µL POS yüklü SNEDDS (1+10 emülsiyon) eklendi (Menzel vd., 2018).



(I)

(II)

Şekil 11 : (I)ThinCert™ hücre kültürü inserti ile yapılan Transwell permeasyon testinin şematik anlatımı (A: alıcı kompartman, B: Yarı geçirgen membran üzerindeki mukus tabakası, C: Verici kompartman) (II) ThinCert™ hücre kültürü inserti

Plakalar, plaka kapakları ile kapatıldıktan sonra 37 °C sıcaklıkta 20 rpm hızla çalışan karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Belirlenen zaman aralıklarında alıcı kompartmanlardan 100 µL alındı ve yerine önceden 37°C'ye ısıtılmış 50 mM pH 4.5 laktat tamponu eklendi. Alıcı kompartmanına geçen POS miktarı florometrik deteksiyon ile (260 nm eksitasyon dalgaboyu ve 360 nm emisyon dalgaboyu) alıcı ve verici kompartmanlar arasına mukus eklenmeden elde edilen permeasyon değeri 100% referans kabul edilerek hesaplandı.

2.2.4.10. *In Vitro* Mukolitik Aktivite Deneyi

EU-NAC-SNEDDS formülasyonunun mukolitik aktivitesi, Andreas Bernkop Schnürch'ün araştırma grubu tarafından bir Haake Mars Thermo Electron plaka-plaka kombinasyon reometresi, kullanılarak geliştirilen teknik ile değerlendirildi (Rohrer vd., 2016). Salınım modülü kullanarak mukus - formülasyon karışımlarının doğrusal viskoelastik bölgesin belirlendikten sonra, kayma gerilme hızı, 37 ± 1 ° C sıcaklıkta ve 1 Hz frekans aralığında ve $0,1 \pm 2$ Pa aralığına ve iki plaka arası mesafe 0,5 mm'ye ayarlandı.

Reolojik çalışmada, NAC (%2 a/h) veya EU-NAC kompleksi (%8 a/h) içeren SNEDDS formülasyonları kullanıldı. Kontrol olarak NAC çözeltisi (%2 a/h), 50mM laktat pH 4.5 çözeltisi, etkin madde içermeyen (boş) SNEDDS veya sadece EU RS 100 (%6 a/h) içeren SNEDDS (EU SNEDDS) ile muamele edilmiş mukus kullanıldı. Numuneler, reolojik analiz yapılana kadar hava

geçirmez şekilde 37 ± 1 ° C'de saklandı. Her ölçüm, beş tekrar ile yapıldı. Mukus viskozitesinde meydana gelen değişiklikler % olarak hesaplandı.

2.2.4.11. Sitotoksosite Çalışmaları

SNEDDS formülasyonlarının model hücre hattı HeLa hücreleri üzerindeki konsantrasyona bağlı potansiyel sitotoksik etkilerini araştırmak için resazurin (Alamar mavisi) deneyi yapıldı.

HeLa hücreleri, Avrupa Onaylı Hücre Kültürleri Koleksiyonu ('ndan Wiltshire, İngiltere) temin edildi. Hücreler 12 kuyucuklu plakalara (Greiner Bio-One) 4×10^4 / kuyucuk konsantrasyonunda ekildi. Hücrelerin konsantrasyonu, Countess™ otomasyonlu hücre sayacı ile belirlendi. HeLa hücreleri 37 ° C'de % 10 (h/h) FBS ve penisilin / streptomisin (100 birim / 0.1 mg/L) içeren "Minimum Essential Eagle's Medium" (MEM) içinde 37 ° C'de % 95 nem altında % 5 CO₂ atmosferinde 7 gün boyunca inkübe edildi.

SNEDDS formülasyon örneklerinin her biri, üçer farklı konsantrasyonda (0,1 %, 1%, 10% h / h) MEM içerisinde ayrı ayrı emülsifiye edildi ve 1 mL hacimde kuyucuklara ilave edildi. Hücreler 3 saat 37 °C'de inkübe edildi. Fenol kırmızısı içermeyen MEM negatif kontrol olarak kullanılırken, pozitif kontrol için % 4 (a/h) Triton X100 kullanıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, besiyerleri kuyucuklardan vakum yardımı ile temizlendi ve hücreler iki kez PBS pH 7.4 (500 ul) ile yıkandı. Her bir kuyucuğa 1 mL resazurin çözeltisi (MEM içinde 2.2 µM konsantrasyonda) ilave edildi ve HeLa hücreleri 3 saat daha inkübe edildi. Deney sonunda kuyucuklardan alınan 100 µL örnek, 96 kuyucuklu bir mikrotitrasyon plakasına aktarıldı ve indirgenmiş rezorufinin floresans yoğunluğu, 540 nm eksitasyon ve 590 nm emisyon dalga boyunda arka plan değerleri çıkarılarak ölçüldü. Canlılık yüzdesi, her numune için Denklem 5'te verilen eşitliğe göre hesaplandı (Menzel vd., 2018):

Denklem 5 : Hücre Canlılığı Oranı

$$\text{Hücre Canlılığı Oranı} = (\text{Floresans yoğunluğu}_{\text{işlem görmüş}} / \text{Floresans yoğunluğu}_{\text{kontrol}}) \times 100$$

2.2.4.12. *In vitro* Antifungal Çalışmalar

POS içeren SNEDDS'nin zamana bağlı antifungal aktivitesini araştırmak için zaman- öldürme deneyi (time-kill assay) yapıldı. Bu amaçla önceden ayarlanmış *Candida albicans* ATCC 1533 inokulum süspansiyonları, sırasıyla; hiç bir etkin madde içermeyen (kontrol) SNEDDS, POS içeren SNEDDS, EU-NAC-SNEDDS ve hem POS hem EU-NAC-SNEDDS ve serbest POS çözeltisi içeren önceden 37 °C'ye ısıtılmış formülasyonlara eklendi. Kullanılan tüm örnekler için POS konsantrasyonu, 1 µg / mL olarak ayarlandı.

Son ekim konsantrasyonu, 1:10000 seyreltme ile sağlandı. İnkübasyon süreleri 37 ° C'de 2, 6 ve 24 saat olarak belirlendi. Her bir zaman noktasında, test numuneleri otomatik spiral plater (WASP 2, Don Whitley, Shipley, İngiltere) kullanılarak Mueller-Hinton agar besiyeri içeren üç farklı plakaya ekildi. Daha sonra, plakalar 37 °C'de 48 saat süreyle inkübe edildi ve bu süre sonunda CFU sayısı hesaplandı. Negatif kontrol olarak, inokulum süspansiyonu, antifungal ilaç POS olmadan steril su (1:10 h / h) içinde Mueller-Hinton agar besiyeri içeren plakalarda inkübe edildi (Sergey Zaichik vd., 2018).

2.2.5. SNEDDS formülasyonlarından NAC Salımının Belirlenmesi ve Yeni Salım Metodu Geliştirilmesi

2.2.5.1. Diyaliz Torbası Metoduyla NAC Salımının Belirlenmesi

SNEDDS formülasyonlarından NAC salım profilini tespit etmek için yapılan deney, 37° C'de salım ortamı olan 100 mM fosfat tamponunda (Ellman Tamponu, pH 8) bekletilmiş ve dengeye ulaşmış bir diyaliz tüpü kullanılarak gerçekleştirildi (Float-a-lyser®, MWCO = 100 kDa)

SNEDDS emülsiyonları, 1 mL distile suda 0,1 mL yağlı fazın emülsifiye edilmesiyle hazırlandı. Diyaliz tüpleri, 1 mL NAC çözeltisi, 1 mL NAC SNEDDS, 1 mL EU-NAC SNEDDS emülsiyonu ve 1 mL EU-NAC kompleksinin distile sudaki süspansiyonu ile dolduruldu. Örnekler, 300 rpm'de çalkalama cihazında karıştırılarak 37 °C'de 25 mL 100 mM fosfat tamponu pH 8'e karşı diyaliz edildi. Önceden belirlenmiş zaman noktalarında (15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 dk) 1 mL olacak şekilde örnekler ortamdan çekildi ve aynı miktarda tampon salım ortamına ilave edildi. Bu formülasyonlardan salınan NAC miktarı, 2.2.3.6'da anlatıldığı gibi Ellman Testi kullanarak saptandı.

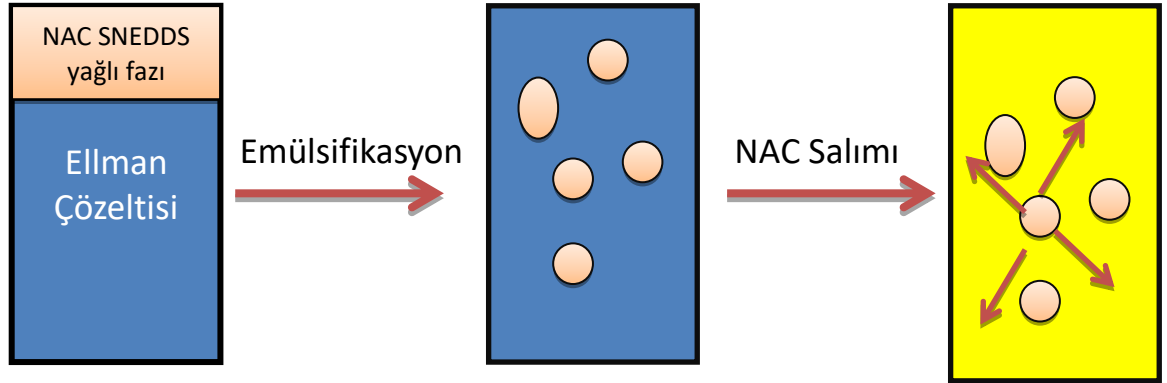
2.2.5.2. NAC Salımının Belirlenmesi İçin Yeni Salım Metodu Geliştirme Çalışmaları

SNEDDS formülasyonlarından NAC salım profilini belirleyecek yeni bir metot geliştirmek amacıyla Ellman Testi salım çalışmalarına uyarlandı.

Ellman çözeltisi hazırlamak için kullanılan 5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) reaktifi, alkali ortamda tiyol grubu içeren bileşiklerin varlığında kromojenik bir ürün olan 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit'e (TNB⁻²) dönüşür. Sarı renkli TNB⁻² bileşiğinin UV absorbansına dayanarak yapılacak miktar tayini ile ortamdaki tiyol grubu içeren bileşiğin miktarı bulunabilir.

Buradan hareketle herhangi bir diyaliz torbası veya ayırıcı membran kullanmadan, Ellman çözeltisi içinde emülsifiye edilen yağlı fazdan salınarak sulu faza geçen NAC miktarı, NAC'ın sulu fazda bulunan Ellman reaktifi ile

tepkimeye girerek oluşturduğu ara bileşiğin absorbandsının 405 nm'de okunmasıyla belirlendi.



Şekil 12 : Ellman Testi protokolüne dayanan yeni geliştirilen salım metodunun şematik anlatımı

Bunun için 15 mL hacimdeki Falcon tüpler içerisinde, 1 mL NAC veya EU-NAC Kompleksi içeren yağlı faz 10 mL 0,25 μ M konsantrasyonda DTNB içeren Ellman çözeltisine ilave edilerek mekanik karıştırıcıda emülsifiye edildi. Belirlenen zaman aralıklarında alınan örnekler 1:100 oranında seyreltilerek UV absorbandsları 405 nm'de Tecan M200 kullanılarak ölçüldü. Ölçülen absorbands değerlerinden Ellman çözeltisi içinde NAC içermeyen yağlı fazın emülsifiye edilmesi sonucu oluşan arka plan absorbands değerleri çıkarıldı. Bütün ölçümler 3 paralel grup ile yapıldı (n=3).

NAC salımının belirlenmesi amacıyla yeni geliştirilen metodun doğrulanması için Nernstsches dağılım yasası kullanıldı. SNEDDS içinde salınmadan kalan ilaç miktarını hesaplamaya olanak veren Nernstsches dağılım yasasının uygulanması için önce NAC'a ait $D_{SNEDDS/SO}$ değeri hesaplandı. Bunun için bilinen miktarda (20 mg) NAC SNEDDS yağlı fazı içinde çözündürüldükten sonra, 1 kısım yağlı faz 10 kısım salım ortamı içerisinde emülsifiye edildi. Salım ortamına geçen NAC miktarı ve buradan hareketle yağlı faz içinde kalan NAC miktarı Ellman testi kullanılarak hesaplandı.

Elde edilen $D_{SNEDDS/so}$ değeri Denklem 6'da verilen Nernstsches denkleminde yerine konularak yağlı faz içinde kalan NAC miktarı hesaplandı.

Denklem 6 : Nernstsches Dağılım Denklemi (C_{SNEDDS} : SNEDDS içinde kalan ilaç konsantrasyonu, V_{so} : Salım ortamının hacmi, V_{SNEDDS} : SNEDDS hacmi, $D_{SNEDDS/so}$: İlacın SNEDDS ve salım ortamı için hesaplanan D değeri)

$$C_{SNEDDS} = \frac{100 \%}{1 + \frac{V_{so}}{V_{SNEDDS} \times D_{SNEDDS/so}}}$$

2.2.6. İstatistik Analiz

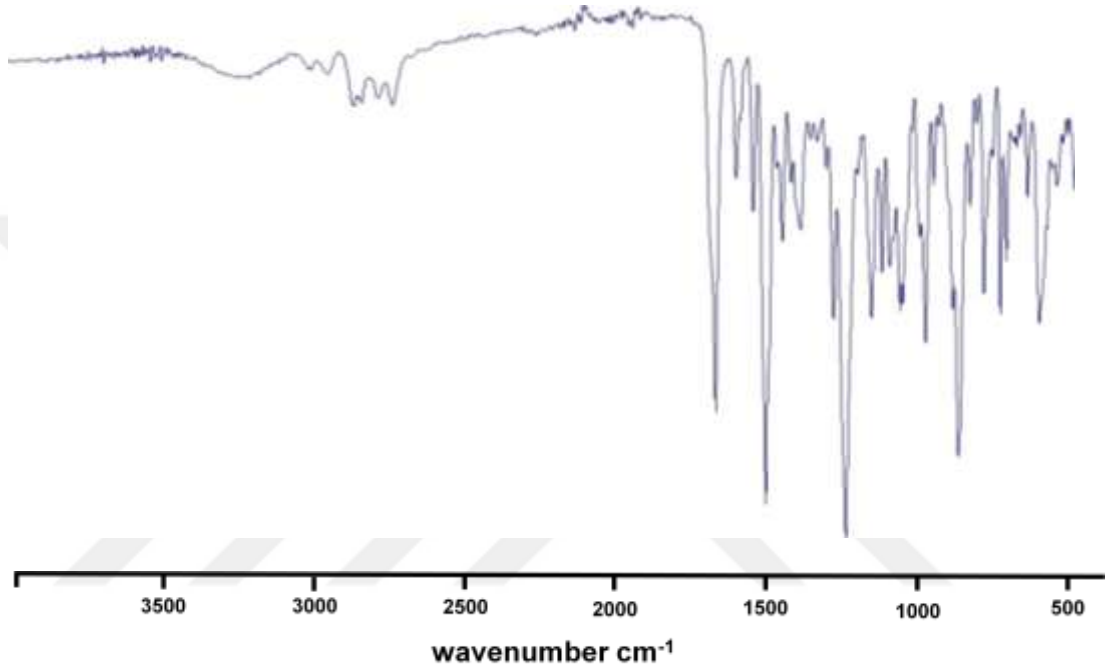
Elde edilen verilen istatistiksel analizi için GraphPad Prism 8.0 programı kullanıldı. Gruplar arası anlamlı farklılıklar değerlendirilirken $p < 0.05$ olarak kabul edildi. Çoklu gruplar arası analizlerde çift yönlü ANOVA testi, iki grubu karşılaştıran analizlerde bağımsız örneklem T testi kullanıldı.

Bulgular

3.1. Etkin Madde Karakterizasyonu, Miktar Tayini Yöntemi ve Analitik Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular

3.1.1. POS'un FT-IR Spektrumuna Ait Bulgular

Etkin madde POS'a ait FT-IR spektrumu Şekil 13'te verilmektedir.

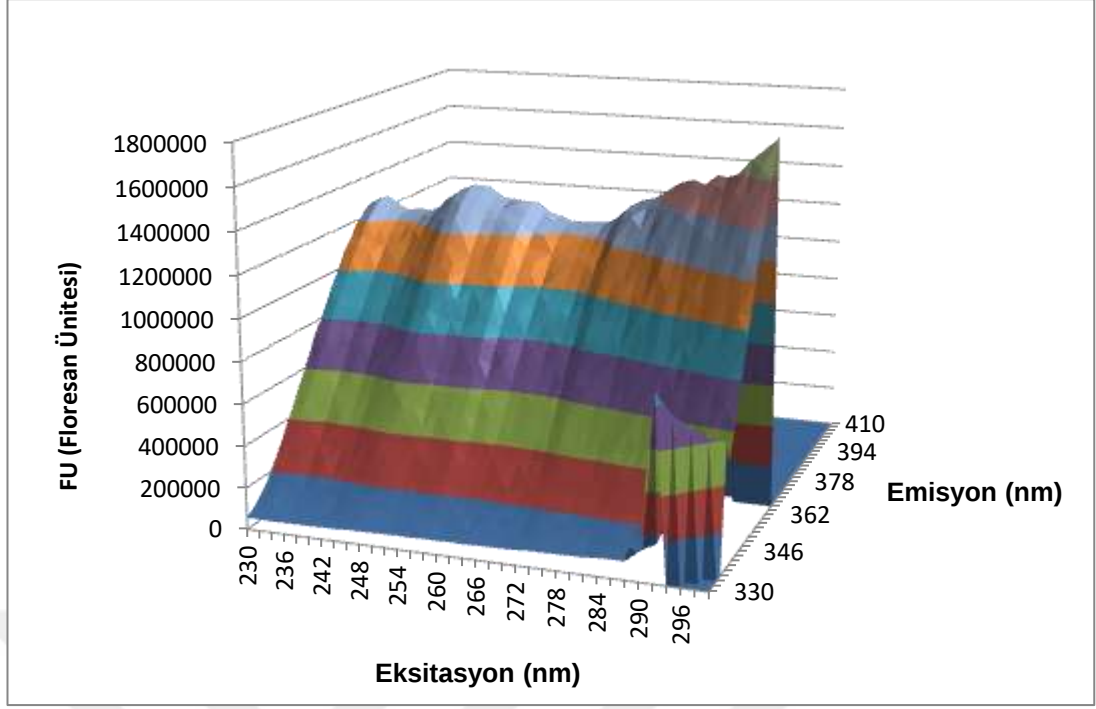


Şekil 13 : POS'un FT-IR spektrumu

3.1.2. Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular

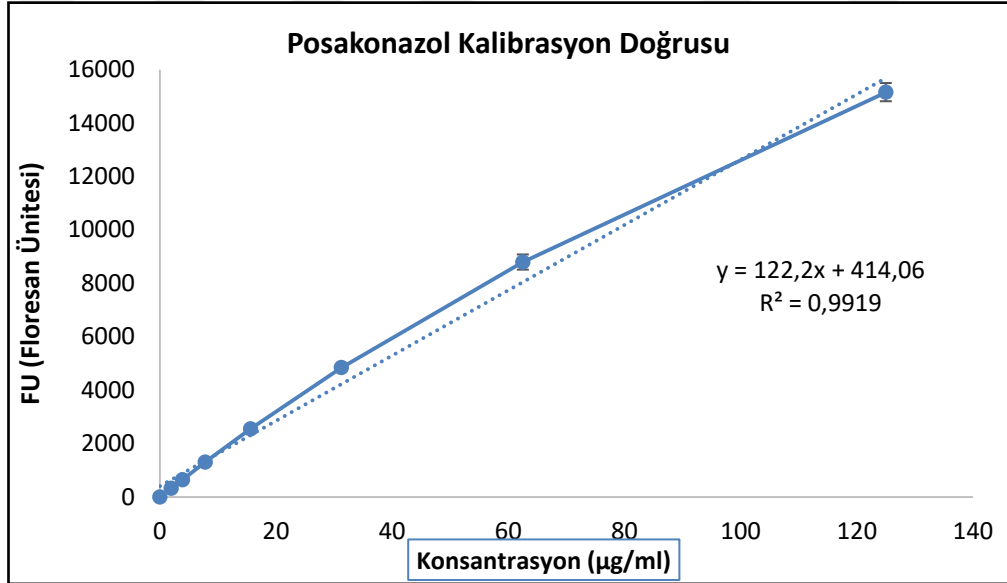
3.1.2.1. Miktar Tayini Yöntemine Ait Bulgular

Bölüm 2.2.1'de anlatıldığı gibi çalışılarak POS'un eksitasyon dalga boyunun 260 nm ve emisyon dalga boyunun 360 nm olduğu belirlendi. POS'un 3 boyutlu florasan spektrumu taraması Şekil 14'te verilmiştir.



Şekil 14 : POS'a ait 3 boyutlu floresan spektrumu taraması

Tecan Spark Multimod mikroploka okuyucu kullanılarak elde edilen POS'a ait kalibrasyon doğrusu Şekil 15'te yer almaktadır.



Şekil 15 : POS'a ait kalibrasyon doğrusu

3.1.2.2. Analitik Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular

Doğrusallık

Örnekteki maddenin belirlenen aralıktaki konsantrasyonu ile elde edilen yanıtın orantılı olduğunun göstergesidir. Doğrusallık tespiti için Bölüm 2.2.1.3'te anlatıldığı gibi çalışıldı ve POS kalibrasyon eğrisi çizildi. Elde edilen doğrunun denklemi $y=122.2x + 414.06$ ve R^2 değeri 0,9919 olarak bulundu.(LLOD) 0.006µmol / mL ve alt (LLOQ) 0.0189 µmol / mL olarak bulundu

Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik

Doğruluk, saptanan değerin gerçeğe yakınlığıdır. POS'un DMSO içinde 5, 10 ve 25 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerin floresans değerleri ölçüldü ve bu değerlere karşılık gelen konsantrasyon değerleri (µg/mL) standart doğru yardımıyla hesaplandı.

Geri elde edilebilirlik değerleri de yöntem 2.2.1.3'te anlatıldığı gibi konsantrasyon değerlerinden hareketle hesaplandı. Ortalama geri kazanım farkının $\pm \%10$ aralığına girdiği, varyasyon katsayılarının (VK) da % 2'den küçük olduğu bulundu. Bu ölçümlerde okunan eğri altı alan, ortalama (ORT) ve standart sapma (SS) değerleri Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9 : Doğruluk ve geri elde edilebilirlik bulguları

Konsantrasyon (µg/mL)	Eğri Altı Alan	Hesaplanan Değer	%Geri Elde
5,000	1025,060	5,009	100,174
5,000	1025,182	5,010	100,194
5,000	1027,626	5,030	100,594
5,000	1039,846	5,130	102,598
5,000	1028,848	5,040	100,795
5,000	1026,282	5,019	100,374
ORT	1028,807	5,039	100,788
SS	5,600	0,046	0,918
VK	0,005		
10,000	1636,060	10,017	100,169
10,000	1637,282	10,027	100,269
10,000	1638,504	10,037	100,369
10,000	1635,082	10,009	100,089
10,000	1626,528	9,939	99,388
10,000	1635,082	10,009	100,089
ORT	1634,757	10,006	100,062
SS	4,243	0,035	0,348
VK	0,0030		
25,000	3469,060	25,041	100,166
25,000	3471,504	25,062	100,246
25,000	3459,284	24,961	99,845
25,000	3467,838	25,031	100,126
25,000	3455,618	24,931	99,725
25,000	3459,162	24,960	99,841
ORT	3463,744	24,998	99,992
SS	6,514	0,053	0,214
VK	0,002		

Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliği için Bölüm 2.2.1.3'te anlatıldığı gibi örnekler, arka arkaya altı kez ölçülerek aritmetik ortalama ve standart sapma (SS) hesaplandı. Tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik değerleri değerlendirildi.

Tekrar Edilebilirlik

POS'un DMSO içinde 25 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan örneklerinin Tecan Spark Multimod Mikroplaka Okuyucu cihazında eksitasyon 260 nm ve emisyon 360 nm 6 kez art arda okunmasıyla elde edilen eğri altı alan, ORT ve SS değerleri Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10 : Etkin madde miktar tayini yönteminin tekrar edilebilirlik çalışması sonucunda elde edilen eğri altı alan değerleri

Örnek Konsantrasyonu (µg/mL)	Eğri Altı Alan Değeri
25	3483,601
25	3471,381
25	3471,736
25	3495,821
25	3457,072
25	3468,070
ORT	3474,614
SS	±13,415
VK	0,004

Tekrar Elde Edilebilirlik

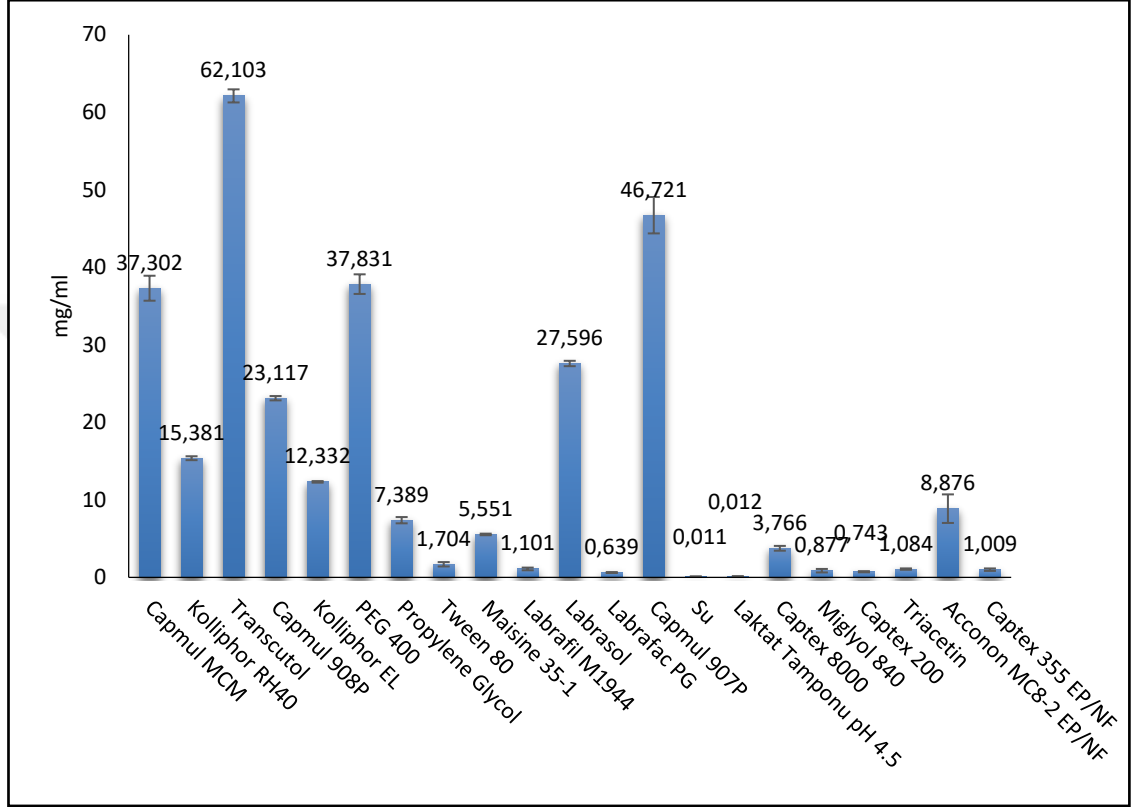
Bölüm 2.2.1.3'te anlatıldığı gibi çalışılarak aynı konsantrasyonda hazırlanan altı paralel örneğin enjeksiyonu sonucu elde edilen eğri altı alan , ORT ve SS değerleri Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11: Etkin madde miktar tayini yönteminin tekrar elde edilebilirlik çalışması sonucunda elde edilen eğri altı alan değerleri

Örnek Konsantrasyonu (µg/mL)	Eğri Altı Alan Değeri
25	3484,824
25	3473,826
25	3471,736
25	3483,602
25	3444,852
25	3443,630
ORT	3467,078
SS	18,433
VK	0,004

3.2. Etkin Maddenin Çözünürlük Çalışmasına Ait Bulgular

Etkin madde POS'un formülasyonlarda kullanılacak çeşitli yağ, surfaktan, kosolvan ve tampon çözeltilerdeki çözünürlüğü taranmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 16'da verilmiştir.



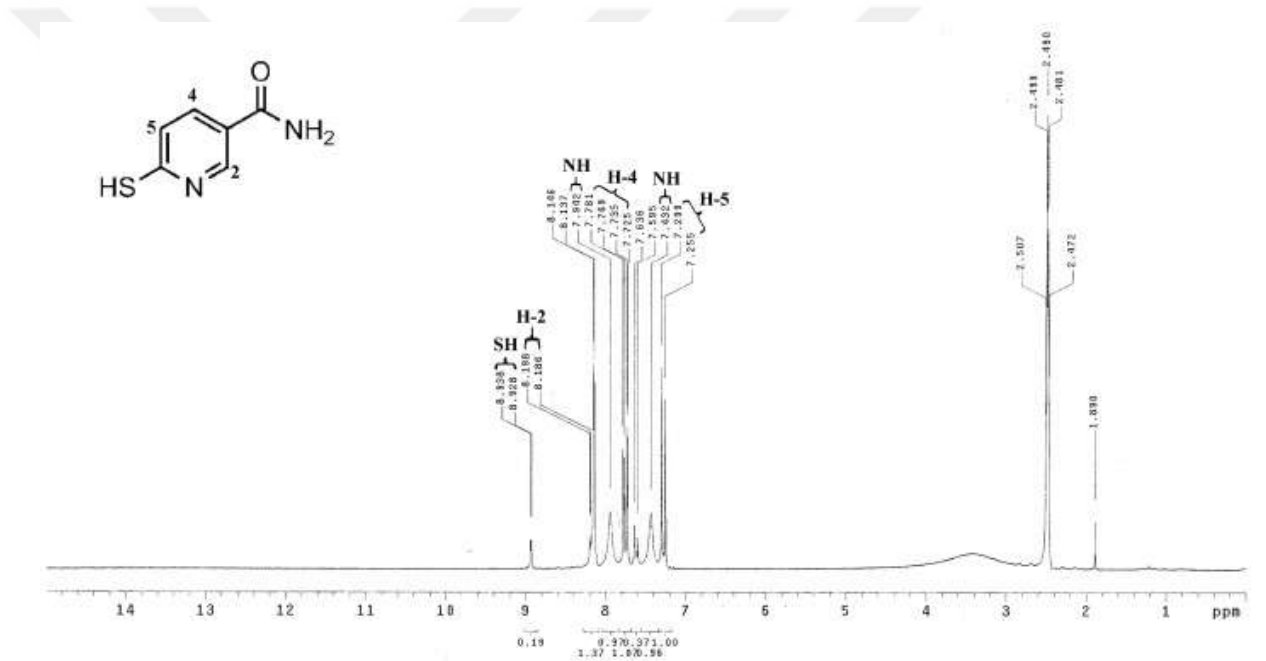
Şekil 16 : POS'un çeşitli yağ, surfaktan, kosolvan ve tampon çözeltilerdeki çözünürlüğü

3.3. Mukoadezif Tiyomer Sentezi ve *in vitro* / *eks vivo* Karakterizasyonuna Ait Bulgular

3.3.1. Reaksiyon Ara Ürünlerinin Karakterizasyonuna Ait Bulgular

Reaksiyon ara ürünleri olan 6-MNA, 6,6'-DTNA, aromatik ligand Cys-6-MNA ve L-sistein yapıları ^1H NMR spektroskopisi ile yapısal olarak incelenerek özellikleri konfirme edilmiştir.

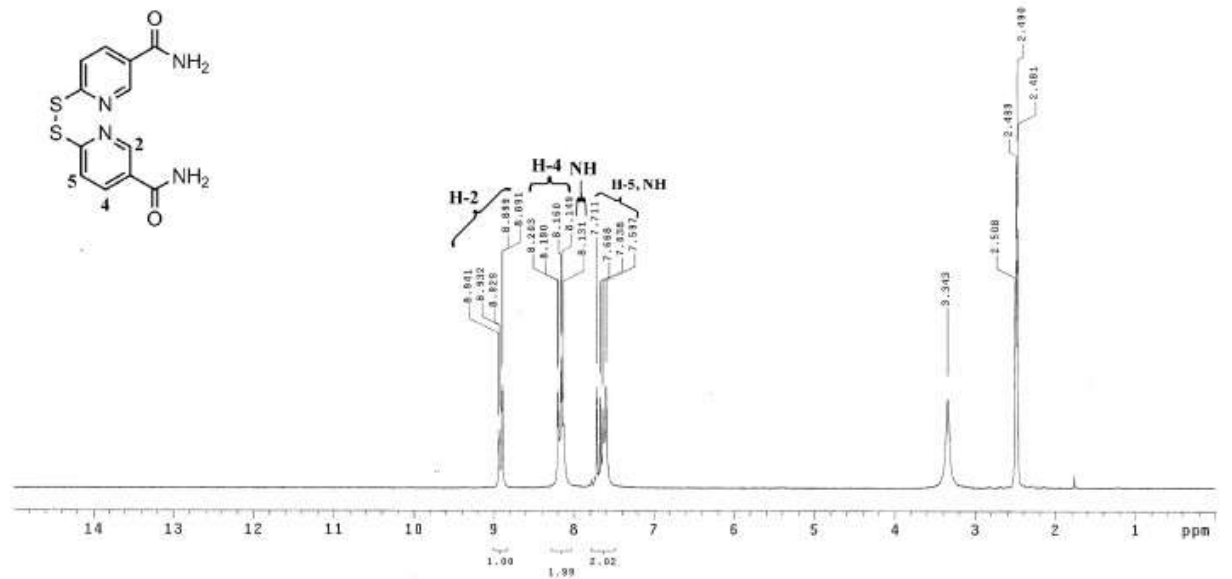
Bölüm 2.2.3.4'te anlatıldığı gibi yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bu yapılara ait NMR spektrumları sırasıyla Şekil 17,- Şekil 20'de verilmektedir.



Şekil 17 : Monomer 6-MNA'ya ait ^1H NMR spekturumu (DMSO- d_6 içinde)

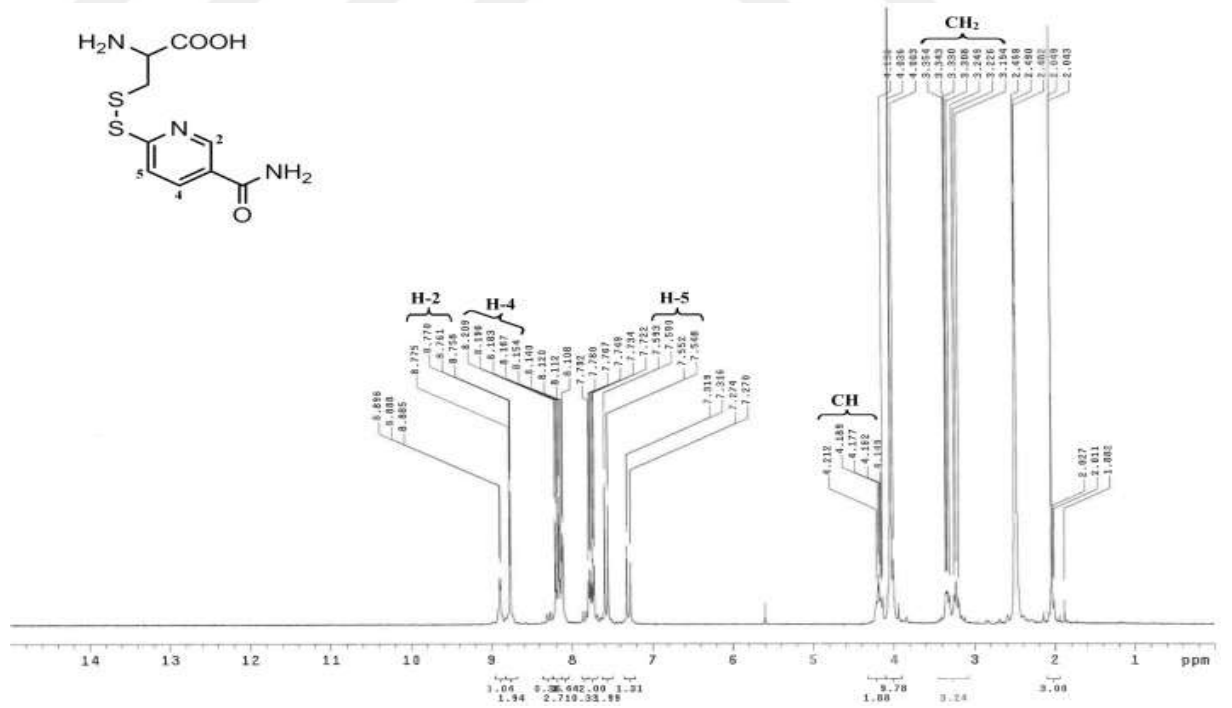
Ayrıca 6-MNA ve 6,6'-DTNA, aromatik ligand Cys-6-MNA ve L-sistein yapıları ^1H NMR spektroskopisi ile yapısal olarak incelenerek özellikleri konfirme edilmiştir.

6-MNA: ^1H NMR (DMSO- d_6), δ : 8.93 (d, 1H, D_2O - değişebilir SH), 8.18 (d, 1H, $J=2.0\text{Hz}$, H-2), 7.94 (br s, 1H, D_2O - değişebilir NH), 7.76 (dd, 1H, $J=8.8\text{Hz}$, $J=2.0\text{Hz}$, H-4), 7.43 (br s, 1H, D_2O - değişebilir NH), 7.28 (d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$, H-5)



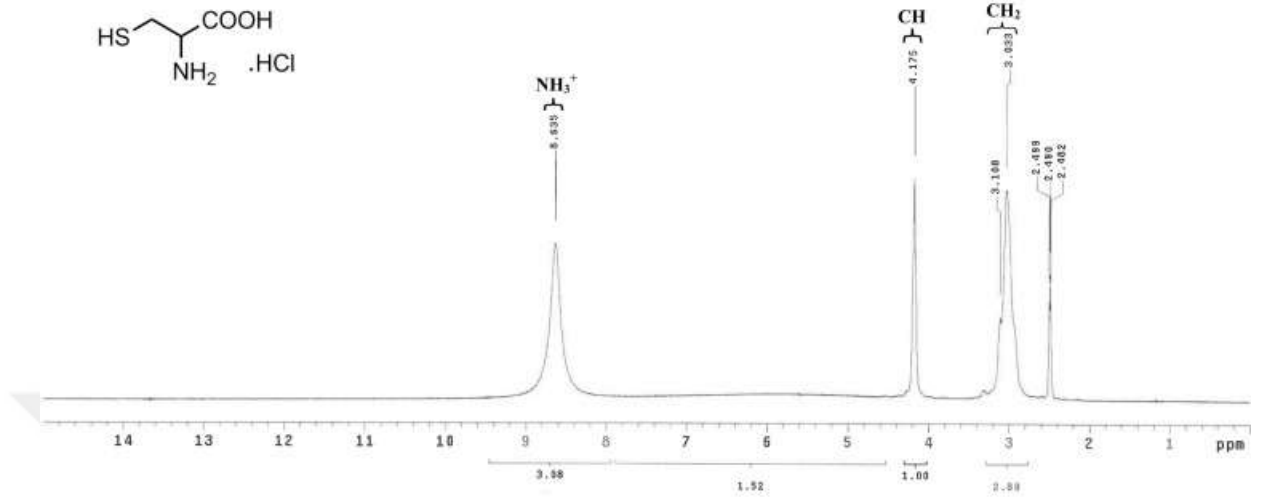
Şekil 18 : Dimer 6,6'-ditiyonikotinamid (6,6'-DTNA) ait ^1H NMR spekturumu (DMSO- d_6 içinde)

6,6'-DTNA: ^1H NMR (DMSO- d_6), δ : 8.94–8.89 (m, 1H, H-2), 8.18 (dd, $J=8.4$, 2.4Hz, 1H, H-4), 8.13 (s br, 1H, D_2O -değişebilir, NH), 7.71–7.60 (m, 2H, 1H sonrasında D_2O -değişebilir, 1H, H-5)



Şekil 19 : Aromatik ligand Cys-6-MNA'ya ait ^1H NMR spekturumu (DMSO- d_6 içinde)

Cys-6-MNA: ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6+\text{D}_2\text{O}$), δ : 8.77 (dd, $J=2.6\text{Hz}$, $J=0.8\text{Hz}$, 1H, H-2), 8.18 (dd, $J=8.4\text{Hz}$, $J=2.6\text{Hz}$, 1H, H-4), 7.57 (dd, $J=8.4\text{Hz}$, $J=0.8\text{Hz}$, 1H, H-5), 4.21–4.14 (m, 1H, CH), 3.35–3.19 (m, 2H, CH_2)

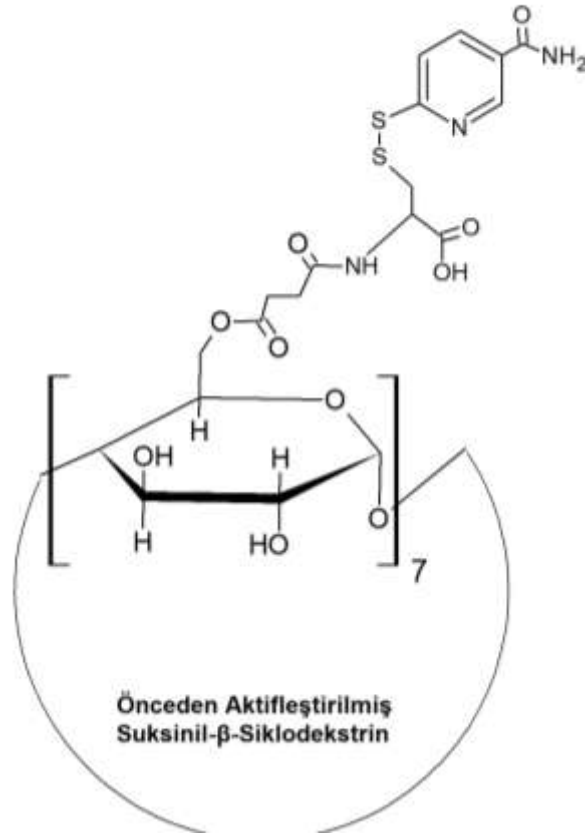


Şekil 20 : L-sistein Hidroklorit'e ait ^1H NMR spekturumu ($\text{DMSO}-d_6$ içinde)

L-sistein hidroklorit: ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$), δ : 8.63 (s, 3H, NH_3^+) D_2O -değişebilir, 4.17 (1H, $-\text{CH}$), 3.11–2.91 (m, 2H, CH_2)

3.3.2. Suc- β -CD-MNA Sentezi ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular

Suc- β -CD-MNA Bölüm 2.2.3'de anlatıldığı gibi çok adımlı bir reaksiyon ile sentezlendi. L-Cys'in 6-MNA'ya konjüge edilmesinden sonra elde edilen Cys-6-MNA ligandının serbest primer amino grupları, ile CD halkası üzerindeki süksinil uzantılarının karboksil grupları arasındaki amit bağı oluşumu yoluyla Şekil 21'de gösterilen Suc- β -CD-MNA elde edildi.

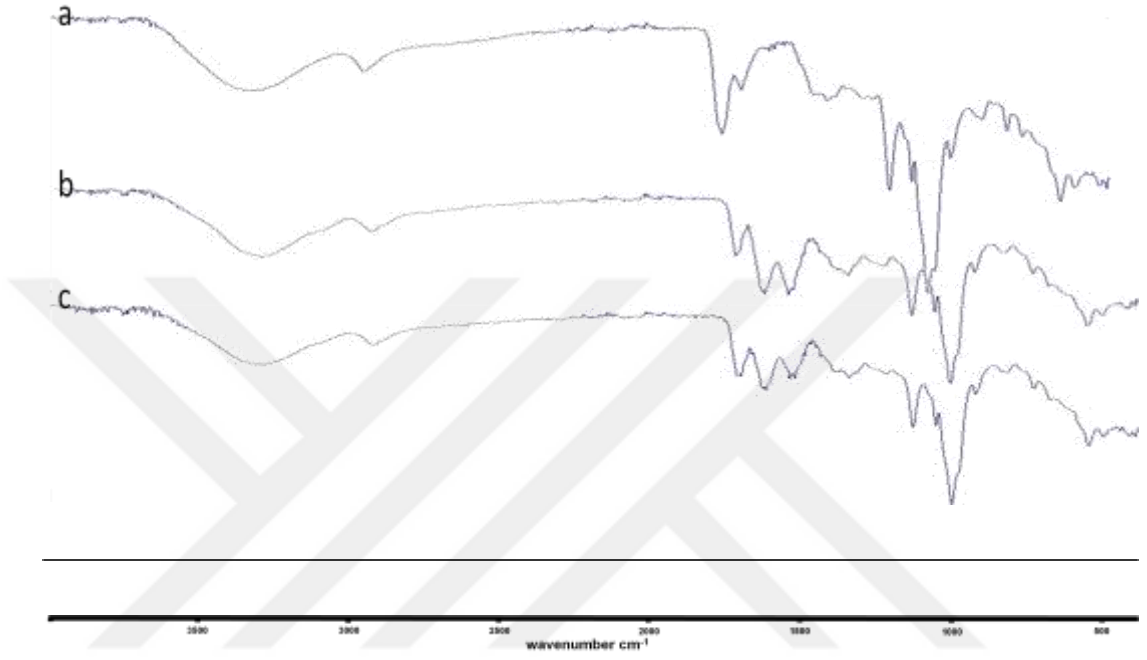


Şekil 21: Suc-β-CD-MNA'nın kimyasal yapısı

Reaksiyondan ve saflaştırma işlemlerinden sonra liyofilize edilerek kurutulan önceden aktive edilmiş Suc-β-CD-MNA'nın, fibröz yapılı beyaz renkli toz olduğu gözlemlendi.

3.3.2.1. FT-IR Spektrumuna Ait Bulgular

Suc- β -CD, Suc- β -CD-MNA₁, ve Suc- β -CD-MNA₂'ye ait FT-IR spektrumları Şekil 22'de verilmiştir.



Şekil 22 (a) Suc- β -CD (b) Suc- β -CD-MNA1 (c) Suc- β -CD-MNA2'ye ait FT-IR spektrumları

3.3.2.2. Kimyasal Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular (Ellman ve MNA testleri)

Bölüm 2.2.3.6'da anlatıldığı gibi gerçekleştirilen MNA ve Ellman testleri sonucunda karakterize edilen Suc- β -CD-MNA türevlerinin özellikleri Tablo 12'de sunulmaktadır. Sentez sırasında, ligand miktarının değiştirilmesi ile iki farklı oranda konjugasyon sağlandığı Tablo 12'de gösterildiği gibi doğrulandı.

Tablo 12 : Suc- β -CD-MNA türevlerinin kimyasal karakterizasyona ait bulgular

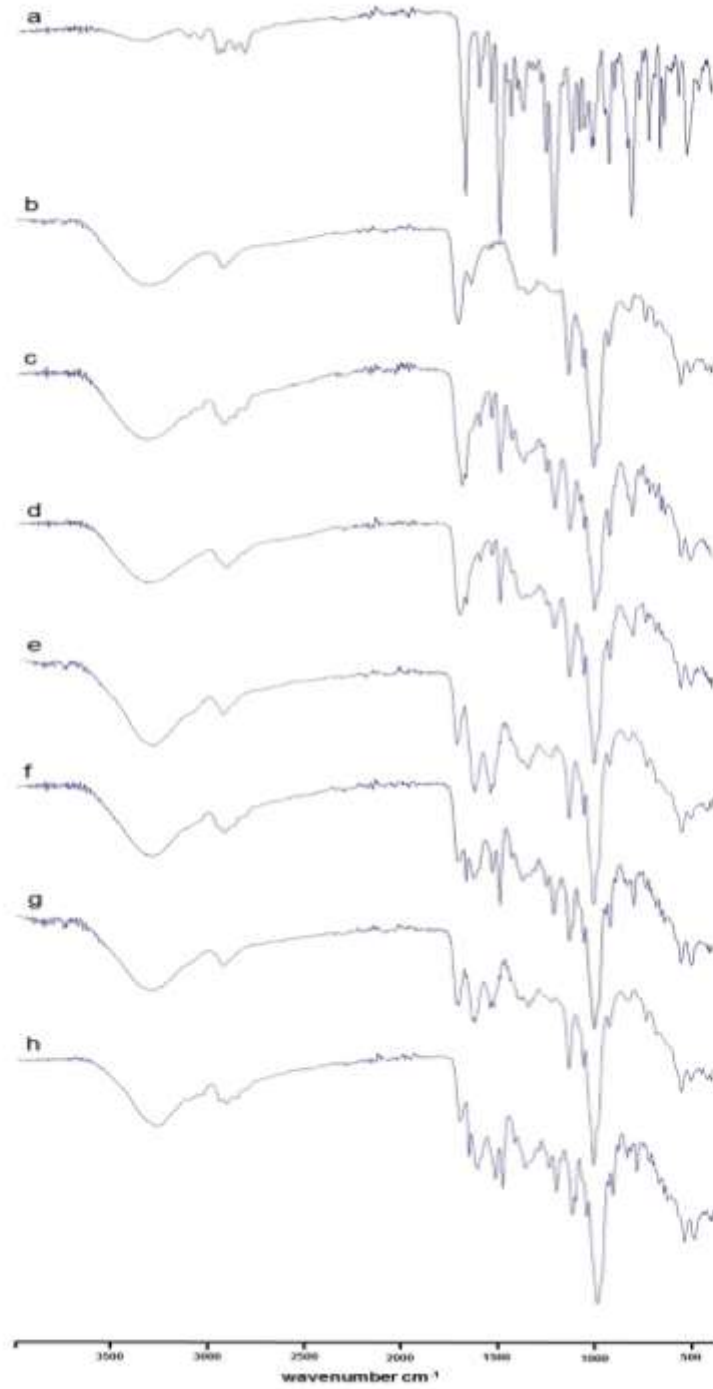
	Suc- β -CD (mg)	MNA (mg)	L-Cys (mg)	EDAC (mg)	MNA (μ mol/g)	CD iskeletindeki tiyol grupları (μ mol/g)	Redüksiyondan sonra tiyol grupları (μ mol/g)
Suc- β -CD-MNA ₁	300	450	225	150	221,16 $\pm$ 51,68	6,39 $\pm$ 0,83	423,51 $\pm$ 31,44
Suc- β -CD-MNA ₂	300	600	300	150	521,76 $\pm$ 28,25	8,83 $\pm$ 0,90	947,12 $\pm$ 25,21

3.3.3. Suc- β -CD-MNA/POS İnküzyon Komplekslerinin Hazırlanması ve Yapısal Analiz Çalışmalarına Ait Bulgular

Bölüm 2.2.3.7'de anlatıldığı gibi hazırlanan inküzyon kompleksleri, Bölüm 2.2.3.8'de anlatıldığı gibi FT-IR ve HR CS MAS ile yapısal olarak analiz edilmiştir.

3.3.3.1. FT-IR spektrometrisi Çalışmalarına Ait Bulgular

POS, Suc- β -CD, Suc- β -CD/POS fiziksel karışımı, Suc- β -CD/POS inküzyon kompleksi, Suc- β -CD-MNA₁, Suc- β -CD-MNA₁/POS inküzyon kompleksi, Suc- β -CD-MNA₂ ve Suc- β -CD-MNA₂/POS inküzyon kompleksine ait FT-IR spektrumları toplu olarak Şekil 23'te verilmiştir.

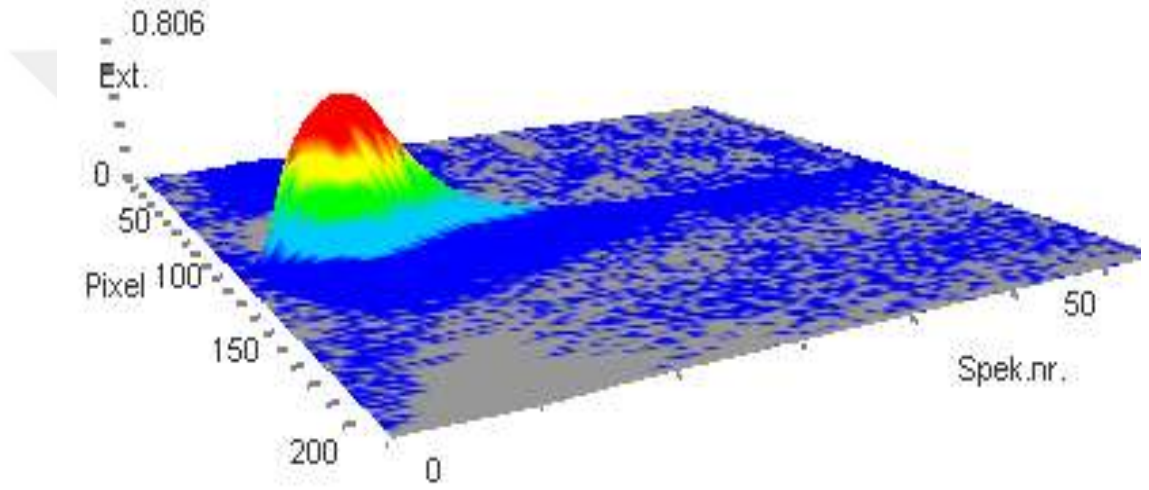


Şekil 23 : (a) POS, (b) Suc- β -CD, (c) Suc- β -CD /POS fiziksel karışımı, (d) Suc- β -CD/POS inklüzyon kompleksi, (e) Suc- β -CD-MNA1, (f) Suc- β -CD-MNA1/POS inklüzyon kompleksi, (g) Suc- β -CD-MNA2, (h) Suc- β -CD-MNA2/POS inklüzyon kompleksi.

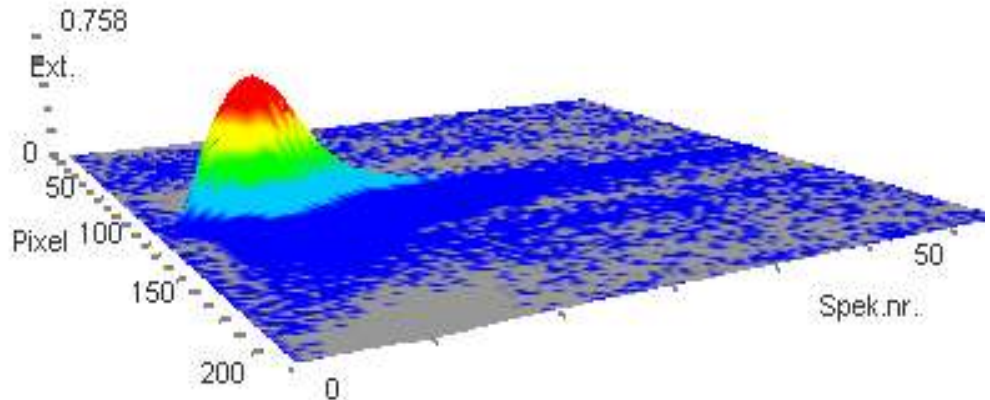
3.3.4. HR CS MAS analizi Çalışmalarına Ait Bulgular

FT-IR spektrum analiz çalışmalarına ek olarak, inklüzyon komplekslerinin oluşumunun daha ileri doğrulaması için HR CS MAS testleri gerçekleştirildi.

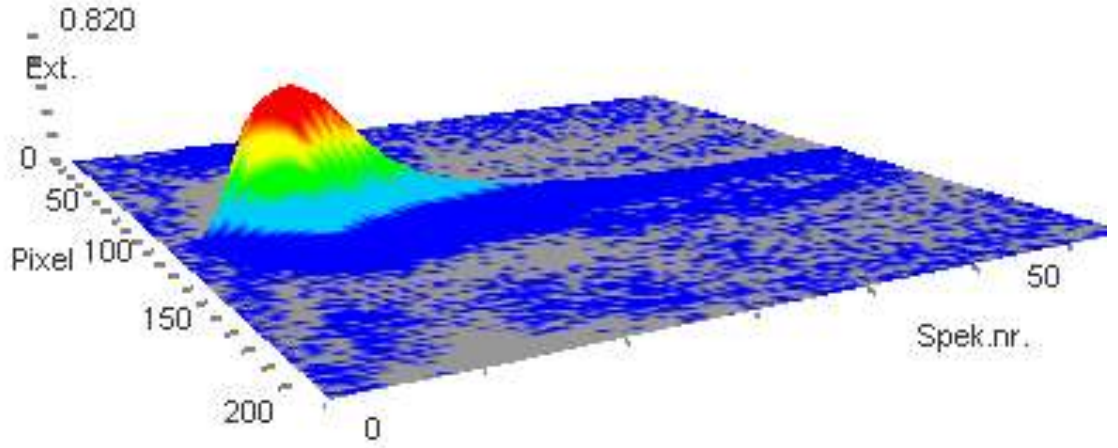
Suc- β -CD ve POS arasındaki kompleksleşmenin doğrulanması amacıyla POS'un moleküler yapısında flor atomu bulunduğu için florin bazlı tayin uygun bulundu ve bu nedenle, 211.2480 nm dalga boyunda galyum monoflorür bazlı florun HR CS MAS ile identifikasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen spektrumlar Şekil 24 - Şekil 27'de verilmiştir.



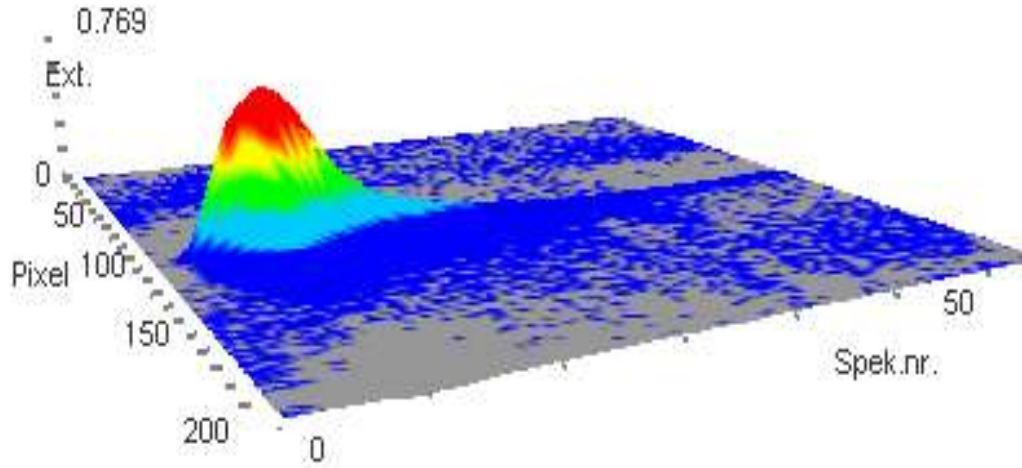
Şekil 24 : POS'a ait yüksek çözünürlüklü sürekli kaynaklı moleküler absorpsiyon spektroskopisi



Şekil 25 : Suc- β -CD/POS inklüzyon kompleksine ait yüksek çözünürlüklü sürekli kaynaklı moleküler absorpsiyon spektroskopisi



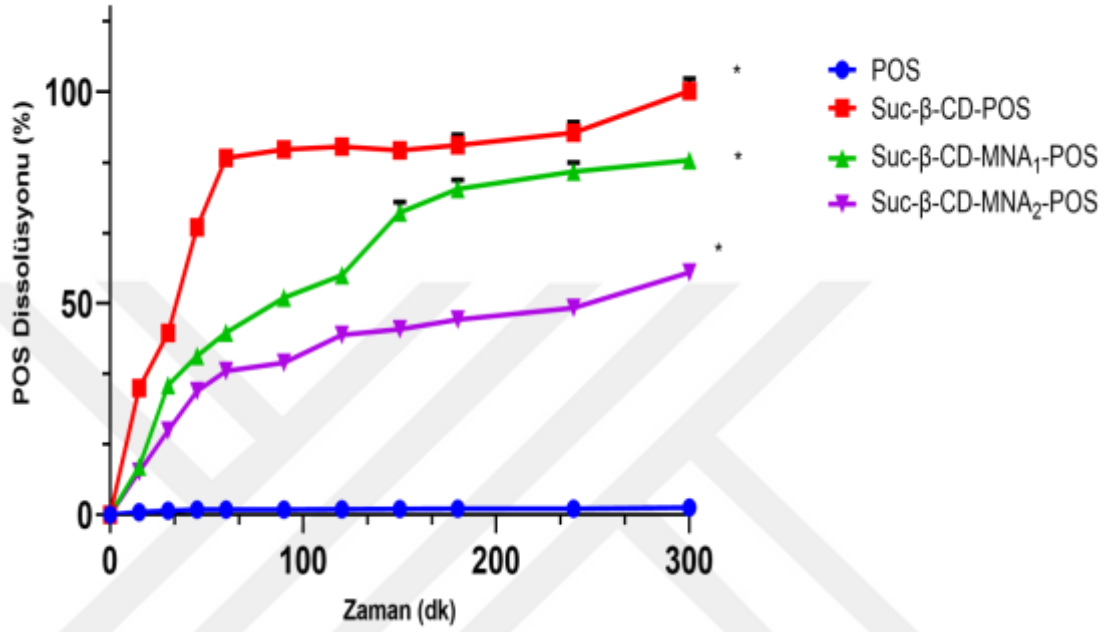
Şekil 26 : Suc-β-CD-MNA1/POS inklüzyon kompleksine ait yüksek çözünürlüklü sürekli kaynaklı moleküler absorpsiyon spektroskopisi



Şekil 27 : Suc-β-CD-MNA2/POS inklüzyon kompleksine ait yüksek çözünürlüklü sürekli kaynaklı moleküler absorpsiyon spektroskopisi

3.3.5. Dissolüsyon Testi Çalışmalarına Ait Bulgular

POS, ve inklüzyon kompleksleri Suc- β -CD/POS, Suc- β -CD-MNA₁/POS, Suc- β -CD-MNA₂/POS'un laktat tamponu içerisindeki dissolüsyon profilleri Şekil 28'de verilmiştir.

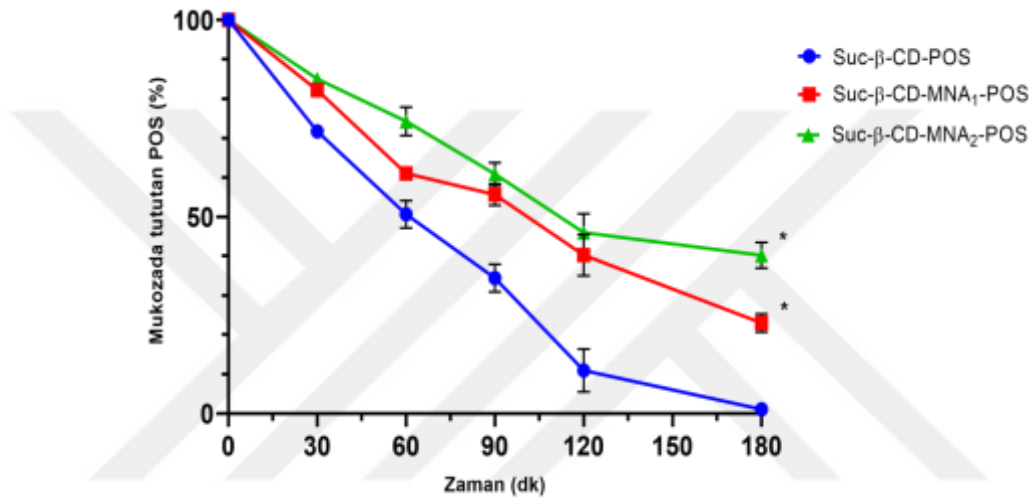


Şekil 28 : POS, Suc- β -CD-POS, Suc- β -CD-MNA₁/POS ve Suc- β -CD-MNA₂/POS'un pH 4.5 50 mM laktat tamponu içerisindeki dissolüsyon profilleri

3.3.6. Mukoadezyon Çalışmalarına Ait Bulgular

3.3.6.1. İnklüzyon Komplekslerinin Mukoadezif Özelliklerinin Yarım Tüp Metodu Kullanılarak İncelenmesine Ait Bulgular

Suc- β -CD/POS, Suc- β -CD-MNA₁/POS ve Suc- β -CD-MNA₂/POS'un domuz vajinal mukozasında yapılan mukoadezyon çalışmasında belirlenen mukoadezyon profilleri Şekil 29'da verilmiştir.



Şekil 29 : Domuz mukozasında tutunan inklüzyon kompleksi miktarının zamana bağlı değişimi

Suc- β -CD-POS, Suc- β -CD-MNA₁/POS ve Suc- β -CD-MNA₂/POS'un domuz vajinal mukozasında yapılan mukoadezyon çalışmasında belirlenen mukoadezyon özellikleri karşılaştırmalı olarak Tablo 13'te verilmiştir.

Tablo 13 : 3 saat sonunda domuz vajinal mukozasında kalan Suc- β -CD-POS, Suc- β -CD-MNA₁/POS ve Suc- β -CD-MNA₂/POS'un karşılaştırmalı oranları

	3 saat sonunda mukozada tutunan (%)	İyileştirme Oranı
Suc- β -CD	1,067 $\pm$ 0,498	1
Suc- β -CD-MNA ₁	23,02 $\pm$ 2,367	21,574
Suc- β -CD-MNA ₂	40,199 $\pm$ 3,257	37,674

3.3.6.2. İnküzyon Komplekslerinin Mukoadezif Özelliklerinin TA-XT Cihazı Kullanılarak İncelenmesine Ait Bulgular

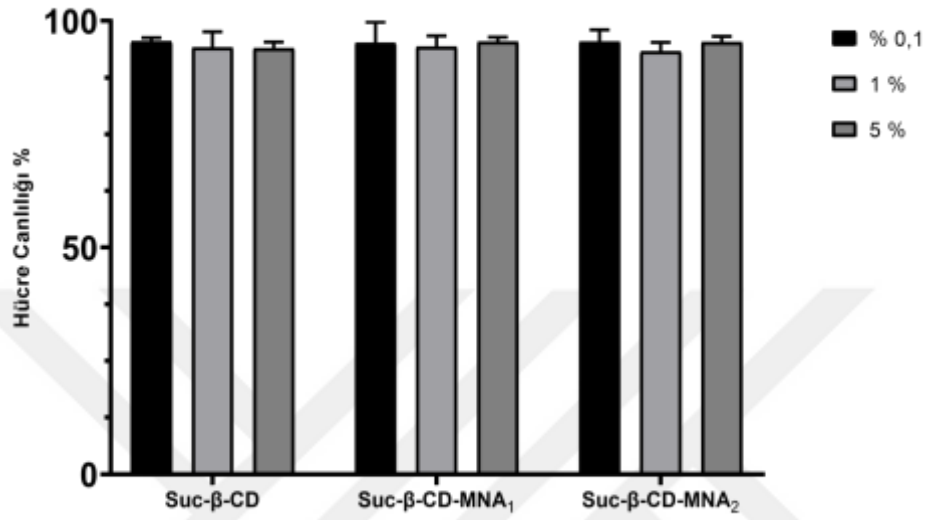
Suc- β -CD, Suc- β -CD-MNA₁ ve Suc- β -CD-MNA₂ 'nin TA-XT Texture Analyser cihazı cihazı kullanılarak belirlenen mukoadezif özellikleri Tablo 14'te verilmiştir.

Tablo 14 : Suc- β -CD, Suc- β -CD-MNA₁ ve Suc- β -CD-MNA₂ 'nin mukoadezif özellikleri

	Kuvvet $\pm$ SS (N)	Mukoadezyon $\pm$ SS (N mm/cm²)
Suc- β -CD	0,016 $\pm$ 0,011	0,165 $\pm$ 0,019
Suc- β -CD-MNA ₁	0,031 $\pm$ 0,005	0,789 $\pm$ 0,066
Suc- β -CD-MNA ₂	0,041 $\pm$ 0,015	1,222 $\pm$ 0,172

3.3.7. Sitotoksisite Çalışmalarına Ait Bulgular

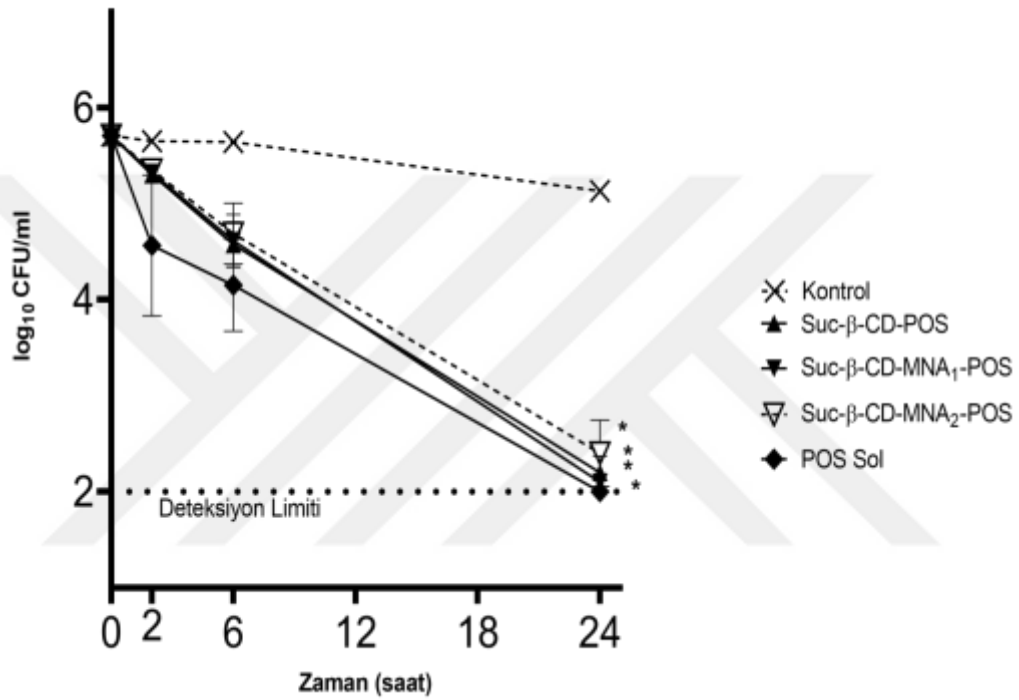
Suc- β -CD ve modifiye edilmiş türevlerinin (Suc- β -CD-MNA₁, Suc- β -CD-MNA₂) HeLa hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmak için yapılan Resazurin testinin sonuçları Şekil 30'da verilmiştir.



Şekil 30 : Suc- β -CD, Suc- β -CD-MNA1 ve Suc- β -CD-MNA2'nin 4 saat sonunda HeLa hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi

3.3.8. In Vitro Antifungal Etkinlik Çalışmalarına Ait Bulgular

POS içeren modifiye edilmemiş (Suc- β -CD) ve modifiye edilmiş (Suc- β -CD-MNA₁, Suc- β -CD-MNA₂) inklüzyon komplekslerinin *Candida albicans* ATCC 1533 suşu üzerindeki zamana bağlı antifungal aktivitesini araştırmak için yapılan bir zaman-öldürme deneyinin (kill-time assay) sonuçları Şekil 31’de verilmiştir.



Şekil 31 : Suc- β -CD/POS, Suc- β -CD-MNA₁/POS ve Suc- β -CD-MNA₂/POS inklüzyon kompleksleri ve POS çözeltisinin *Candida albicans* ATCC 1533 suşu üzerindeki zamana bağlı antifungal aktivitesi

3.4. Mukusa Penetre Olan Formülasyonların Hazırlanması ve *in vitro* / *eks vivo* Karakterizasyonuna Ait Bulgular

3.4.1. SNEDDS Formülasyonların Hazırlanması Ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular

SNEDDS formülasyonlarının ölçülen damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri Tablo 15'te verilmektedir.



Tablo 15 : Formülasyonların damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri

Formülasyon	Damlacık büyüklüğü	±SS	PDI	Zeta	±SS
F1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
F2	313,500	30,11	0,512	-1,417	0,319
F3	306,000	1,735	0,545	-5,793	0,646
F4	338,300	8,202	0,558	-1,393	0,055
F5	30,233	6,721	0,360	-1,903	0,091
F6	14,960	0,891	0,055	-4,620	0,965
F7	33,833	0,179	0,136	-1,078	0,416
F8	28,190	0,190	0,071	-4,210	0,711
F9	22,740	0,087	0,063	-0,600	0,225
F10	24,450	0,928	0,242	-1,844	0,774
F11	55,313	4,458	0,990	-0,709	0,150
F12	18,767	0,297	0,091	-3,933	0,342
F13	17,827	0,444	0,087	-0,458	0,018
F14	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
F15	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
F16	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
F17	13,037	0,194	0,039	0,103	0,229
F18	13,537	0,685	0,038	1,262	1,962
F19	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
F20	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
F21	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
F22	267,467	8,075	0,425	-0,106	0,117
F23	365,333	5,393	0,548	-0,648	0,302
F24	203,367	19,63	0,590	-0,163	0,266
F25	14,467	0,184	0,049	-1,907	1,131
F26	23,407	0,161	0,077	-1,130	0,121
F27	21,577	0,202	0,071	-0,682	0,115
F28	20,867	0,142	0,065	-0,760	0,139
F29	19,943	0,110	0,092	-0,469	0,246
F30	19,117	0,115	0,088	-1,159	0,184
F31	669,2	44,21	0,717	-0,9443	0,126
F32	555,8	21,12	0,626	-0,9897	0,425
F33	522,4	18,14	0,44	-0,8690	0,083
F34	440,6	20,18	0,218	-0,9190	0,111
F35	345,6	15,51	0,244	-0,7750	0,109
F36	270,4	12,10	0,227	-0,2480	0,070
F37	108,900	8,256	0,136	-0,7480	0,116
F38	90,230	4,158	0,187	-1,3500	0,113
F39	140,800	20,12	0,136	-0,8200	0,091
F40	42,260	0,919	0,107	-0,8150	0,082
F41	97,060	19,68	0,326	-0,7490	0,098
F42	283,500	19,74	0,497	-0,6190	0,059
F43	33,72	1,19	0,15	-2,58	0,15
F44	27,003	0,155	0,092	-0,699	0,193
F45	115,633	1,186	0,098	-0,554	0,459
F46	19,653	0,076	0,084	-0,600	0,322
F47	14,620	0,263	0,059	-0,573	0,470
F48	14,467	0,184	0,049	-1,907	1,131

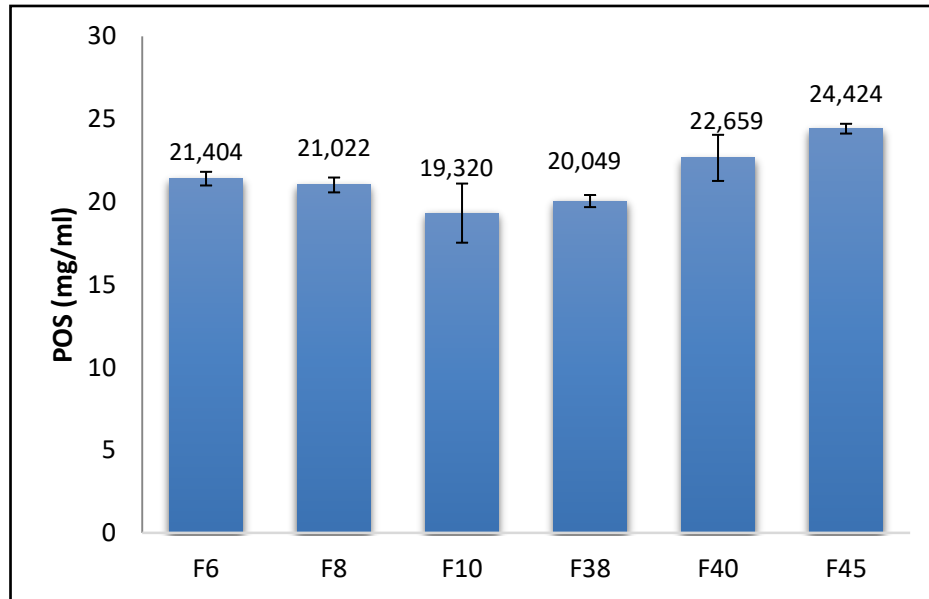
Ön denemelerden sonra seçilen formülasyonlara % 1 (a/h) POS yüklenerek elde edilen SNEDDS'lere ait damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 16 : POS yüklü formülasyonların 4 saatlik arayla ölçülen damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri

	0h			4h		
	Damlacık Boyutu (nm)±SS	PDI	Zeta Pot. (mV)±SS	Damlacık Boyutu (nm)±SS	PDI	Zeta Pot. (mV)±SS
F6-POS	283,500±19,745	0,497	-0,944±0,127	399,300±33,254	0,413	-0,748±0,116
F8-POS	75,640±3,313	0,074	-0,989±0,425	229,640±10,711	0,084	-1,35±0,113
F10POS	22,550 ± 0,636	0,050	-0,869±0,083	123,460±16,658	0,071	-0,82±0,091
F38-POS	108,900±8,256	0,136	-0,919±0,111	181,700±12,325	0,097	-0,815±0,082
F40-POS	140,800±20,128	0,286	-0,248±0,070	180,200±6,211	0,148	-0,749±0,098
F45-POS	113,667 ± 8,256	0,169	-0,767±0,109	133,723±4,200	0,155	-0,736±0,145

3.4.2. Log D Hesaplanması Çalışmalarına Ait Bulgular

POS'un seçilen SNEDDS yağlı fazları içindeki çözünürlük değerleri Şekil 32'da verilmiştir.



Şekil 32 :POS'un seçilen SNEDDS yağlı fazları içindeki çözünürlük değerleri

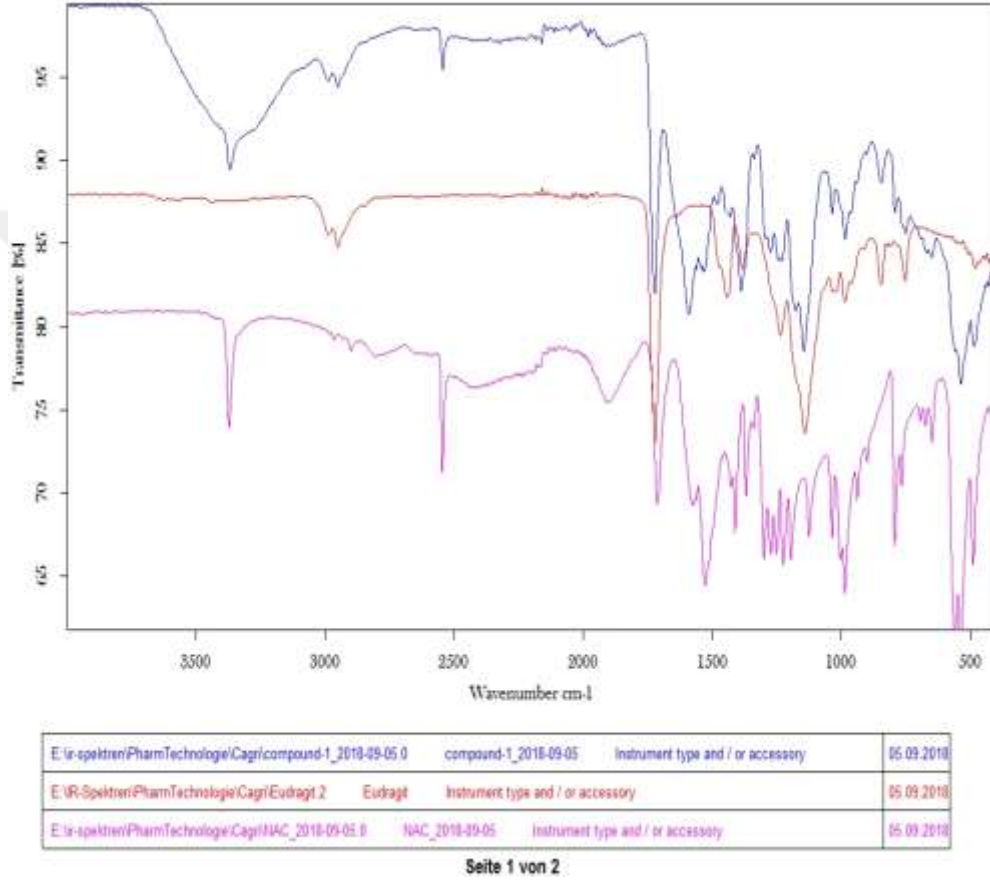
POS'un SNEDDS formülasyonlarındaki çözünürlük, D ve log D değerleri Tablo 17'de verilmiştir.

Tablo 17 : SNEDDS formülasyonlarında POS çözünürlük, D ve log D değerleri

SNEDDS	POS çözünürlük (mg/mL)	± SS (mg/mL)	Salım Ortamındaki Çözünürlük (mg/mL)	D	Log D
F6	21,404	0,413	0,012	1760,533	3,246
F8	21,022	0,449	0,012	1729,122	3,238
F10	19,320	1,787	0,012	1589,120	3,201
F38	20,049	0,366	0,012	1649,025	3,217
F40	22,659	1,394	0,012	1863,740	3,270
F45	24,424	0,295	0,012	2008,903	3,303

3.4.3. EU-NAC Kompleksinin Hazırlanması ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular

Bölüm 2.2.4.4'te anlatılan göre hazırlanan EU-NAC kompleksindeki Eudragit RS 100 ve NAC arasındaki iyonik etkileşiminin doğrulanması için çekilen EU-NAC kompleksi, Eudragit RS 100 ve NAC'a ait FT-IR spektrumları Şekil 33'de verilmiştir.



Şekil 33 :EU-NAC kompleksi, Eudragit RS 100 ve NAC'a ait FT-IR spektrumları

Ayrıca Ellman Testi kullanılarak yapılan miktar tayini sonucunda 80 mg EU-NAC kompleksinin . $20 \pm 1,40$ mg NAC içerdiği bulunmuştur.

3.4.4. POS ve EU-NAC yüklü SNEDDS (POS-EU-NAC-SNEDDS)

formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular

POS-EU-NAC-SNEDDS formülasyonlarının karakterizasyonu için yapılan kısa süreli stabilite testleri, uzun süreli stabilite testleri ve mikroskop görüntüleme çalışmalarına ait bulgular sırası ile verilmiştir.

3.4.4.1. Kısa Süreli Stabilite Testine Ait Bulgular

Optimum formülasyon olarak belirlenen F45'ten hareketle Tablo 8'de anlatıldığı gibi formüle edilen SNEDDS formülasyonlarının mukusun yenilenme süresi olan 4 saat arayla ölçülen damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri Tablo 18'de verilmiştir.

Tablo 18 : F45'ten hareketle formüle edilen SNEDDS formülasyonlarının 4 saatlik arayla ölçülen damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri

	0h			4h		
	Damlacık boyutu $\pm$ SS (nm)	PDI	Zeta Pot $\pm$ SS (mV)	Damlacık boyutu $\pm$ SS (nm)	PDI	Zeta Pot $\pm$ SS (mV)
SNEDDS (F45)	115,633 $\pm$ 1,186	0,149	-0,580 $\pm$ 0,151	118,070 $\pm$ 0,678	0,241	-1,580 $\pm$ 0,151
EU SNEDDS	106,200 $\pm$ 0,889	0,267	27,550 $\pm$ 1,457	132,430 $\pm$ 29,955	0,253	22,300 $\pm$ 0,608
NAC SNEDDS	97,227 $\pm$ 1,115	0,135	-2,738 $\pm$ 0,310	124,367 $\pm$ 3,749	0,181	-2,884 $\pm$ 0,158
EU-NAC SNEDDS	128,467 $\pm$ 7,366	0,286	10,550 $\pm$ 0,954	150,760 $\pm$ 21,948	0,306	12,250 $\pm$ 0,985
POS SNEDDS	113,667 $\pm$ 8,256	0,169	-0,767 $\pm$ 0,128	133,723 $\pm$ 4,200	0,155	-0,736 $\pm$ 0,145
POS-EU-NAC SNEDDS	173,400 $\pm$ 2,136	0,265	9,333 $\pm$ 0,434	198,230 $\pm$ 0,283	0,283	10,517 $\pm$ 0,938
POS-NAC-SNEDDS	122,309 $\pm$ 1,678	0,198	-2,255 $\pm$ 0,056	134,455 $\pm$ 11,232	0,224	-2,233 $\pm$ 0,043
POS-EU-SNEDDS	145,678 $\pm$ 3,589	0,210	26,451 $\pm$ 2,132	168,986 $\pm$ 13,877	0,244	23,570 $\pm$ 2,341

3.4.4.2. Uzun Süreli Stabilité Testine Ait Bulgular

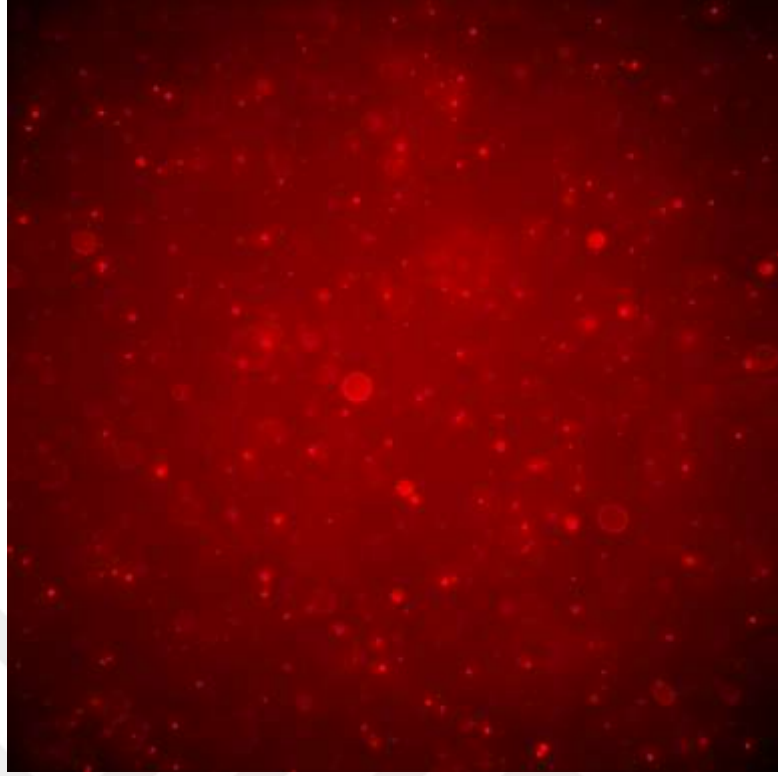
SNEDDS yağlı fazlarının uzun süreli stabilitesini değerlendirmek için, 3 ay ara ile yapılan, damlacık boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümlerinden elde edilen değerler Tablo 19’de verilmiştir.

Tablo 19 : Uzun süreli stabilité testinde elde edilen ölçülen damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri

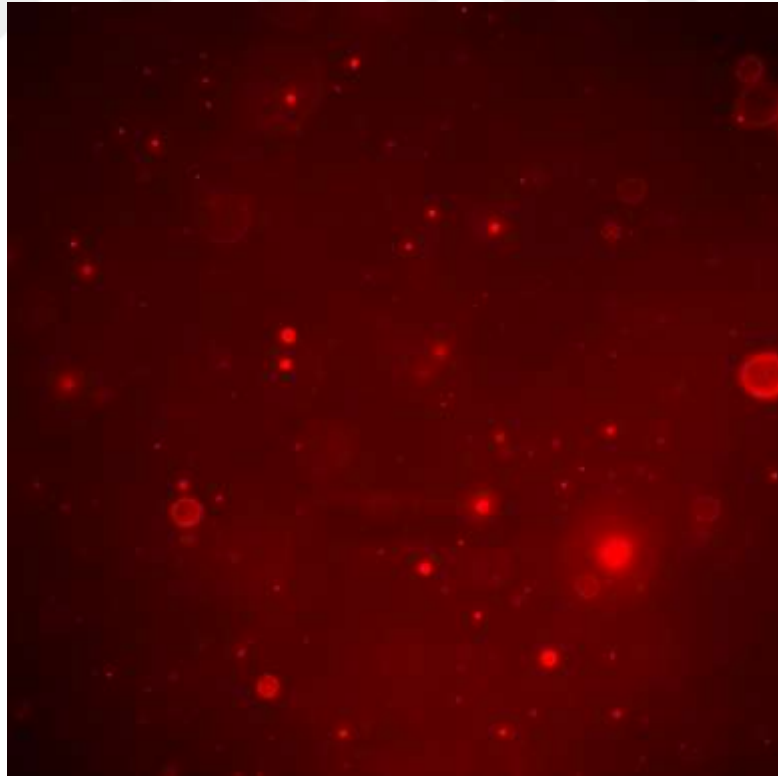
	Başlangıç			3 Ay		
	Damlacık boyutu $\pm$ SS (nm)	PDI	Zeta Pot $\pm$ SS (mV)	Damlacık boyutu $\pm$ SS (nm)	PDI	Zeta Pot $\pm$ SS (mV)
SNEDDS (F45)	115,633 $\pm$ 1,186	0,149	-0,580 $\pm$ 0,151	118,178 $\pm$ 2,886	0,167	-2,123 $\pm$ 0,211
POS-EU-NAC SNEDDS	173,400 $\pm$ 2,136	0,265	9,333 $\pm$ 0,434	169,400 $\pm$ 3,238	0,211	10,293 $\pm$ 0,932

3.4.4.3. Mikroskop Görüntüleme Çalışmalarına Ait Bulgular

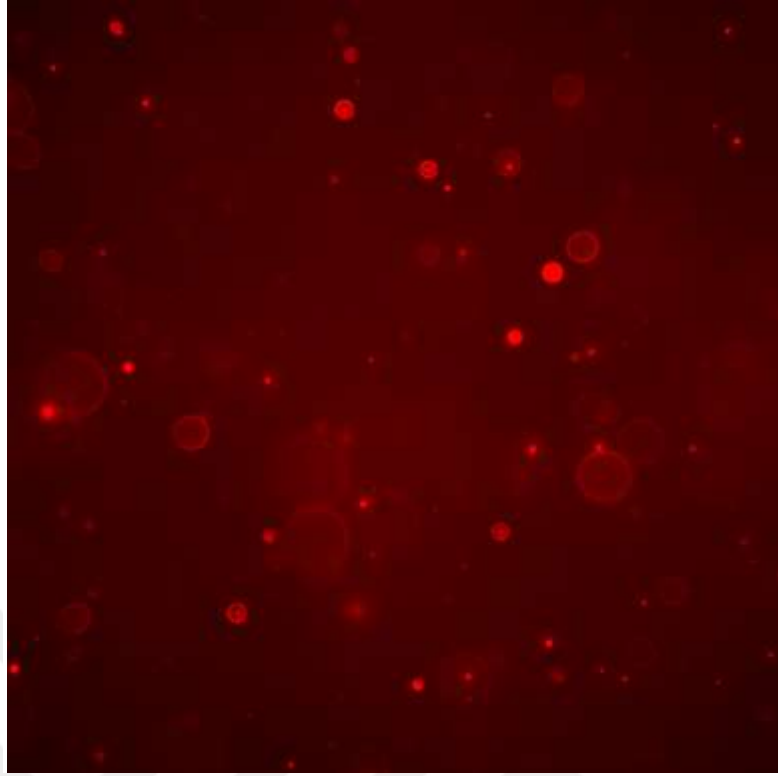
Bölüm 2.2.4.2’de anlatıldığı gibi bir ters geniş alan mikroskobuna (Dmi8, Leica, Almanya) monte edilmiş sCMOS kamera ve floresan aydınlatma sistemi (Olympus, ABD) ile kullanılarak.LASX yazılımı (Leica) ile elde edilen SNEDDS damlacıklarına ait görüntüler Şekil 34 - Şekil 37’te verilmektedir.



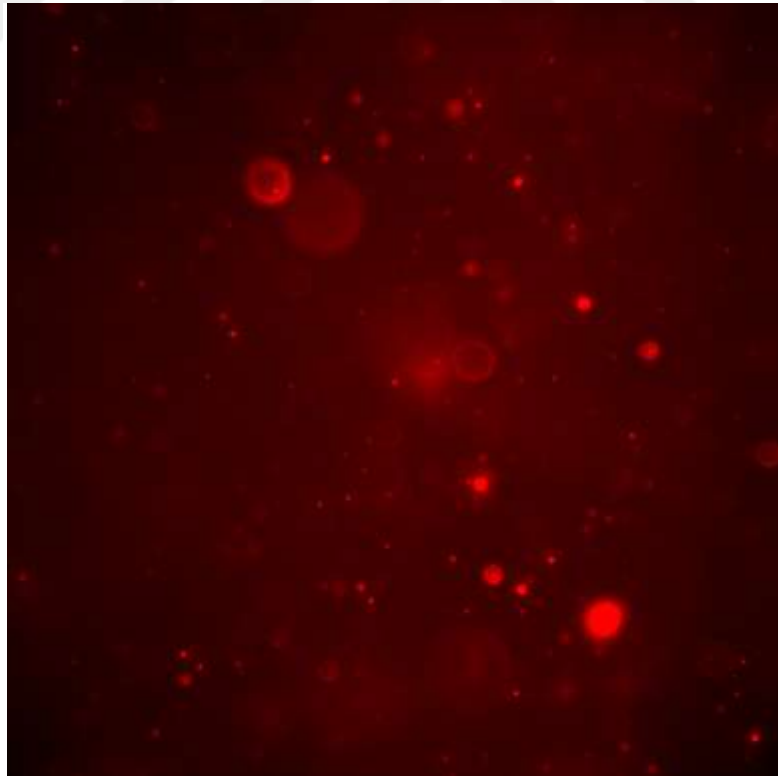
Şekil 34: Boş SNEDDS (F45) Formülasyonu (1:10000 seyreltme oranı)



Şekil 35 : NAC-SNEDDS Formülasyonu (1:10000 seyreltme oranı)



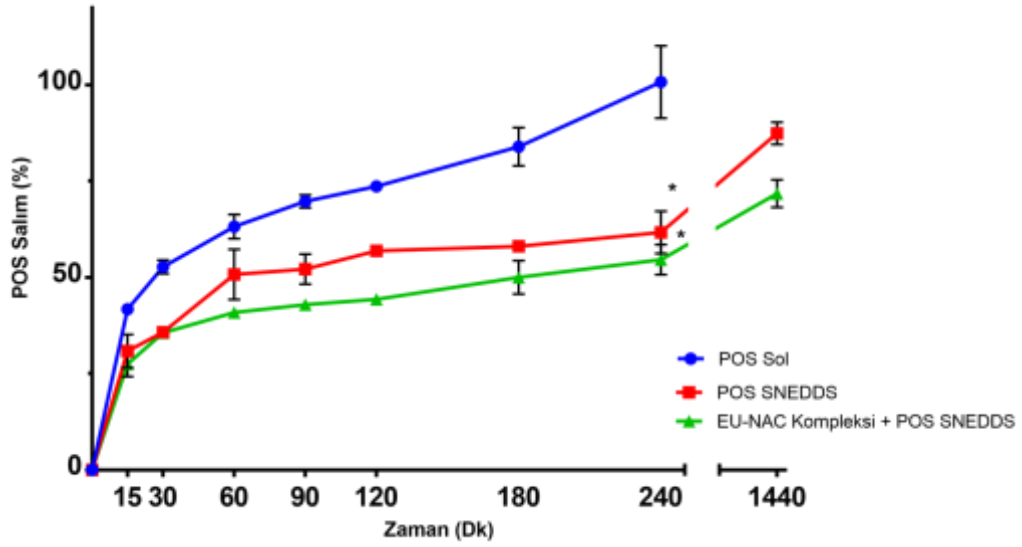
Şekil 36: EU-NAC- SNEDDS Formülasyonu (1:10000 seyreltme oranı)



Şekil 37: POS-EU-NAC-SNEDDS Formülasyonu (1:10000 seyreltme oranı)

3.4.5. POS Salım Çalışmalarına Ait Bulgular

POS'un SNEDDS formülasyonlarından diyaliz torbası kullanılarak elde edilen salım profilleri Şekil 38'de verilmiştir.



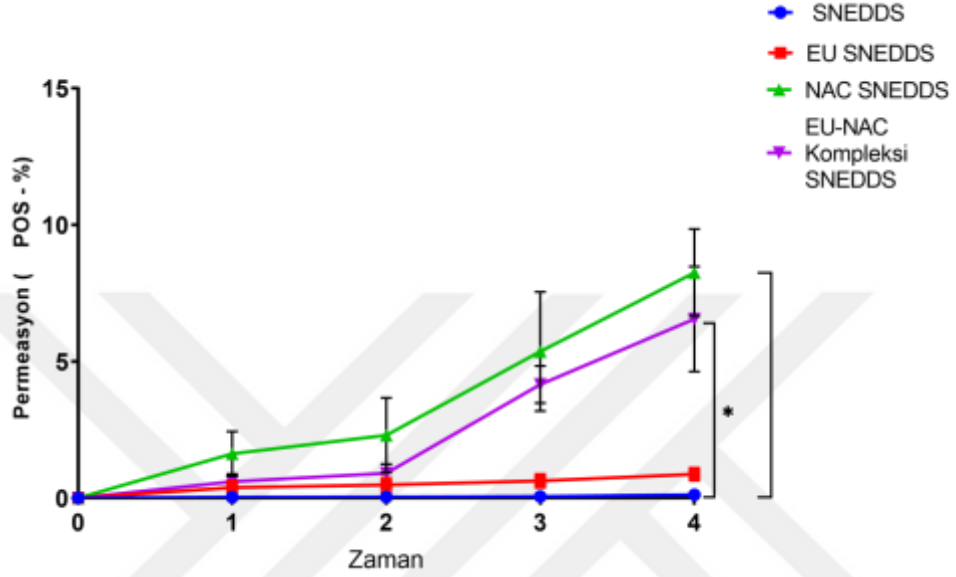
Şekil 38 : SNEDDS formülasyonlarının diyaliz torbası yöntemiyle belirlenen POS salım profilleri

Ayrıca POS için $D_{\text{SNEDDS/SO}}$ değeri 2008,903 $\log D_{\text{SNEDDS/SO}}$ 3,303 olarak bulunmuş ve buradan hareketle Denklem 4'te verilen Nernstsches dağılım yasasına göre SNEDDS yağlı fazı içinde kalan POS miktarı 99,505 olarak hesaplanmıştır.

3.4.6. Mukusa Permeasyon Deneyine Ait Bulgular

SNEDDS formülasyonlarının mukusa penetrasyon özelliklerini araştırmak için yapılan deneylerin sonuçları

Şekil 39'da verilmiştir.

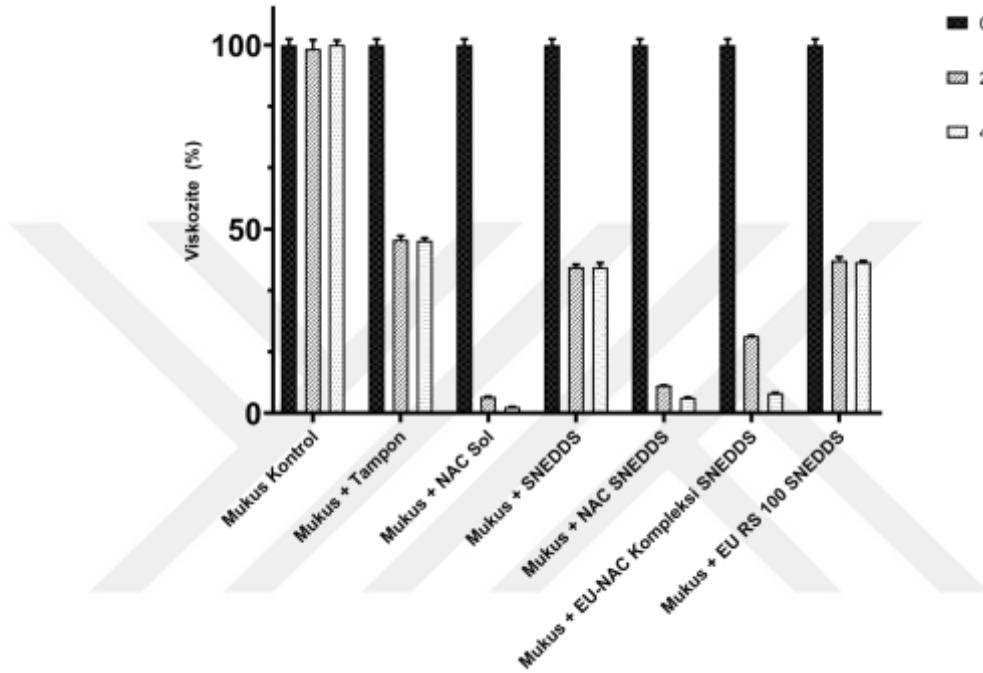


Şekil 39 : SNEDDS formülasyonlarının mukus permeasyon özellikleri

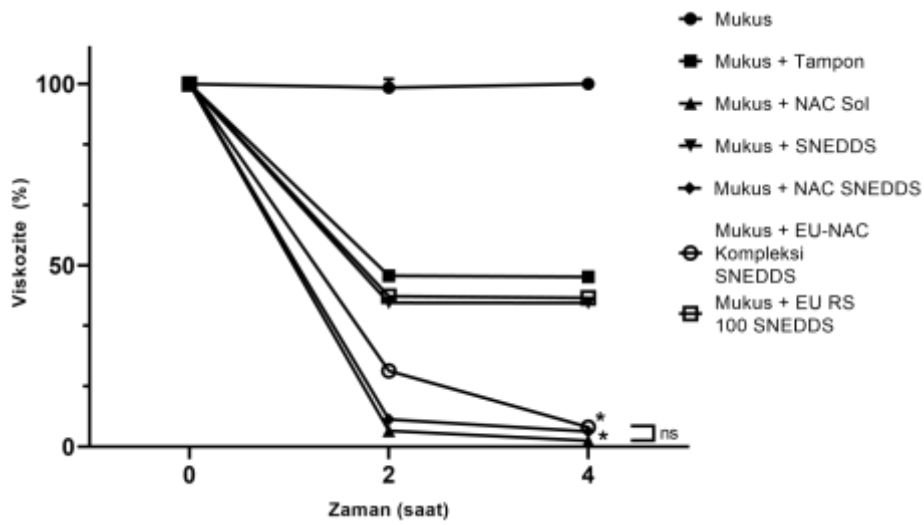
3.4.7. *In vitro* Mukolitik Aktivite Deneyine Ait Bulgular

SNEDDS formülasyonlarının *in vitro* mukolitik etkinliklerini araştırmak için yapılan deneylerin sonuçları

Şekil 40 ve Şekil 41’de verilmiştir.



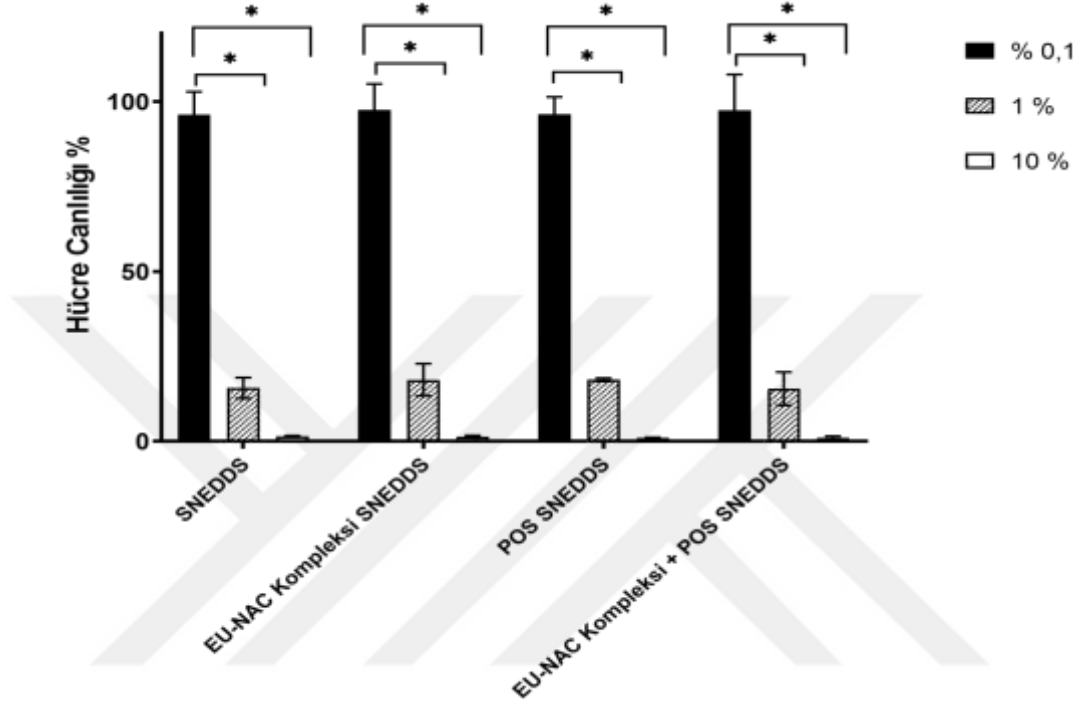
Şekil 40 : *In vitro* mukolitik aktivite deneyine ait sonuçlar



Şekil 41 : *In vitro* mukolitik aktivite deneyine ait sonuçlar

3.4.8. Sitotoksikite Çalışmalarına Ait Bulgular

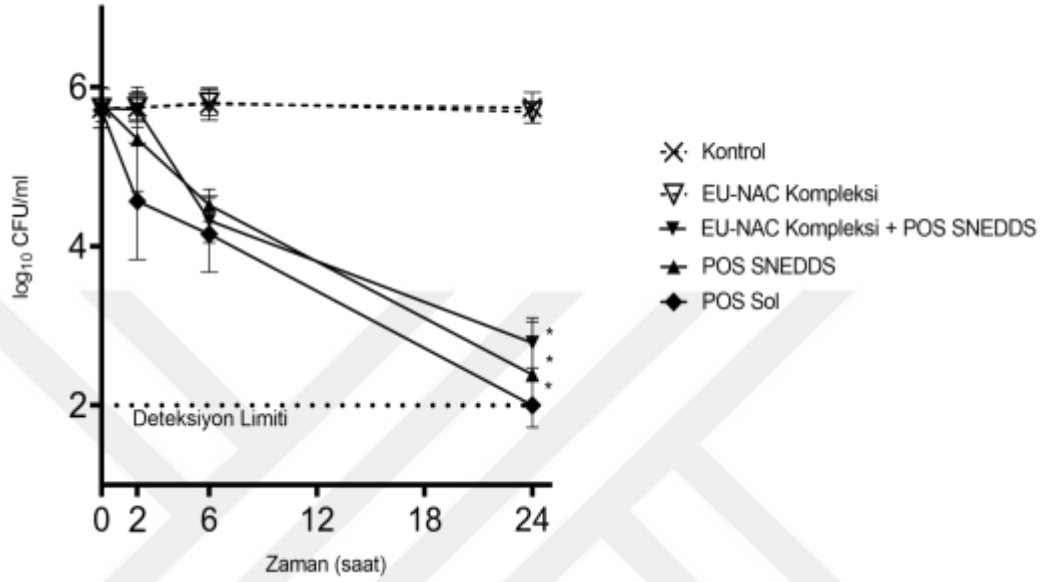
SNEDDS formülasyonlarının HeLa hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmak için yapılan Resazurin testinin sonucunda elde edilen hücre canlılık oranları Şekil 42’de verilmiştir.



Şekil 42 : SNEDDS formülasyonlarının HeLa hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri

3.4.9. *In vitro* Antifungal Etkinlik Çalışmalarına Ait Bulgular

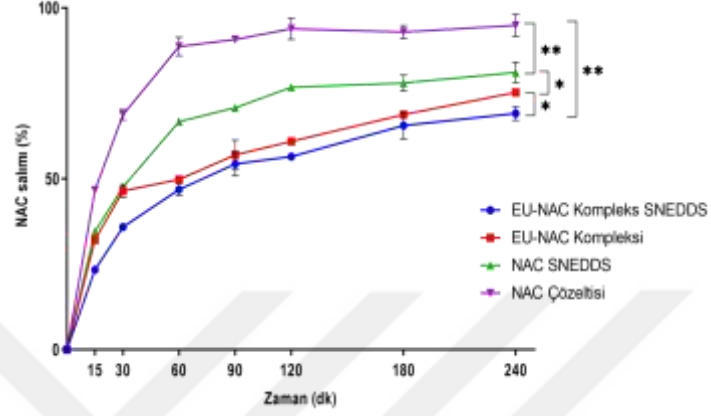
SNEDDS formülasyonlarının *Candida albicans* ATCC 1533 suşu üzerindeki zamana bağlı antifungal aktivitesini araştırmak için yapılan bir zaman-öldürme deneyinin (kill-time assay) sonuçları Şekil 43'te verilmiştir.



Şekil 43 : SNEDDS formülasyonlarının zamana bağlı fungisidal etkisi

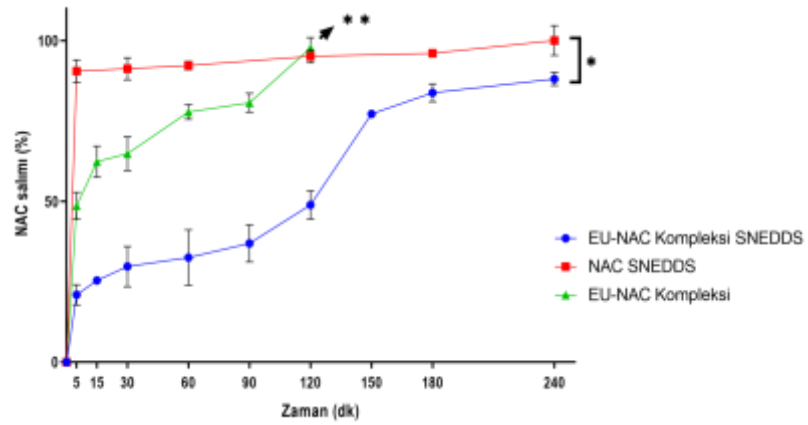
3.4.10. SNEDDS Formülasyonlarından NAC Salımının Belirlenmesi ve Yeni Salım Metodu Geliştirme Çalışmalarına Ait Bulgular

SNEDDS formülasyonlarından diyaliz torbası kullanılarak elde edilen NAC salım profilleri Şekil 44'te verilmiştir.



Şekil 44 : SNEDDS formülasyonlarının diyaliz torbası yöntemiyle belirlenen NAC salım profilleri

SNEDDS formülasyonlarından yeni geliştirilen salım metodu kullanılarak belirlenen NAC salım profilleri Şekil 45'te verilmiştir.



Şekil 45 : SNEDDS formülasyonlarının simültane Ellman Testi yöntemiyle belirlenen NAC salım profilleri

Ayrıca NAC için $D_{\text{SNEDDS/SO}}$ değeri 1.108 olarak bulunmuş ve buradan hareketle Denklem 6'de verilen Nernstsches dağılım yasasına göre SNEDDS yağlı fazı içinde kalan NAC konsantrasyonu % 9,974 olarak hesaplanmıştır.

Tartışma

4.1. Etkin Madde Karakterizasyonu, Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Analitik Validasyonu

4.1.1. POS'un FT-IR spektrumu

Etkin madde POS'un FT-IR spektrumu, 3116 cm^{-1} (OH), 2966 cm^{-1} (CH₂), 1686 cm^{-1} (C = O), 1614 cm^{-1} (C = N) ve 1419 cm^{-1} 'de (CN) spesifik absorpsiyon pikleri taşımaktadır. Bu bantlar, 2884, 2831, 1509, 1451, 1269 ve 828 cm^{-1} 'de bulunan diğer karakteristik absorpsiyon pikleri ile birlikte ilacın karakterizasyonu doğrulamaktadır (Peixiao Tang vd., 2017) (Şekil 23).

4.1.2. Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi ve Analitik Validasyonu

POS'un floresan spektrumunu belirlemek için DMSO içinde 1:1000 oranındaki çözeltisi; Tecan Spark Multimod Mikroplaka Okuyucu kullanılarak eksitasyon dalga boyları 230-300 nm, emisyon dalga boyları 330-410 nm arasında 3 boyutlu olarak taranmış ve POS'un eksitasyon dalga boyunun 260 nm ve emisyon dalga boyunun 360 nm olduğu ve bu bulgunun literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür (Peter Tang & H., 2017).

POS'un floresans miktar tayini yönteminin, doğru ve kesin bir şekilde çalıştığının kanıtlanması için yöntemin validasyonu üzerine çalışılmıştır. Analitik validasyonun kabul edilebilirliğini gösteren validasyon parametrelerinden; doğrusalılık, doğruluk ve geri elde edilebilirlik, tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik belirlenmiştir.

Doğrusallık, çalışılan örnekteki maddenin belirlenen konsantrasyon aralığı içindeki derişimi ile elde edilen yanıtın orantılı olmasının bir göstergesidir. Doğrusallığın belirlenmesi için konsantrasyona karşılık gelen eğri altı alan değerlerinin regresyon değeri hesaplanmalıdır. POS miktar tayini yönteminin doğrusallığını belirlemek için POS'un yöntem 2.2.3'de belirtildiği şekilde standart doğrusu çizilmiştir. Doğrusallık çalışmalarında, çalışılan konsantrasyon aralığında (0-125 µg/mL) konsantrasyon absorbans ilişkisinin doğrusal olduğu görülmüştür. Bu doğrusallığın göstergesi olan r^2 , değeri 0.9995 olarak bulunmuştur.

Miktar tayini yönteminin validasyonu için doğruluk ve geri elde edilebilirlik çalışmaları üç farklı POS konsantrasyonu kullanılarak (5, 10 ve 25 µg/mL) gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmanın sonucunda, elde edilen değerlerde hesaplanan % geri elde değerlerinin ortalaması ve bu dağılımının standart sapması yöntemin doğruluğunu onaylamaktadır. Ayrıca hesaplanan varyasyon katsayısının % 2'nin altında olması da yöntemin doğruluğunu göstermektedir (Tablo 9).

Ardışık ölçümler arasındaki yakınlık derecelerini ifade eden bir parametre olan kesinlik tayininde, yöntemin tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik dereceleri belirlenmiştir. POS'un DMSO içinde 25 µg/mL konsantrasyonu ile yöntemin tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik parametreleri test edilmiştir. Her iki çalışmada da varyasyon katsayılarının % 2'nin altında olması yöntemin kesinliğini kanıtlamaktadır (Tablo 10, Tablo 11)

4.2. Çözünürlük Çalışması

Çözünürlük çalışmasında, Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı gibi çalışılarak, etkin madde POS'un çalışmanın daha sonraki bölümlerinde kullanılması düşünülen eksipiyenler ayrıca distile su ve laktat tampon içindeki çözünürlüğü araştırılmıştır.

Etkin maddenin yüksek çözünürlük gösterdiği belirlenen eksipiyenler arasında Transcutol (62,103 mg / mL) (Capmul 907p (46, 721 mg / mL), PEG 400 (37,831 mg / mL), Capmul MCM (37,302 mg / mL), Labrasol (27,596 mg / mL) Capmul 908p (23,117 mg / mL), Kolliphor RH40 (15,381 mg / mL), Kolliphor EL (12,332 mg / mL), Acconon MC 82 NF (8,876 mg / mL), yer almaktadır (Şekil 16).

4.3. Önceden Etkinleştirilmiş (Pre-activated) Mukoadezif Tiyomer Sentezi ve *in vitro* / *eks vivo* Karakterizasyonu

4.3.1. Suc- β -CD-MNA Sentezi, Yapısal ve Kimyasal Karakterizasyonu

Tiyole CD'ler, çok sayıda farklı polimerden hareketle elde edilen mukoadezif tiyomerler arasında en küçük oligomerik omurgaya sahip olanlardır. CD'lerin tiyollenecek mukoadezif oligomerler olarak ilaç formülasyonlarında kullanılmasına yönelik çalışmalar son yıllarda literatürde görülmeye başlanmıştır (Ijaz, Ahmad, Akhtar, Laffleur, & Bernkop-Schnürch, 2016; Ijaz, Griessinger, vd., 2016; Ijaz vd., 2015a) İlk nesil tiyole CD'ler nispeten zor koşullar altında glikoz halkalarının oksidatif açılması yoluyla elde edilmiş olsalar da, bu türevlerin mukoadezif özellikleri güçlü bir şekilde iyileştirilebilmiştir. Ancak, açık halka yapısı özellikle hidrofobik ilaçlar ve daha uzun süreli ilaç salım özellikleri olan stabil inklüzyon kompleksleri oluşturmak için dezavantajlıdır. Ayrıca, oksidatif halka açma yöntemi ve bunu takiben sisteamin gibi tiyol grubu içeren amino ligandlarının indirgeyici aminasyon yoluyla kovalent bağlanması ile elde edilen CD'ler katyonik özelliktedir. Bu katyonik tiyole CD'ler, hücreler üzerinde önemli bir toksik etki göstermişlerdir. Ayrıca oligomerin katyonik özellikleri istenmeyen bir pH bağımlı ilaç salınımına yol açabilir (Moghadam vd., 2018). Bir yandan mukozada kalış süresini uzatması ve ilacın dissolüsyon özelliklerini iyileştirebilmesi gibi istenen özellikler sağlayabilirken diğer yandan oksidatif halka açılması gibi zahmetli bir sentez yoluyla sentezlenmesi ve elde edilen reaksiyon ürününün sitotoksik sakıncaları mukoadezif CD sentezinde yeni yollar aranmasına yol açmıştır.

Bu çalışmada kullanılan Suc- β -CD molekülü, üzerinde 3,5 substitüsyon derecesi ile karbonil grupları taşımaktadır. Suc- β -CD molekülünün karbonil grupları, halka açma reaksiyonuna gerek olmadan, Şekil 8'de gösterildiği gibi, aromatik ligand Cys-6-MNA ile EDAC ve NHS varlığında konjüge edilerek disülfid bağları aromatik piridil yapısı tarafından korunan Suc- β -CD-MNA sentezi sağlanabilmiştir ve ilk nesil tiyole CD'lerin yukarıda sözü edilen sakıncaları giderilmiştir.

CD türevleri ile daha önce yapılan önceden aktivasyon çalışmalarında kullanılan aromatik ligandın 2-merkaptonikotinic asit olduğu görülmektedir (Asim vd., 2018; Ijaz vd., 2017). Söz konusu araştırmalar esas alınarak bu doktora tez çalışmasına da disülfid bağlarının aromatik 2-merkaptonikotinic asit yapısıyla korunduğu bir Suc- β -CD türevi elde etmek için başlanmıştır (veriler gösterilmemektedir). Bu yöntemde izlenen reaksiyon yolağı sonunda ürünün saflaştırılması için iyon değiştirici reçine kullanılmaktadır. Bu saflaştırma basamağının prensibi 2M NaCl çözeltisi ile iyon değiştirici reçinede tutunan reaksiyon ürününün elüe edilmesi ve ardından 5% DMSO – distile suya karşı diyaliz edilmesidir. Fakat kullanılan derişik NaCl çözeltisi diyaliz aşamasında 0,5 kDa'luk torbaya osmotik basınç farkı sebebiyle hasar verdiği için reaksiyon ürünü saflaştırılamamıştır. Bu nedenle bu aşamada Suc- β -CD'nin 2-merkaptonikotinic asit yerine 6-merkaptonikotinamit kullanılarak sentez yapılmasına karar verilmiş ve çalışmaya bu şekilde devam edilmiştir.

Suc-B-CD-MNA sentezi için çok aşamalı bir reaksiyon izlenmiş ve son ürün için gerekli ara ürünler 6-MNA monomeri, 6,6'-DTNA dimeri ve Cys-6-MNA sırayla sentezlenmiştir.

Reaksiyonun ilk aşamasında gerekli olan 6-MNA monomeri ticari olarak satışa sunulmamaktadır. Bu nedenle öncelikle 6-kloronikotinamit ve tiyoürenin reaksiyonu ile laboratuvar ortamında sentezlenmiştir. Reaksiyon ve saflaştırma işlemlerinden sonra ürün olarak sarı toz şeklinde 6-MNA elde edilmiştir. Bir sonraki aşamada, 6-MNA'nın H₂O₂ ile oksidasyonu sonucunda 6,6'-DTNA dimeri elde edilmiştir. Son aşamada ise Suc- β -CD oligomeri üzerine konjuge edilecek Cys-6-MNA sentezi yapılmıştır Cys-6-MNA, 6,6'-DTNA dimerinin DMSO içinde L-sistein ile disülfid değişim reaksiyonuna girmesiyle elde edilmiştir (Şekil 8).

4.3.1.1. Reaksiyon ara ürünlerinin ¹H NMR Karakterizasyonu

Her bir sentez basamağından sonra elde edilen ara ürünler ¹H NMR spektroskopisi kullanılarak yapısal olarak incelenmiş ve özellikleri konfirme edilmiştir.

6-MNA ve 6-MNA dimeri olan 6,6'-DTNA ^1H NMR spektrumları karşılaştırıldığında (Şekil 17 ve Şekil 18); H_2O_2 ile yapılan dimerizasyon reaksiyonunun başarıyla sonuçlandığını fakat dimerin ^1H NMR spektrumunda. reaksiyona girmemiş monomerden bazı izleri taşıdığı görülmektedir. Spektrumdan elde edilen verilerin kabul edilebilir ve literatürle uyumlu olduğu belirlenmiştir (Elbahwy vd., 2018) (6-MNA: ^1H NMR (DMSO- d_6), δ : 8.93 (d, ^1H , D_2O - değişebilir SH), 8.18 (d, 1H, $J=2.0\text{Hz}$, H-2), 7.94 (br s, ^1H , D_2O - değişebilir NH), 7.76 (dd, 1H, $J=8.8\text{Hz}$, $J=2.0\text{Hz}$, H-4), 7.43 (br s, ^1H , D_2O - değişebilir NH), 7.28 (d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$, H-5). 6,6'-DTNA: ^1H NMR (DMSO- d_6), δ : 8.94–8.89 (m, 1H, H-2), 8.18 (dd, $J=8.4$, 2.4Hz , ^1H , H-4), 8.13 (s br, ^1H , D_2O -değişebilir, NH), 7.71–7.60 (m, 2H, ^1H sonrasında D_2O - değişebilir, ^1H , H-5).)

Aromatik ligand Cys-6-MNA'nın sentezi için kullanılan DMSO ortamında 6,6'-DTNA ve L-sistein arasındaki disülfid değişim reaksiyonu kullanılmıştır. Ligand Cys-6-MNA'nın ^1H NMR Spektrumu L-Cys spektrumu ile karşılaştırılarak incelendiğinde (Şekil 19 ve Şekil 20); Cys-6-MNA spektrumunun, aromatik 6-MNA protonlarının yanı sıra, L-Cys'e ait alifatik protonlarından da izler taşıması, hedef bileşiğin yapısını teyit etmektedir. Bununla birlikte spektrumda, reaksiyona girmemiş monomer ve dimerin bazı izleri ligand spektrumunda görülmektedir. Elde edilen verilerin kabul edilebilir ve literatürle uyumlu olduğu görülmektedir (Elbahwy vd., 2018) (Cys-6-MNA: ^1H NMR (DMSO- d_6 + D_2O), δ : 8.77 (dd, $J=2.6\text{Hz}$, $J=0.8\text{Hz}$, 1H, H-2), 8.18 (dd, $J=8.4\text{Hz}$, $J=2.6\text{Hz}$, 1H, H-4), 7.57 (dd, $J=8.4\text{Hz}$, $J=0.8\text{Hz}$, 1H, H-5), 4.21–4.14 (m, 1H, CH), 3.35–3.19 (m, 2H, CH_2). L-sistein hidroklorit: ^1H NMR (DMSO- d_6), δ : 8.63 (s, 3H, NH_3^+) D_2O - değişebilir, 4.17 (1H, $-\text{CH}$), 3.11–2.91 (m, 2H, CH_2))

Reaksiyon ara ürünlerinin yapılarının ^1H NMR ile doğrulanması çalışmaların ardından, Cys-6-MNA kullanılarak EDAC ve NHS varlığında amit bağı oluşumu yoluyla Suc- β -CD-MNA sentezlendi ve saflaştırma işlemlerinden sonra liyofilize edilerek fibröz yapılı beyaz renkli toz halinde elde edilmiştir (Şekil 8) .

Sentezin ardından Suc- β -CD-MNA'nın yapısının doğrulanması amacıyla FT-IR spektroskopisi, Ellman testi ve MNA testi yapılmıştır.

4.3.1.2. Suc-β-CD-MNA'nın yapısal ve kimyasal karakterizasyonu

FT-IR spektrumu

Suc-β-CD'nin Cys-MNA ile reaksiyona girdikten sonra elde edilen iki üründen alınan spektrumlarda Suc-β-CD'in temel yapısını doğrulayan bantlar görülmüştür. Suc-β-CD-MNA₁ ve Suc-β-CD-MNA₂ modifikasyonlarının oligosakkaritin türevleri olduğunun doğrulanması, 3291 ve 3310 cm⁻¹'de (germe OH), 2928 ve 2927 cm⁻¹'de (germe CH), ve ayrıca sırasıyla 1153/1078/1026/947 ve 1153/1077/1025/947 cm⁻¹ (germe COC, CO) ve ayrıca 1397/1363 ve 1406/1362 cm⁻¹'de (bükülme) görülen bantlara dayanmaktadır. Karboksilik asit grubunun neden olduğu sinyal, 1719 ve 1718 cm⁻¹'de görülmektedir ve öncül molekül ile uyumludur (Şekil 23).

3311 cm⁻¹'de görülen bant, O-H gerilmesine karşılık gelmektedir. 2926 cm⁻¹'de bulunan bant, C-H bağının asimetrik gerilmesinden kaynaklanırken, buna uygun bükülme sinyalleri 1406 ve 1362 cm⁻¹'de görülmektedir. 1200 ila 900 cm⁻¹ (1152/1077/1022/946 cm⁻¹) arasındaki karakteristik desen, glikozidik C-O-C ve C = O'nun simetrik gerilmesine karşılık gelir. Bununla birlikte, 1718 cm⁻¹ 'de görülen belirgin sinyal, Suc-β-CD'nin karboksilik asit modifikasyonu (C = O süksinilin gerilmesi) ile bağlantılıdır (Şekil 23).

Öncüllerin Cys-MNA ile başarılı reaksiyonu, Suc-β-CD spektrumunda ilave bantların ortaya çıkması ile doğrulanmıştır. Suc-β-CD-MNA₁ ve Suc-β-CD-MNA₂ spektrumlarının her ikisinde 1637 cm⁻¹'de görülen güçlü bantlar, Cys-MNA yapısının konjugasyonunun göstergesidir (Şekil 23).

MNA Testi

MNA testinin sonuçlarına göre; oligomer omurgası üzerine Suc-β-CD-MNA₁ molekülünde 221,16±51,68 µmol / g 6-MNA, Suc-β-CD-MNA₂ için ise 521,76±28,25 µmol / g 6-MNA konjuge edildiği görülmüştür (Tablo 12). Bu değerler Suc-β-CD üzerinde konjuge edilmiş 6-MNA miktarlarını göstermektedir.

Ellman Testi

Bölüm 2.2.3.6'da verilen Ellman testi ile Suc- β -CD üzerindeki disülfid bağlarının tamamen aromatik yapılarla korunduğunu doğrulamak amacıyla serbest tiyol gruplarının sayısı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Suc- β -CD üzerinde serbest tiyol grubu sayısının gözardı edilebilecek miktarda düşük (Suc- β -CD-MNA₁ için $6,39 \pm 0,83 \mu\text{mol} / \text{g}$ ve Suc- β -CD-MNA₂ için $8,83 \pm 0,90 \mu\text{mol} / \text{g}$) olduğu ve tamamen korunan stabil bir tiyomer yapısı elde edildiği görülmüştür (Tablo 12). Benzer şekilde serbest tiyol gruplarının gözardı edilebilecek miktarda düşük olduğu ve disülfid bağlarının tamamen aromatik yapılarla korunduğu çalışmalar literatürde bulunmaktadır (Elbahwy vd., 2018; Hintzen vd., 2013).

MNA ve Ellman testlerinin doğrulaması olarak yapılan disülfid testinde, Suc- β -CD-MNA₁ ve Suc- β -CD-MNA₂'in sodyum borohidrit ile indirgenerek disülfid bağlarının parçalanması sonrasında toplam serbest tiyol grubu sayısını gösteren değerler Suc- β -CD-MNA₁ için $423,51 \pm 31,44 \mu\text{mol} / \text{g}$ ve $947,12 \pm 25,21 \mu\text{mol} / \text{g}$ olarak bulunmuştur (Tablo 12). Bu değerlerin yarısı disülfid bağının kopmasından sonra Suc- β -CD üzerinde immobilize olan serbest tiyol gruplarından, diğer yarısı ise ayrılan MNA grubu üzerinde serbest tiyol gruplarından kaynaklanmaktadır. Test sonucunda sodyum borohidrit indirgenme sonrası tiyol grubu miktarının yaklaşık iki katına çıktığı görülmektedir. Bu durum yapılan MNA testinin ve Ellman testinin sonuçlarını doğrulamaktadır.

4.3.2. Suc- β -CD-MNA/POS İnküzyon Komplekslerinin Hazırlanması ve Yapısal Analiz Çalışmaları

Konak CD ve konuk ilaç molekülü arasında bir inküzyon kompleksi oluşması, çözeltide daha yüksek stabilite, artan çözünürlük gibi, konuk bileşenin farmakokinetik parametrelerinin ve fizikokimyasal özelliklerinin iyileştirilmesine neden olur. Bu çalışmada liyofilizasyon yöntemi yoluyla POS'un Suc- β -CD, Suc- β -CD-MNA₁ ve Suc- β -CD-MNA₂ ile 1:1 molar oranda inküzyon kompleksleri hazırlanmış ve bu komplekslerin yapıları FT-IR ve HR CS MAS ile doğrulanmıştır.

FT-IR spektrumlarında görülen, ana yapılar a ait C = O, C = N ve C-N'un gerilme titreşimiyle ilgili bantların inklüzyon kompleksi spektrumlarındaki kaymış dalgalanmaları, Suc- β -CD ve POS arasındaki kompleksleşmenin teyiti olarak düşünölmüştür (Tang et al., 2017).

Eşit miktarda Suc- β -CD ve POS içeren fiziksel karışımının FT-IR analizi, her bir bileşenin bantlarını ayrı ayrı gösteren bir spektrum ortaya koymaktadır. İlgili spektrumda 3340 cm^{-1} (OH), 2934 cm^{-1} (CH), 1707 cm^{-1} (C = O) ve 1149/1076/1022/944 cm^{-1} (COC ve CO)'da görölen sinyaller Suc- β -CD yapısından kaynaklıdır. 2885, 2831 cm^{-1} , 1687 cm^{-1} (C = O), 1615 cm^{-1} (C = N), 1509, 1450, 1269 ve 828 cm^{-1} 'deki bantlar ise karışımındaki POS varlığından kaynaklanmaktadır (Şekil 23).

Sırasıyla Suc- β -CD, Suc- β -CD-MNA₁ ve Suc- β -CD-MNA₂'nin POS ile oluşturduğu inklüzyon komplekslerinin spektrografileri, reaksiyon öncöl maddesi Suc- β -CD'e ait ayırt edici olan bantları taşımaktadır. 3300, 3299 ve 3299 cm^{-1} (OH germe), 2930, 2931 ve 2934 cm^{-1} (asimetrik germe CH), 1719, 1728 ve 1730 cm^{-1} (C = O), 1152/1077/1025/942, 1152/1078/1024/942 ve 1152/1078/1024/942 cm^{-1} (COC ve CO), Suc- β -CD yapısı ile ilgili absorbsiyon bantlarıdır. Ayrıca Suc- β -CD-MNA₁ ve Suc- β -CD-MNA₂'nin POS ile oluşturduğu inklüzyon kompleksleri sırasıyla 1647 cm^{-1} ve 1639 cm^{-1} 'de (Cys-MNA: 1636 cm^{-1}) ve ayrıca 1549 ve 1548 cm^{-1} 'de ek sinyaller göstermiştir (Şekil 23).

Ayrıca, spektrumda açıkça POS ile ilgili olabilecek sinyaller bulunmaktadır. POS'un Suc- β -CD, Suc- β -CD-MNA₁ ve Suc- β -CD-MNA₂'nin ile oluşturduğu inklüzyon komplekslerinden elde edilen bütün spektrumlar, 1686 cm^{-1} 'de POS'a ait C = O gerilmesini gösteren bir bant sergilemiştir ve bu bulgu literatür ile uyumlu bulunmuştur (Peixiao Tang vd., 2017).

Suc- β -CD/POS kompleksinin spektrumunda 1615, 1510, 1451, 1269 ve 823 cm^{-1} dalga boylarında görölen bantlar, Suc- β -CD-MNA1/POS kompleksininin spektrumunda 1510, 1450, 1270 ve 820 cm^{-1} 'de görölen bantlar ve Suc- β -CD-MNA2/POS kompleksinin spektrumunda 2964, 1510, 1449, 1271 ve 822 cm^{-1} dalgaboylarında görölen pikler inklüzyon komplekslerinin yapısını doğrulamaktadır(Şekil 23).

Bu verilere ek olarak, POS'un varlığını tespit etmeyi amaçlayan farklı ve daha hassas bir analitik yöntem olan HR CS MAS spektroskopisi çalışmaları yapılmıştır.

Beklendiği gibi, POS içermeyen Suc- β -CD ve Suc- β -CD-MNA türevleri incelendiğinde, POS molekülünde bulunan florüre atfedilen karakteristik sinyallere rastlanmadı. Buna karşılık, saf POS ve Suc- β -CD ve Suc- β -CD'in yeni sentezlenmiş türevlerinin POS ile oluşturduğu inklüzyon komplekslerinin spektrumları incelendiğinde florüre ait güçlü sinyaller gözlenmiştir. Bu nedenle, florür içeren bir etkin madde olan POS'un Suc- β -CD ve türevleri ile başarıyla enkapsüle edilmesi sonucunda beklediği şekilde inklüzyon komplekslerinin oluşturulduğu HR CS MAS spektroskopisi tarafından doğrulanmıştır (Şekil 24 - Şekil 27) (Würtenberger & Gust, 2014).

4.3.3. Dissolüsyon Testi

POS, pratikte su içerisinde çözünmediği kabul edilen ve log P değeri 5,5 olan oldukça lipofilik bir moleküldür. Şekil 16'da sunulan verilere göre POS'un distile su içindeki çözünürlüğü 0,011 mg/mL (SS $\pm$ 0,001 mg/ mL), pH 4.5 50 mM laktat tamponu içindeki çözünürlüğü 0,012 mg/mL (SS $\pm$ 0,001 mg/ mL) olarak bulunmuştur.

Elde edilen Suc- β -CD/POS Suc- β -CD-MNA₁/POS ve Suc- β -CD-MNA₂/POS inklüzyon komplekslerinin pH 4.5 laktat tamponu içerisindeki çözünme kinetiği hakkında veri elde etmek için yapılan çalışmalarda Suc- β -CD'in POS'un laktat tamponu içerisindeki dissolüsyonunu 5. saatin sonunda 58,616 kat arttırdığı saptanmıştır (Şekil 23). Öte yandan, Suc- β -CD-MNA₁'in POS'un laktat tampon içerisindeki dissolüsyonunu 49,13 kat arttırdığı, Suc-CD-CD-MNA₂'nin ise 33,61 kat arttığı gözlenmiştir (Şekil 23). Her üç kompleksin dissolüsyonunun POS dissolüsyonundan istatistiksel olarak farklı olduğu yapılan istatistiksel analiz sonucunda görülmüştür (p<0.05)

CD moleküllerine tiyol grubu taşıyan yapıların konjugasyonları, CD'lerin ilaç dissolüsyonu üzerindeki etkilerini farklı şekillerde etkileyebilir. Moghadam ve arkadaşları yaptıkları çalışmada β -CD molekülüne -SH grupları konjuge etmiş ve elde ettikleri tiyole β -CD türevlerinin mikonazol nitrat dissolüsyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Elde edilen verilere göre sudaki

çözünürlüğü en düşük doğal CD türevi olan β -CD'nin (Miranda vd., 2011) halkasal omurgasına bağlanan hidrofilik –SH gruplarının sayısı arttıkça; mikonazol nitratın bu CD'lerle hazırlanan komplekslerinin dissolüsyon özelliklerinin de daha çok iyileştiği görülmüştür. Bu sonucun –SH gruplarının hidrofilik yapısıyla açıklanabileceği düşünülmektedir (Moghadam vd., 2018). Ijaz ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada 2-merkaptonikotinic asit kullanarak önceden aktive edilmiş α -CD'in trimetoprim dissolüsyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Sunulan verilere göre α -CD ile hazırlanan trimetoprim inklüzyon kompleksleri molekülün dissolüsyonunu iyileştirmiş fakat CD omurgasına eklenen 2-merkaptonikotinic asit yapılarının sayılarının arması ile trimetoprimin sulu ortamdaki dissolüsyonu yavaşlamıştır (Ijaz vd., 2017).

Bu çalışmada Suc- β -CD-MNA₁/POS ve Suc- β -CD-MNA₂/POS komplekslerinin modifiye edilmemiş Suc- β -CD/POS kompleksine göre daha yavaş çözünme hızı sergilediği görülmüştür. Ayrıca Suc- β -CD-MNA₁/POS kompleksinin dissolüsyon hızının Suc- β -CD-MNA₂/POS kompleksine göre daha yavaş olduğu gözlenmiştir. Bu durumun CD omurgasına hidrofobik 6-MNA'nın entegrasyonunun etkisiyle açıklanabileceği, anyonik karbonhidrat omurgası üzerindeki 6-MNA yapılarının sayısındaki artışa bağlı olarak kompleksin sulu ortamdaki çözünürlüğünün azaldığı düşünülmektedir. Özetlemek gerekirse inklüzyon komplekslerinden POS'un dissolüsyon hızı Suc- β -CD > Suc- β -CD-MNA₁ > Suc- β -CD-MNA₂ biçiminde sıralanabilir.

Yeni sentezlenmiş Suc- β -CD-MNA türevleri ile elde edilen yavaş dissolüsyon özelliklerine rağmen, kompleksleşmemiş POS'un sulu ortamdaki çözünürlüğü göz önüne alındığında elde edilen sonuçların umut vaad edici olduğu söylenebilir.

4.3.4. Mukoadesyon Çalışmaları

CD-ilaç komplekslerinin hazırlanması, mevcut farmasötik ekspiyanlarla formüle edilmesi ve sunulması zor olan ilaçlar için formülasyonların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu durumun ilaç piyasasında CD bazlı farmasötik ürün sayısına yansımaları giderek artmaktadır (T Loftsson vd.,

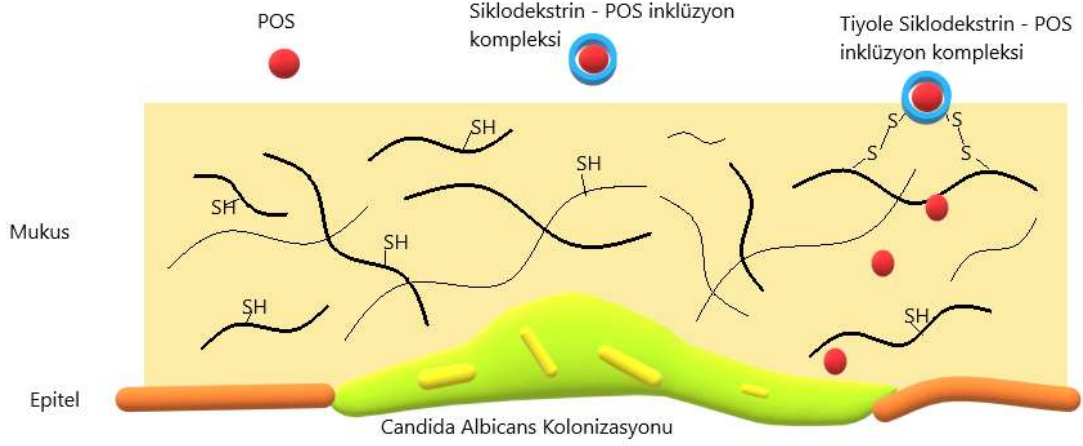
2004). POS da ticari müstahzarı olan Noxafil preparatında sulfobutileter- β -CD ile formüle edilmektedir((Schiller & Fung, 2007)

Son yıllarda daha elverişli güvenlik profillerine sahip CD türevlerinin potansiyel kullanımı, çeşitli yollardan ilaç uygulamaları için CD'lerin genişletilmiş kullanımına olan ilgiyi artırmıştır Mukozal uygulama da bu nedenle en çekici olanlar arasındadır (Moghadam vd., 2018).

Polimerlerin mukoadezif özellikleri, mukus jel tabakasının fonksiyonel kısımları ve mukoadezif polimerlerin arasındaki etkileşimlere bağlıdır. CD'lerin mukoadezif özellikleri, yapılarının mukus glikoproteinlerinin sistein bakımından zengin alanları ile disülfid bağları oluşturmaya izin verecek şekilde modifiye edilmesiyle büyük ölçüde geliştirilebilir (Asim vd., 2018).

Tiyole mukoadezif polimerler, 2000'li yılların başından beri farmasötik teknolojinin ilgi odağındadır. Tüm olumlu özelliklerine rağmen, tiyomerler özellikle inert koşullar altında saklanmadıkça pH 5'de tiyol oksidasyonuna maruz kaldıklarından çözeltilerde ve jellerde nispeten daha az kararlıdır. Tiyol gruplarının mukus tabakası ile temas etmeden önceki bu çok erken oksidasyonu, tiyomer ve mukus tabakası arasındaki etkileşimi bozabilir ve böylece tiyomerlerin etkinliğinin düşmesine neden olabilir. Bu şartlar altında, önceden aktifleştirilmiş tiyol gruplarının kullanımı, tiyomerlerin stabilitesini ve mukadezyonunu arttırmak için etkili bir yaklaşım olabilir (Laffleur & Röttges, 2019).

Disülfid bağlarının polimer üzerinde aromatik yapılarla korunması, polimer mukus tabakası ile temas etmeden önce gerçekleşecek çok erken bir oksidasyonu önleyebilir. Aynı zamanda daha aktif tiyol grupları uzun süre mukozal membranlar ile temas sağlayabilir.



Şekil 46 : Tiyole CD - ilaç inklüzyon komplekslerinin mukustaki glikoprotein yapıları ile disülfid bağları aracılığıyla etkileşerek mukoadezif özellik göstermesinin şematik gösterimi

Çalışmanın bu bölümünde, mukoadezif özelliği olmayan Suc- β -CD molekülüne 6-MNA'nın konjugasyonu sentezlenen Suc- β -CD-MNA türevlerinin mukoadezif özellikleri incelenmiştir. Sentezlenen türevlerin mukoadezif özellikleri ilk olarak POS ile hazırlanan inklüzyon komplekslerinin domuz vajinal mukozası kullanılarak oluşturulan deneysel düzenek üzerinde değerlendirilmiştir. Bu düzenekte 45° açıyla bir platforma sabitlenmiş vajina mukozası üzerinden laktat tamponu geçirilerek mukoza üzerine yapışarak kalabilen CD-ilâç kompleksi miktarı hesaplanmıştır.

Domuz vajinal mukozasında Suc- β -CD-MNA inklüzyon kompleksleri ile yapılan mukoadezyon çalışması, sentezlenen tiyomerlerin geliştirilmiş mukoadezif özellikler gösterdiğini doğrulamıştır. Sentezlenen, Suc- β -CD-MNA₁ ve Suc- β -CD-MNA₂ ile hazırlanan inklüzyon kompleksleri modifiye edilmemiş Suc- β -CD ile hazırlanan komplekslere kıyasla sırasıyla 21,574 ve 37,674 kat daha yüksek mukoadezyon sergilemiştir (Tablo 13). Şekil 29'da gösterildiği gibi, Suc- β -CD-MNA₁ ve Suc- β -CD-MNA₂ inklüzyon komplekslerinin vajina mukozasına yapışabilir ve daha uzun süre kalabilir olduğu gözlenmiştir ve Suc- β -CD-MNA₁ ile hazırlanan inklüzyon kompleksinin % 40'ından fazlası 3 saat sonra vajina mukozasında kalmıştır. Elde edilen sonuçların istatistiksel analizi sonucunda sentez ürünleri olan Suc- β -CD-MNA₁ ve Suc- β -CD-MNA₂'nin mukoadezyon özelliklerinin Suc- β -CD'den anlamlı bir olarak farklılık sergilediği görülmüştür ($p < 0.05$)

Sentezlenen Suc- β -CD ve Suc- β -CD-MNA türevlerinin mukoadezif özellikleri ayrıca yazılım kontrollü penetrometre (TA-XT cihazı) kullanılarak incelenmiştir.

Bölüm 2.2.3.11’de detaylı olarak açıklandığı gibi Suc- β -CD, Suc- β -CD-MNA₁ ve Suc- β -CD-MNA₂ inklüzyon komplekslerinin vajinal mukozadan ayrılması için gerekli olan çekme kuvveti belirlenmiş ve mukoadezif özellikleri saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar, modifiye edilmemiş Suc- β -CD’ye kıyasla Suc- β -CD MNA₁ ve Suc- β -CD-MNA₂’yi mukozadan ayırmak için gereken kuvvetin sırasıyla 4,78 kat ve 7,40 kat daha fazla olduğunu göstermiştir. Üzerinde daha çok 6-MNA konjuge edilen Suc- β -CD-MNA₂’nin Suc- β -CD MNA₁’e göre 1,55 kat daha mukoadezif olduğu gözlenmiştir (Tablo 14).

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda hazırlanan inklüzyon komplekslerinin mukoadezif özellikleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Mukoadezif özelliğin belirlenmesi için izlenen her iki metottan elde edilen sonuçlara dayanarak MNA varlığının oligomerin mukoadezif özelliği arttırdığı, Suc- β -CD-MNA türevleri karşılaştırıldığında ise CD omurgasına konjuge edilmiş işlevsel grupların miktarındaki artış ile mukoadezif özelliklerinin Suc- β -CD < Suc- β -CD-MNA₁ < Suc- β -CD-MNA₂ sırasıyla arttığı saptanmıştır.

İjaz ve arkadaşları, oksidatif halka açılmasını izleyen indirgeyici aminasyon yoluyla sisteaminin kovalent bağlanmasına dayanan iki aşamalı bir sentezle mukoadezif tiyole β -CD (β -CD-Cys) elde etmişlerdir (İjaz vd., 2015a). Sözü geçen çalışmada β -CD-Cys, değiştirilmemiş β -CD ile karşılaştırıldığında, domuz bağırsak mukozasında 49 kat geliştirilmiş tutunma süresi ve domuz bukkal mukozasında 35 kat daha fazla adezyon sergilemiştir. Başka bir çalışmada ise α -CD’in oküler rezidansı, sisteaminin oligomerik omurga üzerinde immobilizasyonu ile elde edilen mukoadezif türevi ile 32 kat arttırılmıştır (İjaz, Ahmad, vd., 2016). Bu çalışmada elde edilen veriler literatürle karşılaştırıldığında, Suc- β -CD-MNA türevlerinin mukoadezif özelliklerindeki gelişmenin kabul edilebilir olduğu görülmektedir.

4.3.5. Sitotoksosite Çalışmaları

CD'lerin ve bunların sentetik türevlerinin potansiyel kullanım alanları içerisinde stabilite, çözünürlük ve biyoyararlanım gibi ilaçların bazı özelliklerinin iyileştirilmesi sayılabilir (Del Valle, 2004). Güvenlik, farmasötik formülasyonlarda kullanılması amaçlanan yeni eksipiyenler için birincil bir husustur. Pratikte kullanılmaya başlanmadan önce CD'lerin biyolojik davranışları ile birlikte toksikolojik özellikleri kapsamlı bir şekilde araştırılmalıdır (Moghadam vd., 2018).

Hücre kültürü çalışmaları formülasyonların sitotoksik özelliklerini belirlemek için oldukça sık başvurulmuş bir yöntemdir. Bu çalışmada HeLa hücreleri üzerinde resazurin testi yapılarak Suc- β -CD ve sentezlenen Suc β -CD-MNA türevlerinin sitotoksik özellikleri araştırılmıştır.

Resazurin testi konsepti, floresan olmayan resazurin boyasının metabolik olarak aktif hücreler tarafından floresan resofurine indirgenmesine dayanır. Resazurin (7-hidroksi-3H-fenoksazin-3-on 10-oksit), canlı hücreler tarafından pembe renkli ve oldukça kırmızı floresan resorufine geri dönüşümsüz olarak indirgenene kadar zayıf bir şekilde floresan olan mavi bir boyadır. Ölçülen floresans yoğunluğu canlı hücrelerle doğrudan ilişkilidir (Elbahwy vd., 2018)

Suc- β -CD ve mukoadhezif Suc β -CD-MNA türevlerinin sitotoksik özelliklerini belirlemek için yapılan resazurin testi için Bölüm 2.2.3.12'de anlatıldığı gibi çalışılmıştır. 4 saatlik inkübasyon süresi sonunda elde edilen verilere göre Suc- β -CD ve sentezlenen Suc- β -CD-MNA türevlerinin herbirinin %0,5, %1, ve %5'lik konsantrasyonlarda uygulandıklarında HeLa hücrelerinin canlılık oranının %95 üzerinde olduğu ve sitotoksik bir profil göstermedikleri gözlenmiştir (Şekil 30) Suc- β -CD ve sentezlenen Suc- β -CD-MNA türevlerinin, %0,1, %1 ve %5'lik konsantrasyonlarının uygulanması sonucu elde edilen HeLa hücreleri canlılık oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$) (Şekil 30).

Literatürdeki bazı çalışmalar, tiyol gruplarının hücre bağlanma işleminde hücre içi adezyon molekülü olan ICAM-1'in ekspresyonunda kilit düzenleyicileri olduklarını göstermiştir. Örneğin, L-sistein, reaktif oksijen yolağını inhibe ederek ICAM-1 ekspresyonunu baskıladığı için monositlerin

endotel hücrelere keton kaynaklı adezyonunu bloke eder (Kiss vd., 2010; Mukherjee, Mishra, Mukhopadhyay, & Hoidal, 2007). Buna karşın elde edilen sonuçlar, tiyol gruplarının hücreler ile etkileşimlerinin hücre canlılığı üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Ancak, hücre canlılığının oligomerin yükünden belirgin bir şekilde etkilendikleri saptanmıştır. Katyonik CD-SH türevlerinin yüksek toksisitesi, heparin sülfat proteoglikanları gibi anyonik hücre yüzey alt yapıları ile iyonik olarak etkileşime giren ikincil amino grupları ve ardından hücre zarı bütünlüğünü bozan, fizyolojik pH'daki pozitif yüküyle açıklanmıştır (Kiss vd., 2010; Mukherjee vd., 2007).

Literatürde yer alan çalışmalarda katyonik β -CD türevlerinin ortaya koydukları sitotoksikite profilleri ve bu çalışmada ile elde edilen %95 hücre canlılık oranı gözönünde bulundurulduğunda, sentezlenen Suc- β -CD-MNA türevlerinin halka açılması yoluyla sentezlenen katyonik CD türevlerine göre daha güvenli olduğu söylenebilir (Ijaz vd., 2015b, 2015a).

4.3.6. *In vitro* antifungal etkinlik çalışmaları

Farmasötik endüstride CD'ler, ilacın çözünürlüğünü ve stabilitesini artırmak, formülasyonun fiziksel özelliklerini değiştirmek, formülasyonların hoş olmayan tat ve kokularını maskeleyerek için geleneksel olarak kullanılmaktadır. Bu durum antifungal formülasyonlar için de geçerlidir ve CD'ler, antifungal ajanların topikal, oral ve intravenöz farmasötik formlarında yaygın olarak kullanılırlar .

Bununla birlikte, CD'lerin kullanımı, etkin maddenin biyosidal aktivitesini değiştirilebilir. İnklüzyon kompleksi oluşturulmuş biyositler, kompleks halinde olmayan biyositlerden önemli ölçüde daha az veya daha çok aktif olabilir. Cevher ve arkadaşları yaptıkları çalışmada natamisin ile γ -CD arasında inklüzyon kompleksi oluşturarak, inklüzyon kompleksinin daha düşük natamisin konsantrasyonlarında antifungal etkin madde ile aynı MİK değerini sağladığını ve sinerjik bir etki ortaya koyduğunu göstermişlerdir (Cevher, Şensoy, Zloh, & Mülazımoğlu, 2008). Di-n-desildimetilamonyum katyonunun antifungal mekanizması ile ilgili bir çalışmada, CD inklüzyon kompleksinin tipine bağlı olarak, komplekslerin, kompleks halinde olmayan antifungal madde ile aynı seviyede aktivite sergilediği gösterilmiştir (Leclercq, Lubart,

Dewilde, Aubry, & Nardello-Rataj, 2012; Macaev, Boldescu, Geronikaki, & Sucman, 2013). Nikolic ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada biyokanın A ve HP- β -CD ile hazırladıkları inklüzyon kompleksinin kompleksleşmemiş ilaca kıyasla, *Candida albicans* üzerinde daha etkili olduğunu fakat *Aspergillus Niger*'e karşı antifungal etkinlik sergilemediğini göstermişlerdir (Nikolic vd., 2018) .

Antifungal etkinliğin belirlenmesi için yapılan zaman - öldürme testi, *in vitro* bir antimikrobiyal test materyaline (ilaca) maruz kaldıktan sonra belirlenen bir örnekleme süresi içinde bir mikroorganizma popülasyonundaki değişimi ölçer. İlaç veya ilacın seyreltik çözeltisi belirli bir sıcaklıkta belirli bir süre boyunca bilinen bir mikroorganizma popülasyonu ile temas ettirilir. İlaç daha sonra istenilen zamanda nötralize edilir ve hayatta kalan organizmalar sayılır.

Bu çalışmada, yapılan zaman - öldürme testinde aynı etkin madde konsantrasyonundaki POS ile Suc- β -CD-MNA/POS Suc- β -CD-MNA₁/POS ve Suc- β -CD-MNA₂/POS inklüzyon komplekslerinin antifungal aktiviteleri *Candida albicans* ATCC 1533 suşuna karşı değerlendirilmiştir. Sözü edilen etkin madde ve inklüzyon komplekslerinin antifungal aktiviteleri arasında 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. ($p>0.05$). Buna karşılık tek başına POS'un ve inklüzyon komplekslerinin antifungal aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p<0.05$) (Şekil 31) Buradan hareketle kompleksleşmenin etkin maddenin antifungal etkisini değiştirmede ve hazırlanan inklüzyon komplekslerinin *Candida albicans* ATCC 1533 suşuna karşı en az POS kadar etkili olduğu söylenebilir.

4.4. Mukusa Penetre Olabilen SNEDDS Formülasyonlarının Hazırlanması ve *in vitro* / *eks vivo* karakterizasyonu

4.4.1. SNEDDS Tipi Formülasyonların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Mukusa penetre olabilen SNEDDS formülasyonlarının hazırlanması için. önce POS'un yüksek çözünürlük göstereceği bir SNEDDS yağlı fazı formüle etmek amacıyla etkin maddenin mevcut ekşiyanlar içindeki çözünürlüğü taranmıştır Bunun için Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı gibi çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar .Şekil 16'da gösterilmiş ve Bölüm 4.2'de tartışılmıştır.

Denenen çok sayıdaki ekşiyan arasından Capmul 907p (yağ), Capmul 908p (yağ), Capmul MCM (yağ), Kolliphor EL (surfaktan), Kolliphor RH40 (surfaktan), Acconon MC 82 NF (surfaktan), Transcutol (ko-solvan), PEG 400 (ko-solvan) SNEDDS formülasyonlarında kullanılmak üzere seçilmiştir Ayrıca kaynaklarda POS'un içerisinde yüksek çözünürlük 140 (mg/mL) gösterdiği bilgisi yer alan DMSO da formülasyonlar hazırlanırken ko-solvan olarak kullanılmıştır ("Websayfası - Posaconazole", 2019) Seçilen ekşiyanların literatürde SNEDDS hazırlamak için oldukça yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir (Müllertz, Ogbonna, Ren, & Rades, 2010)

POS'un içerisinde yüksek çözünürlük gösterdiği Transcutol (62,103 mg/mL) ve Labrasol (27,596 mg/mL) ekşiyanları ile yapılan formülasyon ön denemelerinde nanoemülsiyon elde edilemediği için sonraki aşamalarda kullanılmamıştır.

Seçilen ekşiyanların Tablo 7'de verildiği gibi çeşitli oranlarda kombinasyonları ile hazırlanan 48 adet SNEDDS formülasyonu incelenmiştir. Literatürde vajinal uygulama için geliştirilen SNEDDS formülasyonları ile yapılan çalışmalarda Köllner ve arkadaşlarının 1+2, Kassem ve arkadaşlarının 1+9 gibi farklı oranlarda seyreltme uygulamaları görülmektedir (Kassem, Mohsen, Ahmed, & Essam, 2016; Köllner vd., 2017b). Bu çalışmada ise SNEDDS yağlı fazları damlacık boyutu, zeta potansiyel ve polidispersite indeksi özelliklerinin incelenmesinden önce su veya tampon içinde 1+10 oranında seyreltilmiştir.

Hazırlanan 48 formülasyon arasında faz ayrımı sebebiyle emülsiyon oluşturmadığı gözlenen F1, F14, F15, F16, F19, F20, F21, dışında kalan 41

adet formülasyonun damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyelleri saptanmıştır (Tablo 15). Elde edilen sonuçlarda en düşük damlacık boyutuna sahip formülasyonun $13,037 \pm 0,194$ nm ile F17 olduğu, en büyük damlacık boyutuna sahip formülasyonun ise $338,300 \pm 8,202$ nm ile F4 olduğu gözlenmiştir. Formülasyonların zeta potansiyelleri incelendiğinde tüm formülasyonların nötral ya da nötrale yakın pozitif veya negatif değerlere sahip oldukları görülmektedir. Bunun kullanılan tüm ekşiyanların non-iyonik bileşenler veya zayıf iyonik özellikteki yağ asitleri içeren bileşenler olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir ve durum literatürle uyumluluk göstermektedir. (Müllertz vd., 2010)

Test edilen formülasyonlarda, optimizasyon şartı olarak; mukusa penetrasyon için optimum özellik olan <200 nm damlacık boyutu ve nötral ya da nötrale yakın negatif yük ve düşük polidispersite indeksi aranmıştır. Karakterizasyon çalışmasından sonra, diğer deneylere F6, F8, F10, F38, F40 ve F45 ile devam edilmesine karar verilmiştir

F6, F8, F10, F38, F40 ve F45 bir sonraki aşamada % 1 (a/h) POS ile yüklenerek, POS yüklü formülasyonlar hazırlandıktan hemen sonra (sıfırıncı saat) ve mukusun yenilenme süresi olan dördüncü saat sonunda formülasyonların damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır. Formülasyonlara etkin madde POS'un % 1 (a/h) oranında eklenmesinin F45 formülasyonu hariç diğer 5 formülasyon için damlacık büyüklüğünde artışa sebep olduğu gözlenmiştir. (Tablo 15 ve Tablo 16).

Bu 6 formülasyonun su ve pH 4.5 laktat tamponu içerisinde 4 saat süren stabilite testleri sonucunda ön plana çıkmıştır. F45 formülasyonunun başlangıçta $113,667 \pm 8,256$ nm damlacık boyutuna, 0,169 PDI değerine ve $0,767 \pm 0,109$ zeta potansiyele sahip olduğu görülmüştür. 4 saat sonunda ise $133,723 \pm 4,200$ nm damlacık boyutuna 0,155 PDI değerine ve $-0,736 \pm 0,145$ zeta potansiyele sahip olduğu gözlenmiştir. Değerlerdeki bu değişime rağmen formülasyonun 4.saat sonunda da mukus permeasyonu için optimum özellikte olduğu görülmektedir (Netsomboon & Bernkop-Schnürch, 2016)

Bir sonraki aşamada yukarıda sözü edilen F6, F8, F10, F38, F40 ve F45 formülasyonları ile log D çalışmasına geçilmiştir

4.4.2. Log D Hesaplanması

Kendiliğinden emülsifiye olan ilaç taşıyıcı sistemler son yıllarda mukozal yolla ilaç uygulanması için potansiyel bir platform olarak kabul edilmeye başlanmıştır. Bununla birlikte özellikle bu tipteki formülasyonları optimize etmek için gerekli *in vitro* - *in vivo* korelasyon çalışmaları bir deneme-yanılma yaklaşımı ile yürütülmektedir. Bu durumun başlıca nedeni, SNEDDS'den ilaç salımını belirlemek için uygun yöntemlerin bulunmaması ve kullanılmakta olan yöntemlerin zahmetli olmasıdır. Çünkü ilacın salım ortamı içindeki miktarının belirlenmesi için yağlı damlacıkların ortamdaki ayrılması gerekir.

SNEDDS formülasyonlarının geliştirilmesinde yürütülen salım çalışmalarının çoğunda, diyaliz membranlar veya elde edilen salım profili üzerinde büyük bir etkiye sahip olan filtreler gibi bir ayırma membranları kullanılmaktadır (Zupančič, Griebinger, vd., 2016; Zupančič, Partenhauser, Lam, Rohrer, & Bernkop-Schnürch, 2016). Ayrıca, yapılan çoğu çalışmada da sink koşul gerekliliğine her zaman uyulmadığı görülmektedir (Andreas Bernkop-Schnürch & Jalil, 2018). Literatürde yer alan bir derleme makalede membran içermeyen ve sink koşul sağlayan bir salım modelinin geliştirildiği takdirde yararlı olabileceği fikrine yer verilmiştir (Andreas Bernkop-Schnürch & Jalil, 2018). Buradan yola çıkarak çalışmamıza bu tip bir yöntemin geliştirilmesi de dahil edilmiştir. Bu düşünceye göre

SNEDDS'den ilaç salımı, lipofilik bir yağlı fazdan sulu bir faza basit bir difüzyon işlemine dayandığından, salım davranışını karakterize etmenin muhtemelen daha anlamlı bir yolu, dağılım katsayısının ($\log D_{\text{SNEDDS}} / \text{SO}$) belirlenmesidir. Bu nedenle salım çalışmalarına geçilmeden önce POS'un seçilen altı formülasyondaki log D değerlerinin hesaplanması gerçekleştirilmiştir.

Log D, basitçe bileşiğin iki faz içerisindeki çözünürlük farkının bir ölçümü olduğundan, ilacın çözünürlüğünün SNEDDS yağlı fazında ve salım ortamında ayrı ayrı ölçülmesiyle belirlenmiştir. F6, F8, F10, F38, F40 ve F45

için POS'un yağlı faz / pH 4.5 50 Mm laktat tamponundaki log D değerleri hesaplanmıştır. Tüm formülasyonlarda POS'a ait log D değeri 3'ten büyük olarak bulunmuştur (Tablo 17).

Log D _{SNEDDS / SO} değerinin 3'ün altında olması oldukça yüksek miktarda ilacın hemen SNEDDS damlacıklarından salınacağını göstergesidir. log D değerinin 5'ten büyük olması durumunda ise ilaç salımının yavaşlaması beklenir ki literatürde bu tip bulgulara rastlanmaktadır. Örneğin log D > 5 olan fenofibrat, sinnarizin gibi oldukça lipofilik ilaçların damlacıkların içerisinde çok uzun süre kalma eğilimli oldukları ve salımın yavaş olduğu yapılan bir çalışmada gösterilmiştir.(Andreas Bernkop-Schnürch & Jalil, 2018).

Yukarıda yapılan çalışmalar ışığında POS içeren F6, F8, F10, F38, F40 ve F45 formülasyonları damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyelleri, 4 saatlik stabiliteleri ve POS'unbu formülasyonlar için log D değerleri göz önüne alınarak bir değerlendirme yapılmış ve çalışmamızın bundan sonraki bölümüne % 20 Capmul 907,% 10 Kolliphor EL,% 45 Acconon MC8-2 EF ve% 25 DMSO içeren içeren F45 formülasyon ile devam edilmesine karar verilmiştir.

4.4.3. EU-NAC Kompleksinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

NAC oldukça yaygın kullanılan mukolitik bir ajandır (Rohrer vd., 2016). SNEDDS formülasyonlarından etkin madde salımının iyonik etkileşimlerle kontrol edilebileceği fikrinden hareketle hem formülasyonların mukus penetrasyon yeteneklerini arttırmak hem de mukolitik ajan NAC'ın kontrollü salımını sağlayarak artırmak amacıyla NAC ve Eudragit RS 100 polimeri arasında Şekil 10'da şematik olarak anlatıldığı gibi iyonik etkileşimlere dayanan bir polimer - ilaç kompleksi oluşturulmuştur (Andreas Bernkop-Schnürch & Jalil, 2018). Bilindiği kadarıyla bu çalışma Eudragit RS 100 gibi iyonik bir polimer kullanılarak SNEDDS'ten ilaç salımının kontrol edilmesi amacıyla yapılan ilk çalışmadır.

Bunun için, suda çözünmeyen katyonik EU RS 100 polimerinin etil alkoldeki çözeltisine pH 4'te anyonik NAC çözeltisi damla damla eklenmiş ve iyonik etkileşimle çöken kompleks liyofilizasyon yöntemi ile saflaştırılmıştır.

İyonik etkileşime dayalı polimer – ilaç komplekslerinin literatürde çok sayıda farklı amaç için hazırlandığı görülmektedir. Lupo ve arkadaşları katyonik kitosan polimerinden hareketle sentezlenen tiyole kitosan türevleri ile anyonik sodyum dodesil sülfat arasında polimerin lipofilitesini arttırmak üzere bir kompleks hazırlamışlar ve elde ettikleri ürünü SNEDDS içinde formüle etmişlerdir . Eudragit ticari markası ile satışa sunulan polimetakrilik asit polimerleri, taşıdıkları iyonik grubun yüküne ve miktarına bağlı olarak pek çok farklı tipte formülasyondan kontrollü, geciktirilmiş veya hemen salım sağlanmasına olanak tanıyan ve farmasötik endüstrisinde uzun zamandır kullanımda olan polimerlerdir. (Jenquin & McGinity, 1994; Wagner & McGinity, 2002). Eudragit RS 100 katerner amonyum grubu taşıyan katyonik bir polimerdir ve anyonik ilaçların kontrollü salımını sağlanmasında literatürde Eudragit RS ile yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Cuña, Vila Jato, & Torres, 2000; Mehta, Chawla, Sharma, & Pawar, 2013; Narisawa, Nagata, Hirakawa, Kobayashi, & Yoshino, 1996).

Bu çalışmada hazırlanan EU-NAC kompleksi FT-IR ile yapısal olarak analiz edilmiş ve Ellman testi kullanılarak içerdiği NAC miktarının belirlenmiştir.

FT-IR

Katyonik Eudragit RS 100 polimerindeki amonyum grubundan kaynaklanan pozitif yük ile NAC'ın karboksilik asit grubu arasındaki negatif yükün etkileşimine dayanan iyonik kompleksin yapısı FT-IR ile doğrulanmıştır (Şekil 33). Elde edilen FT-IR spektrumunda EU-NAC kompleksinin -N-H gerilme bandının 3400 cm^{-1} 'de olduğu görülmüştür. Görülen bu kayma Eudragit RS 100 ve NAC arasındaki iyonik etkileşimi doğrulamaktadır

Miktar Tayini

Elde edilen EU-NAC kompleksinin NAC içeriği miktarı Ellman Testi ile bulunmuştur. 400 mg EU RS 100, ve 160 mg NAC'tan hareketle elde edilen, 80 mg kompleksin etil alkol içinde çözündürülmesinden sonra uygulanan miktar tayininde $20 \pm 1,40$ mg NAC içerdiği gözlenmiştir. Buradan hareketle kompleksin elde edilmesi esnasında distile su ile yıkama işleminde fiziksel ve

iyonik etkileşimlere maruz kalmadığı için bir miktar NAC'ın ortamdan uzaklaştırıldığı söylenebilir.

4.4.4. POS-EU-NAC-SNEDDS Hazırlanması ve Karakterizasyonu

EU-NAC kompleksi ile yapılan FT-IR analizi sonrasında optimum formülasyon olarak belirlenen F45 formülasyonu kullanılarak mukolitik EU-NAC kompleksi ve %1 POS içeren SNEDDS formülasyonlarının hazırlanmasına geçilmiştir. Karşılaştırma yapabilmek amacıyla Tablo 8'de verilen formülasyonlar ayrı ayrı hazırlanmış ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarına geçilmeden yağlı fazlar yine distile su veya laktat tamponu 1+10 oranında emülsifiye edilmiştir.

Tablo 18'de sunulan verilerde görüldüğü gibi başlangıçta SNEDDS formülasyonu $115,633 \pm 1,186$ nm damlacık boyutuna ve $-0,580 \pm 0,151$ mV zeta potansiyele sahiptir. Eudragit RS 100 yüklü EU-SNEDDS formülasyonunun damlacık boyutu $106,200 \pm 0,889$ nm ve zeta potansiyeli $27,550 \pm 1,457$ mV olarak bulunmuştur. Boş formülasyonun Eudragit RS 100 polimeriyle yüklendikten sonra gözlenen zeta potansiyelindeki bu dramatik artışın Eudragit RS 100 polimerindeki pozitif yüklü katerner amonyum gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bulgu literatür ile de uyumludur (Elbahwy vd., 2018). Ayrıca bu formülasyon için elde edilen PDI değerlerinin zamanla arttığı, buna rağmen halen kabul edilebilir bir aralıkta olduğu görülmektedir.

Kontrol olarak kullanılan NAC-SNEDDS formülasyonunun $97,227 \pm 1,115$ nm damlacık boyutuna $-2,738 \pm 0,310$ mV zeta potansiyele sahip olduğu gözlenmiştir (Tablo 17). Boş formülasyon ile NAC-SNEDDS formülasyonu arasında görülen küçük zeta potansiyel değişiminin eklenen NAC'tan kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Rohrer vd., 2016).

Eudragit RS 100 ve NAC arasındaki iyonik etkileşimle hazırlanan EU-NAC kompleksinin SNEDDS yağlı fazlarına eklenmesiyle elde edilen nanoemülsiyonun $128,467 \pm 7,366$ nm damlacık boyutuna ve $10,550 \pm 0,954$ mV zeta potansiyele sahip olduğu gözlenmiştir (Tablo 18).

Mukusa penetre olabilen antifungal SNEDDS formülasyonu olarak formüle edilen final formülasyon olan POS-EU-NAC-SNEDDS nanoemülsiyonu ile yapılan analizlerde damlacıkların damlacık boyutunun $173,400 \pm 2,136$ nm, zeta potansiyelinin $9,333 \pm 0,434$ mV ve PDI değerinin 0,265 olduğu saptanmıştır. POS-EU-NAC-SNEDDS nanoemülsiyonunun hazırlanmasından 4 saat sonra yapılan ölçümlerde bulunan değerler ise damlacık boyutu için $198,230 \pm 0,283$ nm, zeta potansiyel için $10,517 \pm 0,938$ mV dir. PDI ise 0,283 olarak bulunmuştur (Tablo 18). Elde edilen bu sonuç damlacık boyutundaki artışa rağmen, formülasyonun damlacık boyutunun, mukusun yenilenme süresi olan 4 saat sonunda dahi mukusa penetrasyon için ideal boyut olan 200 nm'nin altında olduğunu göstermektedir (Dünnhaupt vd., 2015; Netsomboon & Bernkop-Schnürch, 2016).

Ayrıca F45 ve ondan hareketle hazırlanan POS-EU-NAC-SNEDDS formülasyonu için uzun süreli stabilite testleri yapılmıştır. Başlangıçta ve 3 ay sonunda yapılan ölçümlerde damlacık boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerlerinde önemli bir değişiklik görülmediği formülasyonun hala istenilen damlacık boyutu aralığında olduğu görülmüştür (Tablo 19)

SNEDDS formülasyonlarının damlacık morfolojisi floresan mikroskop çalışması ile incelenmiş ve emülsifikasyon sonucunda beklenildiği üzere yuvarlak biçimli damlacıkların elde edildiği görülmüştür (Şekil 34, - Şekil 37).

4.4.5. POS Salım Çalışmaları

Bölüm 2.2.4.7'de anlatıldığı üzere SNEDDS formülasyonlarından POS salım profilini tespit etmek için diyaliz tüpleriyle yapılan çalışmalarda 4. saatin sonunda POS çözeltisindeki tüm etkin maddenin (%100) reseptör faza geçtiği, POS-SNEDDS formülasyonlarından geçen POS miktarının %61, POS-EU-NAC-SNEDDS formülasyonlarından ise yaklaşık %54 olduğu saptanmıştır. 24 saatin sonunda alınan örneklerde ise POS-SNEDDS formülasyonunun içerdiği etkin maddenin yaklaşık %88'inin, POS-EU-NAC-SNEDDS formülasyonunun içerdiği etkin maddenin ise yaklaşık %71'inin salındığı gözlenmiştir (Şekil 38). Elde edilen salım profilleri istatistiksel olarak incelendiğinde her iki formülasyonun POS çözeltisine ve birbirine kıyasla anlamlı bir farklılık taşıdığı görülmüştür ($p < 0.05$). POS-SNEDDS ve EU-NAC-

POS-SNEDDS formülasyonlarının diyaliz membran metodu kullanılarak elde edilen salım profillerinin farklılık göstermesinin sebebinin; Eudragit RS 100 polimerinin yağlı damlacık yüzeyinde yapısal bir engel oluşturması olabileceği düşünülmektedir.

Denklem 4'te verilen Nernstsches dağılım yasasına göre ilaçların iki faz arasındaki dağılımı; ilacın D değeri ile yağlı fazın ve salım ortamının hacimlerinden hareketle hesaplanabilir. Bu dağılım değeri, ilacın başlangıçtaki salım oranı hakkında fikir verebilir. POS'un F45 formülasyonundaki D değerinden hareketle Nernstsches dağılım denkleminde hesaplanan değere göre POS'un, SNEDDS yağlı fazının salım ortamında 1+10 oranında seyreltilmesi sonucu yaklaşık 99%'luk miktarının damlacıklar içinde kalacağı, salıma uğramayacağı ön görülmektedir. Ancak bu öngörü, POS içeren formülasyonlarla diyaliz membran kullanılarak yapılan salım çalışmalarında elde edilen verilerle uyuşmamaktadır. Bu durumun DMSO içeren salım ortamının kullanılmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. SNEDDS tipi formülasyonlar, temel olarak biyofarmasötik sınıflandırma sistemine göre Sınıf II ve Sınıf IV ilaçlar gibi suda az çözünür ilaçları formüle etmek için kullanılırlar, organik çözücüler ve / veya sürfaktanlar içeren salım ortamlarına veya büyük hacimli salım ortamlarına ihtiyaç duyarlar. Yardımcı ajanların eklenmesi söz konusu olduğunda gözlemlenen salım profillerinde farklılık oluşabilir çünkü eklenen organik çözücüler/ sürfaktanlar, SNEDDS'lerin bileşimlerini değiştirerek yağlı damlacıkların içine girer ve bu da farklı bir salım profili elde edilmesi ile sonuçlanır. Çalışmamızda görülen ve Nernstsches dağılım denkleminde elde edilen sonuçla çelişen bir salım profili elde edilmesi, literatürde yer alan bu yaklaşımla ilişkilendirilmiştir (Agboola & Dalglish, 1996; García-Río, Mejuto, Pérez-Lorenzo, Rodríguez-Álvarez, & Rodríguez-Dafonte, 2005).

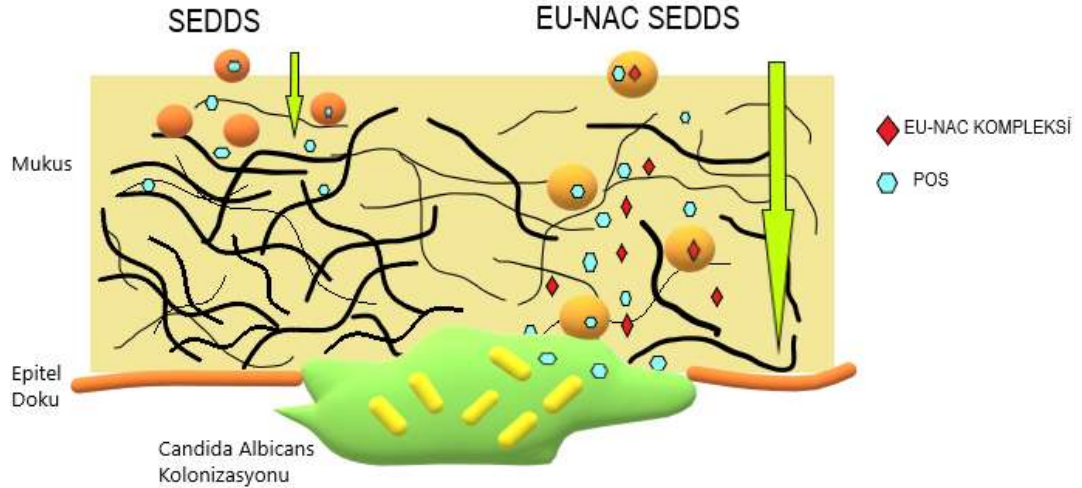
4.4.6. Mukusa Permeasyon Deneyi

Mukus, vücut boşluklarını kaplayan epitel dokuya yapışık, oldukça viskoz bir sıvıdır. Asıl görevi mekanik, kimyasal, bakteriyel ve viral etkilere karşı mukozayı korumaktır. Mukozaya uygulanan ilaç taşıyıcı sistemler de ilk önce penetre olamayacak kadar büyük parçacıkların geçişini engelleyen, 10-200

nm boyutlarında boşluklara sahip iç içe geçmiş ağırs bir mikro yapı olan bu mukus bariyeri ile karşılaşılır.

SNEDDS yağlı damlacıklarının ortalama büyüklüğü 10- 200 nm aralığında olsa bile mukus jelinin yarı geçirgen yapısı, suyun, iyonların, besin maddelerinin, bazı proteinlerin ve 50 nm'den büyük parçacıkların / damlacıkların yapısal olarak değişmeden serbestçe geçmesine izin vermeyebilir. Mukolitik ajan kullanımı, mukus ağ yapısını bozarak daha büyük boyutlarda olsa bile SNEDDS veya nanopartikül tipindeki formülasyonların mukusa rahatlıkla penetre olmasını sağlayabilir. Menzel ve arkadaşları, mukolitik ajanlar içeren nano ilaç taşıyıcı sistemlerin, jel tabakasının yapısını veya bütünlüğünü tahrip etmeden çapraz bağlı müsin ağının lokalize bir şekilde gevşemesine ve jel tabakada küçük delikler oluşmasına neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. İlaç emiliminin büyük kısmı, mukozal bariyerin gevşek olduğu bu yerlerde meydana gelir. Menzel ve arkadaşlarına göre fizyolojik koşullar altında meydana gelen mukus yenilenmesinin de dikkate alınması gerekir (Menzel & Bernkop-Schnürch, 2018). Mukusun yenilenme süresi, Goblet hücrelerinden salgılanması ile mukozal membran üzerinde bulunan mukusun yer değiştirmesi arasında geçen süre olarak tanımlanabilir. Mukusun bu yenilenme özelliği göz önünde bulundurulduğunda, musin jel yapısının ağ büyüklüğündeki kısmi artışın zamanla sınırlı olduğu söylenebilir (Dawson, Krauland, Wirtz, & Hanes, 2004; Johansson, 2012).

Diğer yandan SNEDDS nanodamlacıklarının hidrofobik yüzey özellikleri ve mukus tabakası ile etkileşimlerinin şekil deformasyonu kabiliyetleri nedeniyle nispeten düşük olması sebebiyle, daha küçük ağ gözeneklerine sahip mukus jel tabakalarından bile difüze olabildiği literatürde belirtilmektedir (Boegh, García-Díaz, Müllertz, & Nielsen, 2015; Dünhaupt vd., 2015)



Şekil 47 : Mukusa penetre olabilen SNEDDS formülasyonlarının epitelde kolonize olan Candida albicans üzerindeki etkisinin şematik gösterimi

Yukarıdaki bilgiler doğrultusunda bu çalışmada SNEDDS damlacıklarının hidrofobik yüzey yapısı ve şekil deformasyon yeteneklerinden kaynaklanan mukus permeasyon özelliklerinin mukolitik bir ajanla kullanılarak artırılması amaçlanmıştır.

POS içeren SNEDDS formülasyonlarının doğal mukus içindeki taşınımını analiz etmek için Bölüm 2.2.4.9'da anlatıldığı gibi Transwell difüzyon odası sistemi kullanılmıştır (Menzel & Bernkop-Schnürch, 2018). Bunun için mukus, verici ve alıcı kompartmanın arasına yerleştirilmiş polikarbonat filtre tabanlı insertlere yerleştirilmiş, verici bölmesine formülasyonlar yüklenmiş ve bu ince mukus tabakasından geçerek alıcı bölmesine difüze olan ilaç miktarını değerlendirmek için alıcı kompartmandan örnekler alınmıştır. Örnekler, POS'un floresans özellik göstermesinden yararlanılarak alıcı kompartmana geçen miktar hesaplanmıştır.

POS-SNEDDS, POS-NAC-SNEDDS, POS-EU-SNEDDS ve POS-EU-NAC-SNEDDS ile yapılan mukus permeasyon testinden elde edilen sonuçlara göre, 4 saatin sonunda, POS-SNEDDS formülasyonu için mukus bariyerini aşarak alıcı kompartmana ulaşan POS oranının $\% 0,119 \pm 0,39$ olduğu görülmüştür. Buna karşın NAC-SNEDDS formülasyonunda bu oranın $\% 8.251 \pm 1,597$ ve EU-NAC-SNEDDS formülasyonunda ise $\% 6,550 \pm 1,922$ olduğu görülmüştür (Şekil 39). Bu sonuçlar hem tek başına hem de

kompleksleşmiş halde NAC-SNEDDS formülasyonlarının POS'un mukusa permeasyon özelliklerini dramatik ölçüde iyileştirdiğini göstermektedir. POS-NAC-SNEDDS formülasyonunun, 69,336 kat, POS-EU-NAC-SNEDDS formülasyonunun ise POS-SNEDDS formülasyonuna göre mukusa 55,042 kat daha fazla penetre olabildiği görülmüştür. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, POS-NAC-SNEDDS ve POS-EU-NAC-SNEDDS formülasyonlarının mukus permeasyon özelliklerinin boş SNEDDS'ten anlamlı fark gösterdiği saptanmıştır ($p < 0.05$). Diğer taraftan NAC-SNEDDS ve EU-NAC-SNEDDS arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$). EU-NAC SNEDDS'in permeasyonunun NAC-SNEDDS'e göre 4. saatin sonunda daha az olmasının sebebinin NAC'ın Eudragit RS 100 ile kompleks oluşturulmasına bağlı olduğu söylenebilir. Kontrol olarak kullanılan ve Eudragit RS 100 içeren EU-SNEDDS formülasyonunun mukus permeasyon özelliklerinin boş SNEDDS formülasyonundan istatistiksel olarak farklı olmadığı ($p > 0.05$) da görülmüştür. Bu sonuca göre Eudragit RS 100 polimerinin SNEDDS formülasyonlarının mukus permeasyonu üzerinde etkisi olmadığı görülmektedir.

NAC gibi serbest tiyol grubu taşıyan mukolitik ajanların, disülfid bağlarını parçalayarak musin liflerinin çapraz bağlanmasını azalttığı bilinmektedir. Rohrer ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, NAC benzeri serbest tiyol grubu taşıyan bileşikler içeren SNEDDS formülasyonlarının mukus permeasyonunu dönen tüp metodu kullanarak değerlendirmişler ve bu bileşiklerin permeasyonu olumlu yönde etkilediğini göstermişlerdir (Rohrer vd., 2016). Bu doktora çalışmasında elde edilen sonuçlar da farklı bir mukus permeasyon metodu kullanılmasına rağmen sözü geçen literatürle uyumluluk göstermektedir.

Mukusun içeriğindeki siyalik asit ve sülfonik asit yapıları sebebiyle negatif yüklü olduğu bilinmektedir. Pozitif yüklü partiküller mukus ile elektrostatik etkileşimler kurarak mukusun üst tabakalarına tutunurlar ve alt tabakalara penetre olamazlar. Literatürde, bu sebeple partiküllerin / damlacıkların negatif yüklü olmasının mukus penetrasyonu için bir avantaj olduğu belirtilmektedir. Ayrıca daha küçük partiküllerin / damlacıkların büyük olanlara göre mukusa

daha kolay penetre olabildiği bilinmektedir. POS-EU-NAC-SNEDDS'in pozitif zeta potansiyele ve daha büyük damlacık boyutuna sahip olmasına rağmen, negatif zeta potansiyele ve daha küçük damlacık boyutuna sahip POS-SNEDDS formülasyonundan daha iyi mukus permeasyon özelliği göstermesi, formülasyondaki NAC'ın sebep olduğu mukus ağının disülfid bağlarının kopması, mukus viskozitesinde azalma ve sonucunda mukus jel tabakası boyunca arttırılmış bir geçirgenlik ile açıklanabilir (Rohrer vd., 2016). Elde edilen bu verinin gelecekte yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu sonuçlara göre EU-NAC kompleksi ile birlikte formüle edilen POS içeren SNEDDS formülasyonlarının, mukustan POS permeasyonunu arttırarak mukus altındaki epitel üzerinde kolonize olan *Candida albicans* üzerindeki etkinliğini arttıracak ileri sürülebilir.

4.4.7. In Vitro Mukolitik Etkinlik Deneyleri

Mukus glikoproteinleri, esnek bir ağ oluşturur ve mukusun viskoelastik özelliklerinden sorumludur. Mukolitik maddelerle mukusun bozunması, bu ağ yapısının kaybolmasına ve mukusun viskozitesinin azalmasına neden olur (Bell vd., 1985; Pearson, Chater, & Wilcox, 2016). Glikoprotein zincir yapısının kısalması yoluyla mukus viskozitesinin azaltılması, papain, bromelain ve tripsin gibi proteolitik enzimler ya da NAC gibi serbest tiyol grubu taşıyan mukolitik maddeler kullanılarak sağlanabilir (Leichner vd., 2017; Menzel & Bernkop-Schnürch, 2018; Netsomboon & Bernkop-Schnürch, 2016).

Yukarıda sayılanlar gibi mukolitik ajan içeren formülasyonların mukus üzerindeki etkilerini reolojik ölçümler ile değerlendirmek mümkündür (Müller vd., 2013). Formülasyonların mukolitik aktivitesi, yeni toplanmış mukusa eklenmelerinin ardından dinamik viskozitenin belirli zaman aralıklarında ölçülmesiyle saptanabilir.

Bu doktora tez çalışması kapsamında reolojik ölçümler yapılarak ile SNEDDS formülasyonlarının *in vitro* mukolitik aktiviteleri araştırılmış ve karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Mukusa 10:1 (a/a) oranında eklenen formülasyonların 2. ve 4. saat sonundaki etkisi, örneklerin dinamik

viskozitelerinin ölçülmesi yoluyla belirlenmiştir. Hiç bir formülasyon eklenmeyen mukus örneğinin 4 saat boyunca viskozitesinde bir değişme gözlenmemiştir. Deneyde kontrol olarak kullanılan ve NAC içermeyen tampon çözelti ve boş SNEDDS formülasyonlarının eklenmesi sonucunda mukus viskozitesinde, mukolitik aktiviteden kaynaklanmayan, sebebi örnek içeriğinin değişmesi olan bir azalma görülmüştür. EU-SNEDDS formülasyonunun 4 saat sonunda mukus viskozitesi üzerinde anlamlı bir etki göstermediği gözlenmiş ve bu sonuç aynı şekilde yorumlanmıştır. (Şekil 40).

Diğer yandan NAC içeren formülasyonlar ile elde edilen sonuçlar incelendiğinde; NAC-SNEDDS formülasyonun 4 saat sonunda mukus viskozitesini başlangıç değerinin $\% 4,228 \pm 0,118$ 'ine (yaklaşık $\% 96$ 'lık azalma) kadar düşürdüğü görülmüştür (Şekil 38). NAC çözeltisi ile inkübe edilen mukus örneğinin viskozitesinin 4 saat sonunda başlangıç değerinin $\% 1,685 \pm 0,068$ 'ine kadar düştüğü (yaklaşık $\% 99$ azalma) gözlenmiştir. Mukolitik aktiviteleri açısından NAC-SNEDDS ile NAC çözeltisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). EU-NAC-SNEDDS formülasyonunun 4 saat sonunda mukus viskozitesinin başlangıç değerinin yaklaşık $\% 5$ 'ine kadar düşürdüğü gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, EU-NAC-SNEDDS mukolitik aktivite profilinin istatistiksel olarak NAC-SNEDDS'ten anlamlı bir fark taşıdığı görülmüştür ($p < 0.05$). Yapılan salım çalışmalarının değerlendirilmesinin ardından yorumlanabilen bu farkın, 2. Saatteki NAC salımı farkından kaynaklandığı bunun da EU-NAC kompleksi içeren formülasyondan NAC salımının daha yavaş olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Gerçekleştirilen mukolitik aktivite çalışması değerlendirildiğinde gelişmiş permeasyon ile sonuçlanan mukus yapısını lokal olarak parçalama yeteneklerinden dolayı mukolitik ajan taşıyan mukusa penetre olabilen sistemlerin, düşük çözünürlüğe ve dolayısıyla düşük biyoyararlanım ya da lokal etkinliğe sahip olan ilaçların verilmesi için bir çözüm sunabileceği düşünülmektedir.

4.4.8. Sitotoksosite Çalışmaları

Hazırlanan SNEDDS formülasyonlarının sitotoksik etkilerini araştırmak için HeLa hücre kültürü üzerinde resazurin testi gerçekleştirilmiştir. Resazurin testi konsepti, floresan olmayan resazurin boyasının metabolik olarak aktif hücreler tarafından floresan resofurine indirgenmesine dayanır. Ölçülen floresans yoğunluğu canlı hücrelerle doğrudan ilişkilidir.

Resazurin testinde elde edilen sonuçlara göre SNEDDS konsantrasyonu ile hücre toksisitesi arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir (Şekil 42). Sitotoksik etkileri araştırılan 4 formülasyon (Boş SNEDDS, EU-NAC-SNEDDS, POS-SNEDDS ve POS-EU-NAC-SNEDDS) için de HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin % 0,1 konsantrasyonda en az % 10 konsantrasyonda ise en fazla olduğu ve sonuçların istatistiksel olarak farklı olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$).

Konsantrasyon artışına bağlı olarak toksik etkinin artması beklenen bir durumdur. Literatürde yer alan bir çalışmada da SNEDDS tipi formülasyonların içeriklerinde yer alan yüzey aktif maddelerin konsantrasyonuna bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir. (Bu, Narayanan, Dalrymple, Cheng, & Serajuddin, 2016; Ujhelyi vd., 2012)

Mukusa penetre olabilen SNEDDS tipi formülasyonlar, mukusun altında bulunan epitelyal hücrelere zarar verme riski taşırlar. Temel olarak şimdiye kadar yayınlanan tüm çalışmalarda SNEDDS'lerin *in vitro* hücre kültürü deneylerinde toksik etki göstermesinin en önemli nedeni, içeriklerinde yer alan ve hücre zarına penetre olarak hücre ölümüne sebep olan yüksek konsantrasyonda yüzey aktif madde içermeleridir (Menzel & Bernkop-Schnürch, 2018)

Konsantrasyon sabit tutularak (%10) formülasyonların sitotoksik etkileri karşılaştırıldığında 4 saatlik süre sonunda elde edilen verilere göre, formülasyonların HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p < 0.05$). Bulunan sonuç aynı konsantrasyonlarda Caco-2 hücre hattı üzerinde yapılan çalışmalarla uyumluluk göstermektedir (Narayanan, Dalrymple, Cheng, & Serajuddin, 2016).

Hazırlanan POS-EU-NAC-SNEDDS formülasyonu için yapılan hücre kültürü çalışması sonucunda formülasyonlar arasında sitotoksosite açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamasına rağmen kesin ve doğru sonuca ancak *in vivo* çalışmalar ile ulaşılabileceği düşünülmektedir. Özellikle mukozaya uygulanan sistemlerde *in vitro* testler hiç bir zaman gerçek *in vivo* koşulları yansıtmamaktadır çünkü hücre kültürü çalışmalarında, hücreler epitel hücrelerinin aksine, *in vivo* şartlarda korunduğu gibi mukus tabakası tarafından korunmamaktadır (Menzel & Bernkop-Schnürch, 2018; S. Zaichik vd., 2019)



4.4.9. In Vitro Antifungal Etkinlik Çalışmaları

Bu çalışmada, POS içeren SNEDDS formülasyonlarının *Candida albicans* ATCC 1533 suşu üzerindeki zamana bağlı olarak gösterdiği antifungal etkisi incelenmiştir. Yapılan deneyde, POS-EU-NAC-SNEDDS, ve POS-SNEDDS formülasyonlarının antifungal etkisi POS solüsyonu ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca EU-NAC kompleksinin antifungal etkisinin olup olmadığı da araştırılmıştır (Şekil 43).

Elde edilen verilere göre, 24 saat sonunda beklendiği gibi mukolitik EU-NAC kompleksinin herhangi bir antifungal etkisi olmadığı ve kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği görülmüştür ($p>0.05$).

POS-EU-NAC-SNEDDS formülasyonunun *Candida albicans* ATCC 1533 suşu üzerindeki antifungal etkinliğinin istatistiksel olarak kontrol grubundan farklı olduğu ($p<0.05$), diğer yandan POS çözeltisinden ve hem POS içeren SNEDDS formülasyonundan farklı olmadığı ($p>0.05$) gözlenmiştir. Bu durum final formülasyonu olan POS-EU-NAC-SNEDDS formülasyonunun *Candida albicans* ATCC 1533 suşu üstünde etkin madde solüsyonu kadar etkin olduğu şeklinde yorumlanabilir.

4.4.10. SNEDDS formülasyonlarından NAC Salımı ve Yeni Salım Metodu Geliştirme Çalışmaları

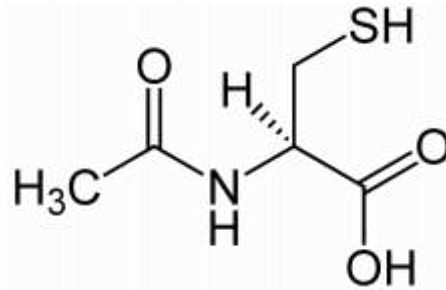
POS içeren vajinal SNEDDS formülasyonlarının geliştirilmesi ve karakterizasyonu çalışmalarını gerçekleştirirken yapılan salım çalışmaları sırasında NAC molekülünün serbest tiyol grubu içermesinden ve literatürde yer alan bir derleme makalede membran içermeyen ve sink koşul sağlayan bir salım modelinin geliştirildiği takdirde yararlı olabileceği fikrinden yola çıkarak NAC için alternatif bir salım metodu geliştirip geliştirilemeyeceği araştırılmıştır (Andreas Bernkop-Schnürch & Jalil, 2018). Sözü edilen bu makalede SNEDDS'den ilaç salım çalışmaları için yaygın şekilde kullanılan membranlı yöntemlerin bazı sakıncalarından bahsedilmektedir. Bu yöntemlerde yağlı damlacıklar, serbest ilaca geçirgen olan, ancak yağlı damlacıkları geçirmeyen filtreler veya diyaliz membranları yoluyla salım ortamından ayrılır, SNEDDS veya ayırma membranının salımı kontrol etme etkisi arasında ayırım yapmak zorlaşır. Verici kompartmandan alıcı kompartmana geçişte mevcut sınırlı difüzyon membranı yüzey alanı nedeniyle, yağlı damlacıklardan salım ortamına taşınabilecek ilaç miktarını etkilemesi sonucunda çoğu durumda sink koşulların ihlal edildiğinin de altı çizilmiştir (Andreas Bernkop-Schnürch & Jalil, 2018).

Bu bölümde yapılan çalışmalar kapsamında, NAC içeren formülasyonlar hazırlanmış ve NAC salım profilleri önce konvansiyonel diyaliz membran metodu ile belirlenmiştir (Şekil 44) Bölüm 2.2.5.1'de anlatıldığı gibi çalışılarak gerçekleştirilen salım deneyleri sonucunda diyaliz membranı yöntemi ile elde edilen verilere göre NAC çözeltisinden NAC salımı 1 saat sonunda dengeye ulaşmıştır. NAC-SNEDDS formülasyonundan 15. dakikada NAC'ın %50'sinin salındığı tespit edilmiştir. Bu değer 2. saatin sonunda % 76'ya, 4. saatin sonunda % 81'e ulaşmıştır. Denklem 6'te verilen ve zamandan bağımsız olarak ilaç dağılım miktarının hesaplanmasını sağlayan Nernstsches denklemine göre, SNEDDS yağlı fazının salım ortamında 1+10 oranında seyreltilmesi sonucu yağlı damlacıklar içindeki NAC miktarının yaklaşık 90%'ının sulu faz içine geçeceği hesaplanmıştır. Ancak NAC-SNEDDS'ten diyaliz membran yöntemi ile elde edilen salım miktarı Nernstsches eşitliği ile hesaplanan miktara ulaşmamıştır. Elde edilen bu sonuç salım profili

üzerindeki membran etkisi olarak yorumlanmış ve literatür ile uyumlu bulunmuştur (Andreas Bernkop-Schnürch & Jalil, 2018).

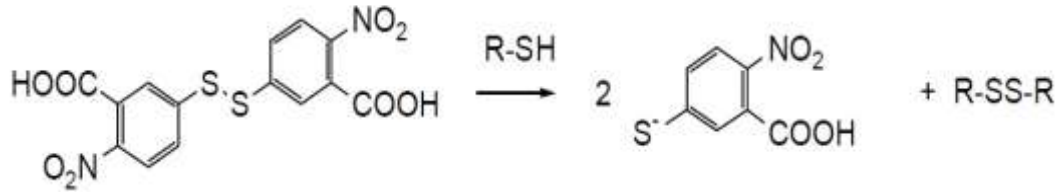
Sadece EU-NAC kompleksi süspansiyonu içeren membrandan salımın ise NAC çözeltisi ve NAC-SNEDDS formülasyonundan yavaş olduğu görülmüştür. En yavaş salımın EU-NAC-SNEDDS formülasyonundan olduğu saptanmıştır. Buradan hareketle diyaliz membranı yöntemiyle elde edilen NAC salım profili üzerinde, hem NAC ile Eudragit RS 100 polimeri arasındaki iyonik etkileşimin hem de SNEDDS formülasyonunun etkisi olduğu ileri sürülebilir. Elde edilen salım profilleri istatistiksel olarak incelendiğinde EU-NAC-SNEDDS formülasyonu ile diğer tüm formülasyonlar bire bir karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olduğu ($p < 0.05$) görülmüştür.

NAC ile yapılan salım çalışmalarının ikinci kısmında SNEDDS formülasyonlarından ilaç salımının herhangi bir membran veya çözücü etkisi olmadan incelenebilmesi için yeni bir metot geliştirilmiştir. Bu metodun temel prensibi, yağlı damlacıklardan sulu ortama salınan NAC'ın ortamdaki Ellman Reaktifi ile tepkimeye girerek oluşturacağı renkli ürünün fotometrik tayini ile konsantrasyonunun belirlenmesine dayanmaktadır (Şekil 12).



Şekil 48 : NAC Molekülü

Ellman Reaktifi ((5,5'-ditiyo-bis-[2-nitrobenzoik asit]), DTNB) alkali ortamda indirgenmiş sisteinler ve diğer serbest sülfidril grupları ile reaksiyona girerek bu maddelerin çözeltideki konsantrasyonlarını belirlemek için güvenilir bir yöntem sağlar. Tiyoller, DTNB ile reaksiyona girerek, disülfid bağını kırar ve alkali pH'ta su içinde TNB^{2-} dianyonuna iyonize olan 2-nitro-5 tiyobenzoat (TNB^-) elde edilir. TNB^{2-} dianyonu yaklaşık 405 nm dalga boyunda detekte edilebilen sarı renge sahiptir (Ellman, 1959).



Şekil 49 : Ellman Reaksiyonu

Bu reaksiyona dayanarak, yağlı damlacıklardan 0,25 μM konsantrasyonda DTNB içeren sulu faza salınan NAC miktarı bölüm 2.2.3.8 anlatıldığı gibi hesaplanmıştır. Şekil 45'da verilen sonuçlar incelendiğinde diyaliz membranı yöntemi ile yapılan salım çalışmasının aksine, bu yöntemle Nernstsches dağılım denklemini doğrulayan sonuçlar elde edildiği görülmektedir. NAC'a ait $\text{Log } D_{\text{SNEDDS/SO}}$ değeri 1.108 olarak hesaplanmış ve Nernstsches dağılım denklemine göre NAC'ın başlangıçta % 9,974 oranında SNEDDS yağlı fazı içinde kalacağı ve yaklaşık 90 % oranında sulu ortama dağılacığı hesaplanmıştır. Salım çalışmasında elde edilen sonuçlarda NAC-SNEDDS formülasyonundan ilk ölçüm noktasında salınan NAC miktarının $90,576 \pm 3,525$ olduğu ve bu değer Nernstsches dağılım denkleminde elde edilen değerle uyduğu gözlenmiştir.

EU-NAC kompleksinin Ellman tamponu içinde süspande edilmesiyle elde edilen salım profilinden kompleksin içerdiği NAC'ın tamamını 2 saat içinde saldığı gözlenmiştir. Salımdaki bu yavaşlamanın Eudragit RS 100 polimerinin ıslanması ve erozyonu için geçen süreye bağlı olduğu düşünülmüştür benzer etki literatürde yer alan çalışmalarda da görülmektedir (Fujimori, Yonemochi, Fukuoka, & Terada, 2002). Eudragit RS 100 zayıf iyon değiştirici reçine özelliğine sahip bir polimerdir ve anyonik moleküller ile formüle edildiğinde ilacı sigmoid şeklinde karakterize edilebilecek bir salım profili ile salar (Glaessl, Siepmann, Tucker, Rades, & J.Siepmann, 2010; Narisawa, Nagata, Hirakawa, Kobayashi, & Yoshino, 1996). EU-NAC kompleksinin NAC salım profili incelendiğinde başlangıçtaki 50%lik salımın kompleksin fiziksel yüzeyinde tutunmuş olan NAC'ın ortamdaki anyonlarla hızlı yer değiştirmesinin bir sonucu olabileceği ve daha sonrasında sigmoid olarak şekillenen salım profilinin polimerin ıslanarak şişmesinin ardından iyon değişim mekanizmasının tekrarlanması sonucu olabileceği ileri sürülebilir.

EU-NAC SNEDDS formülasyonundan NAC salımı incelendiğinde, kontrollü bir salım profili elde edildiği ve en yavaş NAC salımının bu formülasyondan olduğu görülmektedir (Şekil 45). Grafikte 2. Saat sonunda yaklaşık % 48, 4. Saat sonunda ise yaklaşık % 88'e ulaşan bir NAC salımı görülmektedir. Elde edilen profil, NAC salımının hem iyonik kompleks oluşumu hem de SNEDDS tarafından kontrol edildiğini göstermektedir. Sigmoid şekilli salım profilinin yine Eudragit RS 100 polimerinin kullanılması bir sonucu olacağı düşünülebilir. Suda çözünmeyen bir polimer olan Eudragit RS 100, SNEDDS yağlı fazı içinde formüle edildiğinde polimerin ıslanması ve şişmesinin yalnızca yağ damlacıkları / su arayüzünde gerçekleştiği ve bunun sonucunda kontrollü bir salım elde edildiği düşünülmektedir. Bernkop-Schnürch ve arkadaşları yayınladıkları derlemede SNEDDS'ten ilaç salımının iyonik etkileşimlere dayanarak hazırlanan ilaç-polimer kompleksleri ile kontrol edilebileceğini öne sürmüşlerdir (Andreas Bernkop-Schnürch & Jalil, 2018). Çalışmamızda elde edilen veriler bu öngörüğü doğrulamaktadır.

Formülasyonlara ait salım sonuçları istatistiksel olarak analiz edildiğinde, salım profillerinin birbirinden anlamlı farklılıklar ($p < 0.05$) taşıdığı görülmüştür. Membran ve çözücü etkisi olmadan NAC salımının belirlenmesine olanak veren ve yeni geliştirilen bu salım metodunun SNEDDS formülasyonlarından NAC salımı ile ilgili, gerçeğe daha uygun veriler sağladığı düşünülmektedir. Ayrıca NAC molekülü gibi serbest tiyol grubu içeren başka moleküller için de alternatif bir salım metodu olarak kullanılabileceği ön görülmektedir.

Sonuç ve Öneriler

Bu doktora tez çalışmasında oral ve *iv* yolla uygulanan tablet, süspansiyon ve infüzyon tipinde formülasyonları bulunan POS'un ilk kez vajinal *Candida albicans* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmak üzere mukozaya uygulanabilen iki farklı formülasyonu geliştirilmiş ve bu formülasyonlar *in vitro* / *eks vivo* olarak karakterize edilmiştir.

Çalışmanın birinci bölümünde ilk olarak POS'un suda çözünürlüğünün iyileştirilmesi ve formülasyona mukoadezif özellik kazandırılması amacıyla, Suc- β -CD'den hareketle tiyole CD türevleri sentezlenmiştir. Bunun için daha önce CD'ler ile yapılan benzer çalışmalarda kullanılan halka açılması yöntemi yerine daha kolay izlenilebilecek, literatürde çok sayıda polimerin tiyollenmesi için kullanılan amit bağı oluşumuna dayalı bir reaksiyon yolağı kullanılmıştır. Elde edilen ürünlerin literatürde halka açılması yoluyla sentezlenmiş CD türevlerine kıyasla daha iyi bir sitotoksikite profili sergilediği gösterilmiştir. Sentezlenen mukoadezif Suc- β -CD türevleri ve POS'un oluşturduğu inklüzyon komplekslerinin iyileştirilmiş bir dissolüsyon profili ve mukoadezyon sergilediği de görülmüştür. Ayrıca hazırlanan inklüzyon komplekslerinin antifungal etkinlikleri araştırılmış ve *Candida albicans* suşu üzerinde etkin olduğu bulunmuştur.

Bu çalışmada tiyole CD türevi sentezi için merkaptonikotinamit kullanılmıştır. Gelecekte yapılacak çalışmalarda; merkaptonikotinamit ve merkaptonikotinik asit kullanılarak sentezlenen CD türevlerinin ilaç dissolüsyonu ve mukoadezif özellikler üzerindeki etkisinin karşılaştırmalı olarak incelenmesinin literature katkı vereceği düşünülmektedir.

Bu çalışma kapsamında sentezlenen tiyole CD türevlerinin kullanımı ile; sadece POS için değil, POS gibi suda düşük çözünürlük gösteren lipofilik ilaçların çözünürlük özelliklerinin iyileştirilmesi, sitotoksik etkilerinin azaltılması, ve topikal uygulamalarda mukoadezif özellik sergilemesi sağlanabilir.

Çalışmanın ikinci kısmında, mukusa penetre olabilen bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi hedeflenmiş, bu amaçla katyonik Eudragit RS 100 polimeri ve mukolitik etkili NAC kullanılarak EU-NAC kompleksi hazırlanmış ve bu kompleksi içeren SNEDDS formüle edilmiştir. EU-NAC kompleksinin formülasyona eklenmesinin SNEDDS damlacıklarının mukus penetrasyon özelliğini dramatik şekilde arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca yapılan diğer deneylerde formülasyonların mukolitik etkinlikleri, *in vitro* antifungal etkileri ve sitotoksik özellikleri incelenmiştir.

Çalışmanın üçüncü bölümü, POS içeren vajinal SNEDDS formülasyonlarının geliştirilmesi ve karakterizasyonu çalışmalarını gerçekleştirirken yapılan salım çalışmaları sırasında NAC molekülünün serbest tiyol grubu içermesinden ve literatürde yer alan bir derleme makalede membran içermeyen ve sink koşul sağlayan bir salım modelinin geliştirildiği takdirde yararlı olabileceği fikrinden yola çıkarak NAC için alternatif bir salım metodu geliştirip geliştirilemeyeceği konusunun araştırılmasına ayrılmıştır. SNEDDS'ten NAC salımını belirlemek amacıyla 1960'lardan beri yaygın olarak kullanımda olan Ellman testinden hareketle geliştirilen bu yeni salım metodunun başarıyla çalıştığı görülmüştür. Lipofilik ilaçların formüle edilmesi için oldukça uygun bir seçenek olan SNEDDS'ten farklı ilaçların salımını değerlendirebilmek amacıyla yeni metotların geliştirilmesinin gelecekte ilgi çekeceği düşünülmektedir. Bu çalışmada geliştirilen ve Ellman Testi'ne dayanan yeni salım metodunun serbest tiyol grubu taşıyan ilaçların SNEDDS tipi formülasyonlardan salımının belirlenmesinde yeni bir seçenek olacağı ve bu bağlamda literature katkı vereceği düşünülmektedir.

Ayrıca bu yeni salım metoduyla yapılan deneylerden elde edilen sonuçlarda iyonik bir polimerin kullanımı ile NAC gibi hidrofilik etkin maddelerin SNEDDS formülasyonlarından kontrollü salımının sağlanabileceği görülmüştür. Yapılacak çalışmalarda; farklı iyonik polimer ve hidrofilik etkin madde kompleksleri ile pek çok ilaç için SNEDDS formülasyonlarından kontrollü salım sağlanabilir.

Mukozal dokuya ilaç uygulanmasında hem mukoadezif hem de mukusa penetre olabilen sistemlerin kendilerine özgü avantajları vardır. Gelecekte

mukozal uygulamalar için formülasyon geliştirme çalışmalarında eğilimin, mukoadezif ve mukusa penetre olabilen formülasyonların üstün özelliklerinin aynı formülasyonda kombine edilmesiyle yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarlanması yönünde olacağı düşünülmektedir.



Kaynaklar

- Acartürk, F. (2009). Mucoadhesive vaginal drug delivery systems. *Recent patents on drug delivery & formulation*, 3(3), 193–205. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19925443>
- Agboola, S. O., & Dalgleish, D. G. (1996). Effects of pH and Ethanol on the Kinetics of Destabilisation of Oil-in-Water Emulsions Containing Milk Proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72(4), 448–454. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199612\)72:4<448::AID-JSFA676>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199612)72:4<448::AID-JSFA676>3.0.CO;2-I)
- Andrews, G. P., Lavery, T. P., & Jones, D. S. (2009). Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(3), 505–518. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2008.09.028>
- Asim, M. H., Moghadam, A., Ijaz, M., Mahmood, A., Götz, R. X., Matuszczak, B., & Bernkop-Schnürch, A. (2018). S-protected thiolated cyclodextrins as mucoadhesive oligomers for drug delivery. *Journal of Colloid and Interface Science*, 531, 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.07.062>
- Baloglu, E., Karavana, S. Y., Senyigit, Z. A., Hilmioglu-Polat, S., Metin, D. Y., Zekioglu, O., ... Jones, D. S. (2011). In-situ gel formulations of econazole nitrate: preparation and in-vitro and in-vivo evaluation. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 63(10), 1274–1282. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01315.x>
- Baus, R. A., Innerhofer, J., Rohrer, J., Lupo, N., & Bernkop-Schnürch, A. (2018). Anhydrous thiomers: Strategy for enhanced mucoadhesion. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 129, 273–281. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2018.05.038>
- Bell, A. E., Sellers, L. A., Allen, A., Cunliffe, W. J., Morris, E. R., & Ross-Murphy, S. B. (1985). Properties of Gastric and Duodenal Mucus: Effect of Proteolysis, Disulfide Reduction, Bile, Acid, Ethanol, and Hypertonicity on Mucus Gel Structure. *Gastroenterology*, 88(1), 269–280. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(85\)80180-3](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(85)80180-3)
- Bernkop-Schnürch, A., & Steininger, S. (2000). Synthesis and characterisation of mucoadhesive thiolated polymers. *International Journal of Pharmaceutics*,

194(2), 239–247. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00387-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00387-7)

Bernkop-Schnürch, Andreas. (2005a). Thiomers: a new generation of mucoadhesive polymers. *Advanced drug delivery reviews*, 57(11), 1569–1582. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.002>

Bernkop-Schnürch, Andreas. (2005b). Thiomers: a new generation of mucoadhesive polymers. *Advanced drug delivery reviews*, 57(11), 1569–1582. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.002>

Bernkop-Schnürch, Andreas, & Dünnhaupt, S. (2012). Chitosan-based drug delivery systems. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 81(3), 463–469. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.04.007>

Bernkop-Schnürch, Andreas, Hoffer, M. H., & Kafedjiiski, K. (2004). Thiomers for oral delivery of hydrophilic macromolecular drugs. *Expert opinion on drug delivery*, 1(1), 87–98. <https://doi.org/10.1517/17425247.1.1.87>

Bernkop-Schnürch, Andreas, Hornof, M., & Zoidl, T. (2003). Thiolated polymers--thiomers: synthesis and in vitro evaluation of chitosan-2-iminothiolane conjugates. *International journal of pharmaceutics*, 260(2), 229–237. Tarihiinde adresinden erişildi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12842342>

Bernkop-Schnürch, Andreas, & Jalil, A. (2018). Do drug release studies from SEDDS make any sense? *Journal of Controlled Release*, 271, 55–59. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2017.12.027>

Bilensoy, E., Rouf, M. A., Vural, I., Sen, M., & Hincal, A. A. (2006). Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal gel for clotrimazole:beta-cyclodextrin complex. *AAPS PharmSciTech*, 7(2), E38. <https://doi.org/10.1208/pt070238>

Boegh, M., García-Díaz, M., Müllertz, A., & Nielsen, H. M. (2015). Steric and interactive barrier properties of intestinal mucus elucidated by particle diffusion and peptide permeation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 95, 136–143. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2015.01.014>

Boegh, M., & Nielsen, H. M. (2015). Mucus as a Barrier to Drug Delivery - Understanding and Mimicking the Barrier Properties. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 116(3), 179–186. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12342>

- Brewster, M. E., & Loftsson, T. (2007). Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(7), 645–666. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2007.05.012>
- Bu, P., Narayanan, S., Dalrymple, D., Cheng, X., & Serajuddin, A. T. M. (2016). Cytotoxicity assessment of lipid-based self-emulsifying drug delivery system with Caco-2 cell model: Cremophor EL as the surfactant. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91, 162–171. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2016.06.011>
- Carrillo-Muñoz, A.-J., Quindós, G., Ruesga, M., Alonso, R., del Valle, O., Hernández-Molina, J. M., ... Santos, P. (2005). Antifungal activity of posaconazole compared with fluconazole and amphotericin B against yeasts from oropharyngeal candidiasis and other infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(3), 317–319. <https://doi.org/10.1093/jac/dki022>
- Carvalho, F. C., Bruschi, M. L., Evangelista, R. C., & Gremião, M. P. D. (2010). Mucoadhesive drug delivery systems. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(1), 1–17. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502010000100002>
- Cevher, E., Şensoy, D., Zloh, M., & Mülazımoğlu, L. (2008). Preparation and Characterisation of Natamycin: γ -Cyclodextrin Inclusion Complex and its Evaluation in Vaginal Mucoadhesive Formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(10), 4319–4335. <https://doi.org/10.1002/jps.21312>
- Chatterjee, B., Hamed Almurisi, S., Ahmed Mahdi Dukhan, A., Mandal, U. K., & Sengupta, P. (2016). Controversies with self-emulsifying drug delivery system from pharmacokinetic point of view. *Drug Delivery*, 23(9), 3639–3652. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1214990>
- Courtney, R., Pai, S., Laughlin, M., Lim, J., & Batra, V. (2003). Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Oral Posaconazole Administered in Single and Multiple Doses in Healthy Adults. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9), 2788–2795. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2788-2795.2003>
- Courtney, Rachel, Wexler, D., Radwanski, E., Lim, J., & Laughlin, M. (2003). Effect of food on the relative bioavailability of two oral formulations of posaconazole in healthy adults. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 57(2), 218–222. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2003.01977.x>
- Crater, J. S., & Carrier, R. L. (2010). Barrier properties of gastrointestinal mucus to nanoparticle transport. *Macromolecular bioscience*, 10(12), 1473–1483.

<https://doi.org/10.1002/mabi.201000137>

- Crowley, P. D., & Gallagher, H. C. (2014). Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *Journal of Applied Microbiology*, 117(3), 611–617. <https://doi.org/10.1111/jam.12554>
- Cuñá, M., Vila Jato, J. L., & Torres, D. (2000). Controlled-release liquid suspensions based on ion-exchange particles entrapped within acrylic microcapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, 199(2), 151–158. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00379-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00379-3)
- das Neves, J., Amiji, M., & Sarmiento, B. (2011). Mucoadhesive nanosystems for vaginal microbicide development: friend or foe? *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 3(4), 389–399. <https://doi.org/10.1002/wnan.144>
- Dawson, M., Krauland, E., Wirtz, D., & Hanes, J. (2004). Transport of Polymeric Nanoparticle Gene Carriers in Gastric Mucus. *Biotechnology Progress*, 20(3), 851–857. <https://doi.org/10.1021/bp0342553>
- Del Valle, E. M. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39(9), 1033–1046. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00258-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9)
- Dünnhaupt, S., Kammona, O., Waldner, C., Kiparissides, C., & Bernkop-Schnürch, A. (2015). Nano-carrier systems: Strategies to overcome the mucus gel barrier. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 96, 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.01.022>
- Elbahwy, I. A., Lupo, N., Ibrahim, H. M., Ismael, H. R., Kasem, A. A., Caliskan, C., ... Bernkop-Schnürch, A. (2018). Mucoadhesive self-emulsifying delivery systems for ocular administration of econazole. *International Journal of Pharmaceutics*, 541(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.02.019>
- Friedl, H. E., Dünnhaupt, S., Waldner, C., & Bernkop-Schnürch, A. (2013). Preactivated thiomers for vaginal drug delivery vehicles. *Biomaterials*, 34(32), 7811–7818. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.021>
- García-Río, L., Mejuto, J. C., Pérez-Lorenzo, M., Rodríguez-Álvarez, A., & Rodríguez-Dafonte, P. (2005). Influence of Anionic Surfactants on the Electric Percolation of AOT/Isooctane/Water Microemulsions. *Langmuir*, 21(14), 6259–6264. <https://doi.org/10.1021/la0501987>

- Giordano, F., Novak, C., & Moyano, J. R. (2001). Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochimica Acta*, 380(2), 123–151. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(01\)00665-7](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(01)00665-7)
- Grießinger, J., Dünnhaupt, S., Cattoz, B., Griffiths, P., Oh, S., Gómez, S. B. i, ... Bernkop-Schnürch, A. (2015). Methods to determine the interactions of micro- and nanoparticles with mucus. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 96, 464–476. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.01.005>
- Harangi, J., Béke, G., Harangi, M., & Mótyán, J. A. (2012). The digestable parent cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 73(1–4), 335–339. <https://doi.org/10.1007/s10847-011-0061-0>
- Hintzen, F., Hauptstein, S., Perera, G., & Bernkop-Schnürch, A. (2013). Synthesis and in vitro characterization of entirely S-protected thiolated pectin for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(3), 1266–1273. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2013.09.017>
- Ijaz, M., Ahmad, M., Akhtar, N., Laffleur, F., & Bernkop-Schnürch, A. (2016). Thiolated α -Cyclodextrin: The Invisible Choice to Prolong Ocular Drug Residence Time. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(9), 2848–2854. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.04.021>
- Ijaz, M., & Bernkop-Schnürch, A. (2015). Preactivated thiomers: their role in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12(8), 1269–1281. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.1005598>
- Ijaz, M., Griessinger, J. A., Mahmood, A., Laffleur, F., & Bernkop-Schnürch, A. (2016). Thiolated Cyclodextrin: Development of a Mucoadhesive Vaginal Delivery System for Acyclovir. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(5), 1714–1720. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.03.009>
- Ijaz, M., Matuszczak, B., Rahmat, D., Mahmood, A., Bonengel, S., Hussain, S., ... Bernkop-Schnürch, A. (2015a). Synthesis and characterization of thiolated β -cyclodextrin as a novel mucoadhesive excipient for intra-oral drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 132, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.073>
- Ijaz, M., Matuszczak, B., Rahmat, D., Mahmood, A., Bonengel, S., Hussain, S., ... Bernkop-Schnürch, A. (2015b). Synthesis and characterization of thiolated β -cyclodextrin as a novel mucoadhesive excipient for intra-oral drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 132, 187–195.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.073>

Ijaz, M., Prantl, M., Lupo, N., Laffleur, F., Hussain Asim, M., Matuszczak, B., & Bernkop-Schnürch, A. (2017). Development of pre-activated α -cyclodextrin as a mucoadhesive excipient for intra-vesical drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 534(1–2), 339–347. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2017.10.054>

Iqbal, J., Shahnaz, G., Dünnhaupt, S., Müller, C., Hintzen, F., & Bernkop-Schnürch, A. (2012). Preactivated thiomers as mucoadhesive polymers for drug delivery. *Biomaterials*, 33(5), 1528–1535. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.10.021>

Jansook, P., Ogawa, N., & Loftsson, T. (2018). Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 535(1–2), 272–284. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2017.11.018>

Jenquin, M. R., & McGinity, J. W. (1994). Characterization of acrylic resin matrix films and mechanisms of drug-polymer interactions. *International Journal of Pharmaceutics*, 101(1–2), 23–34. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)90072-8](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)90072-8)

Johal, H. S., Garg, T., Rath, G., & Goyal, A. K. (2016). Advanced topical drug delivery system for the management of vaginal candidiasis. *Drug delivery*, 23(2), 550–563. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.928760>

Johansson, M. E. V. (2012). Fast Renewal of the Distal Colonic Mucus Layers by the Surface Goblet Cells as Measured by In Vivo Labeling of Mucin Glycoproteins. *PLoS ONE*, 7(7), e41009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041009>

Kassem, A. A., Mohsen, A. M., Ahmed, R. S., & Essam, M. (2016). Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) with enhanced solubilization of nystatin for treatment of oral candidiasis: Design, optimization, in vitro and in vivo evaluation. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.02.081>

Kast, C. E., & Bernkop-Schnürch, A. (2001). Thiolated polymers — thiomers: development and in vitro evaluation of chitosan–thioglycolic acid conjugates. *Biomaterials*, 22(17), 2345–2352. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00421-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00421-X)

Kiss, T., Fenyvesi, F., Bácskay, I., Váradi, J., Fenyvesi, É., Iványi, R., ...
142

- Vecsernyés, M. (2010). Evaluation of the cytotoxicity of β -cyclodextrin derivatives: Evidence for the role of cholesterol extraction. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40(4), 376–380. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.04.014>
- Köllner, S., Nardin, I., Markt, R., Griesser, J., Prüfert, F., & Bernkop-Schnürch, A. (2017a). Self-emulsifying drug delivery systems: Design of a novel vaginal delivery system for curcumin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 115, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.03.012>
- Köllner, S., Nardin, I., Markt, R., Griesser, J., Prüfert, F., & Bernkop-Schnürch, A. (2017b). Self-emulsifying drug delivery systems: Design of a novel vaginal delivery system for curcumin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 115, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.03.012>
- Krishna, G., Moton, A., Ma, L., Medlock, M. M., & McLeod, J. (2009). Pharmacokinetics and Absorption of Posaconazole Oral Suspension under Various Gastric Conditions in Healthy Volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3), 958–966. <https://doi.org/10.1128/AAC.01034-08>
- Krishna, Gopal, Ma, L., Martinho, M., & O'Mara, E. (2012). Single-Dose Phase I Study To Evaluate the Pharmacokinetics of Posaconazole in New Tablet and Capsule Formulations Relative to Oral Suspension. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(8), 4196–4201. <https://doi.org/10.1128/AAC.00222-12>
- Kujawski, J., Czaja, K., Dettlaff, K., Żwawiak, J., Ratajczak, T., & Bernard, M. K. (2019). Structural and spectroscopic properties of posaconazole – Experimental and theoretical studies. *Journal of Molecular Structure*, 1181, 179–189. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2018.12.074>
- Kurkov, S. V. (2013). Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 453(1), 167–180. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2012.06.055>
- Laffleur, F., & Röttges, S. (2019). Mucoadhesive approach for buccal application: Preactivated chitosan. *European Polymer Journal*, 113, 60–66. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2019.01.049>
- Lai, S. K., Wang, Y.-Y., & Hanes, J. (2009). Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Advanced drug delivery reviews*, 61(2), 158–171. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.11.002>
- Leclercq, L., Lubart, Q., Dewilde, A., Aubry, J.-M., & Nardello-Rataj, V. (2012). Supramolecular effects on the antifungal activity of cyclodextrin/di-n-

decyldimethylammonium chloride mixtures. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(5), 336–345.
<https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2012.02.017>

Leichner, C., Menzel, C., Laffleur, F., & Bernkop-Schnürch, A. (2017). Development and in vitro characterization of a papain loaded mucolytic self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). *International Journal of Pharmaceutics*, 530(1–2), 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.059>

Leitner, V. M., Walker, G. F., & Bernkop-Schnürch, A. (2003). Thiolated polymers: evidence for the formation of disulphide bonds with mucus glycoproteins. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 56(2), 207–214. Tarihinde adresinden erişildi
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12957634>

Leung, S., Poulakos, M., Machin, J., Leung, S., Poulakos, M. N., & Machin, J. (2015). Posaconazole: An Update of Its Clinical Use. *Pharmacy*, 3(4), 210–268.
<https://doi.org/10.3390/pharmacy3040210>

Liu, M., Zhang, J., Shan, W., & Huang, Y. (2015). Developments of mucus penetrating nanoparticles. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(4), 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.12.007>

Loftsson, T., Sigurdsson, H. H., Másson, M., & Schipper, N. (2004). Preparation of solid drug/cyclodextrin complexes of acidic and basic drugs. *Die Pharmazie*, 59(1), 25–29. Tarihinde adresinden erişildi
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14964417>

Loftsson, Thorsteinn. (2014). Self-assembled cyclodextrin nanoparticles and drug delivery. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 80(1–2), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s10847-013-0375-1>

Loftsson, Thorsteinn, Saokham, P., & Sá Couto, A. R. (2019). Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes in aqueous solutions. *International Journal of Pharmaceutics*, 560, 228–234.
<https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2019.02.004>

Lupo, N., Fodor, B., Muhammad, I., Yaqoob, M., Matuszczak, B., & Bernkop-Schnürch, A. (2017). Entirely S-protected chitosan: A promising mucoadhesive excipient for metronidazole vaginal tablets. *Acta Biomaterialia*, 64, 106–115.
<https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2017.10.014>

- Macaev, F., Boldescu, V., Geronikaki, A., & Sucman, N. (2013). Recent Advances in the Use of Cyclodextrins in Antifungal Formulations. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(21), 2677–2683. <https://doi.org/10.2174/15680266113136660194>
- Marchaim, D., Lemanek, L., Bheemreddy, S., Kaye, K. S., & Sobel, J. D. (2012). Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Vulvovaginitis. *Obstetrics & Gynecology*, 120(6), 1407–1414. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e31827307b2>
- Mehta, R., Chawla, A., Sharma, P., & Pawar, P. (2013). Formulation and in vitro evaluation of Eudragit S-100 coated naproxen matrix tablets for colon-targeted drug delivery system. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 4(1), 31–41. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.107498>
- Menzel, C., & Bernkop-Schnürch, A. (2018). Enzyme decorated drug carriers: Targeted swords to cleave and overcome the mucus barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 124, 164–174. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2017.10.004>
- Menzel, C., Holzeisen, T., Laffleur, F., Zaichik, S., Abdulkarim, M., Gumbleton, M., & Bernkop-Schnürch, A. (2018). In vivo evaluation of an oral self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for exenatide. *Journal of Controlled Release*, 277, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.03.018>
- Miranda, J. C. de, Martins, T. E. A., Veiga, F., & Ferraz, H. G. (2011). Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(4), 665–681. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000400003>
- Mirza, M. A., Ahmad, S., Mallick, M. N., Manzoor, N., Talegaonkar, S., & Iqbal, Z. (2013). Development of a novel synergistic thermosensitive gel for vaginal candidiasis: an in vitro, in vivo evaluation. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 103, 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.038>
- Moghadam, A., Ijaz, M., Asim, M. H., Mahmood, A., Jelkmann, M., Matuszczak, B., & Bernkop-Schnürch, A. (2018). Non-ionic thiolated cyclodextrins — the next generation. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 13, 4003–4013. <https://doi.org/10.2147/IJN.S153226>
- Mukherjee, T. K., Mishra, A. K., Mukhopadhyay, S., & Hoidal, J. R. (2007). High Concentration of Antioxidants N-Acetylcysteine and Mitoquinone-Q Induces Intercellular Adhesion Molecule 1 and Oxidative Stress by Increasing

- Intracellular Glutathione. *The Journal of Immunology*, 178(3), 1835–1844.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.3.1835>
- Müller, C., Leithner, K., Hauptstein, S., Hintzen, F., Salvenmoser, W., & Bernkop-Schnürch, A. (2013). Preparation and characterization of mucus-penetrating papain/poly(acrylic acid) nanoparticles for oral drug delivery applications. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(1), 1353. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1353-z>
- Müllertz, A., Ogbonna, A., Ren, S., & Rades, T. (2010). New perspectives on lipid and surfactant based drug delivery systems for oral delivery of poorly soluble drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62(11), 1622–1636.
<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01107.x>
- Narisawa, S., Nagata, M., Hirakawa, Y., Kobayashi, M., & Yoshino, H. (1996). An Organic Acid-Induced Sigmoidal Release System for Oral Controlled-Release Preparations. 2. Permeability Enhancement of Eudragit RS Coating Led by the Physicochemical Interactions with Organic Acid. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(2), 184–188. <https://doi.org/10.1021/js950180o>
- Netsomboon, K., & Bernkop-Schnürch, A. (2016). Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 98, 76–89. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.11.003>
- Nikolic, I. L., Savic, I. M., Popsavin, M. M., Rakic, S. J., Mihajilov-Krstev, T. M., Ristic, I. S., ... Savić-Gajic, I. M. (2018). Preparation, characterization and antimicrobial activity of inclusion complex of biochanin A with (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(11), 1485–1493. <https://doi.org/10.1111/jphp.13003>
- Nowak, J., Laffleur, F., & Bernkop-Schnürch, A. (2015). Preactivated hyaluronic acid: A potential mucoadhesive polymer for vaginal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 478(1), 383–389.
<https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2014.11.048>
- Palmeira-de-Oliveira, R., Palmeira-de-Oliveira, A., & Martinez-de-Oliveira, J. (2015). New strategies for local treatment of vaginal infections. *Advanced drug delivery reviews*, 92, 105–122. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.06.008>
- Partenhauser, A., & Bernkop-Schnürch, A. (2016). Mucoadhesive polymers in the treatment of dry X syndrome. *Drug Discovery Today*, 21(7), 1051–1062.
<https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2016.02.013>

- Pearson, J. P., Chater, P. I., & Wilcox, M. D. (2016). The properties of the mucus barrier, a unique gel – how can nanoparticles cross it? *Therapeutic Delivery*, 7(4), 229–244. <https://doi.org/10.4155/tde-2015-0002>
- Ramírez-Santos, A., Pereiro, M., & Toribio, J. (2008). [Recurrent vulvovaginitis: diagnostic assessment and therapeutic management]. *Actas dermo-sifiliográficas*, 99(3), 190–198. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18358194>
- Ramsay, S., Astill, N., Shankland, G., & Winter, A. (2009). Practical management of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Trends in Urology, Gynaecology & Sexual Health*, 14(6), 18–22. <https://doi.org/10.1002/tre.127>
- Rençber, S., Karavana, S. Y., Şenyiğit, Z. A., Eraç, B., Limoncu, M. H., & Baloğlu, E. (2017). Mucoadhesive *in situ* gel formulation for vaginal delivery of clotrimazole: formulation, preparation, and *in vitro/in vivo* evaluation. *Pharmaceutical Development and Technology*, 22(4), 551–561. <https://doi.org/10.3109/10837450.2016.1163385>
- Rohrer, J., Partenhauser, A., Hauptstein, S., Gallati, C. M., Matuszczak, B., Abdulkarim, M., ... Bernkop-Schnürch, A. (2016). Mucus permeating thiolated self-emulsifying drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 98, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.11.004>
- Schiller, D. S., & Fung, H. B. (2007). Posaconazole: An extended-spectrum triazole antifungal agent. *Clinical Therapeutics*, 29(9), 1862–1886. <https://doi.org/10.1016/J.CLINTHERA.2007.09.015>
- Şenyiğit, Z. A., Karavana, S. Y., İlem-Özdemir, D., Çalışkan, Ç., Waldner, C., Şen, S., ... Baloğlu, E. (2015). Design and evaluation of an intravesical delivery system for superficial bladder cancer: preparation of gemcitabine HCl-loaded chitosan-thioglycolic acid nanoparticles and comparison of chitosan/poloxamer gels as carriers. *International journal of nanomedicine*, 10, 6493–6507. <https://doi.org/10.2147/IJN.S93750>
- Smart, J. D. (2005). The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced drug delivery reviews*, 57(11), 1556–1568. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.001>
- Sobel, J. D. (2016). Recurrent vulvovaginal candidiasis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 214(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.06.067>

- Spósito, P. Á. F., Mazzeti Silva, A. L., de Oliveira Faria, C., Urbina, J. A., Pound-Lana, G., Bahia, M. T., & Mosqueira, V. C. F. (2017). Ravuconazole self-emulsifying delivery system: in vitro activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes and in vivo toxicity. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 12, 3785–3799. <https://doi.org/10.2147/IJN.S133708>
- Suchaoin, W., Pereira de Sousa, I., Netsomboon, K., Lam, H. T., Laffleur, F., & Bernkop-Schnürch, A. (2016). Development and in vitro evaluation of zeta potential changing self-emulsifying drug delivery systems for enhanced mucus permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, 510(1), 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.045>
- Sun, Q. N., Fothergill, A. W., McCarthy, D. I., Rinaldi, M. G., & Graybill, J. R. (2002). In Vitro Activities of Posaconazole, Itraconazole, Voriconazole, Amphotericin B, and Fluconazole against 37 Clinical Isolates of Zygomycetes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5), 1581–1582. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.5.1581-1582.2002>
- Tang, Peixiao, Ma, X., Wu, D., Li, S., Xu, K., Tang, B., & Li, H. (2016). Posaconazole/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host–guest system: Improving dissolution while maintaining antifungal activity. *Carbohydrate Polymers*, 142, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.042>
- Tang, Peter, & H., P. (2017). Determination of Posaconazole in Plasma/Serum by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Separations*, 4(4), 16. <https://doi.org/10.3390/separations4020016>
- Torres, H. A., Hachem, R. Y., Chemaly, R. F., Kontoyiannis, D. P., & Raad, I. I. (2005). Posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(12), 775–785. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70297-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70297-8)
- Tuncay Tanrıverdi, S., Hilmioğlu Polat, S., Yeşim Metin, D., Kandiloğlu, G., & Özer, Ö. (2016). Terbinafine hydrochloride loaded liposome film formulation for treatment of onychomycosis: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Liposome Research*, 26(2), 163–173. <https://doi.org/10.3109/08982104.2015.1067892>
- Uekama, K., & Otagiri, M. (1987). Cyclodextrins in drug carrier systems. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 3(1), 1–40. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3542243>

- Ujhelyi, Z., Fenyvesi, F., Váradi, J., Fehér, P., Kiss, T., Veszelka, S., ... Bácskay, I. (2012). Evaluation of cytotoxicity of surfactants used in self-micro emulsifying drug delivery systems and their effects on paracellular transport in Caco-2 cell monolayer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(3), 564–573. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2012.07.005>
- Wagner, K., & McGinity, J. (2002). Influence of chloride ion exchange on the permeability and drug release of Eudragit RS 30 D films. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 82(2–3), 385–397. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12175751>
- Wang, L., Zhou, Y., Wu, M., Wu, M., Li, X., Gong, X., ... Zhang, X. (2018). Functional nanocarrier for drug and gene delivery via local administration in mucosal tissues. *Nanomedicine*, 13(1), 69–88. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0143>
- Websayfası - Posaconazole. (2019). Tarihinde 17 Temmuz 2019, adresinden erişildi <https://www.selleckchem.com/products/Posaconazole.html>
- Würtenberger, I., & Gust, R. (2014). A highly sensitive method for in vitro testing of fluorinated drug candidates using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry (HR-CS MAS). *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(14), 3431–3442. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7780-1>
- Yang, M., Lai, S. K., Wang, Y.-Y., Zhong, W., Happe, C., Zhang, M., ... Hanes, J. (2011). Biodegradable Nanoparticles Composed Entirely of Safe Materials that Rapidly Penetrate Human Mucus. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(11), 2597–2600. <https://doi.org/10.1002/anie.201006849>
- Yang, M., Lai, S. K., Yu, T., Wang, Y.-Y., Happe, C., Zhong, W., ... Hanes, J. (2014). Nanoparticle penetration of human cervicovaginal mucus: the effect of polyvinyl alcohol. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 192, 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.07.045>
- Zaichik, S., Steinbring, C., Caliskan, C., & Bernkop-Schnürch, A. (2019). Development and in vitro evaluation of a self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for oral vancomycin administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 554. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.010>
- Zaichik, Sergey, Steinbring, C., Menzel, C., Knabl, L., Orth-Höller, D., Ellemunter, H., ... Bernkop-Schnürch, A. (2018). Development of self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for ciprofloxacin with improved mucus permeating

properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 547(1–2), 282–290.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.005>

Zupančič, O., Griebinger, J. A., Rohrer, J., Pereira de Sousa, I., Danninger, L., Partenhauser, A., ... Bernkop-Schnürch, A. (2016). Development, in vitro and in vivo evaluation of a self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for oral enoxaparin administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 109, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.09.013>

Zupančič, O., Partenhauser, A., Lam, H. T., Rohrer, J., & Bernkop-Schnürch, A. (2016). Development and in vitro characterisation of an oral self-emulsifying delivery system for daptomycin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.10.005>



Ekler

EK-1: TÜBİTAK 2214/A Yurt Dışı Araştırma Bursu Başvuru Onay Yazısı



T.C.
TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU BAŞKANLIĞI
Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı

Sayı : 53325897-115.02-170549

02/08/2017

Konu : 2017 Yılı 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs
Programı (Doktora öğrencileri için) 1. Dönem
Başvurunuz

Sayın Çağrı ÇALIŞKAN

2017 yılı 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı (Doktora öğrencileri için)'nin 1. dönemine yaptığınız başvurunun ilgili disiplinde uzmanlaşmış panelistlerin değerlendirme sonuçları doğrultusunda Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı Yürütme Komitesi'nin 07/07/2017 tarih ve 3 sayılı toplantısında incelendiği ve tarafınıza aşağıda belirtilen desteğin sağlandığını bildirmekten mutluluk duyarım.

Bursunuzun başlatılabilmesi için yurt dışına çıkmanıza en az 1 ay kala verilen desteği kabul ettiğinize dair ekte sunulan "2214/A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı Kapsamında Çalışmalarını Yurt Dışında Sürdüreceğ Bursiyerlerin Uyması Gereken Kurallar"ı imzalamanız ve "Düzenleme Şeklinde Taahhüt ve Müşterek Borçlu ve Müteselsil Kefalet Senedi"ni doldurup notere tasdik ettirmeniz gerekmektedir. Ayrıca, Rektörlük (bağlı olduğunuz kurum üniversite değilse kurumunuzun en üst makamından) onaylı izin yazınızı, kefil bordrolarınızı ve banka döviz hesap bilgileriniz ile yurt dışına gidiş-dönüş tarihlerinizi içeren yazınızı Daire Başkanlığımıza / Kurumumuza iletmeniz gerekmektedir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Doç. Dr. Samettin GÜNDÜZ
BİDEB Araştırma Burs ve Destekleri
Grubu Yürütme Komitesi Grup
Koordinatörü V.

NOT: Uçak biletinizle (Sağlanan destek kısmında uçak bileti desteği var ise) ilgili işlemlerinizi için, iletişim bilgileri:

Burs hakkında diğer işlemler ve sorular için iletişim bilgileri:

Sağlanan Destek:

Burs: 12 ay/month x EUR1500 = EUR18000

Uçak Bileti: AVUSTURYA(Bursiyer ve varsa eşi için gidiş-dönüş)

Teşekkür

Tüm doktoram boyunca benimle paylaştığı bilgi birikimi, her türlü emeği ve desteği için danışmanım Prof. Dr. Esra BALOĞLU'na,

Tez çalışmamı 2214/A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında destekleyen ve araştırmalarımın 1 yıllık bölümünü gerçekleştirmeme olanak tanıyan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na

2214/A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu kapsamında Innsbruck Üniversitesi Eczacılık Enstitüsü'nde yürüttüğüm çalışmalarda danışmanlığımı yapan Prof. Dr. Andreas BERNKOP-SCHNÜRCH'e,

Doktora çalışmam boyunca gerekli olanakları sağlamada yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Makbule AŞIKOĞLU ve Prof. Dr. Özgen ÖZER'e,

Innsbruck Üniversitesi Eczacılık Enstitü Farmasötik Teknoloji Bölümü'ndeki çalışma arkadaşlarım Christian STEINBRING, Noemi Lupo, Randi Angela BAUS, Roman GÖTZ ve Sergey ZAICHİK'e

Antifungal etkinlik çalışmalarındaki yardımları için Innsbruck Tıp Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Markus NAGL'a,

Innsbruck Üniversitesi Eczacılık Enstitüsü Farmasötik Kimya Bölümü'nde yaptığım analiz çalışmalarındaki yardımları için Prof. Dr. Barbara MATUSZCZAK ve Daniel BACKER'e

Innsbruck'ta kaldığım bir yıl ve sonrasındaki arkadaşlıkları için Buket UÇAR, Boran Taylan BALCI, Candost DAĞDEVİREN, Claudius STRÖHLE, İrem KILIÇARSLAN, Mehmet Mahsum KAPLAN, Umutcan ŞİMŞEK ve Zeynep Burcu AKKUŞ'a,

Gerçek dostluğu için Ekin KOÇ'a

Her zaman yanımda olduğu için eşim Gizem ÇALIŞKAN'a

Teşekkür ederim.

İzmir, 22.07.2019

Çağrı Çalışkan

Özgeçmiş

Lisans: Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 2004-2008

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Radyofarmasi, "99mTc-Zoledronik Asidin işaretleme verimine deneysel koşulların etkisi", 2009-2012

İletişim Bilgileri: cagri.caliskan@ege.edu.tr

SCI, SSCI, AHCI İNDEKSLERİNE GİREN DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

Zaichik S., Steinbring C., Çalışkan Ç., Bernkop-Schnürch A., "Development and *in vitro* evaluation of a self-emulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral vancomycin administration.", International journal of pharmaceutics, vol.554, pp.125-133, 2019

Karavana S.Y., Ay Şenyiğit Z., Çalışkan Ç., Sevin G., İlem Özdemir D., Erzurumlu Y. , et al., "Gemcitabine hydrochloride microspheres used for intravesical treatment of superficial bladder cancer: a comprehensive *in vitro/eks vivo/in vivo* evaluation", DRUG DESIGN DEVELOPMENT AND THERAPY, vol.12, pp.1959-1975, 2018

Elbahwy I.A., Lupo N., Ibrahim H.M., Ismael H.R., Kasem A.A., Çalışkan Ç., et al., "Mucoadhesive self-emulsifying delivery systems for ocular administration of econazole", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol.541, pp.72-80, 2018

İlem Özdemir D., Karavana S.Y., Şenyiğit Z., Çalışkan Ç., Ekinci M., Aşıkoğlu M., et al., "Radiolabeling and cell incorporation studies of gemcitabine HCl microspheres on bladder cancer and papilloma cell line", JOURNAL OF RADIOANALYTICAL AND NUCLEAR CHEMISTRY, vol.310, pp.515-522, 2016

Senyigit Z.A., Karavana S.Y., İlem-Ozdemir D., Çalışkan Ç., Waldner C., Şen S., et al., "Design and evaluation of an intravesical delivery system for superficial bladder cancer: preparation of gemcitabine HCl-loaded chitosan-

thioglycolic acid nanoparticles and comparison of chitosan/poloxamer gels as carriers", INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE, vol.10, 2015

Şenyigit Z.A., Karavana S.Y., İlem-Ozdemir D., Çalışkan Ç., Waldner C., Şen S., et al., "Design and evaluation of an intravesical delivery system for superficial bladder cancer: preparation of gemcitabine HCl-loaded chitosan-thioglycolic acid nanoparticles and comparison of chitosan/poloxamer gels as carriers", INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE, vol.10, 2015

HAKEMLİ KONGRE / SEMPOZYUMLARIN BİLDİRİ KİTAPLARINDA YER ALAN YAYINLAR

Çalışkan Ç., Cheaburuyilmaz C., Baloğlu E., "CHONDROITIN SULPHATE/ POLYVINYALCOHOL HYDROGELS FOR VAGINAL FORMULATIONS. I. TEXTURE PROFILE ANALYSIS", 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2017),

Şenyigit Z., Karavana S.Y., İlem Özdemir D., Çalışkan Ç., Baloğlu E., "Dilution of Gemcitabine HCl loaded chitosan gels with serum physiologic before the intravesical administration to facilitate the application", 4 th conference on inovation on drug delivery, ,

Şenyigit Z., Karavana S.Y., İlem Özdemir D., Çalışkan Ç., Wagner C., Bernkop Schnürch A., et al., "Comparison of different chitosan types for the preparation of intravesically administered gemcitabine HCl nanoparticles", 18th International pharmaceutical Technology, ,

Karavana S.Y., Şenyigit Z., Çalışkan Ç., Gürsel Ö., Şen S., Baloğlu E., "In Vitro Release Eks vivo Permeation Studies Of Gemcitabine Hydrochloride Microspheres For Intravesical Application 4th Congress on Innovation in Drug Delivery Site Specific Drug Delivery", 4th Congress on Innovation in Drug Delivery, ,

Şenyigit Z., Karavana S.Y., Çalışkan Ç., Baloğlu E., "In situ Gel Formulation for Intravesical Gemcitabine Hydrochloride Installation", 1st European Conference on Pharmaceutics, ,

Şenyigit Z., Karavana S.Y., İlem Özdemir D., Çalışkan Ç., Şen S., Baloğlu E., "Evalution of Chitosan Nanoparticles for Intravesical Administration of

Gemcitabine HCl for the Treatment of Superficial Bladder Cancer", 1st European Conference on Pharmaceutics, ,

Karavana S.Y., Şenyiğit Z., Çalışkan Ç., Baloğlu E., "Development of Intravesical Gel Formulation of Gemcitabine Hydrochloride Microparticles", Challenges in Science and Technology of Polymer Materials, ,

İlem Özdemir D., Karavana S.Y., Şenyiğit Z., Ekinici M., Erzurumlu Y., Çalışkan Ç., et al., "Radiolabeled bioadhesive microspheres loaded chitosan gel formulations incorporation to the bladder papilloma and carcinoma cell lines", 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11), ANKARA, TÜRKİYE, 9-12 Haziran 2015, pp.140-141

İlem Özdemir D., Karavana S.Y., Şenyiğit Z., Ekinici M., Erzurumlu Y., Çalışkan Ç., et al., "In vitro incorporation studies of radiolabeled mucoadhesive microspheres at bladder carcinoma cell lines", 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, ,

İlem Özdemir D., Karavana S.Y., Şenyiğit Z., Ekinici M., Erzurumlu Y., Çalışkan Ç., et al., "In vitro incorporation studies of radiolabeled mucoadhesive microspheres at bladder carcinoma cell lines", 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11), ANKARA, TÜRKİYE, 9-12 Haziran 2015, pp.139-140

Çalışkan Ç., Aşıkoğlu M., Özkılıç H., "Effect of Experimental Conditions on Labeling Yield of ^{99m}Tc Zoledronic Acid and gamma scintigraphic studies", International Multidisciplinary Symposium on Drug Research & Development, TÜRKİYE,

Şenyiğit Z., Karavana S.Y., İlem Özdemir D., Çalışkan Ç., Claudia W., Andreas B.S., et al., "A Thermo Gelling and Bioadhesive Delivery System for Intravesical Administration of Gemcitabine HCl", Challenges in Science and Technology of Polymer Materials, ,

Şenyiğit Z., Karavana S.Y., İlem Özdemir D., Çalışkan Ç., Waldner C., Bernkop Schnürch A., et al., "Effect of Residual Urine in Bladder to Intravesically Applied Chitosan and Poloxamer Gels", 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, ,

Şenyiğit Z., Karavana S.Y., İlem Özdemir D., Çalışkan Ç., Baloğlu E., "Evaluation and Comparison of Chitosan and Poloxamer Gels Used for Intravesical Administration of Gemcitabine HCl Loaded Nanoparticles", International Conference on Pharmaceutical Sciences, ,

Sevin G., Erzurumlu Y., Karavana S.Y., Şenyiğit Z., İlem Özdemir D., Çalışkan Ç., et al., "Cytotoxic Effects of Gemcitabine HCl Loaded Microspheres and Nanoparticles on Bladder Cancer Cell Lines", 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, ,

Sevin G., Erzurumlu Y., Şenyiğit Z., Karavana S.Y., İlem Özdemir D., Çalışkan Ç., et al., "Antitumor Activity of Gels Containing Gemcitabine HCl Loaded Microspheres and Nanoparticles on Bladder Cancer Cell Lines", 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, ,

Aşıkoğlu M., İlem Özdemir D., Çalışkan Ç., Durak G., "Comparative Bone Scintigraphy Study with Radiolabeled Biphosphonates", IPSMPS'2010, İZMİR, TÜRKİYE, 24-27 Haziran 2010, pp.45-46