

**ENZİM REPLASMAN TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE
TRİPSİN İÇEREN MATRİKS TİPİ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAFİZE DİDEM YÜKSEK

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
AĞUSTOS – 2018**

**ENZİM REPLASMAN TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE
TRİPSİN İÇEREN MATRİKS TİPİ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAFİZE DİDEM YÜKSEK

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Dr. Nefise Özlen ŞAHİN**

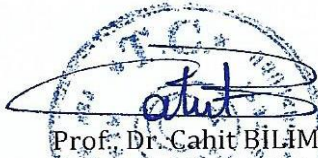
**MERSİN
AĞUSTOS – 2018**

ONAY

Nafize Didem YÜKSEK tarafından Prof. Dr. Nefise Özlen ŞAHİN danışmanlığında hazırlanan Enzim Replasman Tedavisinde Kullanılmak Üzere Tripsin İçeren Matriks Tipi İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması Ve Karakterizasyonu” başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 01 AĞUSTOS 2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği/çokluğu ile Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof.Dr. Nefise Özlen ŞAHİN	
Üye	Prof.Dr. Nazan BERGİŞADİ	
Üye	Doç.Dr. Aylin DÖĞEN	

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun 14/09/2018 tarih ve 2018-35/1258 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Cahit BİLİM
Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

08 AĞUSTOS 2018/ 08 AUGUST 2018


Nafize Didem YÜKSEK

ÖZET

ENZİM REPLASMAN TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE TRİPSİN İÇEREN BONCUKLARIN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Sindirim enzimlerinden biri olan tripsin, kistik fibroz tedavisinde terapötik ajan olarak kullanılabilir. Proteinik yapıdaki ilaçlar, oral yolla uygulandığında degradasyona uğrarlar. Proteinik yapıda bir ilaç aktif maddesi olan tripsin de enzim replasman tedavisinde kullanılırken oral yolla alındığında gastrointestinal sistemde bozunmaya uğrar. Buna ilaveten, tripsin mide ağrısı ve bulantıya sebep olur. İlaç etken maddelerinin kolona hedeflendirilebilmesi için enterik dozaj şekillerinin (boncuk, enterik kapsül, enterik tablet vs.) kullanılması, bu problemlerin çözümü için önerilebilir. Bu çalışmada, enzimi gastrointestinal sistemde korumak için boncuklarda tutuklanması sağlanıp karakterizasyonu yapılmıştır. Hazırlanan boncuklar, matriks tipi kontrollü salım sistemleridir ve biyobozunur bir polimer olan aljinat kullanılarak hazırlanmışlardır. Baryum klorür, çapraz bağlama materyali olarak farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Ayrıca, çapraz bağlama süresi ile ilaç:polimer oranının ilaç tutma kapasitesi üzerine etkileri de araştırılmıştır. Tutuklanmış tripsinin stabilitesi incelendiğinde, 4°C'de 10 gün dayanıklı kalırken, 30°C'de iki gün içerisinde aktivitesini yitirdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, baryum klorür çapraz bağlama ajanı ile hazırlanan aljinat boncuklarında tutuklanan tripsinin, kistik fibroz hastalığının tedavisinde terapötik ajan olarak kullanılması önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: tripsin, kistik fibrozis, aljinat boncukları, enzim tutuklama.

Danışman: Prof. Dr. Nefise Özlen ŞAHİN, Mersin Üniversitesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF TRYPSIN CONTAINING MATRIX TYPE DRUG DELIVERY SYSTEMS FOR ENZYME REPLACEMENT THERAPY

One of the digestive enzymes, trypsin can be used as a therapeutic agent in treatment of cystic fibrosis. The drugs with proteinous structure're degraded upon oral administration. Trypsin as a proteinous drug active substance undergoes degradation in gastrointestinal tract following oral administration for enzyme replacement therapy. In addition, trypsin causes pain in stomach and nausea. The use of enteric dosage forms to deliver the drug substance to colon can be suggested to solve these problems. In this study, in order to protect the enzyme in GIS, it, was immobilized in beads and characterized. The beads were in matrix type controlled release systems (e.g. beads, enteric tablets, enteric capsules) and prepared using biodegradable polymer, alginate. Barium chloride was used as a cross linking agent at different concentrations. Also, the effects of cross linking time and drug to polymer ratio on drug entrapment efficiency and release were investigated. The storage stability of entrapped trypsin at 4°C was found upto 10 days, while at 30°C the enzyme lost its activity within two days. In conclusion, trypsin encapsulated using barium chloride cross linked alginate can be suggested as a therapeutic agent for treatment of cystic fibrosis.

Keywords: trypsin, cystic fibrosis, enzyme immobilization, aljinatebeads.

Advisor: Prof. Dr. Nefise Özlen ŞAHİN, Department of Pharmaceutical Biotechnology, University of Mersin

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca ilminden faydalandığım, yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, her konuda destek olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ayrıca sabır ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen, yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Nefise Özlen ŞAHİN'e,

Ayrıca deneysel çalışmalarım boyunca benden yardım, bilgi ve desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Ece ÇOBANOĞLU'na; Yüksek lisans öğrencisi Ezel YILMAZ'a,

Araştırma süresince yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Dr. Altan YÜKSEL'e

Çalışmalarım esnasında fizikokimyasal analizlerin yapılmasında cihaz kullanımı açısından destekleri ile bana yardımcı olan MEİTAM personeline, kimyasal analizlerin sonuçlarının yorumlanmasında yardımcı olan Dr. Anil G. Singh'e, DSC analizleri için Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'na ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm bölüm arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan benden koşulsuz şartsız yardım ve desteğini esirgemeyen çok değerli saygıdeğer eşim Dr. Hakan YÜKSEK'e, çok değerli ve kıymetli sevgili kızlarım İlay YÜKSEK ve İpek YÜKSEK'e, hayatımın her aşamasında benden maddi manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman desteğini yanımda hissettiğim beni bugünlere getiren CANIM AİLEME, Annem'e ve Babam'a,

SONSUZ SEVGİ, SAYGI VE ŞÜKRANLARIMI SUNARIM.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLOLAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	4
2.1. KİSTİK FİBROZİS	4
2.2. TRİPSİN	5
2.2.1. Tripsinin Kimyasal Yapısı	6
2.2.2. Tripsinin Fizyolojik Fonksiyonları	8
2.2.3. Endikasyonu ve Tıbbi Kullanımı	11
2.2.4. Farmakokinetiği	12
2.2.5. Kontrendikasyonları	12
2.2.6. Yan Etkileri	12
2.2.7. Piyasada Mevcut Müstahzarları	12
2.3. ENZİM	13
2.3.1. Endüstriyel Katalizör Olarak Enzimlerin Avantajları ve Sınırlamaları	16
2.3.2. Enzimlerin Sınıflandırılması	16
2.3.3. Enzimlerin Fizikokimyasal özellikleri	17
2.3.4. Enzimlerin Katalitik Aktivitelerini Etkileyen Faktörler	17
2.3.4.1. Sıcaklık	17
2.3.4.2. pH	18
2.3.4.3. Enzim ve Substrat Konsantrasyonu	19
2.3.5. Enzim Formülasyonları	20
2.3.5.1. Katı Dozaj şekilleri formu	20
2.3.6. Enzim İmmobilizasyonu	21
2.3.6.1.1. Hapsetme (Tutuklama)	24
2.3.6.1.2. Fiziksel Adsorbsiyon	25
2.3.6.1.3. Enkapsülasyon	27
2.3.6.1.4. Çapraz bağlama yöntemi	28
2.3.6.1.4. Kovalent bağlama	30
2.3.6.1.5. Enzim İmmobilizasyonunda Boncukların Kullanımı	31
2.4. KOLONA İLAÇ HEDEFLENDİRİLMESİ	32
2.4.1. Gastrointestinal Sistem	32
2.4.2. Gastrointestinal Sistemde İlaç Serbestlenmesi	33
2.4.3. Kolona İlaç Serbestlenmesinde Kullanılan Yöntemler	35
2.4.4. pH-Duyarlı Sistemlerin Gastrointestinal Sistemdeki İlaç Salım Uygulamaları	36
2.4.5. Kolona İlaç Hedeflendirilmesinde ve Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Polimerler	37
2.4.6. Kontrollü Salım Sistemi Hazırlanmasında Destek Materyali Olarak Kullanılan İnorganik Maddeler	42
2.5. ALJİNİK ASİT	43
2.5.1. Yapısı ve Özellikleri	44
2.5.2. İyonik Çapraz Bağlama	44
2.5.3. Moleküler Ağırlık ve Çözünürlük	46

	Sayfa
2.5.4. Aljinatlarla Hidrojel Oluşumu ve Özellikleri	46
2.6. ÇALIŞMANIN AMACI	49
MATERYAL ve YÖNTEM	50
3.1. GEREÇLER	50
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	50
3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	50
3.1.3. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	50
3.1.4. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	51
3.1.5. Kullanılan Bilgisayar Programları	51
3.2. YÖNTEMLER	51
3.2.1. Ön Formülasyon Çalışmaları	51
3.2.1.1. FTIR Analizi	51
3.2.1.2. DSC Analizi	51
3.2.1.3. Fe-SEM Analizi	51
3.2.2. Tripsin Yüklü Sodyum Aljinat Boncuklarının Hazırlanması	52
3.2.3. Mikroskopik Analiz	53
3.2.4. Boş Boncukların Denge Su İçerikleri Tayini	53
3.2.5. İlaç Yükleme Kapasitesi	54
3.2.6. Şişme Hızının Saptanması	54
3.2.7. Aşınma Tayini	54
3.2.8. Partikül Boyutu Saptama	54
3.2.9. İn vitro Dezentegrasyon Çalışmaları	55
3.2.10. İn vitro Salım Çalışmaları	55
3.2.11. İstatistiksel Analizler	55
3.2.12. Enzim Stabilitesi	55
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	56
4.1. ÖN FORMÜLASYON ÇALIŞMALARI: TRİPSİN VE YARDIMCI MADDELERİN KARAKTERİZASYONU	56
4.1.1. FTIR Analizleri	56
4.1.2. Erime Derecesi Tayini	58
4.1.3. Tripsin Çözünürlük Testi	59
4.1.4. Tripsin Miktar Tayini	59
4.1.5. DSC Analizleri	59
4.2. BONCUKLARIN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU	61
4.2.1. Hazırlanan Boncukların Polarize Işık Mikroskobu ve SEM İle İncelenmesi	61
4.2.2. Hazırlanan Boncuklara Ait Enzim Tutuklama Verim Hesapları ve Partikül Boyutu Analizleri	63
4.2.3. Hazırlanan Boncukların Denge Su İçeriklerinin Tayini	64
4.2.4. Boncuklarda Tutulan Protein Miktarı	65
4.2.5. Şişme Hızının Saptanması	66
4.2.6. Aşınma Tayini	66
4.3. İN VİTRO DEZENTTEGRASYON ÇALIŞMALARI	66
4.4. İLAÇ YÜKLÜ BONCUKLARDAN TRİPSİN SALIM ÇALIŞMALARI	67
4.4.1. İlaç/Polimer Oranının Tripsin Salımına Etkisi	67
4.4.2. Çapraz Bağlamam Süresinin Tripsin Salımına Etkisi	68
4.4.3. Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Tripsin Salımına Etkisi	69
4.4.4. pH'nın Tripsin Salımına Etkisi	70
4.5. ENZİM STABİLİTESİ	70
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	80
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	82

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Tripsinin Tarihçesi	6
Tablo 2.2. Enzim Sınıflaması	17
Tablo 2.3. İmmobilize Enzimlerin Performansını Etkileyen Faktörler	23
Tablo 2.4. Bazı İmmobilizasyon Tekniklerinin Avantaj ve Dezavantajları	30
Tablo 2.5. Enzim Matrislerinin Kimyasal Sınıflandırılması	38
Tablo 3.1. Tripsin Yüklü Boncukların Hazırlanmasında Uygulanan Değişkenler	53
Tablo 4.1. Farklı Formülasyonlara Ait Boncuk Hazırlama Verimi Değerleri	64
Tablo 4.2. Boncukların Denge Su İçerikleri	65
Tablo 4.3. Boncukların Şişme Öncesi ve Sonrası Partikül Boyutu	66
Tablo 4.4. Boncukların Dağılma Süreleri	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Polipeptid Zincirlerinin Şematik Gösterimi	8
Şekil 2.2. Kimotripsin Özgüllüğü	9
Şekil 2.3. Kimotripsin, Tripsin ve Elastazın S1 Cepleri	10
Şekil 2.4. Anahtar Kilit Modeli	13
Şekil 2.5. Bir Aktif Enzimin Yapısı	14
Şekil 2.6. Enzimatik Reaksiyon-Sıcaklık Grafiği	18
Şekil 2.7. Enzim Reaksiyonunda pH Grafiği	18
Şekil 2.8. Enzim ve Substrat Reaksiyon Grafikleri	19
Şekil 2.9. Toz Preparatların Üretiminde Etkili Faktörler	20
Şekil 2.10. Farklı Enzimatik Reaksiyon Türleri	23
Şekil 2.11. Tutuklama Tekniğini Kullanarak Bir Enzimin İmmobilizasyonu	25
Şekil 2.12. Adsorpsiyon Tekniği İle Enzim İmmobilizasyonu	25
Şekil 2.13. Çeşitli Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Şematik Gösterimi	26
Şekil 2.14. Enzimlerin Kapsülleme Tekniğini Kullanarak İmmobilizasyonu	28
Şekil 2.15. Hareketsizleştirme Tuzağı Yönteminde Matriks	28
Şekil 2.16. Çapraz Bağlama Tekniği	29
Şekil 2.17. Çapraz Bağlama (a) Vasıtasıyla Hareketsiz Kılınan ve Atıl Moleküller İle Birlikte Çapraz Bağlanan Biyokatalizörler (b).	29
Şekil 2.18. Enzimlerin Kovalent Bağlama Tekniği İle İmmobilizasyonu	30
Şekil 2.19. Kolonun Yapısının Şematik Gösterimi	33
Şekil 2.20. Gastrointestinal Sistemde Biyobozunur ve pH Duyarlı Oral İlaç Serbestleyen Formülasyonların Kullanımı	34
Şekil 2.21. Belirli Boyut ve Şekillerde Taşıyıcıya Bağlı İmmobilize Enzimler	39
Şekil 2.22. Kitozanın Kimyasal Yapısı	41
Şekil 2.23 Aljinatın Yapısı ve Zincir Konformasyonu ve Blok Dağılımı	45
Şekil 2.24. Değişik Aljinat Formlarının Eldesine Ait Önemli Parametreler	45
Şekil 2.25. β -D-mannuronik asit ile α -L-glukronik asit kalıntılarını gösteren aljinatın yapısı	47
Şekil 2.26. İki aljinat monomer, guluronat (G) ve manuronat (M) kimyasal yapısı ve konformasyon	48
Şekil 2.27. Yumurta-kafes kutusu modeli	49
Şekil 3.1. Boncuk Üretim İşleminin Akış Şeması	52
Şekil 4.1. Sodyum Aljinata Ait FTIR Spektrumu	57
Şekil 4.2. Tripsine Ait FTIR Spektrumu	57
Şekil 4.3. Tripsin + Aljinat (1:1) Karışımına Ait FTIR Spektrumu	58
Şekil 4.4. Tripsin + Aljinat + Baryum Klorür (1:1:1) Karışımına Ait FTIR Spektrumu	58
Şekil 4.5. Baryum Klorüre Ait DSC Diyagramı	60
Şekil 4.6. Tripsine Ait DSC Diyagramı	60
Şekil 4.7. Sodyum Aljinata Ait DSC Diyagramı	61
Şekil 4.8. Tripsin İçeren Polarize Işık Mikroskopunda Çekilmiş Fotoğrafı	62
Şekil 4.9. Boş Boncukların Fotoğrafı	62
Şekil 4.10. Protein Miktar Tayinine Ait Standart Doğru Grafiği	65
Şekil 4.11. 0.1 M Baryum Klorür Çözeltilisiyle Hazırlanan Tripsin Yüklü Boncuklardan %Tripsin Salımı	67
Şekil 4.12. 0.5 M Baryum Klorür Çözeltilisiyle Hazırlanan Tripsin Yüklü Boncuklardan % Tripsin Salımı	68
Şekil 4.13. Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Salım Hızına Etkisi	69

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simgesi	Tanım
KFTR	Kistik Fibrozis Transmembran Regulator
PERT	Pankreas Enzim Replasman Tedavisi
PI	Pankreas Yetmezliği
PS	Pankreas Yeterliliği
CLEA	Çapraz bağlı enzim agregatları
E.C.	Enzim Komisyon
USP	Birleşmiş Milletler Farmakopesi
MR	Modifiye Salınlı
ER	Uzun süreli salınlı
CR	Kontrollü salım
SR	Sürekli veya yavaş salım
LA	Uzun etkili
LMW	Düşük Molekül Ağırlıklı
GİS	Gastrointestinal Sistem
M	Manuronat
G	Guluronat
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
DTA/TG	Diferansiyel Termal Analiz/Termogravimetri
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
Na-Alg	Sodyum aljinat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
RT	Oda sıcaklığı
BCA	Bikinkinoik asit

1. GİRİŞ

Kistikfibrozis, ter bezleri, pankreas, solunum sistemi (akciğerler), gastrointestinal sistem ve üreme sistemlerinin müköz bezlerini tutan [1,2], beyaz ırkta en çok karşılaşılan [3] epitelyum hücrelerinin apikal yüzeylerinde bir klor kanalı olarak görev yapan 1480 aminoasitlik bir proteinin sentezini sağlayan [1] KFTR (Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör) geni 230 kb uzunluğunda olan ve 27 ekzon içeren [4] 7. kromozom üzerinde gen mutasyonu oluşturarak, otozomal resesif kalıtım gösteren ölümcül bir hastalıktır. [5,6]. Kistik fibrozisli hastalar için standart tedaviler; fiziksel göğüs tedavisi, aerosol antibiyotikler, mukusu azaltan ilaçlar ve PERT'i (Pankreas Enzim Replasman Tedavisi) içermektedir [2].

PERT fonksiyonları sindirim enzimleri ile yer değiştirmekte bunun yanı sıra gıda sindirim ve emilimini geliştirmektedir [2]. PERT, kistik fibrozisli hastalarda beslenme ile ilgili müdahalelerin yapılması ile en çok kullanılan yöntemlerden bir tanesi olup, enzim replasmanı kullanılan kistik fibrozisli hastaların yaklaşık % 90'ına uygulanmaktadır [2]. Kistik fibrozis ile karakterize olan kalın mukus, hastalardaki emilim bozukluğu ve sindirim bozukluğu sonucunda pankreastan ince bağırsağa salınan sindirim enzimlerini salınımını engellediği bildirilmiştir [2].

Kistik fibrozisli hastalarda mortalitenin önde gelen sebebini pulmoner kaynaklı sorunlar oluşturmakta olup, destek tedavideki ilerlemeler sonucunda sağ kalma süresi aylardan uzun yıllara kadar uzatılmıştır [7].

Pankreas yetmezliği olan kistik fibrozisli hastalardaki tedavi dışarıdan [8] PERT ile yapılmaktadır. Buradaki en önemli nokta, enzimin doğru zamanda, doğru yerde ve yeterli düzeyde bulunmasını sağlamaktır [9]. PERT 'nde pH'ya duyarlı mikrokürecikler kullanılır, enzimin midede açılmasını ve inaktivasyonu önlemek için mikroküreciklerin bulunduğu vasatın pH'sının 5.5-6'dan büyük olması istenir çünkü bu pH dışında mikrokürecikler açılmazlar [10]. Enterik kaplı kapsüllerin midede açılmasını önlemede mide asidini baskılayıcı ilaçlar kullanılabilmektedir [11].

Ekzokrin pankreas yetersizliği, kistik fibrozisli bireylerin % 85-90 kadarında oluşmaktadır. Sindirim enzimlerinin eksikliğinden dolayı bağırsaklarda sindirememe ve emilim bozukluğu görülmektedir. Eğer ekzokrin pankreas yetersizliği hastalığı tedavi edilmeden bırakılırsa; yetişkinlerde ağırlık kaybına, çocuklarda yetersiz büyüme, bebeklerde fiziksel olarak gelişim geriliği, yutma güçlüğü, kilo alamama, karın ağrısı, yağ bezlerinde salgı artışı ve çeşitli rahatsızlıklara sebep olabilir. Bu hastalığın tedavi yöntemi PERT olup, bu tedavi sonucunda amaç normal sindirimdeki iyileşme ve yeterli beslenme durumunu korumayı başarmak olmaktadır.

Enzim replasman tedavisi genel olarak; güvenilir, etkili, klinik denemelerdeki limitli sayılar üstüne iyi ve klinik denemelerde yaygın olarak nitelendirilmiştir. Pankreatik enzim takviyesi, Amerikan Gıda ve İlaç dairesindeki (FDA) kararnameden önce geliştirilmiştir. Ancak, ters etkilerin bildirilmesine karşılık bazı enzim katkılarının yüksek dozları ile bazı müstahzarların terapötik etkilerindeki eksiklik, 2004 yılında FDA ile yönetilen pankreatik enzim takviyelerinin üreticileri ile yeni ilaç uygulamalarının tutarlı verimliliğini sağlama, güvenilirliği ve bu maddelerin kalitesini sağlamak ile ilişkilendirilmiştir. 2004 FDA yetkisi ile Creon kapsüllerinin son formülasyonu keşfedilerek ilişkilendirilmiştir [12].

PERT’de amaç, hastalarda yüksek yağ içerikli diyetlerin normal olarak yenmesini sağlamak, hoş gitmeyen sindirim sistemi semptomlarını durdurmak, kısmen de olsa karın ağrısı ve şişkinliği gidermeyi sağlamak olmalıdır. Burada dışkı özellikleri ve bağırsak florası normal olmalıdır. İyi beslenme sonucunda bebeklerde, çocuklarda ve yetişkinlerde büyüme normal gerçekleşmelidir [13].

Canlı sistemlerde bütün biyokimyasal reaksiyonlar için gerekli biyolojik katalizörler [kimyasal katalizörlerden farklı olarak] olarak bilinen en önemli biyolojik moleküller enzimler olarak bilinir. Tripsin, pankreas öz suyundan proteinlerin sindirimi için ince bağırsağa salgılanan önemli bir serin proteaz enzimidir. Proteinler oniki parmak bağırsağına ulaştığında (burası midenin hemen yanında ince bağırsağın ilk kısmı), pankreas tripsinojen (tripsinin proenzimi), kimotripsinojen (kimotripsinin proenzimi) ve prokarboksipeptidaz salgılar. Tripsinojen (zimojenin inaktif formu) pankreatik kanallar vasıtası ile ince bağırsaktaki mukozal hücreler tarafından salgılanan enterokinaza bir kere dokunduğunda, tripsin aktif hale gelmektedir. Tripsin daha sonra diğer inaktif formda olmayan sindirim enzimleri zimojenler, prokarboksipeptidazlar ve kimotripsinojeni aktive etmekten sorumludur. Akıcı bir şekilde, bu enzimler kimotripsin ve karboksipeptidaza dönüşmektedir. Buna ek olarak, tripsinin peptileri aminoasitlere hidrolizinden sorumlu olduğuna değinilmiştir. Peptidlerden dolayı proteinlerin emiliminde en önemli basamağın peptidlerin hidrolizi olduğuna, peptidlerin proteinlerden küçük olmasına rağmen, halen peptidlerin ince bağırsak duvarından emilimi için çok büyük olduğuna değinilmektedir. Bu sebepten, tripsin peptid bağları hidrolize eden biyolojik katalizör olarak işlev görmektedir. Tripsin enzimi ince bağırsaktayken, enteropeptidaz enzimi proteolitik kırılma ile tripsini etkinleştirmektedir [14].

Kistik fibroz hastalarında, mukus tıkaçları, ince bağırsağa açılan pankreatik kanalları tripsinojenin ve kimotripsinojenin ince bağırsağa ulaşmasını engeller [15]. Bu mukus plakları ayrıca akciğerdeki küçük hava yollarını tıkararak hastanın solunum yolu enfeksiyonlarına ve kronik akciğer hastalıklarına eğilimini arttırırlar. Kistik fibroz hastalarında akciğer

komplikasyonları ölümcül sonuçlara yol açabilmektedir. Pankreas fonksiyonunda bozukluk olan hastalarda pankreas kanalları tıkalı olabilir veya tripsin ve kimotripsin içeren hücrelerde hasar olabilir. Pankreas hücre hasarının olduğu ve pankreatik yetmezliğe yol açan durumlar sıklıkla pankreatitte pankreas kanserinde gözlenir. Bu patolojilerde yeterli miktar enzim üretilmediği için, proteinleri parçalayacak uygun miktarda enzim ince bağırsağa ulaşamaz [16]. Bu durumda tripsin, kimotripsin gibi enzimler replasman tedavisi ile hastaya dışarıdan oral yolla verilir.

Tripsin günümüzde ilaç piyasasında; diğer pankreatik enzimlerle kombine halde enterik kaplı tabletleri şeklinde mevcuttur. Son yirmi yılda eczacılıkta meydana gelen değişimler, ilaç etkin maddelerinin istenilen etki bölgesine hedeflendirilmesini ve\veya istenen hızda (sürekli veya kontrollü) salınmasını sağlayacak dozaj şekillerinin formülasyonuna imkân vermektedir. Biyobozunur polimerik maddelerle hazırlanan boncuklar bu dozaj şekilleri arasında önemli yer tutar. İlacın hedeflendirilmesini sağlarlar, dağıtım alanına selektiftirler ve etkili dağıtım yaparlar. Son zamanlarda; aljinat, pektin ve kitozan gibi doğal polimerlerle hazırlanan boncuklar dikkat çekmektedir [17].

Aljinat; pH'ya duyarlı, maliyeti düşük, toksik olmayan, biyobozunur ve biyouyumlu, alglerden elde edilen doğal bir polimerdir. Protein ve hücre enkapsülasyonunda ilaç taşıyıcı sistemin formüle edilmesinde en çok tercih edilen polimerdir. Sodyum tuzunun 2 değerlikli kanyonlarla çapraz bağlanması sonucu jelleşerek boncukların oluşmasını sağlar. Oluşan boncuklar, kontrollü ilaç salınım sistemlerinin hazırlanmasında kullanılırlar [18].

Pankreatin, tripsin, kimotripsin gibi gastrointestinal sistemin üst kısımlarında stabilitesi düşük olan ilaçların kolona hedeflendirilmesi tercih edilmektedir. Midenin asidik pH'sında jellerin şişme dereceleri az olduğundan, yüklenen ilaç mide vasatında enzimlerin sindirici etkisine karşı korunur. Jel gastrointestinal sistemi geçerken pH artar ve artan iyonlaşmadan ötürü şişme derecesi yükselir. İlaç etkin maddesini içeren hidrojen, kolona ulaştığında enzimlerin ve ortam düzenleyicilerin çapraz bağlara girmesine imkan veren bir şişme derecesine ulaşır. Jel, daha sonra bozunup etkin maddeyi salarak sistemik absorpsiyona veya kolondaki etkiye hazır hale gelir [19].

Bu tez projesinin ana amacı; tripsin yetmezliği olan Kistik Fibrozis'li hastalarda enzim replasman tedavisinde kullanılmak üzere kolona hedeflendirilmiş, midenin asidik ortamına dayanıklı, biyouyumlu ve biyobozunur polimerlerle hazırlanmış ilaç taşıyıcı sistemlerin formülasyonu hedeflenmektedir. Böylece tedavinin daha etkin ve ilacın daha kararlı olması sağlanacaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. KİSTİK FİBROZİS

Kuzey Avrupa'daki her 2500 kişiden 1'inde rastlanan Kistik Fibrozis en yaygın görülen otozomal resesif çekiniklik gösteren ölümcül bir hastalıktır. Bu hastalıkta kayda değer bir artış olduğunun anlaşılmasından sonra, 1989 yılında Kistik Fibrozis Transmembran iletkenlik Regülatör (KFTR) geni tanımlanmıştır. 600'den fazla KFTR geninin farklı mutasyonları tanımlanarak, genotipik-fenotipik ilişkileri kaydadeğer bir şekilde kazandırılmıştır. Hem kliniksel hem de besinsel olarak Pankreas Yetmezliğine (PI) ve Pankreas yeterliliğine (PS) neden olan bu mutasyonları ayırmanın yararlı olduğu bildirilmiştir. Pankreas yeterliliği olan hastalar pankreatik hatalığa sahiptirler, fakat normal besinlerin sindirimine ve emilimine izin veren yeterli ekzokrin fonksiyonlarına sahiptirler. Bunlar kistik fibrozis popülasyonunun % 10-15' ini oluşturmakta olduğu ve geç yaşlardaki teşhisle daha ılımlı bir hastalık seyrine sahip oldukları, akciğer hastalıklarında daha yavaş ilerleme, beslenme durumlarının daha iyi ve Pankreas yetmezliği olan hastalara göre daha üstün bir hayata sahip oldukları bildirilmiştir. Ağırlıktaki azalma ile kronik beslenme yetersizliği ve doğrusal büyüme noksanlığı Kistik Fibrozis hasta popülasyonlarında bir problem olarak fark edilmiştir [20].

Canlı doğumlarda 1/2000-1/3500 oranında görülen hastalığın, taşıyıcılık oranı 1/25 olarak bildirilmiştir [21].

İyi beslenme durumu ve gelişmiş akciğer fonksiyon parametreleri ile birlikte ebebeynlere ve kistik fibrozisli hastalara daha çok motivasyona bağlı kalmak için öngörülen besinsel terapilerin örneğin enzimler, vitaminler ve dengeli yüksek enerji alımı vurgusu önerilmiştir. Kuzey Amerikan Kistik Fibrozis Kurum Anlaşma Komitesinin, bütün yaşlardaki normal büyüme ve ağırlık kazanımı için gerekli olan enerjinin karşılanması için uygun olarak değerlendirilmesi ve beslenme durumu ile ilgili her yaşa uygun bir diyet tavsiyesini içermektedir. Kistik Fibrozisli hastalarda enerji talebini karşılamak için diyetin % 35-40 oranındaki kalorisinin yağlardan karşılandığı belirtilmiştir. Yeni doğan kistik fibrozisli hastalar için beslenme rehberi oybirliği ile yayınlanmıştır. Bebeğin ilk birinci yılında birincil beslenme kaynağı olarak devamlı anne sütü önerilmektedir. Anne sütü ile beslenmenin yeni doğan kistik fibrozisli bebeklerde koruyucu bir etki gösterdiği bildirilmiştir. İtalya'da yapılan bir çalışmada ilk 3 yılda mama ile beslenen bebeklerle anne sütü ile beslenen bebeklerle kıyaslandığında anne sütü ile beslenen bebeklerde akciğer fonksiyonlarında gelişmişlik ve enfeksiyona yakalanma oranında azalma olduğu gelişme göstermiştir [22].

Malnütrisyon ve akciğer hastalığının birbiriyle ilişkili olduğu iyi bilinmektedir. Kistik fibroze yönelik bakım, en uygun sonuçların teşvik edilmesi için beslenme durumuna ve akciğer fonksiyonuna dikkat çekmeyi içerir. Kistik fibroz alanında tecrübeli bir diyetisyenin, hastaların bakımında önemli bir rol oynadığı ayrıca, kistik fibroz bakımına yönelik multidisipliner bir ekip yaklaşımının rutin ziyaretler ve takip ile sağlanması gerektiği bilinmektedir. Kistik fibrozlu kişilerin enerji taleplerini karşılamak için yağdan% 35-40 kalori içeren bir diyet önerilir [23].

Son yıllarda tanı ve tedavide ilerlemeler olmasına rağmen bu kistik fibrozisli hastalar için karışık, zaman alıcı günlük günde 2-4 saat zaman alan diyet gerektirmektedir. Böylece, kistik fibrozis tedavi edilecek en zor kronik hastalıklardan biri olma yolunda ilerlemektedir [23].

2.2. TRİPSİN

Tek parçalı serin proteazlar sınıfının bir üyesi olan Tripsin [24-27], endüstriyel ve biyokimyasal uygulamalarda, tripsin gibi enzimlerin kullanımının kanıtlanması büyük önem taşımakla birlikte [25], pozitif yüklü, substrat özgüllüğüne sahip, lizin ve arginin yan zincirlerine dayanan bir pankreatik enzim kabul edilmektedir [28]. Orta büyüklükte globüler bir protein olan tripsinin, pankreas tarafından inaktif proenzim olan tripsinojen olarak üretildiği, gıda maddelerinde bulunan proteinlerin sindiriminde rol oynadığı da bilinmektedir [28].

Tripsin enzimi, bağırsağa ulaşmadan önce inaktif formda olan tripsinojen formunda bulunmakta olup, eğer aktif formu olan tripsin şeklinde bulunursa pankreasın iç yüzeyini tahrip edeceği bildirilmektedir. İnce bağırsağın ilk ve en kısa kısmı olan oniki parmak bağırsağının mukoza hücreleri tarafından salınan enterokinaz enzimi ile birlikte, tripsinojenin tripsin hâline dönüşmesinde rol oynadığı ve sonuçta tripsin enziminin aktif hale geçtiği bildirilmektedir [28].

Tripsinin bileşiminde bulunan Tripsinojenin, bir terminal hekzapeptidin çıkarılmasıyla aktive edilerek tek zincirli β -tripsin üretilebildiği; sonraki sınırlı otoliz, disülfür bağı ile bağlanmış iki veya daha fazla peptid zincirine sahip diğer aktif formları ürettiği, başlıca formların, iki peptid zinciri ve β - tek bir zincire sahip olan α -tripsin olduğu ifade edilmiştir [28].

Tripsinin tarihçesine bakacak olursak, hangi yıl, kimin tarafından keşfedildiği ve yapılan keşfin ne olduğu aşağıdaki tabloda gösterildiği gibidir. 1876'larda ilk defa söz edilemeye başladığı görülmekte olup, günümüzde de halen araştırılmaya devam etmektedir.

Tablo 2.1 Tripsinin Tarihçesi [28]

Yıl	Bilim Adamı	Keşif
1876	Kuhne	-Pankreatik enzimin proteolitik etkinliğinin tanımlanması. -Tripsin ve pepsin karşılaştırılarak ayırıcı optimum pH'nın saptanması.
1936	Nothrop ve Kunitz	- Tripsinin kristallendirilerek saflaştırılması.
1974	-	- Tripsin içeren serin endopeptidaz S1 ailesinin protoripi olan 3 boyutlu yapının belirlenmesi.
1980-1990	-1987: Sprang ve ark. -1989: McGrath ve ark. -1992: Corey ile Craik ve ark.	-Rekombinant tripsin ile mutagenез, belirli amino asit artıklarının rolünün belirlenmesi.
1990'ların sonu	-	-Kalıtsal temelli pankreatit hastalığında tripsinin rolünün olup olmadığının araştırılması. -Arg117His'te bir mutasyonun otolizin önlenmesinden mesul olduğunun ve bu nedenle, pankreatitin meydana gelmesine yol açtığı belirlenmesi.
2004	-Manz ve ark.	Peptid sıralama teknikleri kullanılarak proteinlerin identifikasyonunun yapılması.
2007	Tzetis ve ark.	-Tıp alanında kistik fibroz gibi pankreasla ilgili hastalıklarda tripsinin rolünün incelenmesi.
2008	Wang ve ark.	-Eklem kıkırdığının osteoartritteki ayrışmasını modellemek amacıyla tripsinden yararlanılması.
2009	- Soleimani ve ark. -Banumathi ve ark. -Yang ve ark.	-Hücre ve doku kültürlerinin geliştirilmesinde tripsinin öneminin saptanması.
2009	-Li ve ark	-Osteoartritte tripsinin kullanımı.
2009	-Chen ve ark.	- Tripsinin pankreatit hastalığında rolünün belirlenmesi.

2.2.1. Tripsinin Kimyasal yapısı

Tripsin enziminin molekül Ağırlığı 23.3 kDa olduğu bilinmekle birlikte [27], tripsinojenin tripsinin proenzim formu olan zimojen olarak adlandırılan ekzokrin asinar hücrelerinde sentezlenip, inaktif öncü protein şeklinde, pankreastan salgılandığı, salgılanan insan pankreas tripsinojeninin üç izoformda salgılandığı; bunların; katyonik (tripsinojen-1), anyonik (tripsinojen-2) ve mezotripsinojen (inhibitöre dirençli) (tripsinojen-3) olduğu bilinmektedir [27]. İnsanda baskın bulunan izoformlar katyonik ve anyonik tripsinler, 2:1 oranında ortaya çıkan

sindirim sistemindeki proteinlerin parçalanmasından sorumlu başlıca izoformları olarak bilinirken, mezotripsinojenin pankreatik sekresyonlarının % 5'inden azını oluşturduğu ifade edilmektedir [27].

Tripsin ile Katalizlenen Reaksiyonlar Tripsinogen'in Tripsin'e Dönüştürülmesi;
Katalitik süreçteki basamaklar:

1. Substrat bağlama. Substrat polipeptidine gelince, çekilebilir peptid bağından hemen önce amino asit yan zincir tortusu, enzim üzerindeki aktif bölgeye bağlanabilir; bu bağın karbonil karbonu, nükleofilik serin 195'e yakın konumlandırılmıştır[27].

2. Nükleofilik saldırı. Nükleofil Serine 195'in hidroksil grubu, Ser195'in hidroksil grubundan bir protonu soyutlayan Histidin57 tarafından kolaylaştırılarak karbonil karbonu etkilediği, nükleofilik ataklar için bir kovalent bağ oluştuğu ve bir hidrojen bağı, iki proteaz omurga amidi protonundan (oksanyon deliği) oluşan peptid karbonil oksijen üzerinde gelişen negatif yükü stabilize edebildiği bildirilmektedir [27].

3. Protonasyon. Substrat amid azotu, His57 tarafından bir hidrojen verdiği, substratın Karboksil terminal kısmını serbest bir peptit olarak serbest bıraktığı ifade edilmektedir [27].

4. Ester hidrolizi. Su ile peptid ve Ser195 oksijen arasındaki ester bağı üzerindeki saldırısının son adım olduğu, normal bir karboksil grubuna sahip peptidin, ikinci bir ürün ve serin hidroksil rejenerasyonu yaptığı, ikinci peptidin daha sonra enzimden ayrılarak başka bir katalitik döngünün başlatılmasına izin verdiğinin, gerçek kataliz Ser195 kalıntıyla yapıldığı bilinmekle birlikte, diğer artıkların Serin konumlandırmada ve ara ürünlerin stabilizasyonu için önemli olduğu da bildirilmektedir[27].

Tripsinin genel yapısının kimotripsininkiyle aynı olduğu varsayılmaktadır. Hem tripsinin hem de kimotripsinin aktif merkezlerinin yakınındaki grupların çoğunun aynı veya çok benzer olması dikkat çekmekte olduğu, bu iki enzim arasındaki tek önemli farkın, kimotripsinin nötr serin-189'unun, tripsin içinde negatif yüklü aspartik asit-177 haline gelmesi olarak bildirilmektedir. Kimotripsin ve Tripsinin özgüllüklerinin farklı olma sebebinin iki grubun farklı olmasından kaynaklandığı bildirilmektedir [29].

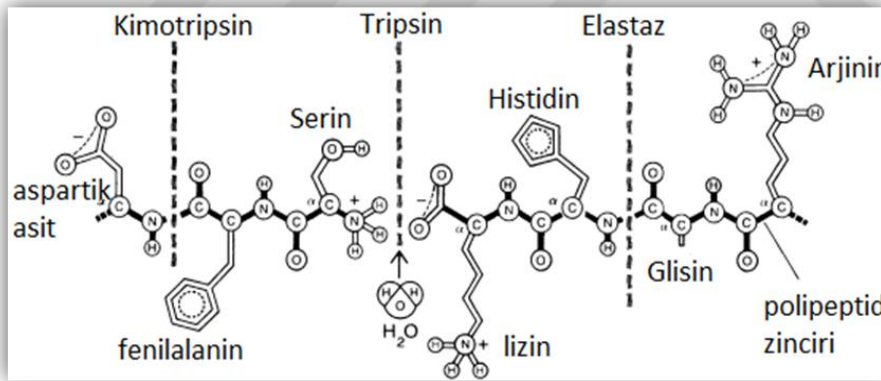
Tripsinin, biyoaktif peptitlerin hazırlanması, süt tedavisi, kutanöz sargının hazırlanması ve deterjan endüstrisinde katkı maddesi olarak ve daha birçok proseste kullanılmakta olduğu ifade edilmiştir [30].

Enzim immobilizasyonunun bir çok avantajının bulunduğu bunlar arasında, optimum reaksiyon koşulları altında geri kazanımının kolaylaştırılması, tekrar kullanım kolaylığının sağlanması, operasyonel ve termal stabiliteyi arttırma bilmesi ve enzim performansının geliştirilebilmesi sayılmaktadır. Tripsin, farklı yöntemler kullanılarak immobilize edilmiştir. Bu yöntemler arasından birkaçı; enzimlerin suda çözünmeyen taşıyıcıya bağlanması, adsorpsiyon, hapsedme ve kovalent bağlanması sayılmaktadır. Enzimler, taşıyıcıdan bağımsız olarak da

immobilize edilebilmektedirler. Çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) yönteminin, enzim moleküllerinin çökmesini ve oluşan agregatların çapraz bağlanmasını içerdiği bilinmektedir. Bu yöntemde agregatların, protein yüzeyi üzerindeki serbest amino grupları üzerinden çapraz bağlanarak, katalitik aktivitesi muhafaza edilirken, agregatların kalıcı olarak çözünmez hale getirildiği ifade edilmektedir [30].

Proteolitik enzimlerin çoğunda olduğu gibi tripsin ve kimotripsin, hücresel proteinlerin istenmeyen şekilde yok edilmesini önlemek ve enzim aktivitesinin ne zaman ve nerede gerçekleştiğini düzenlemek için inaktif zimojen öncülleri (tripsinojen ve kimotripsinogen) olarak sentezlendiği inaktif zimojenlerin, atılımdan önce küçük ve kalın bağırsakları dolaşarak duodenuma salındıkları, zimojenlerin de kan dolaşımına girdiği ve burada idrarla atılmadan önce serumda tespit edilebildiği bilinmektedir [31].

Polipeptit zincirinin, sindirimde yer alan üç serin proteaz tarafından farklı konumlarda bölündüğü ifade edilmiştir. Aşağıdaki şekil 2.1’de, amino asit ünitelerine katılan peptid bağlarının azot atomlarının sağındaki moleküller olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, bütün peptid bağlarının serin proteazlardan tarafından etkilenmedikleri ifade edilmektedir. Kimotripsinin, fenilalanin gibi sadece büyük ve hidrofobik yan zincirlere etki ettiği bildirilmekte iken, Tripsin, birini takip eden iki pozitif yüklü yan zincir içeren lizin ve arginindeki peptid bağlarını kestiği bildirilmektedir [32].

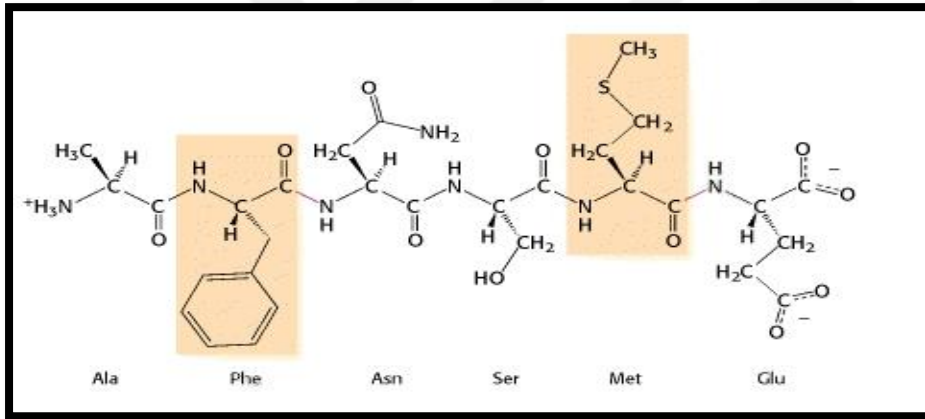


Şekil 2.1 Polipeptid zincirlerinin şematik gösterimi [32]

2.2.2. Tripsin'in fizyolojik fonksiyonları

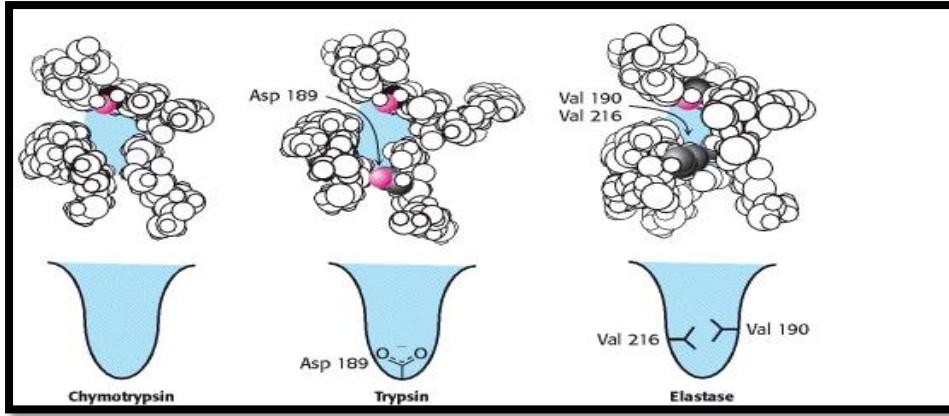
Tripsinin, protein sindiriminde kullanılan ince bağırsaklara salınan pankreatik özsuyu içinde bulunan önemli bir protein sindirici enzim olduğu, protein, duodenuma ulaştığında (duodenum, jejunuma yol açan, mideden hemen sonra ince bağırsağın ilk kısmıdır) pankreasın, tripsinogen'i (tripsin proenzimi), kimotripsinogen'i (kimotripsinogen proenzimi) ve prokarboksiptidazı serbest bıraktığı, bir kez tripsinojen (inaktif zimojen) ince bağırsakların

mukozal hücreleri tarafından pankreas kanalından salınan enterokinaza dokunursa, tripsinin aktif hale getirildiği ve tripsinin, diğer inaktif sindirim enzimi olan zimojen, prokarboksipeptidaz ve kimotripsinogen'in aktive edilmesinden sorumlu olduğu, çalkantılı olarak, kimotripsin ve karboksipeptidaza dönüşürtüğü, tripsinin, peptidi hidrolize etmek için çalıştığı bilinmektedir. Peptitlerin hidrolizinin, protein Emiliminde önemli bir adım olduğunu, çünkü peptidlerin proteinlerden daha küçük olmasına rağmen hala ince bağırsağın astarı tarafından absorbe edilemeyecek kadar büyük olduğunu belirtmenin önemi üzerine vurgu yapılmaktadır. Bu nedenle, tripsinin, peptid bağları için hidrolize edici bir biyolojik katalizör olarak görevi gördüğü bildirilmektedir. Ayrıca, ince bağırsaktaki, enteropeptidazın, proteolitik aktivite ile tripsin haline getirildiğine de dikkat çekilmiştir. Tripsinin, ek tripsinojeni aktive etmek için işlev görebildiği, bu olayın otokataliz olarak ifade edildiği de bilinmektedir. Bu nedenle, reaksiyonun tekrar başlatılması gerekiyorsa ya da bu işlem gerçekleştiğinde, enteropeptidazın az miktarda kullanılması gerektiği, bu aktivasyon mekanizmasının çoğu serin proteaz enzimi için ortak olduğu ve pankreasın otomatik bozunmasını önlemeye yarar sağladığı da bilinmektedir [27].



Şekil 2.2 Kimotripsin Özgüllüğü [33]

Yukarıdaki şekilde görüldüğü gibi, kimotripsinin, aromatik veya büyük hidrofobik amino asitlerin karboksil tarafındaki proteinleri (gölgeli sarı) parçaladığı bilinmektedir [33].



Şekil 2.3 Kimotripsin, Tripsin ve Elastaz'ın S1 Cepleri [33]

Tripsinin, özellikle pozitif yüklü lizin veya argininin C-terminal grubundaki peptid bağlarını parçaladığı, hem basit hem de karmaşık matrislerde kütle spektrometresiyle protein tanımlaması için en çok kullanılan proteaz olduğu ifade edilmiştir [34]. Diğer bir ifade ile tripsin, lizin ve arginin yan zincirlerine dayanan substrat özgüllüğüne sahip; arjinin, lizin ve ornitin karboksilik gruplarındaki ester, amid ve peptid bağlarını hidrolize eden, pankreatik bir serin proteaz olarak tanımlanmaktadır. Proteazın, manyetik katı destek üzerinde immobilizasyonu, indirgenmiş otoliz ürünleri nedeniyle son yıllarda potansiyel olarak güçlü bir prosedür olarak düşünülmüştür. Örneğin, Bayramoğlu ve ark. tarafından bildirildiğine üzere, Krogh ve ark.; piyasada bulunan paramanyetik gözenekli cam boncuklara immobilize enzimler kullanarak proteinlerin hızlı sindirilmesini göstermiştir. Aynı çalışmacılar, Yine, Tigrett ve ark.'nın, tripsinden bir paramanyetik çekirdek ile mikropartikül elde ettiklerini, ayrıca Li ve ark. ise, Tripsin'in immobilizasyonu için amin ile işlevlendirilmiş manyetik nanosferleri kullanarak, proteinlerin analizi ve tanımlanmasını hareketsizleştirilmiş enzim ile incelediklerini bildirmişlerdir [35].

Enzimler, çeşitli enzimatik biyosensörlerin gelişimini kolaylaştıran proteom sindiriminde anahtar rol oynadığı bilinmekle birlikte, rutin olarak kabul edilen serbest enzim sindiriminde, serbest proteaz (tipik olarak tripsin) ile uzun kuluçka süresinin (12-20 saat), numune işleme verimini sınırladığı ve kompleks sterik engellemesiyle eksik protein proteolizini sağladığı ifade edilmektedir. Bir enzimin immobilizasyonu ve özelliklerinin, hazırlanma yöntemi, destek matrisinin seçimi ve matrisin fiziko-kimyasal özellikleri tarafından etkilendiği bildirilmektedir. İdeal destek matrisinin taşıması gereken özellikler arasında, basınca karşı fiziksel direnç, enzimlere karşı inertlik, türetme kolaylığı, biyouyumluluk, mikrobiyal saldırıya direnç ve düşük maliyetli kullanılabilir olması sayılabilmektedir. Tripsin, hidroliz ve yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin küçük peptidlere proteolizi için kullanılan önemli sindirim enzimlerinden biridir. Hidroliz işlemi sırasında, tripsin solüsyonunun hızlı otolizi ve nötr proteazın en az stabilitesi

sayesinde, istenmeyen ve müdahale edilebilen materyaller ürettiği ve dolayısıyla bunun sonucunda katalitik reaksiyonların verimliliğinin ve oranının düştüğü ifade edilmektedir [36].

2.2.3. Endikasyonu ve Tıbbi Kullanımı

Tripsinin, solunum yolları enfeksiyonlarında (trakeitis, bronşit, bronşektazi, pnömoni, postoperatif akciğer atelektazi vb.), viskoz sıvıların ve eksüdanların çıkarılmasını kolaylaştırmak için yardımcı madde olarak kullanıldığı bilinmekle birlikte bu gibi durumlarda, tripsin içeren ilaç aerosol formunda inhalasyon yoluyla ya da i.m. enjeksiyonla hastaya uygulandığı bilinmektedir. Ayrıca, tripsinin, balgamın sıvılaşmasını sağladığı böylece, atılımının kolaylaştığı da bilinmektedir. Eksüdatif plörezi ve plevral ampiyem olan hastalarda, tripsinin eksüda sıvı alımı, irin boşaltılması ve tahliyesinin kolaylaştırılması için intraplevral olarak uygulanabildiği, pankreatit ve diğer sindirim sistemi hastalıklarının tedavisinde kimotripsin ve/veya pankreatin ile birlikte kullanıldığı, tripsinin kristal formunda anti-inflamatuar etkisinden ötürü, tromboflebit, periodontitis, osteomyelit, sinüzit, otit ve diğer inflamatuvar hastalıkların inflamatuvar-distrofik formları ile kas içi enjeksiyonlar için de kullanıldığı bilinmektedir. Tripsin içeren oftalmik preparatların (göz damlası veya göz banyosu) ise, iritium, iridosiklit, gözün ön kamarasındaki hemorajiler, cerrahi operasyon ve travmayı takiben okolougla dokularının şişmesi durumunda topikal olarak kullanıldığı da bilinmektedir. Yine, tripsinin yara iyileştirici özelliğinden dolayı, yanıklar, yatak yaraları, pürülan yaraları tedavi etmek için, topikal preparatlarından yararlanılabildiği ifade edilmektedir [37-39].

Tripsin kristali içeren bir preparatın, yetişkin hastalara günde bir kez 0,005-0.01g (5-10 mg) dozda, çocuklar için ise 0,0025 g (2,5 mg) dozda enjekte edildiği, enjeksiyonlar için, kullanmadan hemen önce 0,005 g (5 mg) tripsin kristalinin, 1 ila 2 ml steril izotonik sodyum klorür çözeltisi veya % 0.5 ile % 2 novokain çözeltisi içinde çözündürüldüğü bilinmektedir [40].

İnhalasyon şeklindeki uygulamalar için ise, ilacın 5-10 mg'ı 2 ila 3 ml izotonik sodyum klorür çözeltisi içinde çözündürülüp bir inhalasyon cihazından aerosol olarak uygulandığı, hastaya bir bronkoskop veya endotrakeal prob ile enjekte edildiği, solunum sayısının hastalığın seyrine ve tedavinin etkinliğine bağlı olduğu ve ilaç inhale edildikten sonra, hasta ağzını ve burnunu da ılık su ile durulaması gerektiği bilinmektedir [41].

2.2.4. Farmakokinetiği

Tripsin, dahilen kullanılan farmasötik preparatlarda diğer enzimlerle kombine halde bulunduğundan tek başına tripsin içeren bir dozaj şekli piyasada olmadığından sadece bu etken maddeyi içeren bir ilacın farmakokinetiğine dair veriye rastlanmamıştır.

2.2.5. Kontrendikasyonları

Tripsinin kontrendikasyonlarına dair literatürde yeterli bilgiye rastlanmamıştır. Ancak, yeni doğanlarda ve hemofili hastalarında kullanımının sakıncalı olabileceği bazı tripsin bromelain kombine preparatlara ilişkin tıbbi bilgilerde rastlanmıştır. Yine, laktasyon dönemi ve gebelikte kullanımının önerilmediği, enjeksiyonluk preparatlarının, kalp yetmezliği, amfizem, solunum yetmezliği, akciğer tüberkülozu, karaciğer, siroz, hepatit, pankreatit, hemorajik zayıflık dekompanze oluşturduğu da bilinmektedir.

2.3.6. Yan etkileri

Literatür verileri incelendiğinde tripsinin yan etkilerine dair herhangi bir kayda rastlanmamıştır. Tripsin kimotripsin kombine preparatlarının aşırı hassasiyete yol açabileceği belirtilmektedir. Alerjik reaksiyonlar, ateş, taşikardi; i.m. uygulamada ağrı, enjeksiyon yerinde hiperemi; inhalasyon uygulamasında ise üst solunum yollarındaki mukoza zarının tahrişi, sesin ses kısıklığı gibi yan etkilerle karşılaşılabilirdiği belirtilmektedir.

2.2.7. Piyasada mevcut müstahzarları

Türkiye piyasasında tablet formunda preparatı mevcuttur. Bu preparatta pankreatin ve kimotripsin ile kombine halde bulunur. Yurt dışında ülserler, güneş yanıkları ve diyabetik ayak yaralarının tedavisinde sprey formunda topikal kullanılan preparatları (müstahzar: Granülex) mevcuttur. Osteoartrit tedavisinde ise, yine topikal formülasyonu bromelain ile hazırlanarak kullanıldığı (Dermasprey, Granulderm) bilinmekle birlikte, yine merhem formunda (müstahzar: Xenaderm ve Vasolex) peru balsamı ve hint yağı ile birlikte yaraların iyileşmesi ve ağrı kesici olarak kullanıldığı da bilinmektedir [38].

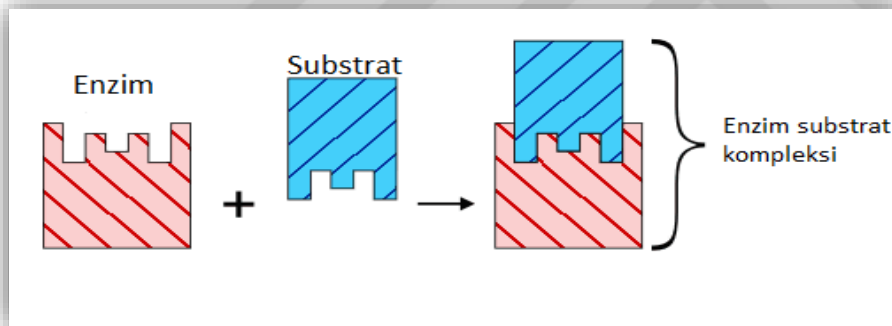
Türkiye’de sığır, buzağı, koyun, keçi ve köpek gibi hayvanlarda yüksek oranda eksudat birikimi olan bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde destekleyici olarak, örn. akciğer, meme ve karın boşluğu enfeksiyonları, artrit, doğumla ilgili hastalıklar, flegmonlar, panarisia ve aktinomikozlar, papillomatozlar ve malignant tümörlerin tedavisinde (operasyon öncesi ve

sonrasında) i.m. süspansiyon formunda kullanılan preparatının (Nekro Veyxym) mevcudiyeti bilinmektedir [42,43].

2.3. ENZİM

Enzimler, endüstriyel alandaki birçok uygulamada artarak kullanılmakta olan ve organik bileşim içeren çok yönlü [25], hücrelerden ekstrakte edilebilen [44], canlı organizmalarda biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hücrelerden çıkarılan ve daha sonra ticari olarak önemli proseslerin katalizörlüğünü yapmak için kullanılan seçici ve son derece verimli, çok yönlü biyolojik katalizörler olarak tanımlanmaktadır [27,44] Biyolojik süreçteki, hastalıktaki ve sağlıktaki rolleri kapsamlı olarak araştırmacılar tarafından araştırılmıştır [26]. Diğer bir ifade ile enzimler, vücuttaki tüm reaksiyonları kendileri değişmeden reaksiyon hızını arttırarak işlemini tamamlayan proteinik yapıli katalizörler tarafından yürütölmektedirler [45].

Enzimlerin biyokatalitik dönüşömlerde kullanılmalarının başlıca avantajlarının, onların kemo-, regio- ve stereo-spesifikliğinden ve ayrıca kullanılabölen hafif reaksiyon koşullarından oluştuğu bilinmektedir [46].



Şekil 2.4 : Anahtar kilit modeli [47]

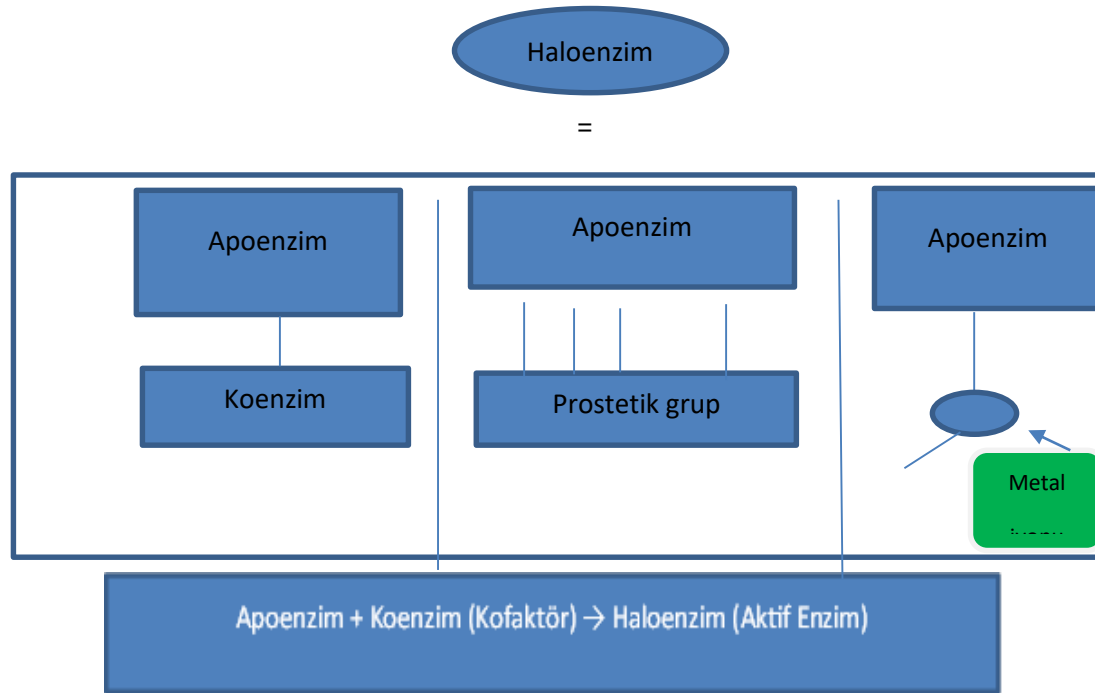
En basit şekli ile bir enzimin nasıl çalıştığını gösteren şekil yukarıda görölmektedir. Şekil 2.4.'de göröldüğü gibi substrat ile enzimin aktif bölgesine bağlanarak enzim substrat kompleksi oluşturduğu ifade edilmektedir [47].

'Enzim' kelimesi ilk önce 1878'de Alman fizyolog Wilhelm Kühne tarafından mayanın şekerlerden alkol üretme yeteneğini açıklaması ile kullanılmıştır [44,48]. İnsanlar çok eski çağlardan beri enzimatik reaksiyonlardan yararlanarak şarap, ekmek, yoğurt, boza, kıymız üretmelerine rağmen, bu ürünleri elde ederken, enzimden ve enzimin katalitik etkilerinden haberleri olmadan faydalanmışlardır. 1833'lerde, Payen ve Persoz alkol kullanmak sureti ile malt ekstresinden nişastayı sindiren enzimi presipitasyon yolu ile ayırt etmişler ve bu oluşuma

Diyastaz adını vermişlerdir. Schwan, 1836 yılında mide suyundan pepsini elde eden kişi ise olmuştur. Bu yılları takiben 1926 yılında Summer kristal halde bulunan ilk enzim olan üreazı izole etmiştir. 1930-1936 yılları arasında Northrop tarafından pepsin, tripsin ve şimotripsinin kristal hali elde edilmiştir [48].

Enzim özgünlüğünün, substratın ve onun aktif bölgesinin tamamlayıcı doğasından kaynaklandığı hipotezi, ilk olarak 1894'te Alman kimyager Emil Fischer tarafından önerilmiş ve Fischer'in "kilit ve anahtar hipotezi" olarak bilinmeye başlanmıştır. Bu teorinin, bu enzimlerin protein olduğu bile belli olmadığı bir zamanda önerilmesinin şaşırtıcı olduğu ifade edilmektedir. X-ışını kristalografisi gibi teknikler yoluyla enzim yapısı hakkında daha fazla bilgi edinildiğinde, enzimlerin sağlam yapılar olmadığı, aslında şekil bakımından oldukça esnek oldukları anlaşılmıştır. Bu bulgu ışığında, 1958 yılında Daniel Koshland, Fischer'in fikirlerini genişletmiş ve enzim molekülünün alt tabakanın bağlanmasına uyum sağlamak için şeklini biraz değiştirdiği alt katmanın ve enzim bağlanmasının "uyarılmış fit modeli" ni sunmuştur [44]. Kelime olarak, enzim (Yunanca en=içinde ve zyme=maya) anlamı taşımaktadır [27, 44].

Enzimler dikkat çekici özgülüğe sahip olduğu, güçlü, spesifik katalizörler olarak bilinmekle birlikte, enzimlerin katalitik aktivitesi; ciro hızı, ciro frekansı veya devir sayısı olarak adlandırılan sabit bir k_{cat} ile ifade edilebildiği ve bu sabitin, birim zamanda (genelde dakikada veya saniyede) tek bir enzim molekülü ile ürüne dönüştürülebilen substrat moleküllerinin sayısını temsil ettiği ifade edilmektedir [44].



Şekil 2.5: Bir aktif enzimin yapısı (haloenzim bileşenleri) [44]

1960'lardan beri enzimler avantajlı bir şekilde katalizör olarak kullanılmaktadır. Çeşitli enzim katalizli proseslerden, bazı gıda maddelerinin, ilaçların ve zirai kimyasalların üretimi için enzimler endüstriye başarıyla dahil edilmiştir [49].

Apoenzim ile koenzimin birlikte bulunduğu gruba tam enzim anlamına gelen Haloenzim olarak ifade edilmektedir. Koenzimlerin enzime gevşek olarak bağlandığı, koenzim apoenzime sıkıca bağlı ise o zaman koenzimin “prostetik grup” olarak adlandırıldığı, genellikle suda çözünür ve renksiz olan enzimlerin etki ettikleri maddelere substrat yani etkinen madde denildiği ve enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan maddeye de ürün adı verildiği ifade edilmektedir [50].

Her enzim, genelde Enzim Komisyon numarası (E.C. sayısı) olarak bilinen bir ad ve dört basamaklı bir sistem kodu ile ifade edilmektedir [27]. Enzimlerin 4 rakamlı numaraları vardır. Bunlardan bir numara sınıfı, iki numara alt sınıfı, üç numara grubu ve dört numara ise kendine özgü sıra numarasını ifade etmektedir [48]. Dört basamaktan oluşan sınıflandırma numarası enzimi, katalize edilen reaksiyon ile tanımlanır. Bu ayrıca, bilgileri diğer veritabanları ile ilişkilendirmek için de değerli bir bilgi olarak kabul edilmektedir [51]. Birinci basamağın, bir enzimin katalize ettiği kimyasal tepkimenin genel türüne göre ana sınıfı belirttiği, ikinci basamağın, çıkarılmış veya aktarılan bir kimyasal grubun doğasına veya bölünmüş veya oluşturulmuş herhangi bir bağa dayanan alt sınıfı karakterize ettiği, üçüncü basamağın alt alt sınıfı belirttiği ve alt sınıfın daha ayrıntılı alt bölümü için kullanıldığı ifade edilirken; AT numarasının son basamağının ise; alt-alt sınıftaki her bir enzime rastgele atanmış bir seri numarasını belirttiği bilinmektedir. Bunun, proteinlerin peptid bağını parçalayan bir enzim sınıfı olduğu, aktif bölgelerinde katalitik bir serin kalıntısı varlığı ile karakterize edildikleride ifade edilmektedir [27].

Enzimlerin, başta biyomedikal ve biyoteknolojik alanlarda olmak üzere çok çeşitli pratik uygulamalarda, çeşitli destek maddeleri ile immobilizasyon yoluyla kullanılmakta olduğu bilinmektedir. Enzimlerin immobilizasyonu için birçok yöntem mevcut olmasına rağmen, genellikle dört yöntemden biri kullanılmaktadır: (i) fiziksel adsorpsiyon; (ii) hapsetme; (iii) kopolimerizasyon; (iv) kovalent bağlanma. Enzim immobilizasyonu için kullanılan yöntemlerin ve desteklerin, enzim aktivitesinin en üst düzeyde tutulmasını, stabilitesini ve dayanıklılığını sağlamak için seçildiği ifade edilmektedir. Adsorpsiyonun genellikle çok güçlü immobilizasyon yöntemi olmadığı çünkü adsorbe edilen enzimin bazılarının yıkama ve çalıştırma sırasında desorbe edildiği, dolayısıyla, adsorpsiyon yoluyla tersinir enzim immobilizasyonunun, enzim ve destek arasında güçlü bir hidrofobik veya iyonik etkileşim gerektirdiği bilinmektedir [35].

Mükemmel katalitik özelliklerine rağmen, enzim özelliklerinin endüstriyel ölçekte uygulanmadan önce geliştirilmesi gerektiği, genellikle, çözünür enzimlerin, endüstriyel reaktörlerde uzun süre tekrar kullanılmak üzere hareketsizleştirilmek zorunda kalındığı ve buna ek olarak, diğer bazı kritik enzim özelliklerinin stabilite, aktivite, reaksiyon ürünleri ile

inhibisyon, doğal olmayan substratlara karşı seçicilik gibi geliştirilmesi gerektiği ifade edilmektedir [52].

2.3.1. Endüstriyel katalizör olarak enzimlerin avantajları ve sınırlamaları

Bir enzim olarak nispeten pahalı bir katalizörün kullanılması, birçok durumda, ekonomik olarak uygulanabilir bir işlem yapmak için geri kazanım ve yeniden kullanımını gerektirmekte olup, dahası, bir hareketsizleştirilmiş enzimin kullanımının reaktörün tasarımını büyük ölçüde kolaylaştırdığı ve reaksiyonun kontrolünün basit enzim filtrelemeyi durdurduğu, bu nedenle, immobilizasyonda genelde bir enzimin bir endüstriyel biyokatalizör olarak kullanılması için bir gereklilik olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, enzimin tekrar kullanılması fikri, son enzim preparatının stabilitesinin bu yeniden kullanıma izin verecek kadar yüksek olması gerektiği anlamına geldiği, bu nedenle enzimin, immobilizasyon işlemi sırasında uygun bir işlem olması için çok kararlı olması gerektiği ya da stabilize edilmesi gerektiği ifade edilmektedir [52].

2.3.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimlerin, bulundukları yerde aktivite göstermelerine ve salgılandıkları yere göre 2 gruba ayrıldıkları, bunlardan birincisinin, endojen olarak ifade edilen bulundukları hücrede aktivite gösteren hücre içi enzimler olduğu, ikincisinin ise ekzojen olarak ifade edilen, salgılandıkları yerden ayrı bir yerde aktivite gösteren hücre dışı enzimler olduğu bilinmektedir [48, 51].

Enzim sınıflandırmasının ve terminolojisinin, katalize ettiği reaksiyonlar açısından, enzimlerin belirgin şekilde tanımlanmasına izin veren bir sistem olduğu ifade edilirken, bu, katılan kimyasal reaksiyonu tanımlayan reaksiyonun katalizli ve sistematik adlandırmanın tiplerine göre gruplar halinde sınıf enzimlere göre sayısal bir sisteme dayandığı ifade edilmektedir [51].

Enzimler için diğer bir sınıflandırma ise; etki ettikleri reaksiyon çeşidine göre altı sınıfa ayrıldığı bilinirken, bu enzimlerin sınıflandırması aşağıdaki tablo 2:2 'de gösterilmektedir.

Tablo 2.2: Enzim Sınıflandırılması [44,48,51]

Enzimlerin sınıflandırılması	
1- Oksidoredüktazlar	Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Oksitlenme, moleküle oksijen eklemekle veya molekülden hidrojen ayrılması ile yani artı değer artması ile oluşmaktadır.
2-Transferazlar	Hidrojen dışında bir atomun veya atom grubunun bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlayan enzimlerdir. C,N veya P taşıyan grupların transferini katalizler. Fosforilazlar ve transamilazlar bu gruba örnek enzimlerdir.
3-Hidrolazlar	Bağlara su sokarak yıkmayı katalizler. Bu gruba örnek enzimler proteazlar, karbonhidrazlar, lipazlar olarak ifade edilirler.
4-Liyazlar	Su molekülü çıkarmadan molekülleri yıkan enzimlerdir. C-C, C-S ve belli C-N bağlarının yıkımını katalizler.
5-İzomerazlar	Molekül içinde değişiklik yaparak onun uzayda dizilişini değiştiren enzimlerdir. Optik veya geometrik izomerlerin rasemizasyonunu katalizler.
6-Ligazlar(Sentetazlar)	Enerji kullanarak substrat moleküllerinin birbirine bağlanmasını sağlayan enzimlerdir. Yüksek enerjili fosfatların hidrolizi ile birlikte yürüyen karbon ve O,S,N arasında bağ oluşumunu katalizler. Aminoasitlerin veya yağ asitlerinin aktifleşmesi bu enzimlere iyi bir örnek oluşturmaktadır.

2.3.3. Enzimlerin Fizikokimyasal özellikleri

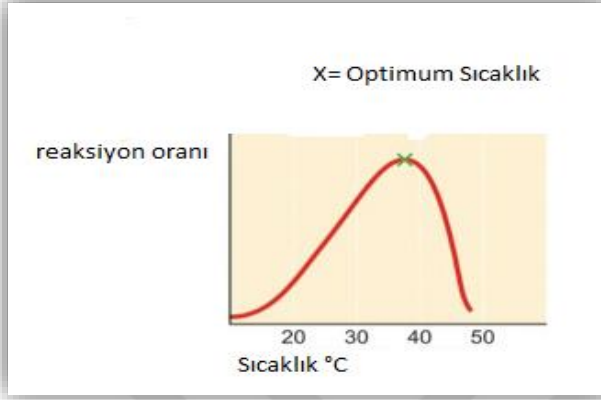
Birçok enzim protein yapısında bulunurken birçoğu da yapı ve görev bakımından farklı olan apoenzim ve koenzim\kofaktör olarak adlandırılan iki ayrı grubu da kapsadığı bilinirken, protein yapısında olan apoenzimin, enzimin özgüllüğünü diğer bir ifade ile spesifikliğini yani başka bir reaksiyonda görev yapma özelliğini sağlayan kısım olarak bilinirken, ısı ile protein yapılı olması sebebi ile proteinin doğal özelliğinin kaybolması ile kolayca denatüre olabildiği bilinmektedir. Enzimin yardımcı ve etkin biçiminin koenzim diğer bir ifade ile kofaktör olarak bilindiği,etkinlik gösterebilmesi için mutlaka apoenzime ihtiyaç duyduğu ve vitaminlerin önemli kofaktörler yani koenzimler olduğu, ayrıca koenzimlerin organik ve inorganik maddelerden oluşmakta olduğu ifade edilmektedir [48,50].

2.3.4. Enzimlerin katalitik aktivitelerini etkileyen faktörler

2.3.4.1. Sıcaklık

Reaksiyonda ısı yükseldikçe reaksiyon molekülleri daha yüksek kinetik enerjiye sahip olmakta ve bu da, başarılı bir çarpışma ihtimalini arttırarak, reaksiyon hızının arttığı bilinmektedir. Aşağıdaki şekilde 2.6'da görüldüğü gibi, bir enzimin katalitik aktivitesinin en

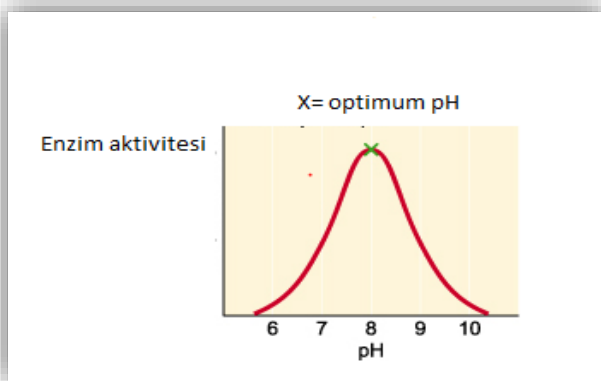
yüksek olduğu belirli bir sıcaklık değeri bulunduğu, bu optimum sıcaklık değerinin insan hücrelerindeki enzimler için insan vücudu sıcaklığı olan 37.5 °C civarında olduğu ve bu sıcaklığın üzerinde enzim yapısının parçalanmaya başladığı yani denatüre olduğu çünkü enzim molekülleri daha fazla kinetik enerji elde ettiği için yüksek sıcaklıklarda molekül içi bağların ve moleküller arası bağların koparıldığı ifade edilmektedir [47].



Şekil 2.6: Enzimatik Reaksiyon – Sıcaklık Grafiği [47]

2.3.4.2. pH

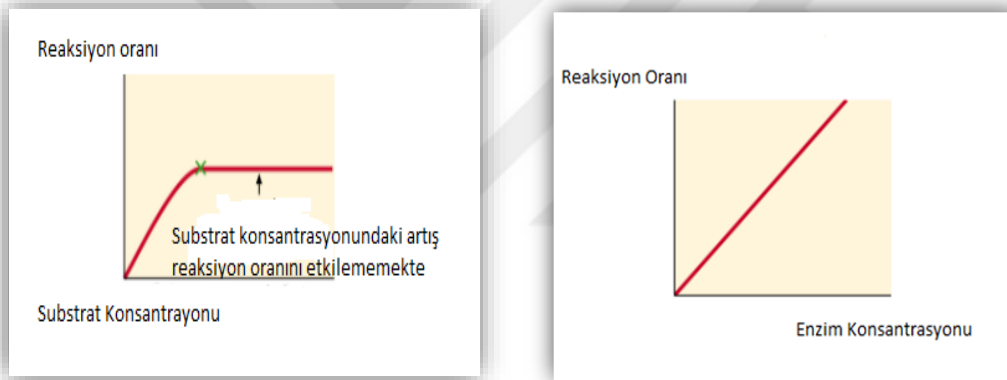
Her enzimin oldukça küçük bir pH aralığında çalıştığı ve her enzim aktivitesinin en yüksek olduğu bir pH sınırının bulunduğu, buna da optimum pH denildiği, pH'daki bu değişikliklerin sebebinin, molekül içi bağları parçalayabilmesi ve molekül içi bağları meydana getirebilmesi olduğu bilinmektedir [47].



Şekil 2.7: Enzim Reaksiyonunda pH grafiği [47]

2.3.4.3. Enzim ve Substrat Konsantrasyonu

Enzim katalizli reaksiyon hızının enzim ve substrat konsantrasyonlarına bağlı olduğu, aşağıdaki şekil 2.8’de görüldüğü üzere, her iki grubun konsantrasyonu arttıkça reaksiyon hızı da arttığı ifade edilmektedir. Belirli bir enzim konsantrasyonu için tepkime hızının, artan substrat konsantrasyonu ile birlikte artmakta olduğu ve bu artışın üstünde, substrat konsantrasyonundaki artışın reaksiyon hızında önemli bir değişiklik oluşturmadığı bilinmekle birlikte bunun nedeninin, belirli bir andaki enzim moleküllerinin aktif alanlarının substratla neredeyse doymuş olmasından kaynaklandığı ifade edilmektedir. Aşağıdaki şekil 2.8’de görüldüğü gibi, enzim / substrat kompleksinin, daha fazla substrat barındırabilmek için aktif yerlerinden serbest bırakılmadan ayrılmaları gerektiği bilinmektedir. Substrat konsantrasyonundaki artışın reaksiyon oranını belirli bir noktaya kadar yükseltmekte olduğu ama belirli bir substrat konsantrasyonundan sonra değişmemekte olduğu da ifade edilmektedir [47].



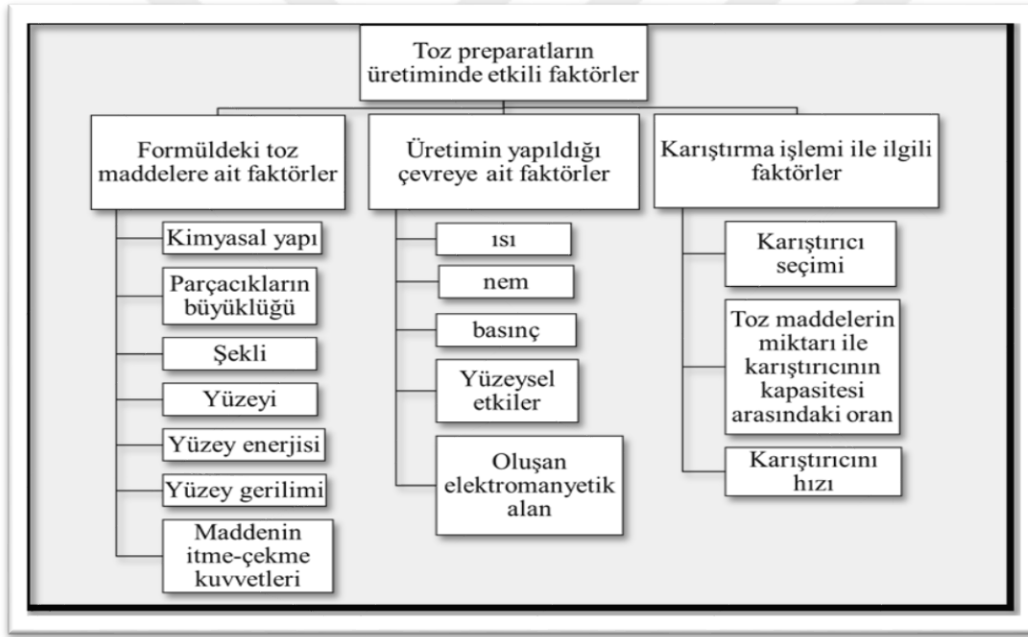
Şekil 2.8: Enzim ve Substrat Reaksiyon Grafikleri [47]

Enzimlerin tepkimeleri ve katalizan yetenekleri onları onlarca yıl boyunca bilim için vazgeçilmez olmakla beraber, enzimlerin hareketsizleştirilme işleminin çok önem arz etmekte olduğusebebinin ise enzimlerin daha uzun yarı ömrü ve daha az bozunmayla aynı reaksiyon için birden çok kez kolaylıkla tekrar kullanılmasına izin vermiş olması bunların yanısıra tepkime hızının yanı sıra reaksiyon başlatma ve durdurma süresinin kontrol edilmesi için önemli sayılmaktadır. Substratın enzim/protein veya diğer bileşiklerle kontaminasyonunu önlemeye yardımcı olması ile birlikte arıtma maliyetlerini düşürerek fayda sağladığı bilinmekle beraber, hareketsizleştirilmiş enzimlerin bu yararlarının gelişen biyoteknolojiye son derece uygun olduğu ifade edilmektedir [53].

2.3.5. Enzim Formülasyonları

2.3.5.1. Katı Dozaj şekilleri formu

Toz, havanda dövülerek, toz haline getirilen ilaç karışımları katı ilaçlar olarak adlandırıldığı ve toz şeklindeki ilaçların Pulvis, Poudre, Powder olarak isimlendirilirken, haricen serpmeye sureti ile ve dahilen kaşık ölçüsü ile kullanılmakta olduğu, bu toz ilaçların da; partikül büyüklüğüne göre de kaba, ince şekilde toz edilmiş, iki veya daha fazla sayıda etken madde ve yardımcı madde içeren homojen karışımlar olduğu ifade edilmektedir. Toz preparatların kullanım şeklinin oral yol ve haricen olmak üzere iki çeşit olduğu ve bu toz ilaçların tek bir etken madde içerir ise basit, birden fazla etken madde içerir ise bileşik olarak isimlendirildiği ifade edilmektedir [54].



Şekil 2.9: Toz preparatların üretiminde etkili faktörler [54]

En dayanıklı ilaç şekillerinden olan toz şeklindeki ilaçların sıklıkla kullanıldığı, toz halinde hazırlanan ilaçların, spesifik yüzey alanlarının büyük olması nedeni ile sıkıştırılmış tozlardan daha çabuk dağılmasının yanında, daha çabuk çözündürülerek organizmada sürekli etki gösterdiği bilinmekle beraber, toz şeklinde hazırlanan ilaçların kullanım alanlarının; 1-Tablet veya kapsül gibi preparatları güçlükle yutabilen çocuklar ve yetişkinlere ilaç verilmesinde, 2-Solüsyon halinde stabilite sorunu olan etken maddelerin bölünmüş toz şeklinde hazırlanan ilaç formülleri halinde kullanıldığı ifade edilmektedir [54]

Kontrollü salım sistemlerinde dozaj formunun, Birleşik Devletler Farmakopesi (USP) modifiye salınlı (MR) dozaj formunu, zamana bağlı rotasyonun veya kullanıldıkları yerdeki ilaç salım özelliklerinin, konvansiyonel dozaj formları tarafından sunulmayan terapötik veya uygunluk hedeflerini gerçekleştirmek için seçildiği doz olarak solüsyonlar, merhemler ya da derhal çözülen dozaj formları olarak tanımlamakta olduğu bilinmekle birlikte, MR dozaj formunun bir sınıfı, diğer bir sınıfın ise uzun süreli salınlı (ER) dozaj formu olduğu ve dozlama sıklığında en az 2 kat azalma veya hasta uyumluluğunda veya terapötik performansda anlamlı bir artış sağlayan ilaç olarak tanımlandığı; konvansiyonel dozaj formunun da bir solüsyon olduğu veya çabuk ilaç salınım yapan dozaj formu olduğu ifade edilmektedir. "Kontrollü salım (CR)", "uzun süreli salınım", "sürekli veya yavaş salınım (SR)" ve "uzun etkili (LA)" terimleri, "uzun süreli salınım" ile eşzamanlı olarak kullanıldığı da ifade edilmektedir. Monolitik oral ER dozaj formlarının neredeyse tamamının aşağıdaki iki teknolojiden birine dahil olduğu; bunlardan 1. Hidrofilik, hidrofobik veya eylemsiz matriks sistemleri olarak bilinmekle birlikte, ilacın çözündüğü veya dağıldığı, hız kontrol eden bir polimer matriksten oluştuğu 2. İçerisinde çekirdek ihtiva eden rezervuar (kaplamalı) sistemlerin bir polimer kaplama içine alınmış olduğu ifade edilmektedir [48]. Kullanılan polimere bağlı olarak iki tip rezervuar sistemi düşünülmektedir. Bunlardan (a) İlaç içeren bir damarın hidrofilik ve / veya suda çözünmeyen polimer kaplamaları içine alındığı basit difüzyon/erozyon sistemleri olup ilacın salıverilmesi ve ilacın kaplama yoluyla veya polimer kaplamanın erozyonundan sonra difüzyonla sağlandığı (b) İlaç çekirdeğinin ilaç iletiminde mekanik/lazerle delinmiş yarı geçirgen bir polimer zarında bulunduğu ozmotik sistemler olduğu ve ilaç salınımını, tablet çekirdeği içerisinde üretilen ozmotik basınç ile sağlanmakta olduğu ifade edilmektedir [55].

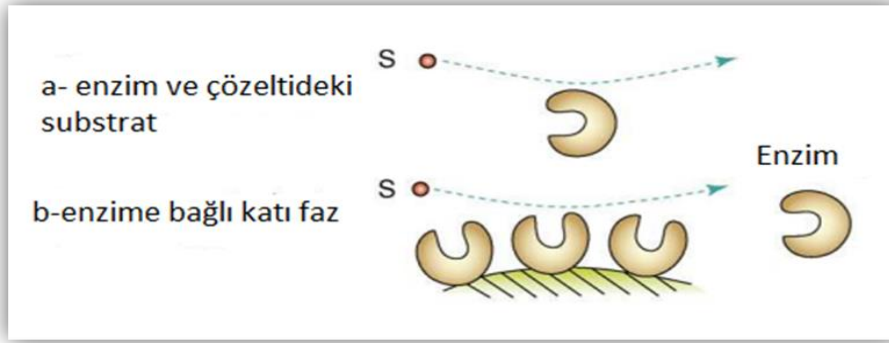
2.3.6. Enzim immobilizasyonu

"İmmobilize enzim" terimi, "katalitik faaliyetlerinin devam etmesi ile belirlenmiş bir alana fiziksel olarak sınırlanmış veya lokalize edilmiş ve tekrar tekrar ve sürekli olarak kullanılabilen enzimlere" denilmektedir [56]. Hareketsizleştirilmiş bir molekülün, uzayda hareketi tamamen ya da katı bir yapıya bağlanarak küçük bir sınırlı bölgeyle sınırlandırılmış bir molekül olduğu bilinmekle beraber, genel olarak immobilizasyon terimi, sınırlayıcı hareketi veya hareketsiz hale getirme hareketini ifade ettiği yani hareketi geciktirdiği [56,57,58] katalitik aktivitelerinin en azından bir kısmını koruyarak katı matrikslere enzim bağlamayı amaçlayan çok sayıda tekniğe karşılık gelmekte olduğu ifade edilmektedir [59]. Endüstriyel proseslerde uygulanmasının yanı sıra, immobilizasyon tekniklerinin, teşhis, biyo-afinite kromatografisi ve biyosensör uygulamalarında bulunan bir takım biyoteknolojik ürünler yapmak için temel oluşturduğu, hareketsizleştirilmiş bir enzim sisteminin ana bileşenlerinin, enzim, matriks ve bağlanma

biçimi olduğu ifade edilmektedir. Enzimlerin, tersinir fiziksel adsorpsiyon ve iyonik bağlardan dengeli kovalent bağlara kadar uzanan etkileşimlerle desteğe tutturulabildiği, sık kullanılan kovalent reaksiyonların, amid, eter, tio-eter veya karbamat bağları yoluyla bağ oluşturduğu da ifade edilmektedir [57]. İmmobilizasyonun sağladığı faydalar arasında, hedef enzimi arındırarak, zaman ve emek tasarrufu sağlamak, daha geniş aralıktaki pH değerlerinde, sıcaklıkta, organik çözen varlığında kullanılabilme, inhibisyonu önleyebilme veya en azından azaltılabilme olarak sayılabilmekte, genel olarak, tüm bunların dışında, endüstriyel işlemler sırasında daha yüksek verimlilik elde etmeyi mümkün kıldığı da ifade edilmektedir [59]. Enzimlerin serbest formlarına kıyasla, hareketsizleştirilen enzimlerin genellikle daha kararlı ve ele alınması daha kolay olduğu, enzim immobilizasyonunun temel amacının, düşük sentez maliyetli ve yüksek bağlama kapasitesine sahip bir destek kullanarak mümkün olan enzim katalizörünün avantajlarını en üst düzeye çıkarmak olduğu da vurgulanmaktadır [60].

İlk enzimatik immobilizasyonu, 1916'da Nelson ve Griffin'nin invertaz enzim aktivitesinin (E.C.3.2.1.26), kömür veya alüminyum hidroksit gibi katı bir matriks üzerinde fiziksel olarak adsorbe edildiğinde zaman enzim aktivitesinin engellenmediği gösterilmiştir [51,52]. Uygun immobilizasyon koşullarının seçiminde sayılabilecek kritik değişkenlerden bazılarının reaksiyon süresi, pH değeri, sıcaklık, tamponlar, inhibitörler veya diğer protein koruyucular olduğu ifade edilmektedir [52]. Hareketsiz enzim terimi, 1971'de ilk Enzim Mühendisliği Konferansı'nda kabul edilmiş olup bunun katalitik aktiviteyi koruyarak belirli bir uzay bölgesinde fiziksel olarak sınırlanmış (lokalize olan) ve sürekli olarak kullanılabilen enzimleri tanımlamakta olduğu da bilinmektedir. Bir enzimin kararlılığının esas olarak kendi iç yapısı ile belirlenebildiği, immobilize enzimin kararlılığının, taşıyıcıyla olan etkileşimine, bağlanma konumuna ve bağ sayısı gibi birçok faktöre bağlı olduğu da ifade edilmektedir [60].

İmmobilizasyon teknikleri; fiziksel ve kimyasal yöntemler olarak ikiye ayrılırken; fiziksel yöntemler de kendi arasında hapsedme, adsorpsiyon, mikrokapsülasyon olarak üç grup altında toplanırken; kimyasal yöntemlerin de; kovalent bağlanma, çapraz bağlama, iyonik bağlama, afinite ligandlarına göre konjugasyon olarak gruplara ayrıldığı ifade edilmektedir [49,61].



Şekil 2.10: Farklı enzimatik reaksiyon türleri [61]

Yukarıdaki şekil 2.10’da farklı enzimatik reaksiyon türleri görülmekte olup, bunlardan, (a)’da enzim katalizi, çözelti fazında enzimleri, (b)’de ise iyi belgelendirilmiş bir polimerik destek üzerine hareketsiz kılılabilir enzimler ifade edilmektedir [61].

İmmobilize edilen enzimin, daha kolay ürün ayırma, tekrar kullanılabilirlik, aşırı yük altında yüksek stabilite, enzimin bir yerden diğerine kolay taşınması, enzim kullanılan herhangi bir işlemin immobilize edilerek maliyetinin düşürülmesi gibi elverişli bir çok işleme sahip olduğu ayrıca daha kolay proses kontrolü sağlamakta olduğu da bilinmektedir [62].

Tablo 2.3: İmmobilize enzimlerin performansını etkileyen faktörler [64]

Etkenler	İmmobilizasyonun etkileri
Hidrofobik bölüm	Hidrofobik substratın reaksiyon hızının artırılması
Taşıyıcının mikro ortamı	Hidrofobik doğal enzim stabilize
Taşıyıcının çok uçlu tutturulması	Enzim termal kararlılığının artırılması
Hareketsizleştirilen enzimlerin çeşitli parçaları veya aralayıcıları	Enzimin etkisiz hale gelmesini önler
Yayılma kısıtlamaları	Enzim aktivitesi azalır ve istikrar artar
Yüzeylerin veya inhibitörlerin varlığı	Daha yüksek etkinlik tutma
Fiziksel son işlemler	Enzim performansının iyileştirilmesi
Farklı bağlama modu	Etkinlik ve istikrar etkilenebilir
Taşıyıcının fiziksel yapısı gözenek boyutu gibi	Etkinlik tutma sıklıkla gözenek boyutuna bağlı
Taşıyıcının fiziksel yapısı	Büyük gözenek boyutuna sahip taşıyıcılar difüzyon sınırlamasını hafifletir ve daha yüksek aktivite alıkoyma sağlar.

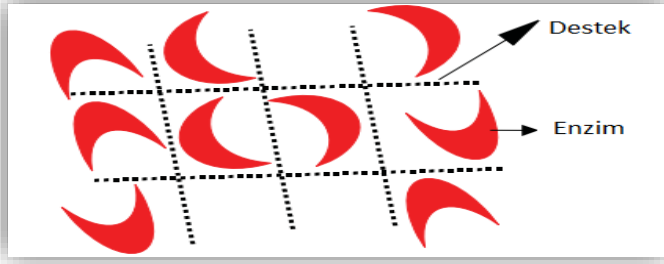
Enzimlerin hareketsizleştirilmesi, bir enzimin çözünmez matriks içinde veya üzerinde çözünmesini içeren gelişmekte olan bir teknik olarak bilinmekle beraber, enzim immobilizasyonunun önemli sayılmasının nedenlerinden birinin de aynı enzimi ard arda kullanmayı mümkün kılınması olarak bilinmektedir. Böylece, her işlem sonunda muhtemel kayıplar önlenerek ve sürecin tamamını daha uygun hale getirecek sürekli sistemlerin tasarımını kolaylaştırdığı bilinmektedir. Immobilizasyon işleminde, biyokatalizörler için daha kararlı bir aktiviteye neden olduğundan dolayı işlemi kontrol etmenin daha kolay olduğu da ifade edilmektedir. Hareketsizleştirme sistemlerinde, enzim-substrat oranının da çok yüksek olduğu, bu sebeple substratın ilave kullanımının da önlenemediği ifade edilmektedir. Her işlemin sonunda enzim, reaksiyon karışımından kolaylıkla çıkarılabilir olmasından dolayı, kontaminasyondan kaynaklanan biyolojik işlemler için olası tehditleri ortadan kaldırdığı da bilinmektedir[64].

Enzim immobilizasyonu, enzimin substrat ve ürünler için farklı olan bir fazda inert polimerler ve inorganik malzemeler gibi genellikle taşıyıcı matriksler kullanılarak sınırlandırılması işlemidir. Bu kullanılan matrikslerin uygun fiyatlı olmanın yanı sıra fiziksel dayanıklılık, stabilite, yenilenebilirlik, enzim özgüllüğünü/etkinliğini artırma ve ürün inhibisyonu, spesifik olmayan adsorpsiyonu ve mikrobik kontaminasyonu azaltma yeteneği gibi özelliklere sahip olması bilinmektedir [64].

2.3.6.1.1. Hapsetme (Tutuklama)

Tutuklama metodunun, bir materyalin kafes yapısında veya polimer zarlarında enzimi tutmak etmeyi içerdiği, bu yöntem ile genellikle enzim sızıntısını en aza indirilebildiği ve stabilizasyonunun iyileştirildiğine işaret edilmiştir. Enzimlerin, enzimin substrat çözeltisinde kaybolmasını önlemek için proteinlerin çözünmez bir desteğe çapraz bağlanması yoluyla hareketsiz kılınabileceği ifade edilmektedir [56].

Bu teknik ile immobilizasyonda, enzim moleküllerinin çözeltide serbest olduğu, ancak şekil 2.11 'de gösterildiği gibi; bir jelin elastik yapısı tarafından hareketle sınırlandırıldığı, adsorpsiyon ve kovalent bağlanmadan farklılık gösterdiği bilinmektedir. Jel örgüsünün, gözeneklilik yapısının enzim veya hücrelerin sızıntısını önleyecek kadar sıkı olmasını sağlamak için kontrol edildiği fakat aynı zamanda substratın ve ürünün serbest dolaşımına izin verdiği de ifade edilmektedir. Destek materyalinin aynı zamanda bir bariyer görevi gördüğü ve immobilize enzimin zararlı hücreler, proteinler ve mikro ortamdaki enzimlerden gelen mikrobiyal kontaminasyondan koruduğu için avantajlı olabildiği bilinmektedir [57].

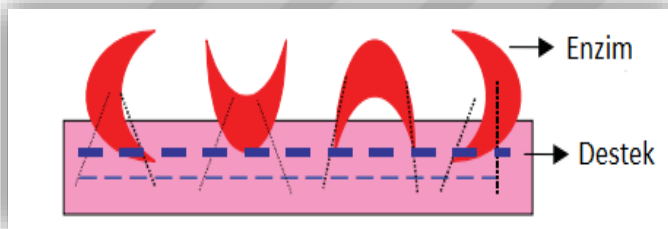


Şekil 2.11:Tutuklama tekniğini kullanarak enzimin immobilizasyonu [57]

Tutuklama tekniğini kullanarak immobilize enzimlerin avantajları arasında enzim yüklemesi çok yüksek olduğu,tutuklama tekniğini kullanarak immobilize edilen enzimlerin dezavantajları arasında destekten enzim kaçağı, substratın enzime difüzyonu ve ürünün enzimden uzakta difüzyonu (difüzyon sınırlaması) sayılabilmektedir [57].

2.3.6.1.2. Fiziksel Adsorbsiyon

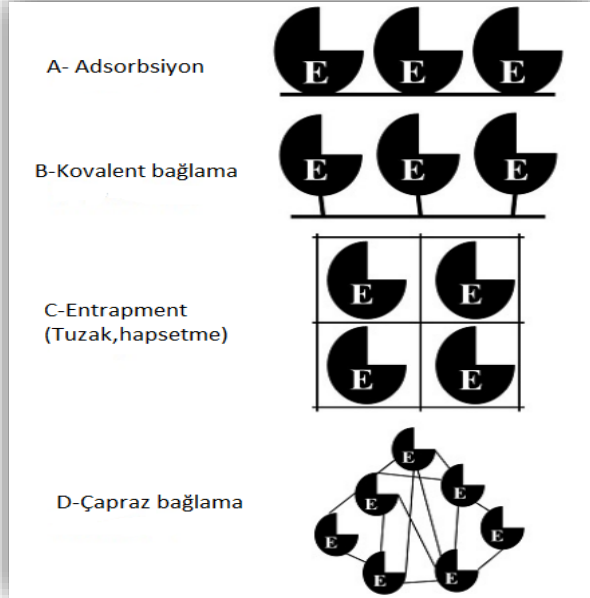
Adsorpsiyon ile immobilizasyon en basit yöntem olarak ifade edilirken geri çevrilebilir yüzeyi ile enzim ve destek malzemesi arasındaki etkileşimler. Şekil 2.13'de gösterildiği gibidir [57].



Şekil 2.12:Adsorpsiyon tekniği ile enzimlerin immobilizasyonu [57]

Adsorpsiyon tekniği ile immobilize enzimlerin avantajları arasında sadece proteinlerin saflaştırılmasını değil aynı zamanda taşıyıcıların tekrar kullanılmasını sağlayan geri çevrilebilirlik; hafif koşullar altında enzim immobilizasyonunu sağlayan sadelik; herhangi bir kimyasal değişiklik yapılmadığı için aktivitenin muhafaza edilmesi olasılığı yüksek olması, ucuz ve hızlı bir yöntem olmakla birlikte, destekte veya enzimde hiçbir kimyasal değişiklik meydana gelmediği ifade edilmektedir. Adsorpsiyon tekniği ile immobilize edilen enzimlerin dezavantajları arasında ise adsorpsiyonla hazırlanan hareketsiz enzimlerin, yüksek iyonik kuvvete, pH'ya, vb. gibi desorpsiyon kuvvetleri tarafından tahrip edilebilmesi, enzim ve taşıyıcı arasındaki nispeten zayıf etkileşim nedeniyle, taşıyıcılardan sızıntı eğilimi göstermesi, ürünün kirlenmesi, sayılabilmektedir [57].

Adsorpsiyon işleminin, çok zayıf kuvvetler olan Van der Waals kuvvetleri, iyonik ve hidrojen bağlanması ve hidrofobik etkileşimler üzerine kurulu olduğu, ancak çok sayıda, yeterli bağlanma kuvveti verdiği ifade edilmektedir [59].



Şekil 2.13:Çeşitli enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi [59]

Adsorban seçiminde, kullanılan enzimin sızıntısını en aza indirmenin özellikle istenilen bir özellik olması ve kimyasal modifikasyonu ve enzim hasarını önlemek için enzimlerin ve desteklerin mevcut yüzey özelliklerinin göz önünde bulundurulması gerektiği, pH veya iyonik güçte alışılmadık değişikliklerin uygulanması sırasında bağlanma kuvvetlerinin zayıflamamasına dikkat edilmesi gerektiği belirtilmektedir. Fiziksel yöntemle adsorpsiyonda genellikle protein mikro ortamında büyük değişikliğe yol açtığı ve tipik olarak tek bir protein molekülü ile immobilizasyon yüzeyi üzerindeki bir dizi bağlanma bölgesi arasındaki çoklu protein adsorpsiyonunu içerdiği de ifade edilmektedir [59].

Mevcut destek malzemelerinin çoğunun, adsorbsiyon ile immobilizasyon için uygun yeterli yüzey şarj özelliklerine sahip olması gerektiği, enzim immobilizasyonunda inorganik taşıyıcılar olarak seramik, aktif karbon, kaolinit, bentonit, gözenekli cam sayılırken, organik sentetik taşıyıcılar olarak naylon, polistiren ve doğal organik taşıyıcılar olarak ise kitozan, dekstran, jelatin, selüloz, nişastanın kullanılabileceği ifade edilmektedir. Adsorbsiyon tekniğinde usulün, sulu bir enzim solüsyonunun bir süreliğine destek malzemesi ile karıştırılmasından oluştuğu, bundan sonra, fazla enzimin, destek üzerindeki hareketsizleştirilmiş enzimden uzaklaştırıldığı belirtilmektedir. Prosedürün, pH ve iyonik kuvvetin sıkı kontrolünü

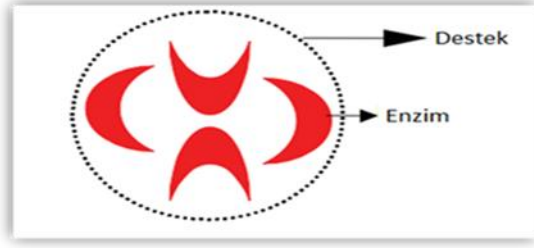
gerektirdiğiçünkü bunların enzim ve desteğin yüklerini değiştirebildiğini ve dolayısıyla adsorpsiyon seviyesini etkileyebildiği ifade edilmektedir. pH'taki basit bir değişimin, iyonik etkileşimleri iptal edebildiği ve enzimin destekten salınmasını sağlayabildiği bildirilmektedir. Adsorpsiyonun avantajları arasında, yöntem sadeliği, biyokatalizörün konformasyonu/aktivitesi üzerindeki az etki ve taze enzim ilavesiyle inaktif enzimin yenilenmesi sayılabilmektedir. Temel dezavantajı ise, kurulan zayıf etkileşimlerden dolayı biyokatalizörün desteğe olan desorpsiyonu olarak ifade edilmektedir [60].

Bir enzimin bir destek veya film malzemesi üzerine adsorpsiyonu, hareketsizleştirilmiş bir enzim elde etmenin en basit yolu olarak bilinmekle birlikte, temel olarak enzimin, kovalent olmayan bağlar ile destek malzemesine bağlandığı ve desteğin herhangi bir ön aktivasyon adımını gerektirmediği belirtilmektedir. Enzim ve destek malzemesi arasında oluşan etkileşimlerin, desteğin mevcut yüzey kimyasına ve enzim molekülünün yüzeyinde açığa çıkan amino asit tipine bağlı olacağı,enzimin adsorpsiyon yoluyla immobilizasyonunun, iyonik veya hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağlanması ve van der Waals kuvvetleri gibi destek ve enzim arasındaki zayıf etkileşimleri içerdiği de ifade edilmektedir [60].

Fiziksel adsorpsiyon, endüstride immobilizasyon için kullanılan en kolay tekniklerden biri olarak kabul edilmekle birlikte, fiziksel adsorpsiyonun, yüksek katalitik aktiviteyi muhafaza eden basit ve daha ucuz bir teknik olduğu bu nedenle, diğer yöntemlerden daha yaygın olarak kullanıldığı da bilinmektedir. Bu tekniğin, pahalı destek malzemelerinin tekrar kullanılmasına da izin verdiği; sonuç olarak, bu destek malzemesinin yeniden kullanılabilirliği, endüstriyel üretimler için ekonomik avantajlar sağladığı fakat bu tekniğin yüksek stabiliteye sahip olmadığı, yıkama ve çalışma sırasında hareketsiz kılınmış biyomoleküllerin kaybına neden olabildiği de ifade edilmektedir [63].

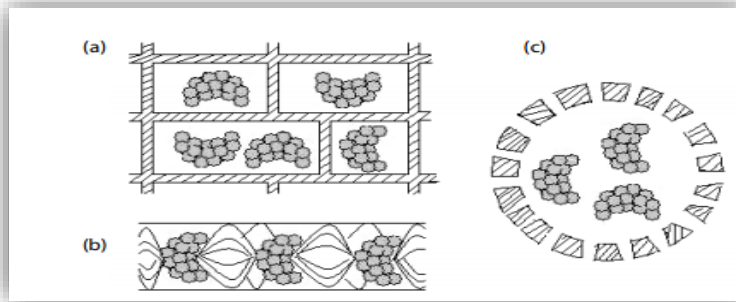
2.3.6.1.3. Enkapsülasyon

Enkapsülasyon tekniğini kullanarak immobilize enzimlerin avantajları arasında enzimlerin hücre içinde kapsüllenebilmeleri, hücrelerin ve/veya enzimlerin belirli uygulamalara uyacak şekilde istenen herhangi bir kombinasyonda hareketsiz kalabileceği yerlerde ortak harekete geçirme imkânı sayılabilmektedir. Enkapsülasyon tekniğini kullanarak immobilize edilen enzimlerin dezavantajları arasında ise difüzyon ile ilgili problemler akut olması ve bir reaksiyona giren ürünlerin hızla birikmesi sonucu membran kopmasına neden olabilmesi sayılmaktadır [57]. Aşağıdaki şekil 2.14'de enzimlerin kapsülleme tekniğini kullanarak immobilizasyonu şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.14: Enzimlerin kapsülleme tekniğini kullanarak immobilizasyonu [57]

Aşağıdaki şekil 2.15’ de immobilizasyon için hapsetme yönteminde, aktif bileşenlerin bir film, jel, fiber, kaplama veya mikrokapsülasyona fiziksel olarak yakalanmasını içerdiği ifade edilmekle beraber, bu yöntemin, bir enzim veya aktif molekülün bir polimer ile karıştırılması ve daha sonra, enzimi yakalayan bir kafes yapısı oluşturmak üzere polimerle çapraz bağlanması sonucu gerçekleştirilebildiği de ifade edilmektedir. Mikrokapsüllenmiş enzimlerin, kontrollü gözeneklilik ile küresel yarı-geçirgen polimer membranlar içindeki enzim solüsyonunun çevrelenmesiyle oluşturulduğu da bilinmektedir. Bu immobilizasyon yönteminin avantajları arasında, substrat ve enzim arasındaki nispeten küçük bir hacimdeki aşırı büyük yüzey alanı ve aynı anda immobilizasyon gerçekleşme olasılığının olması sayılırken, en büyük dezavantajları arasında, mikrokapsülasyon sırasında zaman zaman enzimin inaktivasyonu ve gerekli yüksek enzim konsantrasyonu bulunduğu ve enzimi muhafaza etmek için, gözenek boyutunun çok düşük olması gerektiği ve bu sistemlerin çok difüzyonla sınırlı olma eğiliminde olduğu da ifade edilmektedir [60].

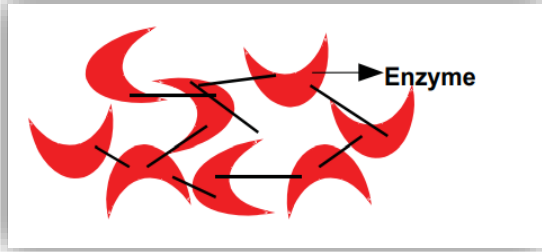


Şekil 2.15: (a) Enzim kapsülleme, (b) elyaf veya (c) kapsül [60]

2.3.6.1.4. Çapraz bağlama yöntemi

Bu tür immobilizasyonun, aşağıdaki şekil 2.16’da gösterildiği gibi destek malzemesi kullanılmaksızın büyük, üç boyutlu bir kompleks yapı oluşturmak üzere enzim moleküllerinin birbirine katılmasını içerdiği ve kimyasal veya fiziksel yöntemle bu bağlanma işleminin gerçekleştirilebildiği bilinmektedir. Çapraz bağlamanın kimyasal yöntemlerinin, normal olarak,

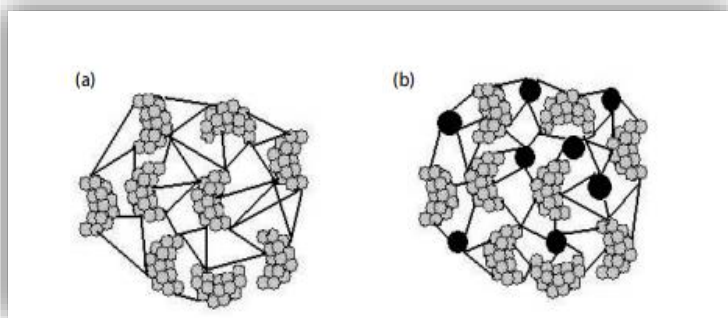
glutaraldehit, dikarboksilik asit veya tolüen diizosiyanat gibi bir iki veya çok işlevli ayıraç vasıtasıyla enzimler arasında kovalent bağ oluşumunu içerdiği, poliaminler, polietilenimin, polistiren sülfonatlar ve çeşitli fosfatlar gibi topaklayıcı ajanların ise, fiziksel bağlar kullanarak hücreleri çapraz bağlamak için yaygın şekilde kullanıldığı da ifade edilmiştir [57].



Şekil 2.16: Çapraz bağlama tekniği [57]

Çapraz bağlama tekniği ile immobilize enzimlerin avantajları arasında hareketsizlik desteksiz olup, aynı enzim molekülleri arasında çapraz bağlanma, yapının sağlamlığını arttırarak enzimleri dengelemek olarak sayılabilmektedir. Çapraz bağlama tekniği ile hareketsiz hale getirilen enzimlerin dezavantajları arasında ise çapraz bağlamanın reaktiflerinin sert olması, bu yöntemin uygulanmasına sınırlayıcı bir faktör olduğu sayılabildiği gibi buna ilaveten dezavantajları arasında; çapraz bağlama reaktifinin aktif bölge boyunca reaksiyona girmesi durumunda, enzim kısmen aktivite kaybedebilir veya tamamen inaktive olabilmesi sayılabilmektedir [57].

Çapraz bağlama yönteminin, iki veya çok işlevli ayıraçlar vasıtasıyla enzim veya aktif moleküller arasındaki kovalent bağların oluşturulmasına dayandığı da bilinmektedir [60].



Şekil 2.17: Çapraz bağlama (a) vasıtasıyla hareketsiz kılınan ve atıl moleküller ile birlikte çapraz bağlanan biyokatalizörler (b) [60]

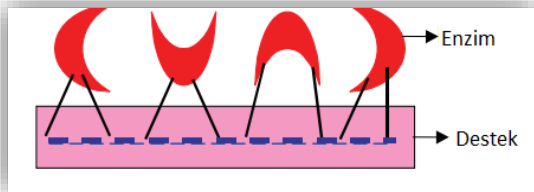
Çapraz bağlama yöntemi, biokatalizörlerin iki veya çok fonksiyonlu reaktif veya ligandlarla birbirine eklenmesini içerir. Bu şekilde, çok yüksek molekül ağırlıklı tipik olarak çözünmeyen agregatlar oluşmaktadır [60]. En sık bilinen immobilizasyon tekniklerinin avantaj ve dezavantajları Tablo 2:3 'de gösterilmiştir.

Tablo 2.4 : Bazı İmmobilizasyon Tekniklerinin Avantaj ve Dezavantajları [63]

İmmobilizasyon Tekniklerinin	Avantajları	Dezavantajları
Fiziksel Adsorbsiyon	Basit ve ucuz Yüksek katalitik aktivite Biyokatalizörün konformasyonel değişikliği yok Reaktiflerin kullanılmasına gerek yok Pahalı malzemenin yeniden kullanılması	Düşük stabilite Olası biyomolekül kaybı Zayıf bağlar biyokatalizörün desorpsiyonuna neden olabilir
Enkapsülasyon ve Hapsetme	Biyokatalizörü koruma Düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin taşınmasına izin verir Bakım hücre yoğunluğu nedeniyle sürekli çalışma sağlar Hücrenin ayrılmasını kolaylaştırır ve aşağı akışlı işlemi basitleştirir	Kütle Transferi Üzerindeki Sınırlamalar Düşük enzim yüklemesi
Çapraz Bağlama	Güçlü biyokatalizör bağlama Sızmayı önler Desorpsiyonu azaltır Biyokatalizörün stabilitesini artırır	Aktif sit alanlarında değişikliklere neden olabilir Yayılma kısıtlamaları Enzim aktivitesinin kaybedilmesi
Kovalent Bağlama	Güçlü bağlayıcı Yüksek ısı kararlılığı Enzim temasını substratıyla kolaylaştırır Biyokatalizörlerin elüsyonunu önler Destek malzemesi ve yöntemi tasarımında esneklik	Sınırlı enzim hareketliliği azalan enzim aktivitesine neden olur Hücrelerin immobilizasyonu için daha az etkili Destek malzemeleri yenilenemez

2.3.6.1.4. Kovalent bağlama

Bu hareketsizleştirme yöntemi, aşağıdaki şekil 2.18 'de gösterildiği gibi, enzim ve destek malzemesi arasında bir kovalent bağ oluşturmaya içerdiği ifade edilmektedir [57,61]. Kovalent bağların genellikle enzim hareketsizleştirme yöntemleri ile karşılaştırıldığında enzim ve taşıyıcı arasındaki en kuvvetli bağları sağladığı bu nedenle, kullanılan matriksten enzimin sızıntısının genellikle kovalent bağlı immobilize enzimlerle asgariye indirildiği vebağların normalde desteğin yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar ile enzim yüzeyindeki amino asit kalıntılarına ait fonksiyonel gruplar arasında oluştuğu da ifade edilmektedir [57].



Şekil 2.18:Enzimlerin kovalent bağlama tekniği ile immobilizasyonu [57]

Kovalent bağlam tekniği kullanılarak immobilize edilen enzimlerin avantajları arasında enzimde sızıntısı olmaması, enzim destek malzemelerine enzimin lokalizasyonu nedeniyle substrata kolayca temas edebilmesi, ısı kararlılığının artması şeklinde ifade edilirken dezavantajları arasında ise iyi desteklerin çok pahalı olmasından dolayı maliyetin oldukça yüksek olması, ayrıca enzim aktivite kaybı sayılabilmektedir [57].

Kovalent bağlamada tekniği ile immobilizasyonda enzim ve destek matriksi arasında kovalent bağların oluşumunu içerdiği ve enzimlerde bulunan fonksiyonel grupların, bu fonksiyonel grupta katalitik aktiviteden sorumlu olmadığı için destek matriksine bağlandıkları ifade edilmektedir [60].

Kovalent bağlama tekniğinde; enzimin, kovalent bağlarla matrikse bağlandığı ve bu hareketsizleştirme yönteminin, asgari konformasyonal değişikliklere neden olan zorunlu olmayan amino asitleri içerdiği de bilinmektedir [63].

2.3.6.1.5. Enzim İmmobilizasyonunda Boncukların Kullanımı

Hastalıkların tedavisi için ilaç dozlarının geleneksel olarak uygulanmasında, ilacın eşit aralıklarla tekrarlı girişini içerdiği, bununla birlikte, bu yöntemin ilaç konsantrasyonunun dalgalanmasına neden olabileceği ve düşük seviyede tedavi edici olmadığı veya yüksek toksik etkilere yol açabileceği ifade edilmektedir. Kontrollü ilaç salım sistemlerinin, bu dalgalanmayı dengelemeyi ve belirli bir süre boyunca sabit bir ilaç seviyesi sağlamayı amaçladığı da bilinmekle birlikte, kontrollü ilaç salım sistemlerinin, geleneksel ilaç haplarına kıyasla daha güvenilir olduğu ve yüksek terapötik taşıyıcılar olarak kabul edildiği de ifade edilmektedir. Polimerik boncuklar, yüksek biyoyararlanım ve stabiliteye hizmet ettikleri için kontrollü ilaç salım sistemleri için iyi adaylar olarak kabul edilmektedir. Ayrıca terapötik aralıkta sınırlı dalgalanma, azaltılmış yan etkiler, azalan doz sıklığı ve daha iyi hasta uyumu gibi avantajlar sunduğu da bilinmektedir [67].

İlaçlar için kontrollü salım sistemlerde aljinat boncuklarının kullanımına olan ilginin giderek arttığı, bununla birlikte, jel erozyonu, ilacın salınmasını hızlandırdığı için aljinat boncukları ile önemli bir sorun oluşturduğu bilinmektedir. Son zamanlarda, aljinat boncuklarının jel matriks erozyonunu baskılamak için kitozanla işlenmiş aljinat jel boncukları geliştirilmiştir. Bununla birlikte, kitozanla işlenmiş aljinat boncukları hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır [68].

Terapötik ajanların etkili olması ve etkili bir şekilde verilmesini sağlamak için araştırılan çeşitli ilaç verme sistemleri arasında, boncuklar dikkat çektiği için son zamanlarda, alginat ve kitozan gibi doğal polimerler ile hazırlanan boncuklara odaklanıldığı bildirilmektedir. Bununla birlikte, jel erozyonunun, ilacın salınmasını hızlandırdığı için aljinat boncuklarının önemli bir problemi olarak bilinmektedir. Bu nedenle, aljinatın jel erozyonunun bastırılması için kitozan

içeren aljinat boncuklar hazırlandığı belirtilmektedir [68, 69]. Kitozanın hem çapraz bağlı aljinat matriksten erozyonla ilaç kaybını önlemekte olduğu, hem de ilaç salımını kontrol ettiği bilinmektedir.

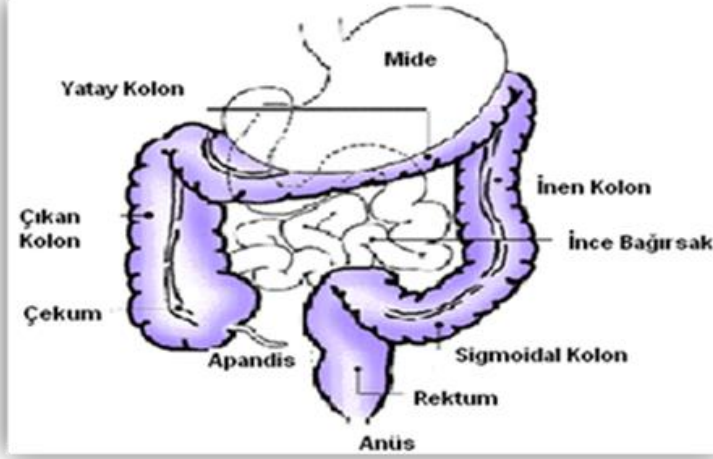
2.4. KOLON İLAÇ HEDEFLENDİRİLMESİ

2.4.1. Gastrointestinal Sistem

Gastrointestinal sistemin (GİS), içi boş bir lümeninden oluşan, ağız bölgemizden anüs bölgesine kadar uzanan, tükürük bezleri, pankreas ve karaciğer gibi glandüler organlarla birlikte işlev gördüğü ifade edilirken, bu sistemin en önemli organlarından bir olan midenin ise, yiyecekleri sindiren ve hormon salgılayan, diaframın alt kısmında, epigastrik, umbilikal ve sol hipokondriak bölgede lokalize olmuş hem ekzokrin hem de endokrin özellik gösteren gastrointestinal sistemin en geniş bölümü olduğu ifade edilmektedir [70]. Salgılanan mide usaresinin miktarının 8-15 ml. civarında olduğu bunun yanında kuvvetli asit reaksiyonu gösteren mide sıvısının pH sınırın 0.9-1.5 olduğu ifade edilmekle beraber, mide sıvısının, mukus, tuzlar, hidrolitik asit ve enzimler ihtiva ettiği bilinmektedir [71].

İnce bağırsağın, 3m boyunda 4cm çapında olan, midenin pilor kısmından başlayıp, kalın bağırsaklara kadar uzanan bir organ olduğu ve birbirini izleyen üç kısımdan oluştuğu, bu kısımların duodenum, jejunum ve ileum olarak adlandırıldığı belirtilmektedir. İnce bağırsağın mideden sonra gelen ilk kısmı duodenum olarak adlandırıldığı ve boyunun 25-30 cm civarında olduğu ve şeklen "C" harfi biçiminde görüldüğü ifade edilmektedir. Jejunumun ise, ince barsağın duodenum'dan sonraki kısmı olmakla birlikte, kesin bir sınırı olmadan ileum ile devam ettiği, duodenumun, ince barsağın en kısa parçası olduğu, 25 cm uzunluğunda ve hareketsiz olduğu belirtilmektedir. İleumun ise; jejunum'un devamı biçiminde olup, bu iki kısım arasında kesin bir sınır mevcut olmadığı, fakat bazı yapısal farklılıklar ile birbirlerinden ayrıldıkları belirtilmektedir. Örnek olarak, jejunumun, ileum'a kıyasla daha kalın bir duvar yapısı ihtiva ettiği ve ileumun kapak yapıda bir oluşum ile kalın barsağa açıldığı ifade edilmektedir [71,73].

Kalın barsağın toplam boyu 120-150 cm civarındadır. Çekum, kolon ve rektum olmak üzere üç kısımdan ibarettir. Çekum, kalın barsağın, ince barsak ile birleştiği yerin altında kalan parçadır. Barsak duvarında oluşmuş kör bir çıkıntı biçimindedir. Karın boşluğunun sağ alt kısmında bulunur. Boyu, 6-7 cm civarındadır ve kalın barsağın hemen hemen en geniş kısmıdır. Kolon, kalın barsağın çekum'dan sonraki kısmıdır. [71,73,76]



Şekil 2.19. Kolonun yapısının şematik gösterimi. [72]

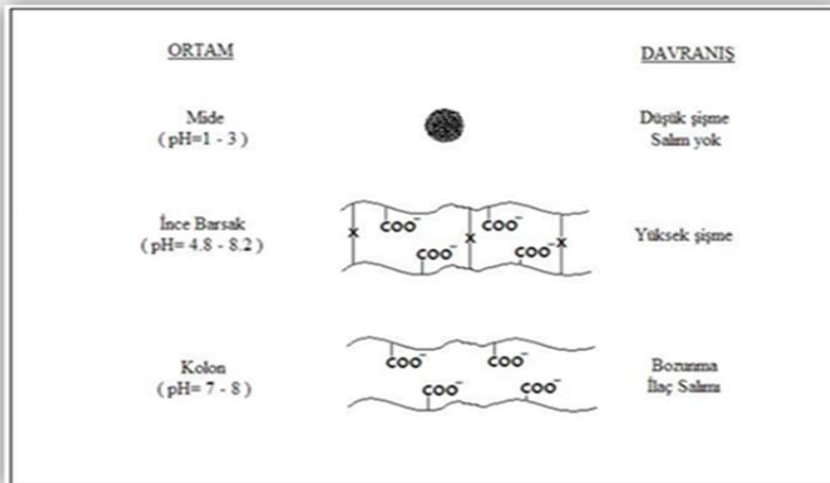
İnce bağırsağın aksine kalın bağırsakta kıvrım ve çıkıntılarının bulunmadığı, bu yüzden, yüzey alanının daha az olduğu, öte yandan, sindirim amaçlı enzim salgılanmasının da olmadığı belirtilmektedir. Bakteri üremesinin kolonda, daha çok çıkan kolonda olmasının nedeninin; burada bulunan besin kaynaklarının fazla olmasından kaynaklandığı ifade edilmektedir. Kalın bağırsağın görevleri arasında; bağırsak salgısı ile emilmeyen selülozun, atılan epitel hücreleri ve bakteriler gibi sindirilemeyen materyalleri vücuttan itrah etmek, suyu ve elektrolitlerin geri emilimini sağlamak olduğu belirtilmektedir. Sonuçta, çekum ve çıkan kolonda, yarı katı olan bağırsak içeriği gittikçe katılaşmakta olduğu ve itrah edilene kadar inen kolonda depolandığı da belirtilmektedir. Kolona hedeflenen ilaç taşıyıcı sistemlerden etkin madde serbestlenmesini etkileyen başlıca fizyolojik faktörler arasında; mide içeriğinin boşalması, gastrointestinal kanal pH'sı, ince bağırsaktan geçiş süresi, kolondan geçiş süresi, kolondan emilim, kolon mikroflorası, kolon hastalıkları sayılabilmektedir. [72-75].

2.4.2. Gastrointestinal Sistemde İlaç Serbestlenmesi

Hastaya oral yolla uygulanan ilaçların başlıca emilim bölgesinin ince bağırsaklar olduğu, bunun iki ana nedeni olduğu, ilkinin; ince bağırsak mukozasının anatomik yapısından kaynaklandığı ve oral uygulanan ilacın veya gıdanın ince bağırsağın sonuna ulaşması için ortalama 5 saat geçmesi gerektiği belirtilmektedir. Bu sürenin ortalama 1/2-1 saatinin midede, kalan kısmının ise ince bağırsak geçtiği ifade edilmektedir. İlacın GİS'te kalış süresinin kısa olmasından ve mide mukoza yüzeyinin küçük oluşundan dolayı midenin, emilime genellikle çok daha az elverişli olduğu belirtilmektedir. Mide-bağırsak kanalının pH'sı ve geçiş süreleri incelendiğinde; midede pH'nın 1,5 olup, geçiş süresinin (s) >3, duodenumun pH'sının 5-

6,1 arasında; jejunum pH'sının ise 6-7; ileum pH'sının 7-8 olduğu belirtilmekle beraber, üçünde geçiş süresinin 3-4 saat arasında gerçekleştiği, kolonun pH'sının ise 5,5-7 arasında olup küçük dozaj şekilleri için geçiş süresinin bilindiği belirtilmektedir [73]. Genel olarak, ağız yoluyla uygulanan ilaç salımının ve soğurmanın gastrointestinal pH'dan etkilenmekte olduğu ve midedeki, açlık ve beslenme koşullardaki, pH'nın sırasıyla 1.5-2 ve 2-6' arasında değiştiği belirtilmekle birlikte, çeşitli pH duyarlı ilaçların bozunmasından asidik pH'nın sorumlu olduğu ve bu sorunun enterik kaplama yolu ile engellenebildiği ifade edilmektedir. İnce bağırsaktaki pH'nın 6.6-7.5'dan biraz fazla olduğu ve kolonda pH'nın 6.4'e düştüğü belirtilmektedir [76].

İlaç verme sistemlerinde, ilacın önce ağız yoluyla mide ve ince bağırsak içine girdiği ve daha sonra kolona ulaşarak, mide salgısının ve gastrik mukusun doğasını ve pH'sını, ilacın salımını ve emilimini etkilemekte olduğu ifade edilmektedir. İlacın sağlam bir formda kolonuna başarılı bir şekilde ulaşabilmesi için, mide ve ince bağırsaktaki engelleri aşması gerektiği belirtilmekle birlikte, gastrointestinal sistemden geçişin, koşula bağlı olarak 1 saat ila 3 saat arasında değiştiği belirtilmektedir. Normal olarak, ince bağırsak geçişinin; fiziksel durumdan, dozaj formunun büyüklüğünden ve midede gıda mevcudiyetinden etkilenmemekte olmasından dolayı, doz formunun ortalama transit süresi ileoçekal birleşme noktasına ulaşmak için yaklaşık 3-4 saat olduğu ve zaman periyodunun tutarlı olduğu ifade edilmektedir. Bu süre zarfında dozaj formunun ince bağırsakta bulunan enzimlere maruz kaldığı belirtilmektedir. Bir kapsülün yetişkinlerde kolonik geçiş süresinin 20-35 saat arasında olduğu ifade edilmektedir. Daha uzun geçiş süresi ile iyileştirilmiş kalma süresinin ve kolondaki mikro flora ile dozaj formunun temasının, ilacın dozaj formundan salınımını ve emilimini yönetmekte olduğu da ifade edilmektedir [76].



Şekil 2.20: Gastrointestinal sistemde biyobozunur ve pH-duyarlı oral ilaç serbestleyen formülasyonların kullanımı [77]

Yukarıda şekil. 2.20’de gastrointestinal sistemde biyobozunur ve pH-duyarlı oral ilaç serbestleyen formülasyonların kullanımının şematik gösterildiğini ve X: çapraz bağlardaki azoaromatik grupları gösterilmektedir [77].

Oral uygulamanın, sistematik dolaşımda herhangi bir ilaç uygulamasında en uygun ve en çok tercih edilen yolu olduğu belirtilmekle birlikte, oral kontrollü salım ilacı verilisinin, dozlama uygulama kolaylığı, hasta uyumu ve formülasyonda esneklik gibi iyileştirilmiş terapötik avantajlar elde etmek için oral uygulamanın farmasötik alana olan ilgisinin arttığı ifade edilmektedir. Gastrointestinal sistemden (GIS) kolayca emilen ve kısa yarı ömürlü olan ilaçların, sistemik dolaşımdan hızlı bir şekilde elimine edildiği ve bu ilaçların sık dozlanmasının, uygun terapötik aktiviteye ulaşmak için gerekli olduğu da belirtilmektedir. Bu sınırlamayı önlemek için, oral kontrollü kontrollü salım formülasyonlarının geliştirilmesinde, ilacın yavaş yavaş mide-bağırsak sistemine (GIS) salınması ve uzun bir süre sistemik dolaşımda etkili bir ilaç konsantrasyonunun muhafaza edilmesi için bir girişim olduğu ifade edilmektedir [78].

GIS ve oral yolun, ilaç uygulaması açısından çok kullanıldığı, ancak bu yolun aşılması gereken önemli zorluklarının bulunduğu belirtilirken, safra kesesinden ince bağırsağa salgılanan ve yağları emülsifiye eden yüzey aktif özellikteki safra tuzlarının, sindirime yardımcı enzimlerin etkileri ve değişik pH değerine sahip bölgelerin, etkin maddenin parçalanmasına ve biyoyararlanımının azalmasına yol açabilecek başlıca etkenler olduğu ifade edilmektedir. Mide usaresinde pepsin veya asit etkisi ile parçalanan ya da mide mukozasını tahriş eden ilaçların mide vasatında ayrılmayan ancak barsakta çözünüp ortadan kalkan formülasyonlarla hazırlandığı da belirtilmektedir. Bu formülasyonların bağırsak pH’sının 5’ten yukarı olduğudurunda parçalanarak içerdikleri etkin maddeyi serbest bıraktıkları bilinmektedir. Bu tür farmasötik dozaj şekilleri enterik kaplı farmasötik şekiller olarak adlandırılmaktadırlar. Oral olarak uygulanan ilaçların ince barsağın yukarı kısımlarında tam olarak emilmemişlerse, bağırsakta kalan kısımları aşağı doğru ilerledikçe, bağırsak mikroflorası tarafından serbestlenen enzimlerce parçalandığı, bağırsak mikroflorasının, bağırsağın yukarı kısımlarında emilmeyen bazı ilaçları biyotransformasyona uğratarak onları ileum ve kolonda emilebilir hale getirip, emilime yardım edebildiği de ifade edilmektedir [79].

2.4.3. Kolona İlaç Serbestlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Farmasötik Teknoloji alanında yapılan çalışmaların önemli bir kısmını konvansiyonel ilaç dozaj formlarının dezavantajlarının giderilmesi ve hastaya daha az etkin madde verilerek ilaç alım sıklığının azaltılması ve bu suretle, daha uzun aralıklarla ilaç salımı sağlayan tedavi yöntemlerinin gerçekleştirilmesi olarak bilinmektedir. Az ilaçla az yan etkinin sağlanması, kısa sürede etkin tedavi sağlanması ve yüksek hasta uyuncu esas alınmaktadır. Kolona ilaç

serbestlenmesinde, ilaç yada biyoaktif maddenin dozaj formundan serbestlenmeden üst gastrointestinal sistemden geçmesi hedeflendiği, bazı ilaçlar için nötr pH, düşük enzim aktivitesi, uzun transit zamanı, sistemik yan etkilerin engellenebilmesi, düşük dozların uygulanabilmesi, belirli bir alana hedeflenme yapılabilmesi, bazı enflamatuvar bağırsak hastalıklarında bölgesel ilaç hedeflemesine olanak sağlanması, etki bölgesinde yüksek ilaç konsantrasyonunun elde edilebilmesi, hidrolitik enzim aktivitesinin ince bağırsaklara oranla kolonda daha az olması peptid protein yapısındaki ilaç etken maddelerinin emilimleri için daha iyi bir bölge olması, gastrointestinal sistemde ciddi yan etkileri olan etkin maddelerin uygulanabilmesi, geciktirilmiş salım yapan formülasyonların geliştirilmesi, emilim bölgesi kolon olan etkin maddelerin vücuda uygulanabilmesi, kolonun absorpsiyon emilimi artırıcı maddelere çok daha fazla ilgi göstermesi, ilaçların geçiş sürelerinin kolonda daha uzun ve enzim aktivitesinin çeşit ve miktarının az olmasından dolayı tercih edilen bir yer ve yöntem olduğu belirtilmektedir [80].

Kolona ilaç hedeflenmesini sağlamak için pH duyarlı jellerin, ön ilaç veya zamana bağlı terapötik sistemlerin hazırlanabildiği ifade edilirken, mide içeriğinin boşalmasının, gastrointestinal kanalın pH'sının, ince bağırsak ve kolondan geçiş sürelerinin, kolondan emilimin, kolon mikroflorasının, kolon hastalıklarının, kolona hedeflenen ilaç taşıyıcı sistemlerden etkin madde serbestlenmesini etkileyen fizyolojik faktörlerin başlıcaları olarak ifade edilmektedir. İnce bağırsağın üst kısımlarında mikrofloranın midedekine benzerlik gösterdiği de belirtilmektedir. Alt kısımlarda ise, Gram negatif bakteri miktarının artmakta olduğu, bakteriyel floradaki bu artışın, ortam pH'sının nötralleşmesinin ve hareketliliğinin azalmasının neticesi sonucunda olduğu ifade edilmektedir. Kolondaki bakteri florasının çoğunluğunun anaerob bakterilerden ibaret olduğu, bakteri üremesinin kolonda daha çok, özellikle çıkan kolonda görüldüğü de bilinmektedir. Bunun nedeninin; burada bulunan gıda kaynaklarının fazla oluşundan kaynaklandığı belirtilmektedir. Temel gıda maddeleri olan karbonhidratlardan nişastanın, polisakkaritlerin (selüloz, hemiselüloz, guar, pektin) ve oligosakkaritlerin (laktöz, sorbitol, ksilol), bakteri kaynaklı polisakkaridaz ve glikozidaz enzimleri tarafından yıkıma uğratıldığı da ifade edilmektedir [81].

2.4.4. pH-Duyarlı Sistemlerin Gastrointestinal Sistemdeki İlaç Salım Uygulamaları

Gastrointestinal kanalın pH'sının midede asidik olduğu ve ince bağırsaklar ile kolonda ise pH'nın alkali olduğu bilinmekle birlikte, GİS'in kanalının farklı segmentlerindeki pH değerlerinin farklılığının kolona özgü ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde kullanıldığı da ifade edilmektedir. Etkin maddenin pH'ya duyarlı polimerlerle kaplanmasının, bu amaçla kullanılan en başarılı yöntem olarak kabul edildiği de bilinmektedir. Bu polimerlerin; midenin asidik ortamında çözünmezken, pH 6 ve üzerindeki pH'da çözünür özellikte olduğu, bu şekilde yapılan

enterik kaplama ile etkin maddelerin mide ve üst-bağırsak kanalında bozunmadan korunarak alt segmentlere geçişinin sağlanabildiği de ifade edilmektedir. Etkin maddelerin pH'ya duyarlı polimerler ile enterik kaplama yapıldığı bu sistemlerin kolona hedefleme teknolojisinde sık kullanıldığı, bunun nedenleri arasında, bu sistemlerin basitliği, pratikliği ve maliyetin düşük olması sayılabilmektedir. Fakat, bu sistemlerin bölgeye özgünlük açısından pek çok sınırlamaya sahip olduğu belirtilmektedir. Bu sistemlerin ilaç serbestleme mekanizmasının gastrointestinal kanaldaki pH farkına dayanmakta olduğu ama gastrointestinal kanal pH'sının iç ve dış pek çok faktörden (örn: diyet, hastalıklar, yaş, cinsiyet, açlık tokluk durumu, ortamdaki kısa zincirli yağ asitlerinin, safra asitlerinin, karbondioksit ve fermentasyon ürünlerinin bulunması gibi) etkilenmekte olduğu da belirtilmektedir. Dolayısıyla, değişkenlik gösteren gastrointestinal kolon pH'sının bu tarz sistemlerin güvenilirliğini sarsmakta olduğu da ifade edilmektedir [82]. Enterik bir formülasyonun geliştirilmesindeki en önemli basamağın uygun biyoçözünür polimerin seçimi olduğu belirtilirken, genelde bu polimerlerin polisakkarit yapısında oldukları ve suda çözünür oldukları belirtilmektedir [83].

2.4.5. Kolona İlaç Hedeflendirilmesinde ve Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Polimerler

Destek seçiminde matriksin özellikleri, immobilize enzim sisteminin performansının belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır. İdeal destek maddelerinin özellikleri arasında basınca fiziksel direnç, hidrofiliklik, enzimlere karşı inertlik, türetme kolaylığı, biyouyumluluk, mikrobik saldırıya karşı direnç ve düşük maliyetli kullanılabilirlik bulunduğu belirtilirken, yapısı biribiri ile aynı veya birbirinden farklı olan moleküllerin kimyasal bağlar ile ve değişik şekillerde kimyasal bağlarla bağlanması sonucunda zincir yapısı uzun yüksek molekül ağırlıklı bileşikler tarafından oluşan yapıların polimer olarak adlandırıldığı ifade edilmektedir. Enzim İmmobilizasyonunda kullanılan polimerlerin kimyasal olarak sınıflandırılması aşağıdaki tablo 2.5'de gösterilmektedir [84].

Tablo 2.5: Enzim immobilizasyonunda kullanılan polimerlerin sınıflandırılması [84]

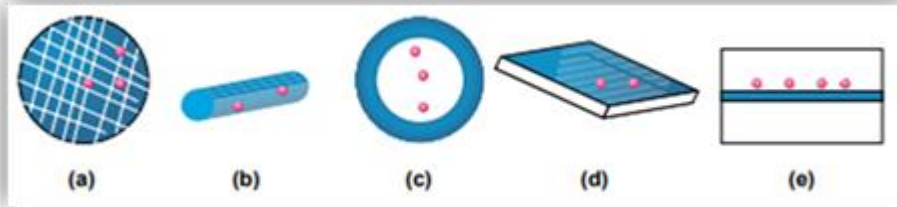
Polimerler	Polimer Grupları	Numuneler
Doğal ve biyolojik olarak parçalanabilenler	Proteinler Polisakkaritler	Albumin, Kolajen, Jelatin, Sığır ve İnsan Serum Albuminleri (BSA ve HSA) Selüloz, dekstran, kitozan, Kondroitin sülfat, aljinat Nişasta, hiyaluronik asit
	Poliamidler	Poli amino asit, polipeptid
Sentetik ve biyolojik olarak parçalanabilenler	Polyesterler Polianhidridler Poliortoesterler Polifosfoesterler	Poli(laktik asit) Poli(glikolik asit) Poli(laktik-ko-glikolik asit)* Poli(kaprolakton) Poli(dioksanon) Poli(hidroksibütirat) Polifosfat, polifosfonat, polifosfit
Sentetik ve biyolojik olarak parçalanamayanlar	Silikon elastomerler Poli(etilen-ko-vinil asetat) Poliakrilatlar	Poli(metil metakrilat)

Bir immobilizasyon sürecinin geliştirilmesi sırasında, ilk tercihin uygun bir katı desteğin seçilmesi olduğu belirtilirken, bu desteğin seçilmesindeki dikkat edilmesi gereken hususların; uygun maliyetli olmaları, desteklerin ve reaktiflerin hem sağlık hem de çevresel açıdan zararsız olmaları, kimyasal ve mikrobik inertliğe sahip olmaları, genellikle istenen bir özellik olmakla birlikte, mekanik özelliklerinin de pratik uygulamalarla uyumlu olması gerektiği belirtilmektedir. Bunların dışında; yüksek yüzey alanı, büyük gözeneklilik ve yeterli parçacık boyutunun bir hareketsizleştirme işlemi için uygun bir matriks seçerken kontrol edilmesi gereken temel gereksinimler arasında olduğu da bilinmektedir. Yaygın olarak kullanılan matriksin agaroz olduğu belirtilirken, bu matriksin proteinler için yüksek kapasiteye yol açan yüksek gözenekliliğe sahip olmasına ilaveten, agarozu matriks olarak kullanmanın diğer avantajları arasında hidrofilik karakter, türetme kolaylığı, yüklü gruplar (substrat ve ürünlerin spesifik olmayan adsorpsiyonunu önler) ve ticari kullanılabilirlik olarak ifade edilmektedir. Bununla birlikte, agaroz ve diğer gözenekli desteklerin kullanımında önemli bir kısıtlamanın yüksek maliyet olduğu belirtilmektedir [58].

Bir immobilizasyon sürecinin geliştirilmesi sırasında ilk tercihin, uygun bir katı desteğin seçilmesi olduğu ve seçilen bu desteklerin ve reaktiflerin hem sağlık hem de çevresel açıdan, bunların yanında kimyasal ve mikrobiyolojik açıdan zararsız olmasının genellikle istenen bir özellik olduğu belirtilmektedir. Yüzey alanının, geniş gözeneklilik ve yeterli partikül boyutunun,

bir immobilizasyon işlemi için matriks seçilirken kontrol edilmesi gereken temel şartlardan olduğu da ifade edilmektedir [59].

Enzim immobilizasyonunda için bir taşıyıcının gerekli olma sebebinin; geometrik parametrelerin ve çözünmez taşıyıcıları kullanmanın birincil hedefinin enzimi çözünmez hale getirmek ve böylece enzimin ayrılmasını ve tekrar kullanılmasını kolaylaştırmak olduğu belirtilmektedir. Taşıyıcı seçiminin, elde edilen hareketsizleştirilmiş katalizörün, katalitik olmayan özellikleri üzerinde kolay kontrol sağladığı belirtilirken, seçilen taşıyıcının, enzimin fonksiyonel kütleline eklenebileceği ve iskele olarak işlev görmekle kalmadığı, aynı zamanda fiziksel ve kimyasal (gözenek boyutu, hidrofilik / hidrofobik denge, akifiliklik ve yüzey kimyası) katalitik özelliklerini de kuvvetle dikte ettiği ifade edilmektedir [65].



Şekil 2.21: Belirli boyut ve şekillerde taşıyıcıya bağlı immobilize enzimler. Çözünmeyen taşıyıcılar, geometrik parametrelerinde farklılık göstermektedirler, farklı şekiller ve enzim taşıyıcı türleri gösterilmektedir: (a) boncuk, (b) lif, (c) kapsül, (d) film ve (e) zar [65].

Enzim immobilizasyonunda kullanılan polimerlere örnek olarak kollajen, selüloz, pektin, nişasta, jelatin, aljinat verilebilir.

2.4.5.1. Kollajen

Kollajenin, çoğunlukla biyoyuymululuk, doğada bulunabilirlik ve hücre bağlama yeteneği nedeniyle immobilizasyon için kullanıldığı bilinirken; bunun sonucunda immobilizasyon için umut verici bir malzeme haline geldiği belirtilmektedir. Kollajen izolasyonu için kaynaklar arasında tendon, deri, kemik ve kıkırdak gibi dokularda bol miktarda bulunduğu ve bu doğal polimerin gözenekli süngerler ve filmlerle işlenerek birleştirilebildiği ifade edilmektedir [63,64].

2.4.5.2.Selüloz

En bol doğal polimer olan selülozun, mantar lakkazı, penisilin G-asilaz, glikoamilaz, a-amilaz, tirozinaz, lipaz ve β -galaktosidazın hareketsizleştirilmesi için yaygın bir şekilde kullanıldığı belirtilmektedir. Dietilaminoetilin (DEAE) modifiye selülozik destekler için daha uzun depolama kapasitesine sahip olduğu ve selüloz kaplı manyetit nanoparçacıkların, α -amilazın selüloz dialdehid ile kaplanmış manyetit nanopartiküllerine eklenmesinin, yeni bir

nişasta parçalayıcı sistemin oluşumuyla nişastanın parçalanması için kullanıldığı ifade edilmiştir [64].

2.4.5.3. Pektin

% 0,2-0,7 gliserol ile birlikte bu yapısal heteropolisakkaritin, destek gevrekliğini azalttığı için plastikleştirici olarak işlev gördüğü ve papaini hareketsiz hale getirmek ve cilt yaralanması tedavisi için yeni malzemelerin geliştirilmesi için kullanıldığı belirtilirken, pektin-kitin ve pektin-kalsiyum aljinat desteğinin, enzim ve pektin kaplı destek arasında yüksek kararlı polielektrolit komplekslerinin oluşması nedeniyle tutulan enzimlerin termal ve denatürant direncini ve katalitik özelliklerini arttırdığı ifade edilmektedir [64].

2.4.5.4. Nişasta

Lineer amilaz ve dallanmış amilopektin ünitelerinden oluşan nişasta enzim immobilizasyonu olarak kullanıldığı ve kalsiyum alginat-nişasta melez destekleri ile, yüzey hareketsizleştirilmesi ve acı kabak peroksidazının tutulması için uygulandığı belirtilirken, tutulan enzimin, iç karbohidrat yarılarına bağlı olarak üre gibi denatüre edicilerde daha kararlı iken, yüzey immobilize enzimin üstün etkinliği olduğu ifade edilmektedir. Akrilamit ve dimetilaminoetil metakrilat gibi maddelerin nişastaya radyasyonla aşılınması, yüksek ürün verimi için yaygın olarak kullanılan endüstriyel teknikler arasında olduğu belirtilmektedir [64].

2.4.5.5. Jelatin

Jelatinin, aminoasitlerde yüksek hidrokolloid bir malzeme olduğu ve ağırlığının on katına kadar su adsorbe edebildiği ifade edilirken, sınırsız raf ömrü, enzim immobilizasyonu için kullanıma uygun hale getirdiğine dikkat çekilmektedir. Jelatinin, krom (III) asetat ile çapraz bağlanmasının krom (III) sülfat ve potasyum krom (III) sülfattan daha iyi olduğu kanıtlanarak poliakrilamid ile karışık taşıyıcı sistemde kullanıldığı ifade edilmektedir [64].

2.4.5.6. Karragen

Doğrusal sülfatlanmış bir polisakkarit olan Karragenin, istikrarı iyileştirmek için lipaz gibi çeşitli enzimleri immobilize etmek için sürekli olarak kullanıldığı belirtilirken, bu destek matriksinin, yapısal olarak psödoplastik olduğu kayma gerilmesi altında inceltmeye yardımcı olarak ve gerilme giderildikten sonra viskozitesini düzelttiği ifade edilmektedir [64].

2.4.5.7. κ -karragen

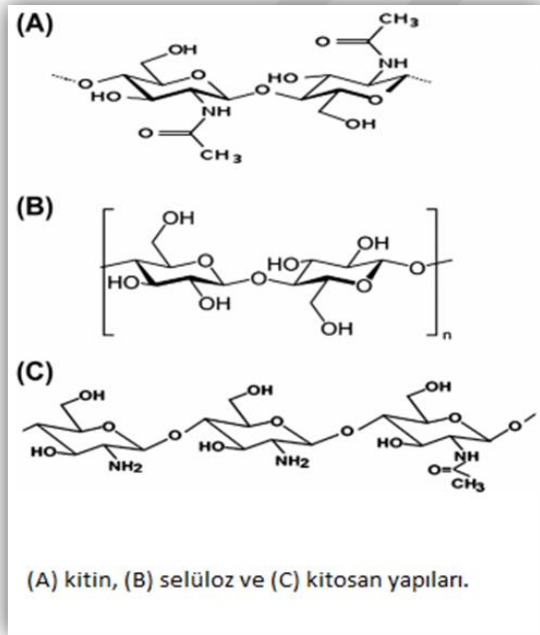
κ -karragenin, hücre immobilizasyonu için alternatif bir destek matriksi olarak kullanılabildiği, çünkü κ -karragenon jellerinin, alginata kıyasla kenetleme maddelerine karşı

daha az duyarlı olduğu bununla birlikte, κ -carrageenan ile oluşan boncukların kırılabilir ve hareketsiz hale getirilmiş malzemenin ortam içinde bozulmasına neden olabileceği belirtilmektedir. κ -karragenonlu boncukların, az miktarda keçi çekirdeği sakızı koyarak güçlendirilebileceği ifade edilmektedir [63,64].

2.4.5.8. Kitozan ve kitin

Kitin ve kitozan gibi doğal polimerler immobilizasyon için destek olarak kullanılmıştır. Enzimlerin protein veya karbonhidrat kısımlarının bunları kitozana bağlamak için kullanıldığı, kitozanın, enzim ve destek arasındaki fiziksel ve iyonik etkileşimler nedeniyle, kitozanla kaplanmış enzimlerin alginata kıyasla daha az sızdırma etkisi yaptığı için alginat ile kombinasyon halinde kullanıldığı ifade edilmektedir. Kitozan ile hazırlanan boncukların, enzimlerin iki katı kadarını hapsedebilme özelliğine sahip olduğu da belirtilmektedir [63,64].

Aşağıdaki şekil 2.22’de, kitin, selüloz ve kitozan yapılarını göstermektedir. Kitozanın, çeşitli derecelerde glukozamin kalıntılarının N-asetillenmesi ile birlikte β -1,4-bağlı glikozaminden oluşan doğrusal bir ikili heteropolisakkarit olarak kabul edildiği belirtilmektedir [87,88].



Şekil 2.22:Kitozanın Kimyasal Yapısı (C) [88]

Kitozanın, kabuklu kabuklarında, mantarlarda, böceklerde ve yumuşakçalarda bol miktarda bulunan kitin deasetilasyonu ile elde edildiği belirtilirken, kitozanın, glutaraldehit ile iyonik veya kimyasal çapraz bağlarla hidrojel oluşturabildiği ve enzimatik olarak hidrolize edilebildiği belirtilmektedir. Kitozanın, ilaç, gıda ve biyoteknolojik uygulamalar için yaygın olarak

kullanıldığı, kitozanın mükemmel biyouyumluluk gösterdiği bu nedenle, birçok biyolojik uygulama için kolayca kullanılabileceği de ifade edilmektedir [64,65].

2.4.5.10. Agar ve agaroz

Agarozun, agardan oluşan bir jel formu olduğu ve saflaştırılmasıyla hazırlandığı ifade edilirken, Agaroz jelinin, birçok proteinin difüzyonel erişimine izin vermek için orantılı boyuttaki beş köşeli gözenekleri içerdiği ifade edilmektedir. Agarda bulunan iki ana bileşenin belirlenebildiği bunların: agaroz ve agaropektin olduğu belirtilirken, agarozun, agarın büyük kısmını oluşturan, nötr bir jelleşen heteropolisakkarit olduğu da ifade edilmektedir. Bunun da, hem α hem de β -glikozidik bağları (dekstran da dahil olmak üzere en yaygın polisakkaritlerin çoğunluğundan farklı olarak) içeren yinelenen birimi olan lineer bir polimer olduğu belirtilmektedir [64].

2.4.5.11. Poliakrilamid ve polianhidritler

Poliakrilamidlerin, farklı boyut ve şekillerde moleküllerin ayrılması için sıklıkla kullanılan sentetik polimerler olduğu belirtilirken, poliakrilamidin, Au^{+3} , Cu^{+2} , Hg^{+2} ve Zn^{+2} gibi metal iyonlarının bağlanması ve seçici olarak geri kazanımı için tüm hücre immobilizasyonu için de kullanılabildiği de belirtilmektedir. Polianhidritlerin, diğer destek malzemeleri ile karşılaştırıldığında yüksek mukavemeti nedeniyle hücre hareketsizliği için kullanıldığı, parçalanmasının yüzey erozyonu ile kontrol edilebildiği ve bunun da bu polimerleri mikro ve makro gözenekli yapıların tasarımı için cazip kıldığı ifade edilmektedir [64].

2.4.6. Kontrollü Salım Sistemi Hazırlanmasında Destek Materyali Olarak Kullanılan İnorganik Maddeler

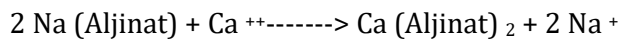
Zeolitlerin veya 'moleküler elekler'in iyi tanımlanmış yapılara ve şekil seçici özelliklere sahip mikro gözenekli kristal halinde katılar olduğu belirtilirken moleküler adsorpsiyonda yaygın olarak kullanıldığı ifade edilmektedir. Kontrollü salım sistemi hazırlanmasında destek materyali olarak kullanılan diğer inorganik maddelerin seramik, selit, silika, cam, aktif karbon, aktif kömür olduğu belirtilirken, selitin, çok gözenekli silikatlı biyoafinite malzemesi olduğu ve lipaz, polifenol oksidazlar ve β -galaktozidazın immobilizasyonu için kullanıldığı çünkü düşük polarite ve geniş yapışma alanı olan ucuz bir destek olmasından kaynaklandığı belirtilmektedir. Ayrıca Selitin yüksek pH'ya veya sıcaklığa, üreye, deterjanlara ve organik çözücülere karşı direnç sağladığı da ifade edilmektedir. Kimyasal inertliği ve birbirine bağlı gözenek yapısı nedeniyle tercih edildiği de belirtilmektedir. Camın ise, oldukça yapışkan bir sıvı olduğu ve α -amilazı immobilize etmek için kullanıldığı belirtilmektedir [64].

2.5. ALJİNİK ASİT

Aljinik asitin, L-guluronik asit ve D-mannuronik asit'in bir hetero polimeri olduğu, değişen miktarlarda 1,4'-bağlı β -D-mannuronik asit ve α -L-guluronik asit kalıntıları içeren, lineer dalsız polisakkaritleralesinin bir üyesi olduğu belirtilirken, genellikle ilaç formülasyonlarında sodyum tuzu (aljinat) olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Aljinatların çoğunlukla deniz yosunundan ekstrakte edilerek elde edildiği ve işledikten sonra suda çözünür sodyum tuzları halinde bulundukları belirtilmektedir. Kahverengi alglerin hücre duvarlarından türetilen aljinatın, aljinik asitin kalsiyum, magnezyum ve sodyum tuzları olduğu ve aljinatın iki değerli iyonlarla (Ca^{+2} gibi) ve glutaraldehitte çapraz bağlanması sonucunda enzimlerin stabilitesini arttırdığı bilinmektedir [64].

Alginatın, tipik olarak kahverengi deniz yosunundan elde edilen doğal olarak oluşan bir anyonik polimer olduğu bilinmekle birlikte; buna ek olarak Ca^{2+} gibi iki değerlikli katyonların eklenmesiyle biyo-uyumluluk, düşük toksisite, nispeten düşük maliyet ve hafif jelasyon nedeniyle birçok biyomedikal uygulama için kapsamlı bir kullanıldığı bilinmektedir [85].

Aljinatın; immobilizasyon ve mikrokapsülasyon teknolojileri için bugüne kadar en çok kullanılan polimer olduğu belirtilmektedir [86]. Aljinat polimerinin kendisi anyonik olduğu belirtilirken, (yani negatif yüklüdür) polivalan katyonların iki komşusu guluronik asit tortusu olduğunda, polimere bağlanabildiği ifade edilmektedir. Böylece, polivalan katyonların hem farklı polimer moleküllerinin hem de aynı polimer zincirinin farklı bölümlerinin çapraz bağlanmasından sorumlu olduğu belirtilmektedir. Jelleşme sürecinin, basitçe sodyum iyonları için kalsiyum iyonlarının değişimi ile nispeten yumuşak koşullar altında gerçekleştirildiği ifade edilmektedir [89].



Aljinatın iyonik olarak bağlı jel yapısının 0-100°C aralığında ısıya dayanıklı olduğu; bu nedenle ısıtma jelini sıvılaştırmadığı belirtilirken, gıda, ilaç, tekstil ve kağıt ürünlerinde yaygın olarak kullanılmakta olduğu belirtilmektedir. Bu ürünlerde kullanılan aljinatın özelliklerinin sırasıyla koyulaştırıcı, stabilize edici, jel oluşturucu ve film oluşturucu olduğu, tek bir monomer türünün (-M-M-M-) (-G-G-G-) homopolimer bloklarının bölümleri olabildiği veya alternatif monomerlerin kısımlarının(-M-G-M-G-M-)olabileceği ifade edilmektedir.Mannuronik ve guluronik asitlerin molekül ağırlığının ve göreceli kompozisyonun temelinde her uygulama için farklı aljinat türlerinin seçildiği belirtilirken, örneğin, koyulaştırma işlevinin (viskozite özelliği) esas olarak polimerin molekül ağırlığına bağlı olduğu; oysa jelleşmenin (katyona olan afinite),

guluronik asit içeriği ile yakından ilişkili olduğu belirtilmektedir. Böylece, yüksek guluronik asit içeriğinin daha kuvvetli bir jel oluşturduğu bilinmektedir[90].

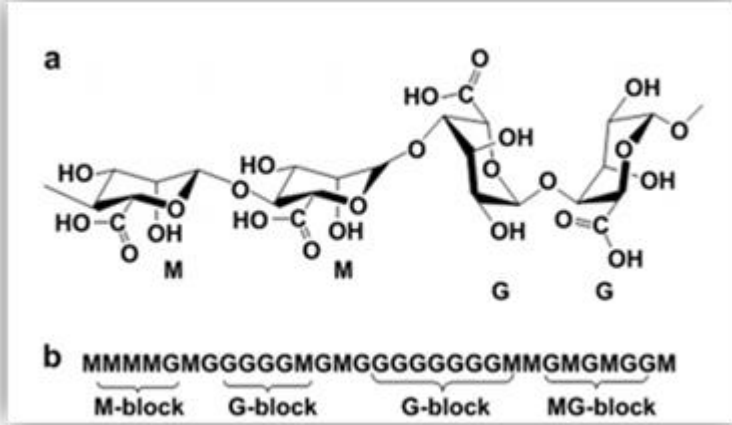
Aljinatın hem biyopolimer hem de biyo-uyumlu, toksik ve immünojenik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen olduğu düşünülen bir polielektrolitten oluştuğu belirtilirken, değişken oranlarda GG, MG ve MM bloklarının düzensiz bir blok şeklinde düzenlenmiş mannuronik asit (M bloğu) ve guluronik asit (G blok) birimlerinden oluşan bir anyonik kopolimer olarak karakterize edilebildiği belirtilmektedir. Mannuronik asit formları (1 → 4) bağlantılarının, M blok bölümleri ile lineer ve esnek konformasyon gösterdiği; guluronik asitin, farklı olarak, karboksil grupları etrafında sterik bir engellemeye hizmet eden (1 → 4) bağlantılara yol açtığı ifade edilmektedir. Bu nedenle, G blok bölümlerinin, moleküler zincirlerin belirgin bir sertliğinden sorumlu olan katlanmış ve sert yapısal konformasyonlar sağladığı belirtilmektedir [91]. Aljinat polimerlerinin, 1,4-bağlı β-D-mannuronik asit (M) ve α-L-guluronik asit (G) kalıntılarının bloklarından oluşan anyonik polisakkaritler olduğu belirtilmektedir [92].

2.5.1. Yapısı ve Özellikleri

Aljinat; ilk olarak 1881 yılında İngiliz kimyager E.E.C. STANFORD tarafından tanımlanmıştır. Daha öncede belirtildiği gibi, doğada genel olarak kahverengi deniz alglerinde bulunmakla beraber, Azotobacter vinelandii gibi toprak bakterilerinde ve bazı Pseudomonas türlerinde de aljinata benzeyen hücre dışı polimerik yapılar belirlenmiştir. Aljinat; kahverengi deniz algisinin kuru maddesinin % 40'ını oluşturmaktadır. Hücre içi matrikste sodyum, kalsiyum magnezyum, stronsiyum ve baryum iyonları içeren jel halinde bulunur [93].

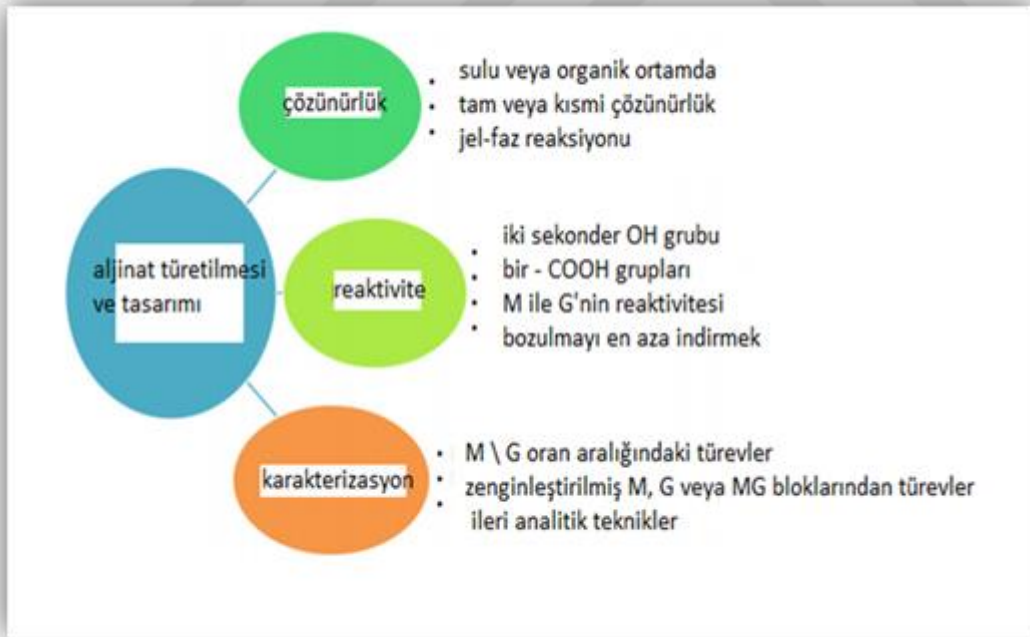
2.5.2. İyonik çapraz bağlama

Aljinatın, hidrojel oluşturmak üzere iki değerlikli katyonlarla kenetlendiği ifade edilmektedir. Aşağıdaki şekil 2.23'de aljinatın zincir konformasyonu ve blok dağılımı görülmektedir. Jel oluşumunun, iki değerlikli katyonların mevcudiyetinde sıkı biçimde kavşaklar oluşturmak üzere ilişkilendirilen, G-blokları arasındaki etkileşimler tarafından yönlendirildiği belirtilmektedir. G-bloklarına ek olarak MG bloklarının da katılmakta ve zayıf kavşaklar oluşturmakta olduğu ifade edilmektedir. Böylece, yüksek G içeriğine sahip aljinatların daha güçlü jeller üretebildikleri belirtilmektedir. Aljinatların iki değerli iyonlara olan eğilimi aşağıdaki sırayla azaldığı ve bu sıra Pb> Cu> Cd> Ba> Sr> Ca> Co, Ni, Zn> Mn olarak ifade edilmektedir. Bununla birlikte, Ca²⁺, alginat jel oluşumunu indüklemek için en yaygın olarak kullanılan katyon olduğu da belirtilmektedir [90].



Şekil 2.23: Aljinatın yapısı: (a) zincir konformasyonu ve (b) blok dağılımı [90]

Aljinatların kalsiyum çapraz bağlanması iki yöntemle gerçekleştirilebildiği belirtilirken, ilkinin, çapraz bağlayıcı iyonların aljinat çözeltisine dış bir rezervuardan dağıldığı bir "difüzyon" yöntemi olduğu, ikincisinin ise, iyon kaynağı alginat çözeltisi içinde bulunan ve kontrollü bir tetik (tipik olarak iyon kaynağının pH'si veya çözünürlüğü), çapraz bağlayıcı iyonların çözeltiye salınmasını sağladığı belirtilmektedir [90].



Şekil 2.24: Değişik formlarda aljinat eldesine ait önemli parametreler [90]

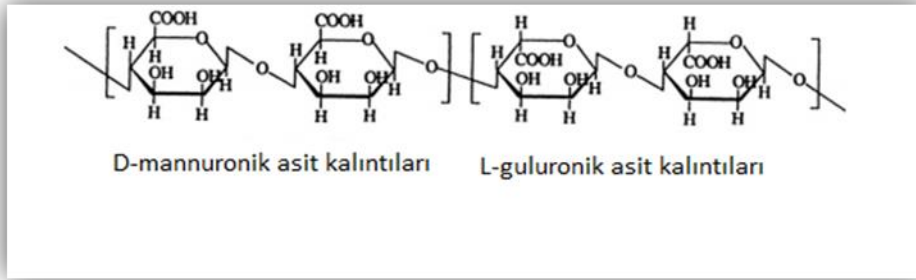
2.5.3. Moleküler ağırlık ve çözünürlük

Piyasada bulunan sodyum alginatların moleküler ağırlıkları 32,000 ila 400,000 g/mol aralığında olduğu, aljinat çözeltilerinin viskozitesinde pH düştükçe arttığı ve aljinatin omurgasındaki karboksilat gruplarının protonlanmış hale geldiği ve hidrojen bağları oluşturduğu için pH'nın 3-3.5 civarında maksimuma ulaştığı ve aljinatin moleküler ağırlığının artırılması sonuçtaki jellerin fiziksel özelliklerini iyileştirebileceği ifade edilmektedir [85].

2.5.4. Jelleştirme yöntemleri

Aljinatin, tıpta, yara iyileşmesi, ilaç verme ve doku mühendisliği uygulamaları da dahil olmak üzere tipik olarak bir hidrojel formunda kullanıldığı bilinirken, hidrojeller, su içeriği yüksek olan hidrofilik polimerlerden oluşan üç boyutlu olarak çapraz bağlı ağlar olarak bilinmektedir. Yapısal olarak vücuttaki makromolekülerin esaslı bileşenlere benzer oldukları için hidrojeller genellikle biyolojik olarak uyumlu ve genellikle minimal invaziv uygulama yoluyla vücuda verilebildiği ifade edilmektedir [85].

Aljinatin, mannuronik asit (M bloğu) ve guluronik asit (G blok) birimlerinden oluşan anyonik bir kopolimer olarak, değişken oranlardaki GG, MG ve MM bloklarının düzenli olmayan blokajlı bir düzeninde düzenlenebildiği belirtilirken, mannuronik asit formlarının (1→4), böylece M blok segmentlerinin doğrusal ve esnek konformasyon gösterdiği; guluronik asitin, farklı olarak, karboksil grupları çevresinde sterik bir engel oluşturmaya yarayan (1 → 4) bağlantılara neden olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle G blok parçalarının, moleküler zincirlerin belirgin bir sertlikten sorumlu katlanmış ve katı yapısal konformasyonlar sağladığı, aljinatin mikroyapısal özellikleri, hücre immünizasyonu, doku mühendisliği, ilaç verme, kontrollü salınım, mikroorganizmaların immobilizasyonu gibi gıda uygulamalarında olduğu gibi birçok alanda istenen biyomalzeme tipinde yaygın olarak kullanılan biyouyumlu ikili kopolimerler olduğu ifade edilmektedir. Şekil 2.25'de β-D-mannuronik asit ile α-L-glukronik asit kalıntılarını gösteren aljinatin yapısı gösterilmektedir. Aljinat, aljinat zincirlerinin fonksiyonel grupları arasında çapraz bağlayıcı olarak işlev gören kalsiyum (Ca²⁺) gibi iki değerlikli katyonların varlığında bir hidrojel oluşturduğu bilinmektedir. Divalan katyonlar tarafından indüklenen hidrojellerin yanı sıra, alginatin üronik asit kalıntılarının pKa değerinin altındaki pH'da asit jel oluşturabildiği de ifade edilmektedir [93,94].



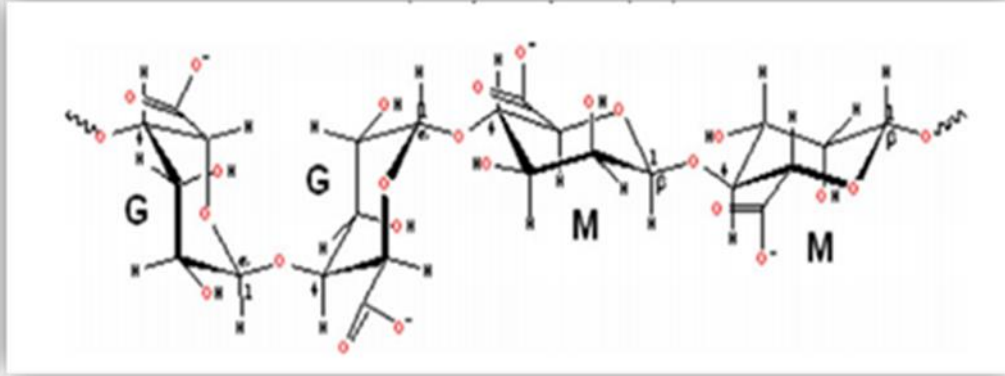
Şekil 2.25: β -D-mannuronik asit ile α -L-glukronik asit kalıntılarını gösteren aljinatın yapısı [94]

Aljinat taneciklerinin, istenen proteini ihtiva eden bir sodyum aljinat çözeltisini, damlacıklar halinde, Ca, Sr veya Ba gibi iki değerli bir çapraz bağlama çözeltisine ekleyerek hazırlanabildiği belirtilmektedir. Monovalent katyonların ve Mg iyonları jelasyona neden olmadığı, Ba ve Sr iyonlarının Ca'dan daha güçlü aljinat jelleri ürettiği ifade edilmektedir. Pb, Cu, Cd, Co, Ni, Zn ve Mn gibi diğer iki değerlikli katyonların ayrıca aljinat jellerini de çaprazladığı, ancak bunların toksisiteyi nedeniyle kullanımı sınırlı olduğu belirtilmektedir. Polimerlerin jelasyonu ve çapraz bağlanmasının, esas olarak, iki değerlikli katyonlarla guluronik asitlerden sodyum iyonlarının değişimi ve bu guluronik grupların Şekil 2.27'de gösterilen karakteristik yumurta kutusu yapısını oluşturmak üzere istiflenmesi ile elde edildiği ifade edilmektedir. Her bir aljinat zincirinin, birçok başka zincir ile birleşme meydana getirmek üzere dimerize olabildiği ve sonuç olarak, çözünmeyen çökeltilerden ziyade jel ağları oluştuğu belirtilmektedir [94].

Aljinat polimerlerin, 1,4-bağlı β -D-mannuronik asit (M) ve α -L-guluronik asit (G) artıklarından oluşan anyonik polisakkaritler olduğu ve blokların homopolimerik (MM ve GG) olabildiği veya alternatif MG dizisinden oluşabildiği belirtilmektedir. Aljinatların Ca^{+2} , Al^{+3} gibi çok-değerli katyonlarla etkileşime girebildiği ve alginatların çapraz bağlanma kabiliyetinin polimerin bileşimi ile kuvvetli şekilde ilişkili olduğu belirtilmektedir. Sodyum aljinatın, iyi bilinen bir iyon aktive jelleştirme ajanı olduğu, kontrollü ilaç dağıtım sistemleri için birçok oküler jel-jel geçiş sisteminde kullanıldığı da ifade edilmektedir [92,94,95].

Alginatların, kahverengi deniz yosundan (Phaeophyceae) izole edilen doğal polisakkarit polimeri olduğu, deniz yosununun, mevcut aljinik asidi çözündüren seyreltik bir alkali çözeltisiyle ekstre edildiği ve elde edilen kalın ve viskoz kütlenin mineral asitlerle muamele edilmesinde serbest aljinik asit elde edildiği ifade edilmektedir. Aljinik asidin daha sonra şu anda kullanılan ana formu olan sodyum aljinatın bir tuzuna dönüştürülebildiği belirtilmektedir. Aljinik asitin, bloklardaki polimer zincirinde düzenlenmiş olan D-mannuronik asit ve L-guluronik asit kalıntılarının oluşturduğu doğrusal bir polimer olduğu ve bu homojen blokların (tek başına asit

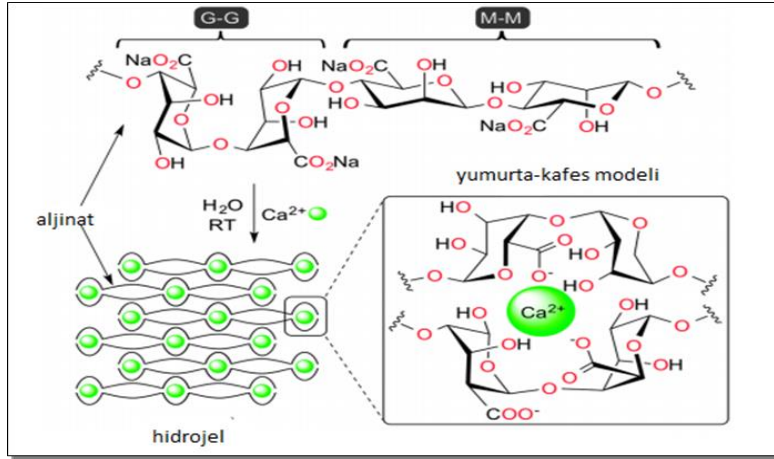
kalıntısından oluşur) rastgele veya değişken mannuronik ve guluronik asit birimlerinden oluşan bloklarla ayrıldığı ifade edilmektedir [96].



Şekil 2.26: İki aljinat monomer, guluronat (G) ve manuronat (M) kimyasal yapısı ve konformasyon [97]

İki aljinat monomer, guluronat (G) ve manuronat (M) kimyasal yapısı ve konformasyon yapısı Şekil 2.26'da görülmektedir. Sodyum aljinatın, aljinik asitin suda çözünür bir tuzu olduğu; doğal olarak oluşan toksik olmayan bir polisakkarit, tüm kahverengi alg türlerinde bulunduğu, gıda ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmakta olduğu ancak son zamanlarda uyuşturucular, makromoleküller ve biyolojik hücrelerin tuzaklanması için bir matriks olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Magnezyum haricindeki birçok divalent katyon ile etkileşerek hidrofilik jel oluşturabildiği, jelleşmenin, üronik asit ünitelerinin iki değerlikli katyonlarla çapraz bağlanmasıyla oluştuğu ifade edilmektedir [97].

Sodyum aljinatın; Ca^{+2} , Ba^{+2} , Sr^{+2} gibi çift değerlikli katyonlar ile uygun koşullar altında hidrojel oluşturma yeteneğine sahip olduğu, sodyum aljinatın yapı birimi olan gluronik asit bloklarının katyonlar ile bir bağ oluşturmakta bunun sonucunda da iyonik etkileşimler ile birbirini tutan aljinat filamentleri ağı oluşturduğu belirtilmektedir. Aljinatların su içindeki çözünürlüklerinin solventin pH'sı, ortamın iyonik gücü ve solvent içindeki jelleştirici iyonlarının varlığına bağlı olduğu ifade edilmektedir. Aljinik asit ve kalsiyum aljinatın suda çözünmezken, çözünür hale geçmeleri için protonlanmış karboksilik asit grupları ve pH'nin belirli kritik değerlerin üzerinde tutulması gerekli olduğu belirtilirken, amonyum aljinat, potasyum aljinat ve sodyum aljinat suda çözünmekte olduğu belirtilmektedir. Ortamın değişen iyonik gücünün, polimer konformasyonu, zincir uzaması, viskozite ve bu nedenle de çözeltinin çözünürlüğünü etkilemekte olduğu ifade edilmektedir. Ca^{+2} , Sr^{+2} ve Ba^{+2} gibi iki değerlikli katyonların varlığında jelleşebilen aljinatların çözünebilmesi için çapraz bağlama iyonlarının sulu serbest solvent olması gerektiği de belirtilmektedir[98].



Şekil 2.27: Yumurta-kafes kutusu modeli [98]

Aljinatların kalsiyum ve baryum iyonları gibi iki değerlikli katyonların varlığında iyonotropik çapraz bağlama yoluyla hidrojelleştirme yeteneğine sahip olduğu, jelleşme kapasitesini düzenleyen bu mekanizmanın zincir boyunca mevcut G bloklarının miktarı ile doğrudan ilişkili olduğu belirtilmektedir. Çünkü yalnızca gluronik asidin bu hidrojelin oluşumunda aktif rol oynamakta olduğu belirtilmektedir. Bir başka deyişle bir aljinat solüsyonunun Ca^{2+} ve Ba^{2+} gibi iki değerlikli katyonların varlığında hidrojelleştirme yapıya dönüşebilmekte, bu hidrojelleştirme yapının, gluronik asit kalıntıları ve iki değerlikli katyonların moleküller arası çapraz bağlanması sonucu, kalsiyum iyonlarının etkisi altında iyonik etkileşimler yardımıyla birbirine tutunan üç boyutlu aljinat filamentleri oluşturularak “-yumurta-kafes” adı verilen jel yapıya dönüştüğü ifade edilmektedir. Şekil 2.27’de “yumurta-kafes modeli” modelinin oluşumu gösterilmiştir. Bu reaksiyonun çok hızlı bir şekilde gerçekleştiği ve bu jelin stabilitesinin solüsyona eklenen iyonların miktarına ve stabil birleşmelerin oluşumundaki G bloklarının uzunluğuna bağlı olduğu belirtilmektedir [98].

2.6. Çalışmanın Amacı

Tripsin, kimotripsin ve pankreatin kistik fibroz hastalığının tedavisinde kullanılan sindirim enzimleridir. Proteinik yapıda olan enzimlerin oral uygulamasını takiben gastrointestinal sistemde degrade olmasını engellemek kolona hedeflemekle mümkün olabilir. Aljinat boncukları, kolona ilaç hedeflemede kullanılan önemli ilaç taşıyıcı sistemlerdendir. Literatürde kalsiyum klorür çapraz bağlama materyali kullanılarak hazırlanmış tripsin içeren aljinat boncuklara ait çalışmalar mevcut olsa da baryum klorür ile hazırlanmış tripsin içeren ilaç formülasyonlarına ait çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında, farklı bir çapraz bağlayıcı ile kistik fibroz tedavisinde kullanmak üzere tripsin içeren boncuklar hazırlanıp optimize edilmiştir. Böylece, hasta uyuncu yüksek, yan etkileri azaltılmış ve daha stabil ilaç formülasyonunun hazırlanması mümkün olacaktır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan Maddenin Adı:	Firma Markası\ Ülke
Sodyum Aljinat	Sigma\ St. Louis/ABD
Baryum Klorür	Merck\ Almanya
Porcine Trypsin	Merck\ Almanya
Sodyum Klorür	Merck\ Almanya
Susuz dibazik sodyum fosfat	Merck\ Almanya
Sitrik Asit Monohidrat	Merck\ Almanya
Hidroklorik asit	Merck\ Almanya
Sodyum hidroksit	Merck\ Almanya
Mono bazik potasyum fosfat	Merck\ Almanya
Tripsin ölçüm kiti (BCA kiti)	Sigma\ St. Louis/ABD

3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Kullanılan Araçlar:	Firma Markası\ Ülke
Analitik terazi	O'Haus Advanturer\ Almanya
Buzdolabı	Regal Nofrost\ Türkiye
Çalkalayıcı Isıtmalı su banyosu	Memmert\ Almanya
Disolüsyon cihazı	DT GE, Aymes\ Türkiye
Distile su cihazı	Milipore\ ABD
DSC cihazı	Shimadzu DT-40 Thermal Analyser\ Japonya
Elek seti (vibrasyonlu)	Fritsch Analysette\ Almanya
Erime derecesi tayin cihazı	Thomas Hoover Capillary Melting Point Apparatus\ İngiltere
Etüv	Binder\ Almanya
FT-IR Spektrofotometre	Perkin Elmer 1720 X\ ABD
Manyetik karıştırıcı	Velp Scientifica\ Almanya
Otomatik mikropipetler	Eppendorf\ Almanya
pHmetre	Mettler Toledo\ ABD
Polarizan mikroskop	Nikon\ Japonya
UV-Visible spektrofotometre	Shimadzu\ Japonya
Vorteks	MVS-1 Multimixer\ Almanya

3.1.3. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Tampon çözeltilerin hazırlanışı: pH 1.2 hazırlanırken, 2 g sodyum klorür bir miktar distile suda çözündürülerek, üzerine 7 ml hidroklorik asit ilave edilip 1litre distile suya tamamlanır. pH 6.8 hazırlanırken, 1 litre suda, 21,72 g susuz di-bazik sodyum fosfat ve 4.94 g sitrik asit monohidrat distile suda çözündürülür. pH 7.4 fizyolojik fosfat tamponu hazırlanırken ise; 900 ml distile suda 1.6 g sodyum hidroksit ve 6.8 g monobazik potasyum fosfat çözündürülerek, 1 N NaOH ile 1litreye tamamlanarak pH 7.5'e ayarlanır [99].

3.1.4. Kullanılan İstatistik Yöntemler

Tez çalışması kapsamında, farklı boncuk serileri arasındaki etkin madde tutma kapasitesi açısından farklılığın anlamlı olup olmadığının belirlenmesi amacıyla Student t-testi kullanıldı. “p” değerinin 0.05’den küçük olması aradaki farkın anlamlı olması şeklinde tanımlandı.

3.1.5. Kullanılan Bilgisayar Programları

Tez metninin yazılması, grafiklerin çizimi, çizelgelerin oluşturulması ve istatistik hesaplarının yapılmasında aşağıda belirtilen bilgisayar programları kullanıldı. a. Microsoft Word 2000 (Microsoft Corp., ABD) b. Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corp., ABD) c. SigmaStat 1.0 İstatistik programı (Jandel Corp., ABD)

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Ön Formülasyon çalışmaları

İlaç etkin maddesi tripsin ve yardımcı maddeler (Na-aljinat, BaCl_2) FTIR, erime derecesi, termal analiz (DSC) ile karakterize edilip geçimlilik çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca, tripsinin çözünürlük ve miktar tayini (UV-visible spektrofotometrik) çalışmaları yapılmıştır.

3.2.1.1. FT-IR Analizi

Polimer filmler, fiberler, su, proteinler, düşük molekül kütleli hidrokarbonlar, tarım, gıda ve petrol ürünleri gibi birçok maddenin analizinde; kimya, eczacılık, biyoloji, gıda, jeoloji ve çevre gibi birçok alanda yapılan çalışmalarda kullanılan bir cihazdır. Dozaj şeklinin hazırlanmasında kullanılan polimerlerle ilaç etkin maddesinin etkileşip etkileşmediğinin belirlenmesi, polimerin formülasyon için uygunluğunun tespit edilmesi açısından bu analiz önemlidir. İlaç etkin maddesi olan tripsin, ilaç taşıyıcı sistem hazırlanmasında kullanılan baryum klorür, sodyum aljinat ile hazırlanan boş ve ilaç yüklü boncukların ayrı ayrı FT-IR spektrumları elde edilmiştir. Bunun için maddeler ve boncuklar agat havanda ezilip toz edilmiştir. Perkin Elmer cihazı ile FT-IR analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.2. DSC Analizi

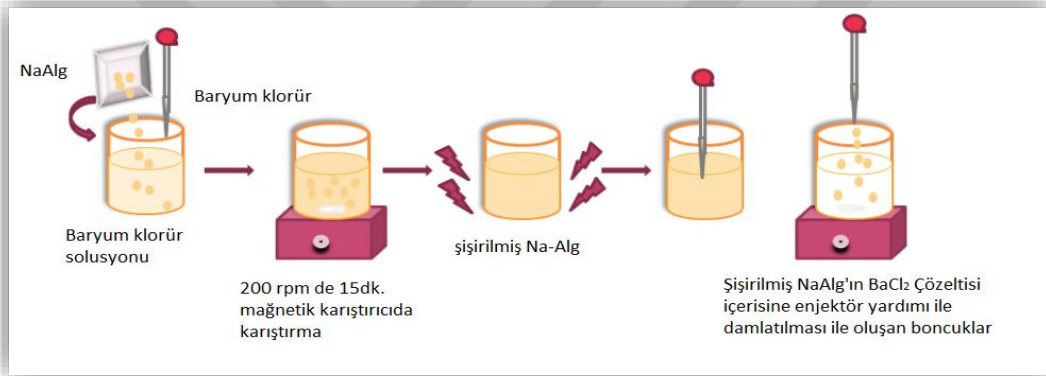
Boncukların DSC analizlerinin sonuçları, Shimadzu (Japan) marka diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılarak elde edilmiştir. Örneklerin DSC termogramları 30 °C’ den 300 °C ‘ye 10 °C/dak. ısıtma hızında alınmıştır.

3.2.1.3. Fe-SEM Analizi

Boncukların elektron mikroyrafları, vakum altında altın ile kaplandıktan sonra Zeiss / Supra 55 (Almanya) model taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edilmiştir.

3.2.2. Tripsin yüklü sodyum-aljinat boncuklarının hazırlanması

Tripsin yüklü matriks tipi taşıyıcı sistemlerde sodyum-aljinat boncukları hazırlanırken faktöriyel dizayn yöntemi ile kullanılarak farklı ilaç:polimer oranlarında, farklı bağlayıcı konsantrasyonlarında farklı çapraz bağlama süreleri uygulanarak “sıvıda olgunlaştırma yöntemi” ile boncuklar hazırlanmıştır. Sodyum aljinat çözeltileri uygun oranlarda hazırlanıp 12 saat şişmeye bırakılmıştır. Şişen karışıma belirlenen miktarda tripsin tartılıp, eklendikten sonra homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Bu süspansiyon, peristaltik bir pompa yardımıyla bir enjektörden sabit hızla 5 cm yükseklikten sürekli karışmakta olan Baryum klorür çözeltisine damlatılmıştır. Belirlenen süre boyunca boncuklar $BaCl_2$ içinde olgunlaştırılmıştır. İyonik jelasyon sonucu ortamda oluşan boncuklar filtrasyonla çapraz bağlama çözeltisinden ayrılmıştır. İki kez distile su ile yıkanıp ve $37^{\circ}C$ ’ de 24 saat kurutulmuştur. Steril flakonlara aktarılıp fizikokimyasal karakterizasyon için saklanmıştır. Her ölçüm için en az 3 seri hazırlanmıştır ($n=3$).



Şekil 3.1 Boncuk üretim işleminin akış şeması [67]

Tripsin yüklü boncuklar, 1:1 ve 1:3 olarak farklı ilaç: polimer oranlarında, 0.1 M, 0.5 M ve 1 M olarak farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında farklı çapraz bağlama süreleri uygulanarak “sıvıda olgunlaştırma yöntemi” ile hazırlanmıştır. Aşağıda yer alan tabloda tripsin yüklü boncukların hazırlanmasında uygulanacak değişkenler görülmektedir.

Tablo 3.1. Tripsin yüklü boncukların hazırlanmasında uygulanan değişkenler

Formülasyon Kodu:	Polimer	Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonu (M)	Çapraz Bağlama Süresi (dk.)	İlaç:polimer oranı
FTB 01	Na-Aljinat	0,1 M BaCl ₂	5 dk.	1/1
FTB 02	Na-Aljinat	0,1 M BaCl ₂	5 dk.	1/3
FTB 03	Na-Aljinat	0,1 M BaCl ₂	15 dk.	1/1
FTB 04	Na-Aljinat	0,1 M BaCl ₂	15 dk.	1/3
FTB 05	Na-Aljinat	0,5 M BaCl ₂	5 dk.	1/1
FTB 06	Na-Aljinat	0,5 M BaCl ₂	5 dk.	1/3
FTB 07	Na-Aljinat	0,5 M BaCl ₂	15 dk.	1/1
FTB 08	Na-Aljinat	0,5 M BaCl ₂	15 dk.	1/3
FTB 09	Na-Aljinat	1 M BaCl ₂	5 dk.	1/1
FTB 10	Na-Aljinat	1 M BaCl ₂	5 dk.	1/3
FTB 11	Na-Aljinat	1 M BaCl ₂	15 dk.	1/1
FTB 12	Na-Aljinat	1 M BaCl ₂	15 dk.	1/3

Yukarıda belirtilen oranlarda hazırlanan sulu polimer çözeltilerine farklı ilaç:polimer (1:1 ve 1:3) oranlarında tripsin ilave edilip dispersiyon hazırlanarak, elde edilen polimer:ilaç karışımı, peristaltik bir pompa yardımıyla bir enjektörden sabit hızla 5 cm yükseklikten sürekli karışmakta olan baryum klorür çözeltisine damlatılmıştır. İyonik jelasyon sonucu ortamda oluşan boncuklar filtrasyonla çapraz bağlama çözeltisinden ayrılmıştır. Her bir üretim 3 seri halinde üretilerek, oda sıcaklığında (24°C), 48 saat boyunca yağlı kağıtların üzerine alınarak kurutulduktan sonra, formülasyon numaraları bulunan steril flakonlara aseptik ortamda laminar akım kabini içinde aktarılıp fizikokimyasal karakterizasyon için saklanmıştır.

3.2.3. Mikroskopik Analiz

Hazırlanan boş ve ilaç yüklü boncuklar, polarize ışık mikroskobu (Nikon Binoküler) altında ve Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim ve Araştırma Merkezinde bulunan SEM (Taramalı Elektron Mikroskopi) cihazında da partikül boyutu ve şekli açısından incelenip fotoğraflanmıştır.

3.2.4. Boş Boncukların denge su içerikleri tayini

Boş boncukların, şişme yeteneklerini belirlemek amacıyla, 50 mg'lık örnekler ayrı ayrı 50 ml'lik distile su, pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4 tampon çözeltileri içerisinde 24 saat süreyle bekletilerek, bu sürenin sonunda, şişmiş boncukların üzerindeki yüzey suyu uzaklaştırılarak tartılmıştır.

Denge su içeriği değerleri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Denge su içeriği} = [(W_s - W_k) / W_k] \times 100$$

W_s : şişmiş boncukların kütlesi;

W_k : Kuru boncukların kütlesini ifade etmektedir. Deney, en az 3 seri halinde gerçekleştirilecektir [101].

3.2.5. İlaç Yükleme Kapasitesi

Teorik olarak yüklenmesi gereken ilaç etkin maddesinin gerçekte ne kadar yüklendiğinin belirlenmesi amacıyla hesaplandı. 50 mg tripsin yüklü boncuk agat havanda ezilip üzerine pH 7.4 fosfat tamponu ilave edildi. 1 saat süreyle ve oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 500 rpm’de karıştırıldı. Elde edilen ekstre süzülerek ilaç içeriği spektrofotometrik olarak tayin edildi. İlaç yükleme kapasitesi; aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\text{İlaç Yükleme Kapasitesi} = [D/T] \times 100$$

D: Boncukların içinde bulunan ilaç miktarı;

T: Teorik olarak hesaplanan boncukların içinde tutulması gereken ilaç etkin maddesi miktarı (mg) [102,103].

3.2.6. Şişme Hızının Saptanması

50 mg tripsin yüklü boncuk distile suda süspanse edilip, 3 saat oda sıcaklığında inkübe edilerek, sonrasında, boncuklar süzülüp, ayrılıp, çapları kumpas (mikrometre) ile ölçülmüştür. Şişme öncesi ve sonrası çapları karşılaştırılmıştır [100].

3.2.7. Aşınma Tayini

Şişme medodu kullanılarak gerçekleştirilen aşınma tayininde, 50 mg boncuk tartılıp, 5 ml fosfat tamponu ile erlen mayerde çalkalayıcı su banyosunda $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 'da 24 saat sürekli çalkalanarak tutulmuş, daha sonra, gravimetrik olarak ağırlık kaybı tespit edilmiştir [104].

3.2.8. Partikül Boyutu Saptama

Boş ve ilaç yüklü boncuklar, tartıldıktan sonra farklı mesh boyutlarına sahip (20 μm -1mm) eleklerin yer aldığı elek sarsma cihazına konup 5 dakika süresince mekanik olarak elenerek her bir elek üzerinde kalan boncukların miktarı belirlenmiştir. Boncukların partikül boyutu dağılımı tespit edilmiştir. Boncukların boyutu ayrıca, mikroskopik olarak polarize ışık mikroskobu ve gratikül kullanılarak da belirlenip her bir seri için ortalama partikül boyutu hesaplanmıştır [105].

3.2.9. İn Vitro Dezentegrasyon Çalışmaları

Tripsin yüklü boncuklar, PharmaTest dezentegrasyon cihazı kullanılarak farklı pH'lara sahip çözeltilerde (pH 1.2, 6.8 ve 7.4), $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ sıcaklıkta, 100 rpm'de sürekli karıştırılarak dezentegrasyon (dağılma) süresi tayin edilmiştir. Boncuklar sert kapsül içerisine yerleştirilerek çalışmalar gerçekleştirilmiştir [106].

3.2.10. İn vitro Salım Çalışmalar

Boncuklardan etkin madde salımı, şişe metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 100 mg ilaç yüklü boncuk, 100 ml hacimli tampon çözeltisine ilave edilerek şişede çalkalanmalı su banyosuna yerleştirilmiş ve salım çalışmaları; $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 'da ve 100 rpm karıştırma hızında 2'şer saat süreyle sırasıyla pH 1.2, 6.8 ve 7.4'de gerçekleştirilmiştir. İki saatlik süre sonunda süzülen boncuklar diğer tampon çözeltiye konularak vücutta mideden kolonun değişik kısımlarına geçiş ve bu bölgedeki salım incelenmiştir. Önceden belirlenmiş zaman aralıklarında (5., 15., 30., 45., 60., 90., ve 120. dakika) 5 ml numune alınıp daha sonra, sink koşulları sağlanarak, alınan 5 ml numuneden salınan tripsin miktarı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir [68,69].

İlaç yükleme kapasitesi, şişme ve aşınma değerleri ile ilaç salım profilleri göz önünde bulundurularak en iyi formülasyonlar seçilip sert kapsülde doze edilmişlerdir. Hazırlanan kapsüllerden etkin madde salımı ise, [107] USP XXII'de verilen pedal yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.11. İstatistiksel Analizler

Serilerin partikül boyutu, ilaç yükleme kapasiteleri, şişme ve aşınma değerleri aralarındaki farkların anlamlı olup olmadığı, Student t-testi koşulları belirlenmiştir.

3.2.12. Enzim Stabilitesi

Hazırlanan tripsin yüklü boncuklardan hassas olarak tartılan ve 120 mAU/ml enzim aktivitesine sahip olan boncuklar, $4^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ ile $30^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 'lik stabilite kabinlerinde 15 gün süresince ön-stabilite çalışmasına tabi tutulmuştur. Süre sonunda, tripsin enzim tayin kiti kullanılarak kolorimetrik yöntemle enzim aktivite tayini yapılarak stabil kaldığı süreler belirlenmiştir [108].

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Tripsin, kistik fibroz tedavisinde kullanılan bir enzimdir. Proteinik yapıya sahip olması nedeniyle oral yolla uygulandığında gastrointestinal sistemde degrade olarak biyoyararlanımı büyük ölçüde düşmektedir. Terapötik hedefe ulaşılmasını zorlaştıran bu olumsuz etkilerin ortadan kaldırılabilmesi için değişik formülasyonlar (örneğin enterik tablet hazırlama, kolona hedeflendirme vb.) önerilebilir.

Tripsinin kolona hedeflendirilmesi bu yaklaşımlardan sadece biridir. Burada kullanılabilecek kontrollü salım sağlayan sistemlerden biri de boncuklardır. Boncuklar; sodyum aljinat, pektin, karagen gibi müsilaj yapısındaki maddelerin divalent katyonlarla iyonik jelasyonu ile oluşan küresel ilaç taşıyıcı sistemler olarak hazırlanabildiği gibi kitozanın asit ortamda oluşturduğu mikropartiküler sistemler de boncuk olarak formüle edilebilir. Boncuklar ilaç etkin maddesinin kontrollü salımı, GİS enzimlerinin degrade edici etkisinden koruma ve hedeflendirme sağlarlar.

4.1. ÖN FORMÜLASYON ÇALIŞMALARI: TRİPSİN VE YARDIMCI MADDELERİN KARAKTERİZASYONU

Farmasötik Biyoteknolojide ilaç formülasyonu geliştirme çalışmalarında ilaç etkin maddesi ile yardımcı maddelerin fizikokimyasal özelliklerinin ve bunların geçimliliğinin incelendiği ön formülasyon çalışmaları büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmalar sonucunda, kullanılacak ilaç formülasyonunun içeriği, hazırlama koşulları saptanmaktadır. Fizikokimyasal çalışmalar olarak FTIR, X-ışını kırımı, DSC ve SEM analizleri gibi yöntemler kullanılabilir [109].

4.1.1 FTIR Analizleri

FTIR, organik bileşiklerin tanımlanmasında, saflık tayininde, moleküler yapı aydınlatmada ve ön formülasyon çalışmalarında yardımcı madde-ilac geçimliliğinin belirlenmesinde önemli bir analizdir. Infrared bölgesi, elektromagnetik spektrumun görünür bölgesi ($4000-450\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu arasında) ile mikrodalga bölgesi arasında yer alır. Doğru yardımcı maddelerin seçilmesine yardımcı olur.

Bu çalışma kapsamında yapılan Na-Aljinat'ın FTIR analizine ait spektrumunda 3442 cm^{-1} de görülen geniş bandın yapıdaki O-H gerilmesine; 2925 cm^{-1} de düşük şiddette alifatik C-H gerilme bandına; 1611 cm^{-1} de $>\text{C}=\text{O}$ gerilme bandına; 1418 cm^{-1} de C-C gerilme bandına ve 1091 cm^{-1} ile 1030 cm^{-1} de ise C-O-C grubuna ait simetrik ve asimetrik gerilme bantlarına rastlanmıştır.



Şekil 4.1: Sodyum aljinata ait FTIR spektrumu

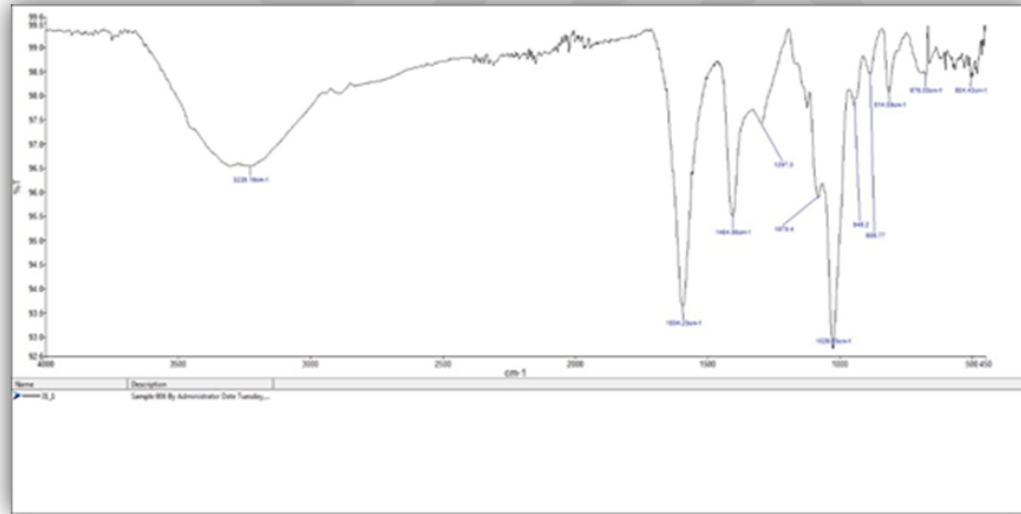
Bu tez çalışmasında yapılan FTIR analizlerinde Tripsin'e ait spektrumda 1275 cm^{-1} 'de görülen pik C-H gerilme bandına aittir. $1600\text{ cm}^{-1} - 1700\text{ cm}^{-1}$ 'de amid I bağ bölgesini göstermektedir ki bu proteinik yapıdaki tripsinin sekonder yapısı açısından önemlidir [110]. Tripsinin sekonder yapısına ait bu band bölgesi aljinat ve aljinat + baryum klorür ile olan karışımlara ait FTIR spektrumlarında da görülmektedir. Tripsinin sekonder yapısını gösteren pik bölgesini karışımda da görmekteyiz. Bu da boncukların hazırlanmasında kullanılan polimer ve çapraz bağlayıcının inert olduğunu, proteini dekompoze etmediğini göstermektedir.



Şekil 4.2: Tripsin'e ait FTIR spektrumu



Şekil 4.3: Trypsin + Aljinat karışımına (1:1) ait FTIR spektrumu.



Şekil 4.4: Trypsin + Aljinat + Baryum Klorür karışımına (1:1:1) ait FTIR spektrumu.

4.1.2 Erime Derecesi Tayini

Etkin madde ile yardımcı maddelerin erime derecesi tayinleri MEİTAM'da erime derecesi tayin cihazı [Mettler Toledo, USA] kullanılarak yapılmıştır. Buna göre, sırasıyla tripsinin erime derecesi 114°C, sodyum aljinatın erime derecesi 342°C, baryum klorürün erime derecesi ise; 960°C olarak bulunmuştur. Elde edilen değerler, (111) literatürle uygunluk göstermektedir. Bu da formülasyon çalışmalarında kullanılan etkin madde ve yardımcı maddelerin saflığı konusunda güvence teşkil etmektedir.

4.1.3. Tripsin Çözünürlük Testi

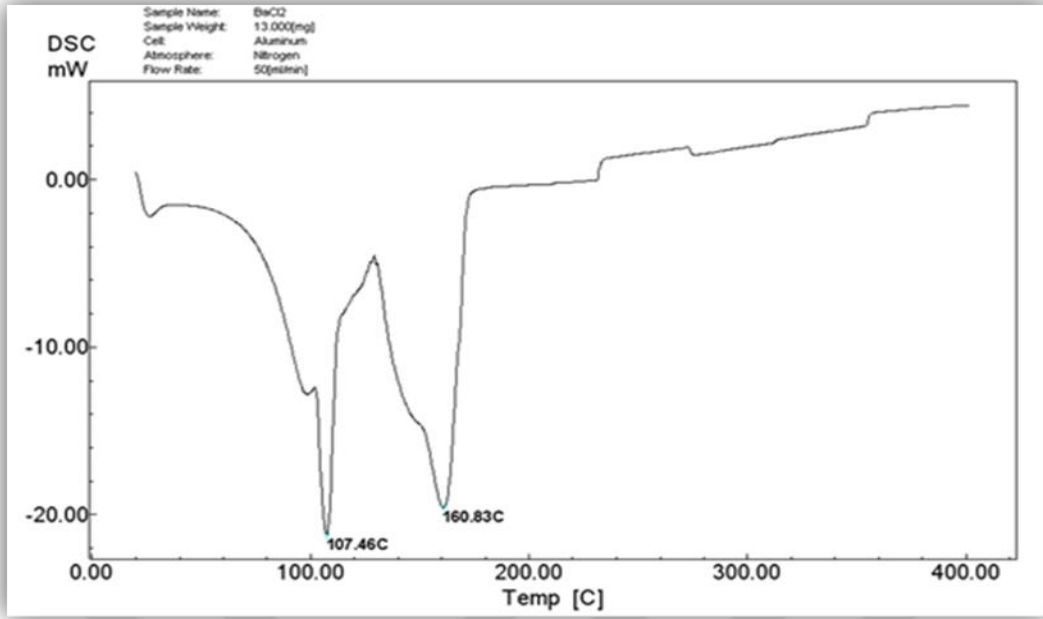
Tripsinin önce aşırı doymuş çözeltisi hazırlanarak 24 saat süresince $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'ta çalkalayıcı su banyosunda tutulmasının ardından filtre edilerek gravimetrik usulle distile suda çözünen miktarı tespit edilmiştir ($n = 6$). 6 (altı) ölçümün aritmetik ortalaması alınmıştır. Buna göre; tripsinin sudaki çözünürlüğü 10 ± 0.341 mg/ml olarak bulunmuştur. Bu değer, (112) literatür ile uygunluk göstermektedir.

4.1.4. Tripsin Miktar Tayini

Tripsin miktar tayini için valide edilmiş kit kullanılmıştır. Ölçümler spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir.

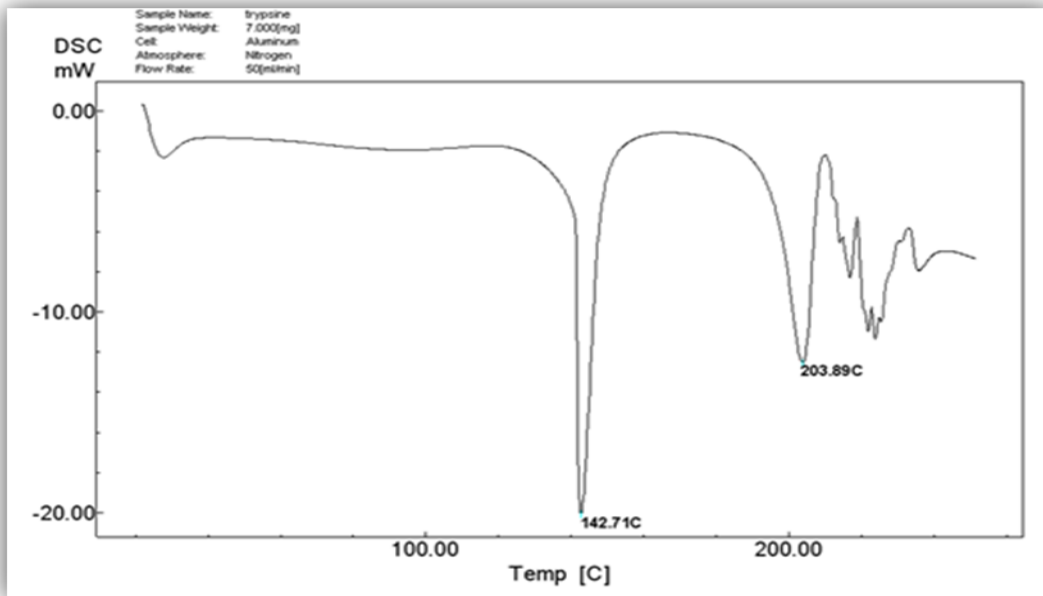
4.1.5. DSC Analizleri

Termal analiz çalışmaları (DTA/TG, DSC), genellikle yapılan FTIR analiz çalışmalarından elde edilen bulguları desteklemek amacıyla kullanılır. DSC analizi, formülasyonun hazırlanması esnasında kristallik özelliğinde meydana gelebilecek bir değişikliğin belirlenmesi amacıyla maddenin erime derecesinin saptanması için yapılır. DSC analizi, ısıtıldığında veya soğutulduğunda, numune tarafından emilen veya salınan enerji miktarını, endotermik (ısı emilimi) ve ekzotermik (ısı evrimi) süreçleri üzerinde niceliksel ve niteliksel veriler sağlayarak ölçer. DSC spekturumları, ayrıca, etkin madde ile yardımcı maddelerin geçimliliği konusunda da bilgi verir. Tripsin, baryum klorür ve sodyum aljinatın DSC sonuçları aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



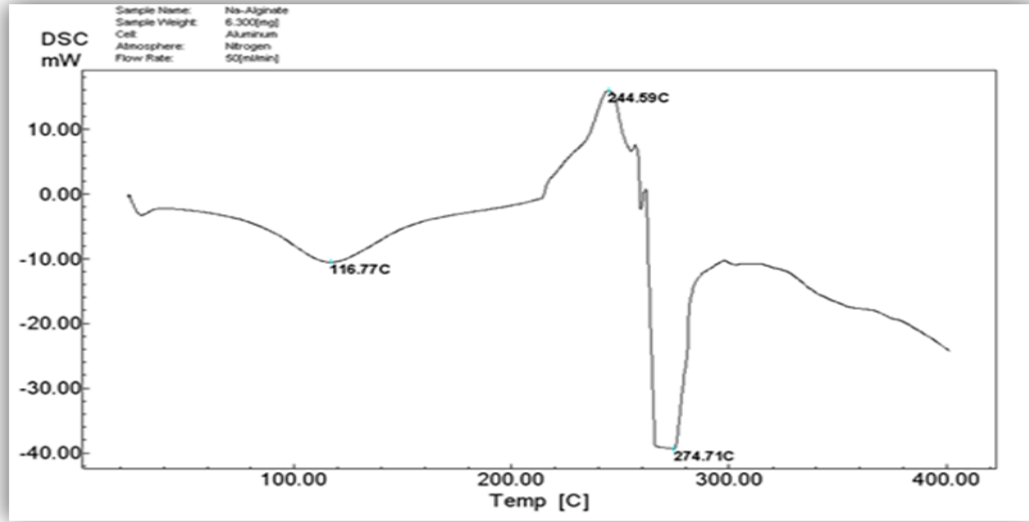
Şekil 4.5: BaCl₂'e ait DSC diyagramı

Baryum klorürün DSC diyagramına baktığımızda 120°C civarında bir egzotermik pik verdiğini görmekteyiz. 180°C civarında dekompoze olduğu görülmektedir.



Şekil 4.6: Tripsin'e ait DSC diyagramı

Tripsinin DSC diyagramında 160°C civarında ve 210°C'de egzotermik pik görülmektedir.



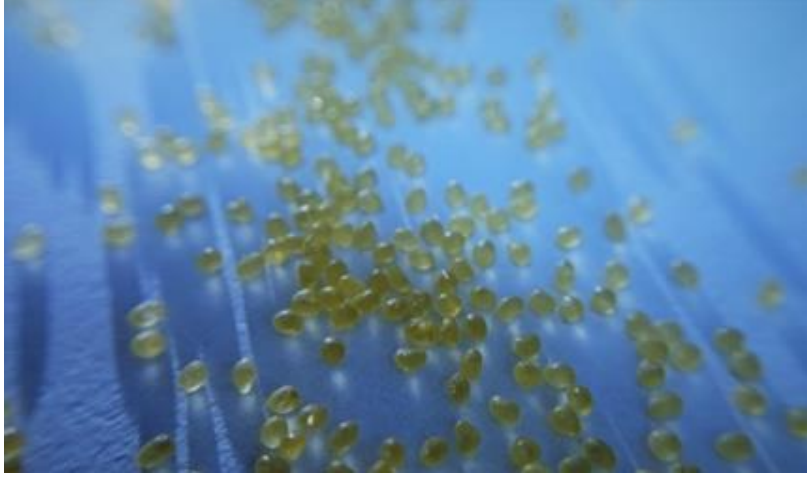
Şekil 4.7: Na-Alg'a ait DSC diyagramı

DSC diyagramlarında Na-Aljinat'ın 114°C'de dehidratasyonu gösteren bir endotermik pik mevcuttur; 244°C'deki egzotermik pik dekompozisyonun başladığını göstermektedir; en sonunda karbonik materyalin dekompozisyonu 300°C ve üstünde gerçekleşir. Bu da literatürle uygunluk göstermektedir(113).

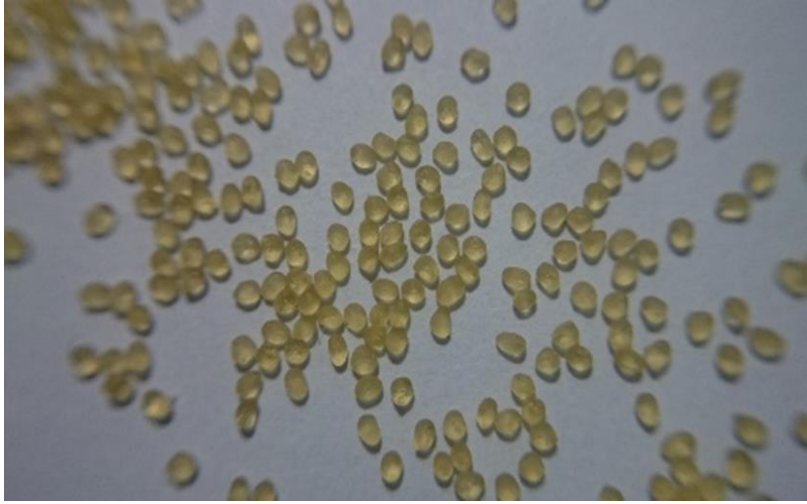
4.2. BONCUKLARIN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

4.2.1. Hazırlanan Boncukların Polarize Işık Mikroskobu ve SEM ile İncelenmesi

Na-Aljinat'ın polimer olarak kullanıldığı Tripsin yüklü boncukların, 1/3 oranında ilaç polimer içeren 15 dak. süre ile 0,5M BaCl₂ konsantrasyonunda çapraz bağlanarak oluşan formülasyondaki "sıvıda olgunlaştırma yöntemi" ile hazırlanan boncukların fotoğrafı aşağıdaki Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da görüldüğü gibi elde edilmiştir. Elde edilen boncukların polarize ışık mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu kullanılarak çekilen fotoğrafları incelendiğinde boş boncukların pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğu, boncukların yapısına tripsinin girmesi ile yüzeyin pürüzlendiği ve küresel yapının arttığı gözlenmiştir. Tutuklanan tripsin enziminin miktarının artması ile yüzey morfolojilerinin çok fazla değişmediği tespit edilmiştir.



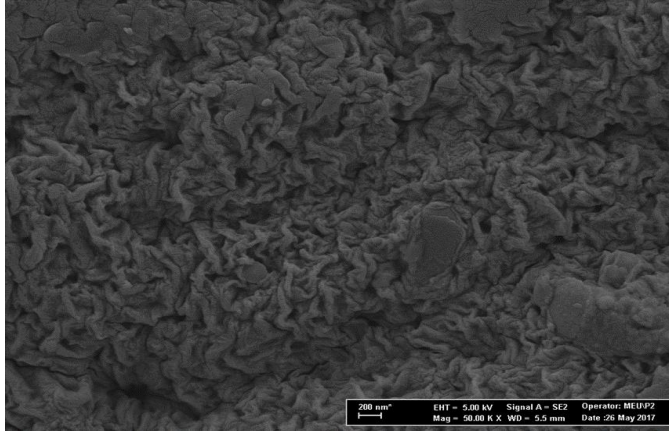
Şekil 4.8: Tripsin yüklü boncukların polarize ışık mikroskobunda çekilmiş fotoğrafı.



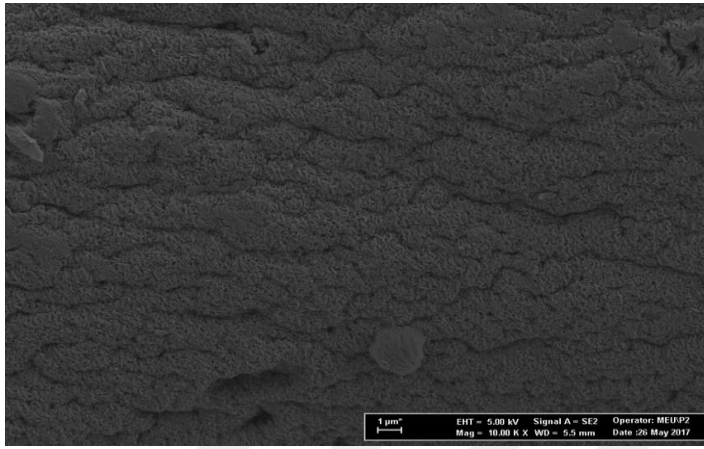
Şekil 4.9: Boş boncukların fotoğrafı (1/3 oranında ilaç polimer içeren 15 dak. süre ile 0,5M BaCl₂ konsantrasyonunda çapraz bağlanarak oluşturulmuş formülasyonlar) .

Resim 4.1-4.3.'de FTB1 8.1-8.3 formülasyonlarıyla elde edilen boncuklara ait (ilaç:polimer oranı: 1/3, çapraz bağlayıcı: 0,5M BaCl₂, çapraz bağlama süresi: 15 dak) 500 kV büyütmeli (200 nm) SEM optik mikroskop görüntüleri verilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında formüle edilen aljinat boncuklarının yüzey morfolojileri SEM analizi ile incelendiğinde, ilaç yüklü boncukların yüzey özelliklerinin farklı olduğu saptanmıştır. İlaç yüklü olan boncukların oldukça pürüzlü, küremsi görünümlü oldukları görülmektedir.

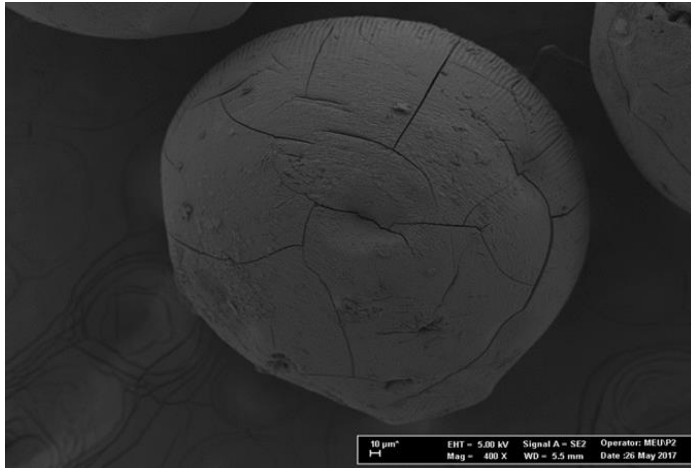
SEM görüntülerine dayanarak ilacın matriks içinde dispers halde olduğu, bu yüzden, herhangi bir yüzeyel tabakada tripsinin tutuklanmadığı tespit edilmiştir. Bu da hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemin matriks tipi olduğuna işaret etmektedir.



Resim 4.1. FTB-8-1 Formülasyonuna ait boncukların 500kV büyütmeli (1 μm °) SEM fotoğrafı



Resim 4.2. FTB-8-2 Formülasyonuna ait boncukların 500kV büyütmeli (1 μm °) SEM fotoğrafı



Resim 4.3. FTB-8-2 Formülasyonuna ait boncukların 500kV büyütmeli (1 μm °) SEM fotoğrafı

4.2.2. Hazırlanan Boncuklara Ait Enzim Tutuklama Verim Hesapları ve Partikül Boyutu Analizleri

Farklı boncuk formülasyonlarına ait enzim tutuklama verim hesapları aşağıda Tablo 4.1’de verilmiştir. Mikroskopik ve elek analizi ile yapılan partikül analizlerinden elde edilen ortalama partikül boyutu değerleri de tabloda yer almaktadır.

Çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, çapraz bağlama süresi ve polimer konsantrasyonu arttıkça, boncuk tutuklama veriminin azaldığı görülmüştür. Çapraz bağlayıcı ve çapraz bağlama süresi arttıkça yükleme kapasitesi azalırken, polimer konsantrasyonu arttıkça yükleme kapasitesi artmıştır. Enzim aktivitesi açısından değerlendirildiğinde, 0.5 M baryum klorür ile hazırlanan formülasyonların 100 enzim ünitesi yüklemeye imkan verdiği görülmüştür.

Baryum klorür miktarı arttıkça, boncukların boyutlarının azaldığı tespit edilmiştir. Bu, muhtemelen polimerik zincir yapısında aktif baryum bağlanma noktalarının fazlalığından ötürüdür.

Tablo 4.1. Farklı formülasyonlara ait boncuk hazırlama verimi değerleri.

Formülasyon Kodu	EnzimTutuklama Verim Değeri (%)	Yükleme Kapasitesi(%)	Partikül Boyutu ($\mu\text{m} \pm \text{SS}$)
FTB 01	23.360 $\pm$ 0.112	48.35 $\pm$ 1.234	856,65 $\pm$ 78,10
FTB 02	22.377 $\pm$ 0.148	47.33 $\pm$ 1.461	857,23 $\pm$ 82,00
FTB 03	22.156 $\pm$ 0.234	48.12 $\pm$ 1.611	862,55 $\pm$ 79,21
FTB 04	22.481 $\pm$ 0.533	46.33 $\pm$ 1.231	672,50 $\pm$ 78,21
FTB 05	6.103 $\pm$ 0.126	41.12 $\pm$ 1.675	619,11 $\pm$ 56,16
FTB 06	5.370 $\pm$ 0.567	39.82 $\pm$ 1.231	524,25 $\pm$ 67,21
FTB 07	5.931 $\pm$ 0.453	40.98 $\pm$ 1.133	567,75 $\pm$ 706
FTB 08	6.172 $\pm$ 0.321	39.31 $\pm$ 1.111	571,45 $\pm$ 67,06
FTB 09	2.212 $\pm$ 0.175	37.63 $\pm$ 1.239	528,45 $\pm$ 8,45
FTB 10	1.547 $\pm$ 0.123	35.32 $\pm$ 1.141	519,5 $\pm$ 56,06
FTB 11	1.844 $\pm$ 0.177	38.34 $\pm$ 1.217	570,14 $\pm$ 23,12
FTB 12	1.792 $\pm$ 0.186	36.21 $\pm$ 1.561	570,25 $\pm$ 89,24

Boncuk boyutunun da enzim tutuklama verimi üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Boncuk boyutu arttıkça, tutuklama oranı da artış göstermiştir. İlaç: polimer oranı arttıkça (1:1) boncuk boyutu büyümüştür. Çapraz bağlanma süresi ile ise, boncuk çapları arasında ters orantı olduğu görülmüştür. Bunun nedeni, yumurta kafes modeli olabilir. Buna göre; çapraz bağlayıcı miktarı arttıkça daha sıkı bir kafes oluşur; bu da çapın küçülmesine sebep olur [101,102].

4.2.3. Hazırlanan Boncukların Denge Su İçeriklerinin Tayini

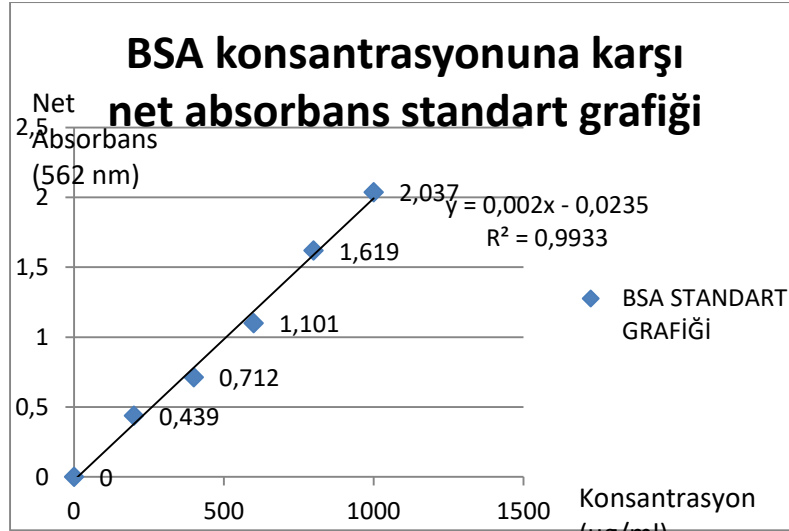
Hazırlanan boncukların denge su içerikleri Bölüm 3.2.4'de belirtildiği gibi tayin edilip Tablo 4.2'de verilmiştir. Bu tabloda değişik formülasyonlarda hazırlanan tripsin içeren boncukların değişik pH'larda (1,2, 6,8 ve 7,4) denge şişme değerleri verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi boncuklara ait en yüksek şişme değerleri pH 6,8'de ve pH 7,4'de elde edilmiştir. Buna göre, mide vasatı ve barsağın pH 6,8'lik kısmında denge şişme değerlerinde düşme gözlenmiştir. Bu; boncukların yapısında bulunan Na-Alg'ın midenin asidik ortamda şişmesinin az olmasından ötürü olabilir.

Tablo 4.2. Boncukların denge su içerikleri

Formülasyon	pH 1,2	pH 6,8	pH 7,4
FTB 01	101,99±1,56	Parçalanma	Parçalanma
FTB 02	94,22±2,74	Parçalanma	Parçalanma
FTB 03	85,64±4,21	Parçalanma	Parçalanma
FTB 04	83,03±1,14	Parçalanma	Parçalanma
FTB 05	82,21±2,22	Parçalanma	Parçalanma
FTB 06	80,12±3,15	Parçalanma	Parçalanma
FTB 07	78,98±2,25	Parçalanma	Parçalanma
FTB 08	74,91±9,11	Parçalanma	Parçalanma
FTB 09	77,10±2,38	761,32 ±3,25	835, 23 ±1,69
FTB 10	78,73±4,60	796,09± 4,62	884,33± 6,12
FTB 11	75,21±3,18	886,34 ±6,72	923,23±7,10
FTB 12	72,64±3,15	851,35 ±3,25	865, 23 ±1,69

4.2.4. Boncuklarda Tutulan Protein Miktar Tayini

Hazırlanan boncuklarda tutulan protein miktar tayini BCA kiti [25] kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için Şekil 4.10'da yer alan standart doğru denkleminde yararlanılmıştır. En yüksek yükleme kapasitesine sahip boncuk formülasyonunda ortalama protein miktarı 120 mg/g olarak bulunmuştur.



Şekil 4.10: Protein miktar tayinine ait standart doğru grafiği.

4.2.5. Şişme Hızının Saptanması

Bölüm 3.2.6'de anlatıldığı şekilde, partikül boyutlarının şişme öncesi ve sonrası dağılımları tespit edildi. Partikül boyutları Tablo 4.3'te verildi. Çapraz bağlanma arttıkça şişme hızının azaldığı görülmektedir.

Tablo 4.3. Boncukların şişme öncesi ve sonrası partikül boyutu

Formülasyon	Partikül boyutu şişme öncesi (µm)	Partikül boyutu şişme sonrası (µm)
FTB 01	856,65±78,10	1027,50±23,46
FTB 02	857,23±82,00	1035,43±19,67
FTB 03	862,55±79,21	1022,83±31,16
FTB 04	672,50±78,21	942,25±34,12
FTB 05	619,11±56,16	824,25±12,34
FTB 06	524,25±67,21	786,17±17,43
FTB 07	567,75±706	736,25±12,56
FTB 08	571,45±67,06	765,12±23,37
FTB 09	528,45± 8,45	853,75±12,78
FTB 10	519,5±56,06	817,25±34,46
FTB 11	570,14±23,12	733,46±17,34
FTB 12	570,25±89,24	697,23±16,25

4.2.6. Aşınma Tayini

Bu çalışma kapsamında hazırlanan boncuk formülasyonları üzerinde barsak ortamında yapılan aşınma tayini incelemelerinde gerçekleştirilen 24 saatlik çalışmanın sonunda boncukların parçalandığı saptanmıştır.

4.3. İn vitro Dezentegrasyon Çalışmaları

Bölüm 3.2.9.'debelirtilen yöntem kullanılarak, tripsin içeren boncukların dezentegrasyon süreleri saptandı. Buna göre, elde edilen dezentegrasyon verileri Tablo 4.4'de verilmiştir. Hazırlanan tripsin içeren boncuk formülasyonlarının barsak pH değerlerinde (6.8 ve 7.4) dağıldığı, ancak, yapısındaki aljinat nedeniyle midenin asidik ortamında dağılmadan kaldığı görülmektedir. Boncukların barsağın farklı pH'lardaki kısımlarındaki dağılımı incelendiğinde pH 6.8'de pH 7.4'e kıyasla daha uzun sürede dağıldığı saptanmıştır. Elde edilen veriler ışığında, hazırlanan tripsin yüklü aljinat boncuklarının kolona hedeflendirmede uygun taşıyıcı sistemler olabileceği görülmektedir.

Tablo 4.4. Boncukların dağılma süreleri

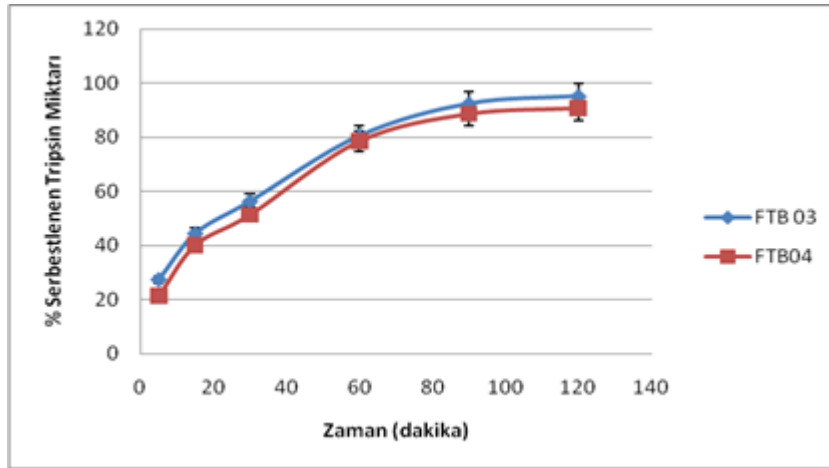
Formülasyon	pH 1,2	pH 6,8	pH 7,4
FH 1	Dağılmadı	34 dk	31 dk
FH 2	Dağılmadı	36 dk	33 dk
FH 3	Dağılmadı	38 dk	35 dk
FH 4	Dağılmadı	35 dk	32 dk
FH 5	Dağılmadı	37 dk	32 dk
FH 6	Dağılmadı	36 dk	33 dk
FH 7	Dağılmadı	37 dk	32 dk
FH 8	Dağılmadı	38 dk	34 dk
FH 9	Dağılmadı	38 dk	36 dk
FH 10	Dağılmadı	37 dk	33 dk
FH 11	Dağılmadı	32 dk	30 dk
FH 12	Dağılmadı	34 dk	30 dk

4.4. İlaç Yüklü Boncuklardan Tripsin Salım Çalışmaları

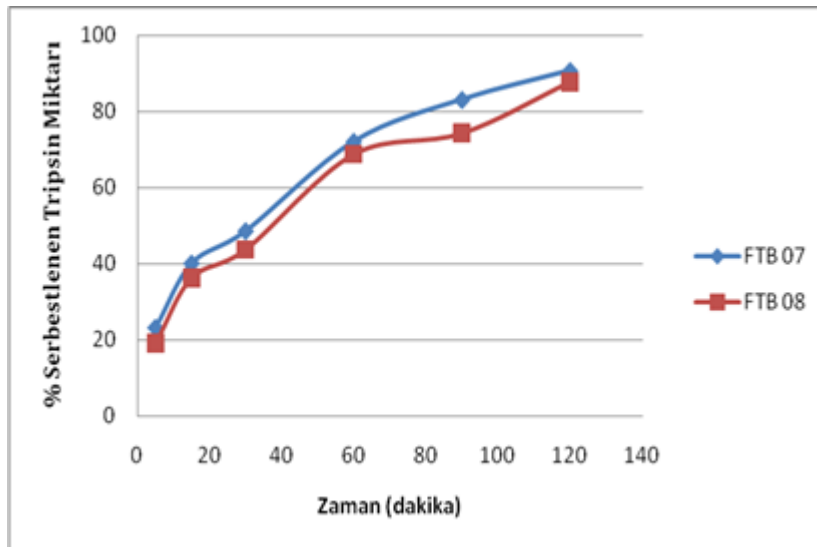
Değişik formülasyonlarda hazırlanan boncukların salım hızları Bölüm 3.10'da belirtilen yöntemle ölçülmüştür.

4.4.1.İlaç/Polimer Oranının Tripsin Salımına Etkisi

İlaç/polimer oranının tripsinin Na-Aljinat boncuklarından salımına etkisi Şekil 4.11. ve Şekil 4.12. 'de verilmiştir. 0,1 M BaCl₂ çapraz bağlama çözeltisinde 5 dk ve 0,5 M BaCl₂ çapraz bağlama çözeltisinde 15 dk olgunlaştırılarak 1/12 ve 1/3 ilaç/polimer oranları ile formüle edilen boncukların salım profillerinin gösterildiği grafikler incelendiğinde ilaç /polimer oranı ile tripsin yüklü boncuklarda tutuklanan enziminin serbestlenmesi arasında doğru orantı olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.11: 0.1M BaCl₂ çözeltisinde hazırlanan tripsin yüklü boncuklardan % tripsin salınımı



Şekil 4.12: 0.5M BaCl₂ çözeltisinde hazırlanan tripsin yüklü boncuklardan % tripsin salınımı

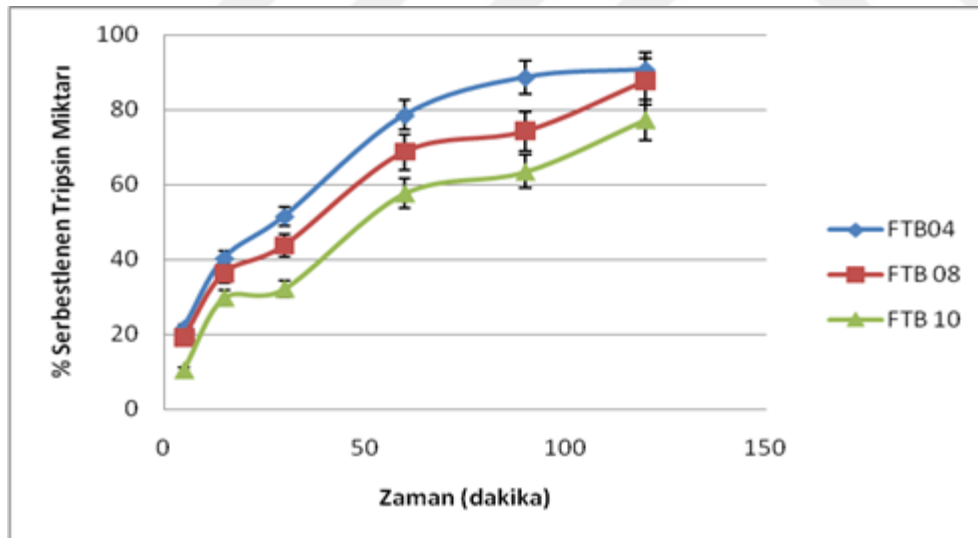
4.4.2. Çapraz bağlama süresinin salım hızına etkisi

Hazırlanan formülasyonlardan tripsin salımı üzerine çapraz bağlama süresinin etkisini araştırmak için 0,1 M BaCl₂ çözeltisi ve ilaç/polimer oranı 1/3; çapraz bağlama süresi 5 dak ve 15 dak olan boncuklar kullanıldı.. Çapraz bağlama süresinin tripsin salımı üzerine etkisi Şekil 4.13’de gösterildi. Şekilden de görüldüğü üzere, çapraz bağlama süresi arttıkça boncuklardan tripsin salımı azalmaktadır. 120 dakika sonunda 5 dakika çapraz bağlı boncuklardan % salım %95,1 ve 15 dakika çapraz bağlı boncuklardan %90,1 olarak saptanmıştır. Bunun nedeni; boncuk oluşumunda çapraz bağlama süresinin artması ile Na-Aljinat ’ın karboksil gruplarına bağlanan Ba⁺² iyonlarının sayısının artması ve bundan dolayı, çapraz bağlanma derecesi yüksek boncukların oluşması olabilir. Bu durum, yine yumurta-kafes modeli ile izah edilebilir. Burada meydana gelen boncukların sahip olduğu yoğun yapıya çözücünün difüze olması ve boncukların

şişmesi ile tripsinin matriks dışına difüzyonla salımı güçleşmektedir. Benzer bulgular literatürde farklı etkin maddeler için aljinat boncukları ile yapılan çalışmalarda da görülmüştür [114].

4.4.3. Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Tripsin Salım Hızına Etkisi

Bu çalışmada boncuk formülasyonları hazırlanırken farklı çapraz bağlama konsantrasyonları ile çalışılmıştır (0.1-1M). Hazırlanan tripsin yüklü boncuklar için çapraz bağlama konsantrasyonunun tripsin salımına etkisi Şekil 4.13' de gösterilmiştir. Bu çalışma kapsamında sodyum aljinat ve 0,1 M; 0,5 M ve 1,0 M BaCl₂ çapraz bağlayıcı çözeltileri kullanarak 15 dak. olgunlaştırmayla hazırlanan boncuklardan 120 dakika sonunda % serbestlenen tripsin miktarları sırasıyla 90,7; 87,6 ve 71,4 olarak bulunmuştur. Formülasyonların hazırlanmasında kullanılan çapraz bağlayıcı BaCl₂ çözeltisinin konsantrasyonunun arttırılması ile boncuklardan tripsin salımının azaldığı tespit edilmiştir. Boncukların hazırlanması esnasında kullanılan çapraz bağlayıcının konsantrasyonunun arttırılmasıyla çapraz bağlama süresine paralel olarak polimerin monomerik birimlerine bağlanan Ba⁺² iyon sayısı artacağı için yumurta-kafes modeline göre, daha sıkı bir yapı meydana gelmektedir. Bundan dolayı, tripsinin matriksten difüzyonu için ihtiyaç duyulan serbest hacim azalmakta, bunun sonucu olarak da boncuklardan salınan tripsin miktarında düşme görülmektedir.



Şekil 4.13. Çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun salım hızına etkisi

4.4.4. pH'nın Tripsin Salım Hızına Etkisi

Tripsinin baryum klorür ile olgunlaştırılmış sodyum aljinat boncuklarından salımının incelendiği bu tez çalışmasında boncuklardan 2 saat (120 dak) süresince ilaç salımı araştırıldı. Elde edilen veriler incelendiğinde mide vasatında (pH 1,2'de) tripsinin boncuklardan göz ardı edilebilecek kadar çok düşük oranda salındığı, ancak, salım ortamının pH'sının artmasıyla tripsin

serbestlenmesinin de arttığı, boncuklardan tripsinin en yüksek salım hızının pH 7,4'de gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bunun sebebi, düşük yani asidik pH değerlerinde salım ortamında mevcut fazla miktardaki H^+ iyonlarının polimer yapısındaki Ba^{+2} iyonlarıyla yer değiştirmesi ve bu iyonların daha küçük olmasından dolayı matriks yapıyı daha sıkı hale getirmesi, bunun da tripsin salımını azaltması olabilir. Ayrıca, mide vasatında tripsin salımın gerçekleşmemesinin öteki sebebi de bu pH'da tripsinin çözünürlüğünün çok düşük olmasıdır. Baryum klorür ile olgunlaştırmayla hazırlanan Na- Alg boncukları pH ve çözünme ortamında bulunan iyonik bileşenlere göre şişme özelliği göstermektedir. Yapılan bu tez çalışmasında, oluşturulan polimer matriksin asidik pH değerinde çözünürlüğünün düşük olduğu görülmüştür. Öte yandan, çözünme ortamının pH'sı arttıkça boncukların dağılma ya da parçalanma özelliği gösterdiği belirlenmiştir. Literatürde yer alan baryum aljinat boncuklarıyla yapılmış çalışmalar incelendiğinde, bu matriksin, mide vasatında Ba^{+2} iyonlarının H^+ iyonları ile yer değiştirmesi nedeniyle Na-Aljinat'ın aljinik aside dönüştüğü ve bundan dolayı, matriksin asidik mide ortamındaki çözünürlüğünün azaldığı görülmektedir. Buna ilaveten, Vaithilingam V. ve ark.'larının yapmış olduğu bir çalışmada da Na-Aljinat'ın boncuklarının mide vasatında şişmesinin az olduğu rapor edilmiştir(115).

4.5. Enzim Stabilitesi

Baryum klorür ile olgunlaştırılmış sodyum aljinat boncuklarında tutuklanmış tripsinin stabilitesi, enzim aktivitesi üzerinden incelenmiştir. Sigma enzim kiti kullanılarak kolorimetrik olarak yapılan çalışmalar neticesinde boncuklarda tutuklu tripsin 4°C'de 10 gün dayanıklı kalırken ($t=0'$ da enzim aktivitesi: $120,2 \pm 1,3$ mAU/ml; $t=10'$ da ise $115,6 \pm 0,4$ mAU/ml), 30°C'de iki gün içerisinde aktivitesini yitirdiği tespit edilmiştir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, kistik fibroz hastalığının tedavisinde ilaç olarak kullanılacak dozaj formunun hazırlanmasında yani tripsin enziminin tutuklanmasında destek malzemesi olarak NaAlg'tan yararlanılmıştır. Sodyum aljinat boncukları üretilirken, çapraz bağlayıcı olarak kalsiyum klorür yerine baryum klorürden yararlanılmıştır. Ön denemelerde hazırlanan boncuklar PVA ile de muamele edilmiş; ancak istenen özelliklerde boncuk oluşumu sağlanamadığından PVA kullanımından vazgeçilmiştir. Boncukların üretiminde kullanılan çapraz bağlayıcının farklı konsantrasyonları (0.1 M-1 M) ile çalışılmış, farklı çapraz bağlama süreleri (5 ve 15 dakika) kullanılarak bu iki faktörün etkileri incelenmiştir. Burada ilaç polimer oranları 1/1 ve 1/3 olarak belirlenmiştir. Tripsin yüklü hazırlanan aljinat boncukların karakterizasyonu; denge su içerikleri tayini, SEM kullanılarak mikroskopik analizler, ilaç yükleme kapasitesi (tutuklama), boncukların şişme hızının saptanması, aşınma tayini, elek analizi, invitro dezentegrasyon ve salım çalışmaları ile FTIR ve DSC analizleri yapılmıştır. Enzim stabilitesinin belirlenmesi için 15 günlük bir ön stabilite çalışması yapılarak enzim aktivitesine formülasyonun ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Buna göre, baryum klorür ile olgunlaştırılmış sodyum aljinat boncuklarında tripsin 2-8°C'de 10 gün enzim aktivitesini yitirmeden stabil kalabilmektedir. Laboratuvarımızda stabilite çalışmaları sürdürülecektir.

Son 20 yılda, farmasötik biyoteknoloji alanındaki önemli gelişmelere karşın, oral yolla uygulanan proteinik yapıdaki ilaçların dayanıklı formda hasta tarafından alınmasına imkan verecek bir dozaj şekli henüz tam anlamıyla geliştirilmemiştir. Dolayısıyla, bu tez çalışması, literatürdeki bu önemli boşluğu doldurabilmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Büyük çaplı endüstriyel üretime elverişli, basit ve ekonomik bir yöntem kullanarak, peptid ve proteinik etkin maddeleri gastrointestinal sistemde enzimatik hidrolizden koruyabilecek, kolona hedefleyebilecek ve kontrollü salım sağlayan bir dozaj şeklinin geliştirilmesi bu tezin ana hedefidir.

Bu amaçla, tripsin gibi kistik fibroz tedavisinde kullanılan bir proteinik yapıdaki ilaç etkin maddesinin molekülünün boncuk formunda hazırlanması işlemi sırasında dayanımını (enzim aktivitesi) olumsuz yönde etkilemeyecek, bir polimer kullanılmıştır. Doğal bir polimer olan sodyum aljinat, kolona ilaç hedeflendirmede enterik tablet formülasyonlarında, etkin maddeyi gastrik vasattan koruyucu etkisi nedeniyle kullanılmaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında, sodyum aljinatın aynı zamanda bir enzim olan tripsin gibi bir proteinik etkin madde içeren enterik boncuk hazırlanmasındaki etkinliği, enzim molekülünün enzimatik aktivite açısından dayanımı ve kontrollü salımın sağlanması gibi önemli hususlar incelenmiştir. Burada, boncuk hazırlamada kullanılan sıvıda olgunlaştırma yöntemi; basit, hızlı, büyük çaplı üretime elverişli, tekrarlanabilir, ekonomik, peptid ve protein molekülünün dayanımı yönünden uygun

olmasından dolayı tercih edilmiştir. Tripsinin sodyum aljinat boncuklarından mide vasatında salımı güç olmakta ve matriks içinde salınmadan kalmaktadır. Bu şekilde, etkin maddenin gastrik ortamda korunması mümkün olmaktadır. Sodyum aljinat boncuklarından suni barsak vasatında pH 6,8 ve 7.4'de tripsinin salımı incelendiğinde ise, difüzyon kontrollü olarak gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen veriler göz önüne alındığında, kistik fibroz tedavisinde kullanılmak üzere tripsin gibi proteinik bir ilaç etkin maddesinin oral uygulamasında baryum klorür ile olgunlaştırılmış sodyum aljinat boncuklarından yararlanılabileceğini ileri sürmek mümkündür.



KAYNAKLAR

- [1] Eliaçık, K., Kanık, A., Baran, M., Zengin, N., Bakiler, A.R., "Febril Konvülziyonla Başvuran Kistik Fibrozis Tanısı Alan Psödobartter Sendromlu İnfant", ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi 2012, 13(3): 31-32.
- [2] Hayek, Kim M., "Medical Nutrition Therapy for Cystic Fibrosis: Beyond Pancreatic Enzyme Replacement Therapy", Journal of the American Dietetic Association 2006, Volume 106, Number 8: 1186-1187.
- [3] Kutlu, R., Pekcan, S., Özberk, D. I., "Kistik fibrozisli çocukta düzelmeyen öksürük nedeni olarak Pseudomonas aeruginosa pnömonisi: Olgu sunumu", Türk Aile Hek Derg. 2013, 17(4): 157-160.
- [4] Kiper, N. , Yalçın, E., "Kistik Fibrozis" ,Sürekli Tıp Eğitim Dergisi 2003, cilt 12, sayı 4, 131.
- [5] Mascarenhas, R. M. , MD., "Treatment of Gastrointestinal Problems in Cystic Fibrosis", Current Treatment Options in Gastroenterology 2003, 6:427-441.
- [6] Fırınacı, F., Işık, S., Karaman, Ö., Uzuner, N., "Adolesan Dönemde Tanı Alan Kistik Fibrozis Olgusu", Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2012, cilt 26, sayı 2 (Ağustos): 125-129.
- [7] Yılmaz, B A., Kan E. , Törüner F., Karakoç A., Aktürk, M., Oruç, M.K., Arslan M., "Kistik Fibrozis İlişkili Diyabetes Mellitus Vakası", Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism 2012, 16:74-8.
- [8] Çokuğraş, Ç. F., "Kistik Fibrozisde Gastrointestinal Tutulum ve Tedavi", J Current Pediatri (Güncel Pediatri) 2007, 5:19-21.
- [9] Demir, K., " Dispepside Pankreas Yetersizliğini (Pankreatik Dispepsi) Ne Zaman Düşünelim, Ne Yapalım?", European Journal of Surgical Sciences 2012, 3(1):1-4.
- [10] Brady, M.S., Rickard K., "An Enteric -Coated High-Buffered Pancrelipase Reduces Steatorrhea in Patients with Cystic Fibrosis: A Prospective, Randomized Study", Journal of The American Dietetic Association 2006, 106: 1181-1186.
- [11] Dalgıç, B. " Çocukluk Çağı Kronik İshallerinde Beslenme", J Current Pediatri (Güncel Pediatri) 2007,5:119-121.
- [12] Trapnell, B.C., Maguiness, K., Graff G.G., Boyd D., Beckmann K., Caras S., "Efficacy and safety of Creon 24,000 in subjects with exocrine pancreatic insufficiency due to cystic fibrosis", Journal of Cystic Fibrosis 2009, 8:370-377.

- [13] Littlewood, J.M., Wolfe S.P., Conway S.P., "Diagnosis and Treatment of İntestinal Malabsorption in Cystic Fibrosis", *Pediatric Pulmonology* 2006, 41:35-49.
- [14] Abdelrasool, M.K., " A Literature Review on Trypsin Enzyme" Qatar University, Collage of Arts and Sciences, Department of Chemistry and Earth Sciences 2016, 14 Ağustos , 1-11.
- [15] Noone, P.G., Zhou, Z., Silverman, L.M., Jowell, P.S., Knowles M.R., Cohn J.A., "Cystic fibrozis gene mutation and pancreatitis risk: relation to epithelial ion transport and trypsin inhibitör gene mutations.", *Gastroentrology* 121 2001, December (6):1310-1319.
- [16] Wilcken, B., Brown, A.R., Urwin, R., Brown, D.A., "Cystic fibrozis screening by dried blood spot trypsin assay: results in 75,000 newborn infants", *J Pediatr.* 1983, Marc; 102(3):383-387.
- [17] Gürsoy, A., "Temel Konular ve Dozaj Şekilleri" Farmasötik Teknoloji, İstanbul, Piksel Bilişim Matbaacılık Reklamcılık ve filmcilik Hizmetleri Ltd. Şti., 2004,p .
- [18] Chien, Y.W., "Novel Drug Delivery System : Fundamentals, Developmental Concepts, Biomedical Assessment, New York: Marcel Dekker Inc, 1982, p.
- [19] Devlin, T., "Textbook of Biochemistry With Clinical Correlations.", New York: Wiley Publishers 2005, 45(35):45-52.
- [20] Quon B.S., Rowe S.M., "Start of the Art Review: New and emerging targeted therapies for cystic fibrozis." *BMJ* Marc 30, 2016, 352: i859.
- [21] Wilson D.C., Pencharz P.B., " Nutrition and Cystic Fibrozis", Elsevier Science, Nutrition 1998, 14:792-795.
- [22] Fırıncı F., Işık S., Karaman Ö., Uzuner N., " Adolesan Dönemde Tanı Alan Kistik Fibrozis Olgusu", *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* Agustos, 2012, cilt 26, sayı 2, 125-129.
- [23] Kalnins D., Wilschanski M., " Maintenance of nutritional status in patients with cystic fibrozis: new and emerging therapies" *Drug Design ,Development and Therapy* 2012, 6: 151-161.
- [24] Ding, S., Cargill A.A., Medintz, L.I., Claussen J. C., "Increasing the activity of immobilized enzymes with nanoparticle conjugation" *Science Direct, Current Opinion in Biotechnology* 2015, 34:242-250.
- [25] Starke, S., Went M., Prager A., Schulze A., " A novel electron beam-based method fort he immobilization of trypsin on poly(ethersulfone) and poly(vinylidene flüoride) membranes" *Reactive& Functional Polymers* 2013, 73, 689-702.

- [26] Asgeirson, B., Fox, J.W., Bjarnason J.B., "Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua* " Eur. J. Biochem. 1989, 180, 85-94.
- [27] Elgendy, A.S., Abdelrasool, M.K., " A literature review on Trypsin Enzyme" Qatar University College of arts and Science, Department of Chemistry and Earth Science. 2016, 1-16.
- [28] Enzim El Kitabı: Trypsin, Worthington Biochemical Corporation, IUB: 3.4.21.4, CAS: 9002-07-7.
- [29] Kasserra, H.P., Laidler, K.L., "Mechanism of action of trypsin and chymotrypsin" Canadian Journal of Chemistry 1969, 47:4031-4039.
- [30] Menfaatli, E., Zihnioğlu, F., "Carrier free immobilization and characterization of trypsin" Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology 2015, 43:140-144.
- [31] McDowall, J., "Trypsin and Chymotrypsin" https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2003_5/Page1.htm (25.08.2018)
- [32] Stroud, R.M., "A Family of Protein-Cutting Proteins" Scientific Americans 1974, vol:231, pp:74-88.
- [33] Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., "Proteases: Facilitating a Difficult Reaction" NCBI Bookshelf. Biochemistry. 5th edition. 2002, W. H. Freeman and Company Bookshelf ID: NBK22526.
- [34] Nicola, R., Rudaz, S., Stella, C., Veuthey, J.L., "Trypsin immobilization on an ethylenediamine-based monolithic minidisk for rapid on-line peptide mass fingerprinting studies", Journal of Chromatography A 2009, 1216, 2695-2699.
- [35] Bayramoğlu, G., Yılmaz, M., Şenel, A.Ü., Arıca, M.Y., "Preparation of nanofibrous polymer grafted magnetic poly(GMA-MMA)-g-MAA beads for immobilization of trypsin via adsorption", Biochemical Engineering Journal 2008, 40: 262-274.
- [36] Gogoi, D., Barman, T., Choudhury, B., Khan, M., Chaudri, Y., Dehingia, M., Pal, A.R., Bailung, H., Chutia, J., "Immobilization of Trypsin on plasma prepared Ag\PPAni nanocomposite film for efficient digestion of protein" Materials Science and Engineering 2014, C43, 237-242.
- [37] White, M.J.V., Glenn, M., Gomer, R.H., "Trypsin Potentiates Human Fibrocyte Differentiation" PLoS One 2013, e70795 Volume 8. Issue 8, 1-9.
- [37] White, M.J.V., Glenn, M., Gomer, R.H., "Trypsin Potentiates Human Fibrocyte Differentiation" PLoS One 2013, e70795 Volume 8. Issue 8, 1-9.

- [38] Carson, T.N., Wiggins, C., Overall K., Hebert J., " Using a Castor Oil-Balsam of Peru-Trypsin Ointment to Assist in Healing Skin Graft Donor Sites" *Ostomy Wound Manage.* 2003, 49(6):60-64.
- [39] Beitz, M.J., "Heparin-Induced Thrombocytopenia Syndrome Bullous Lesions Treated with Trypsin-Balsam of Peru-Castor Oil Ointment: A Case Study" *Ostomy Wound Manage.* 2005;51(6):52-58.
- [40] Cetrulo, G.I., "Use of trypsin intravenously in a gunshot wound" *J. Am. Med. Assoc.* (1953) 152: 605-606.
- [41] Okamoto, H., Todo, H., Lida, K., Danjo, K., "Dry powder pulmonary delivery of peptides and proteins" *KONA*, 2002; 20: 71-83.
- [42] Han DH. Granulex® aerosol spray discontinued. December 31, 2015. Accessed Jan. 4, 2016.
- [43] Nekro Veyxym Enjeksiyonluk süspansiyon.Ekomed veteriner ilaçları firması. <http://www.ekomedilac.com/tr/Product.asp?Section=VTCH&ProductId=NekroVeym>. (26.08.2018)
- [44] Robinson, P.K., "Enzymes: principles and biotechnological applications" *Essay Biochem.* 2015, 59: 1-41.
- [45] Champe, P.C.,Harvey,R.A.,Ferrier,D.R.; "Lippincott Biyokimya" Nobel Tıp Kitabevi, 2007, pp:53.
- [46] Bornscheuer U.T., "Immobilizing Enzymes: How to Create More Suitable Biocatalysts" *Angew. Chem.Int. Ed.*, 2003, 42: 3336-3337.
- [47] Enzymes, Function and Structure, Chemist for Biologists : Enzymes, <http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/enzymes.htm>, (25.08.2018).
- [48] Ası, T., "Tablolarla Biyokimya Cilt 2, Enzimler, Bölüm 8" Ankara, <http://veterinary.ankara.edu.tr/fidanci> , 1999.
- [49] Krajewska, B., "Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A Review" *Enzyme and Microbial Technology* 2004, 35: 126-139.
- [50] Gıda Teknolojisi, Enzimlerin Özellikleri, T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Enzimlerin%20%C3%96zellikleri.pdf , 2011, (25.08.2018)

- [51] McDonald, A.G., Boyce, S., Tipton K.F., "Enzyme Classification and Nomenclature" els John Wiley & Sons 2015, Ltd. www.els.net 1-15.
- [52] Mateo, C., Palomo, J.M., Frnandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R., "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques" *Enzyme and Microbial Technology* 2007, 40:1451-1463.
- [53] Spahn, C., Minter, S.D., "Enzyme Immobilization in Biotechnology" *Recent Patents on Engineering* 2008, 2:195-200.
- [54] Geçgil, Ş., "Farmasötik Teknolojiye Başlangıç" Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 1991, pp.332-333.
- [55] Bhowmik, D., Gopinath, H., Kumar, B.P., Duraivel, S., Kumar, K.P.S., "Controlled Release Drug delivery Systems" *The Pharma Innovation* 2012, Vol.1, No. 10 ISSN: 2277-7965, p 24.
- [56] Brena, B.M., Batista-Viera, F., "Immobilization of Enzyme" A Literature Survey, *Methods in Biotechnology*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 15-30.
- [57] Elnashar, M.M.M., "The Art of Immobilization Using Biopolymers, Biomaterials and Nanobiotechnology", Centre of Scientific Excellence-Polymers Department, www.intechopen.com, 2011, ISBN:978-953-307-179-4.
- [58] Zucca, P., Fernandez-Lafuente, R., Sanjust, E., "Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization" *Molecules*, 2016, 21,1577, doi:10.3390, 1-25.
- [59] Ahmad, R., Sardar, M., "Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix", *Biochemistry & Analytical Biochemistry* 2015, vol.4, Issue.2, 1-8.
- [60] Costa, S.A., Azevedo, S.H., Reis, R.L., " Enzyme Immobilization in Biodegradable Polymers for Biomedical Applications" *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2004, 301-318.
- [61] Benucci, I., Esti, M., "Removal of unstable proteins from White wine by immobilized acid protease", <https://www.Researchgate.net/publication/254692698>. 2016.
- [62] Dwevedi A., " Chapter 2, Basic of Enzyme Immobilization," Springer International Publishing Switzerland, *Enzyme Immobilization*. DOI.10.1007/978-3-319-41418-8-2, (2016).
- [63] Eş, I., Vieira, J. D. G., Amaral, A.C., "Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application" *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015, 99:2065-2082.

- [64] Datta, S., Christena, L.R., Rajaram, Y.R.S., "Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials" Springer, 2013, 3 biotech 3:1-9.
- [65] Cao, L., Langen, L.V., Sheldon R.A., "Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?" Current Opinion in Biotechnology, 2003, 14: 387-394.
- [66] Tischer, W., Kasche, V., "Immobilized enzymes: crystals or carriers?" Elsevier Science, Vol,17, [1999].
- [67] Girgin, B., Korkmaz, O., Yavaşer, R., Karagözler, A.A., " Production and Drug Release Assessment of Melatonin-Loaded Alginate/Gum Arabic Beads" Journal Of Turkish Chemical Society Chemistry 2016, 3(3):205-216.
- [68] Sezer, A.D., Akbuğa, J., " Release characteristics of chitosan treated alginate beads: II. Sustained release of a low molecular drug from chitosan treated alginate beads" Journal of Microencapsulation, Micro and Nano Carriers 1999, 16:6, 687-696.
- [69] Sezer, A.D., " Release characteristics of chitosan treated alginate beads: I. Sustained release of a low molecular drug from chitosan treated alginate beads" Journal of Microencapsulation, Micro and Nano Carriers 1999, 16:2, 195-203.
- [70] Akyüz, F., Demir, K., "Gastrointestinal Fiziopatoloji" Klinik Gelişim,77-80, http://www.klinikgelisim.org.tr/kg22_3/13.pdf
- [71] Gürsoy, A.Z., Dortunç B., " Kontrollü Salım Sistemleri" Bölüm 8, Oral Sistemler, Sindirim Sistemi, (Ed.), Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj San. Tic. Ltd. 2002, İstanbul, 152-154.
- [72] Şengel-Türk, C. T., Haşçıçek, C., Gönül, N., " Kolona Hedeflenen İlaç Taşıyıcı Sistemler" Ankara Ecz. Fak. Derg. 2006, 35(2) 125-148.
- [73] Tuğcu-Demiröz, F., Acartürk, F., " Kolona Özgü İlaç Taşıyıcı Sistemler" FABAD J. Pharm. Sci., 2002, 27, 117-134.
- [74] Sinha, V.R., Kumria, R., " Polysaccharides in colon-specific drug delivery" Int. J. Pharm. 2001, 224, 19-38.
- [75] Turanlı, Y., Acartürk, F., " Nanolifler ve Kolona Özgü İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Uygulamaları" J Lit Pharm Sci. 2018, 7(1):11-23.
- [76] Nicholas, M.E., Panaganti, S., Prabakaran, L., Jayveera, K.N., "Novel Colon Specific Drug Delivery System: A Review" International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research 2011, Vol.2 (10), 2545-2561.

- [77] Basan, H., İmren, D., Gümüşderelioğlu, M., "pH'ya Duyarlı Hidrojeller ve Kontrollü İlaç Salım Sistemlerindeki Uygulamaları" FABAD J. Pharm. Sci. 2001, 26, 81-92.
- [78] Nayak, A.K., Maji, R., Das, B., "Gastroretentive Drug Delivery System: A review" Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 2010, Vol.3 Issue 1, 2-10.
- [79] Hussan, S.D., Santanu, R., Verma, P., Bhandri, V., "A Review on recent advances of enteric coating" IOSR Journal of Pharmacy 2012, Vol.2, Issue.6, pp: 05-11.
- [80] Amidon, S., Brown, J.E., Dave, V.S., "Colon Targeted Oral Delivery Systems: Design Trends and Approaches" AAPS Pharma. Sci. Tech. 2015, Vol. 16, No.4.
- [81] Marakoğlu, K., Kargın, N.Ç., "Peptic Ulcer" Türkiye Klinikleri J Fam Med-Special Topics 2015;6(4):28-32.
- [82] Akbulut G, Çiftçi H, Yıldız E., "Sindirim sistemi hastalıkları ve beslenme tedavisi" 2008, Ankara: Klasmat Matbaacılık [TC Sağlık Bakanlığı Yayınları] Sağlık Bakanlığı Yayın No: 728, ISBN : 978-975-590-244-9.
- [83] Paliwal SR, Paliwal R, Vyas SP., "A review of mechanistic insight and application of pH-sensitive liposomes in drug delivery" Drug Deliv. 2015 May;22[3]:231-42.
- [84] Tüylek, Z., "İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Nanoteknolojik Etkileşim" Bozok Tıp Dergisi 2017, 7[3]: 89-98.
- [85] Lee, K.Y., Mooney, D. J., "Alginate: Properties and Biomedical Applications" Progress in Polymer Science 2012, 37: 106-126.
- [86] Taqieddin, E., Amiji, M., "Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules" Science Direct, Biomaterials 2004, 25:1973-1945.
- [87] Illum L., "Chitosan and Its Use as a Pharmaceutical Excipient", Pharmaceutical Research 1998, Vol 15., No.9.
- [88] Elgadir, M.A., Uddin, M.S., Ferdosh, S., Adam, A., Chowdhury, A.J.K., Sarker, M.z.I., "Impact of Chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A Review", Journal of food and drug analysis 2015; 23:619-629.
- [89] Wang, N.S., "Enzyme Immobilization Protocol Entrapment In Alginate Gel" Department of Chemical & Biomolecular Engineering University of Maryland College Park, <http://eng.umd.edu/nsw/ench485/lab7b.htm>, MD 20742-2111.

- [90] Pawar, S.D., Edgar, K.J., " Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications " *Biomaterials* 2012, 33: 3279-3305.
- [91] Yang, J.S., Xie Y.J., He W., " Research progress on chemical modification of alginate: A review" *Carbohydrate Polymers* 2011, 84:33-39.
- [92] Gilhotra, R.M., Mishra, D.N., "Alginate-chitosan film for ocular drug delivery: Effect of surface crosslinking on film properties and characterization" *Guru Jambheshwar University of Science and Technology* 2008, *pharmazie* 63: 576-579.
- [93] Sabra, W., Zeng, A.P., Deckwer. "Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects." *Appl Microbiol Biotechnol* 2001, 56:315-325.
- [94] Gombotz, W.R., Wee, S.F., " Protein release from alginate matrices" *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012; 64:194-205.
- [95] Aslani, P., Kennedy, R.A., " Studies on diffusion in alginategels. I. Effect of cross-linking with calcium or zinc ions on diffusion of acetaminophen" *Journal of Controlled Release* 1996, 42: 75-82.
- [96] Tonnesen, H.H., Karlsen, J., " Alginate in Drug Delivery Systems" *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2002, 28[6]:621-630.
- [97] Pamies, R., Schmidt, R.R., Martinez, M.C.L., Torre, J.,G., " The influence of mono and divalent cations on dilute and non-dilute aqueous solutions of sodium alginates" *Carbohydrate Polymers* 2010, 80: 248-253.
- [98] Gökbulut, İ., Göktürk, F.S., " Gıda Mikroenkapsülasyonunda Aljinat Kullanımı" *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi* 2018, Cilt 8, Sayı 1\2, 16-28.
- [99] USP 36, USP komisyonu, ABD, 2012.
- [100] Bajpai. S.K., Sharma. S., "Investigation of Swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca⁺² and Ba⁺² ions" *Science Direct Reactive&Functional Polymers* 59: 129-140, [2004].
- [101] Patel, N., Lalwani, D., Gollmer, S., Injeti, E., Sari, Y., Nesanomy, J., "Development and Evaluation of a calcium alginate based oral ceftriaxon sodium formulation" *Prog. Biomater* 2016, 5:117-133.
- [102] Gaudio. P.D., Colombo, G., Colombo, P., Russo, P., "Mechanism Of Formation And Disintegration of Alginate Beads Obtained By Prilling" *International Journal Of Pharmaceutics*, 302, 1-9, (2005).

- [103] Abdalla, K.F., Kamoun, E.A., Maghraby, G.M.E., "Optimization of the entrapment efficiency and release of ambroxol hydrochloride alginate beads" *Journal of Applied Pharmaceutical Science* April, 2015, Vol. 5 (04), pp. 013-019.
- [104] Sayeh, A.E., Abou el Ela, F., Hassan, M.N., El-Maraghy, D.A., "Ketorolac tromethamine floating beads for oral application: Characterization and in vitro/in vivo evaluation " *Saudi Pharm. J.* 2014; 22[4]: 349-359.
- [105] Mandal, S., Kumar, S.S. Krishnamoorthy, B., Basu, S.K., "Development and evaluation of calcium alginate beads prepared by sequential and simultaneous methods" *Braz. J. Pharm. Sci.* 2010; 46[4]: 785-793.
- [106] Al-gousous, J., L-GOUSOUS, LANGGUTH, P., "Oral Solid Dosage Form Disintegration Testing - The Forgotten Test". *J Pharm Sci.* 2015; 104:2664–2675.
- [107] USP XXXVII Dissolution. In *The United States Pharmacopeia and National Formulary USP 37–NF 32*; The United States Pharmacopeial Convention, Inc.: Rockville, MD, 2014.
- [108] Sun J, Bin X, Yang L, Ma H. "Activity and stability of trypsin immobilized onto chitosan magnetic nanoparticles" *Hindawi Advances In Materials Science and Engineering* 2017; 1-10.
- [109] Chaurasia, G., "A Review on Pharmaceutical Preformulation Studies in Formulation and Development of new Drug Molecules" *Int J Pharm Sci Res* 2016; 7[6]: 2313-2320.
- [110] Ceylan, C., Karaççek, B., "Structural and functional characterization of solution, gel, and aggregated forms of trypsin in organic solvent-assisted and pH-induced phase changes" *Turkish Journal of Biochemistry* 2015; 40[1]: 81-87.
- [111] (Trypsin)ProductDescription9002-07-7
http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_US_CB0673677.asp (24.08.2018)
- [112] Biochrom AG, Information for Substances, 2010, Berlin Germany, http://www.biochrom.de/fileadmin/user_upload/service/Tipps_und_Hinweise/englisch/101124_Rohstoffe_TPP_Resistenzliste_en.pdf, (26.08.2018)
- [113] Jana, S., Trivedi, M.K., Tallapragada, R.M., Branton, A., Trivedi, D., Nayak, G., Mishra, R.K., "Characterization of Physicochemical and Thermal Properties of Chitosan and Sodium Alginate after Biofield Treatment" *Pharm. Anal. Acta.* 2015, 6:1.
- [114] March, Y.A., Donati, I., Strand, B.L., Skj, G., "Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on alginate microbeads" *Biomacromolecules*, 2006; 7[5], 1471–1480.

[115]Vaithilingam. V., Kollarikov, G., Qi, M., “Effect of prolonged gelling time on the intrinsic properties of barium alginate microcapsules and its biocompatibility” Journal of Microencapsulation, 2011, 28 [6]: 499–507.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı :Nafize Didem YÜKSEK

Doğum Tarihi :08.05.1976

E-mail :dyukse@mersin.edu.tr

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Gıda Mühendisliği	ÇukurovaÜniversitesi,	2000
Yüksek Lisans	1-Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği 2-Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji	ÇukurovaÜniversitesi, Mersin Üniversitesi	2003 2010
Doktora	-	-	-

Görevler :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Uzman (Bilim)	Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	2004-2007
Uzman (Bilim)	Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı	2007-2013
Uzman (Bilim)	Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölümü Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı	2013-2018
Öğr.Gör. (Unvan değişikliği)	Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölümü Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı	2018- devam ediyor.

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

- 1. Akyıldız, A., Öcal, N.D.,** “Effects of dehydration temperatures on colour and polyphenoloxidase activity of Amasya and Golden Delicious apple cultivars” Journal of the Science of Food and Agriculture, J Sci Food Agric 2006, 86:2363–2368.
- 2. Delialioğlu, N., ÖCAL, N.D., EMEKDAŞ, G.,** “Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Escherichia coli ve Klebsiella Türlerinde Genişletilmiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Oranları” ANKEM Derg 2005;19(2):84-87.
- 3. Delialioğlu, N., ÖCAL, N.D., EMEKDAŞ, G., Otag, Z.F., Aslan G.,** “MERSİN İLİNDE ÇİĞ VE MARKET SÜTLERİNDE AFLATOKSİN M1 DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI” Mikrobiyol Bul 2010; 44: 87-91.
- 4. Yüksek, D., Algül, Ö., Dögen, A., Tari, Ö., Küçük, E., Otag Z.F., Serin, M.S.,** “Synthesis and antimicrobial activity evaluation of some benzimidazole and indole derivatives” African Journal of Microbiology Research 23 April, 2013, Vol. 7(17), pp. 1708-1715.
- 5. Algül, Ö., Meriç, A., Polat, S., Yüksek, N.D., Serin, M.S.,** “Comparative studies on conventional and microwave-assisted synthesis of a series of 2,4-di and 2,3,4-trisubstituted benzimidazo[1,2-a] pyrimidines and their antimicrobial activities ” Cent. Eur. J. Chem., 7(3) ,2009 ,337-342.