

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GASTRİK MUKOADEZİF FORMÜLASYONLARIN
HAZIRLANMASI VE İN-VİTRO İN-VİVO OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Uzm. Ecz. Zeynep ŞENYİĞİT

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tamer GÜNERİ

İzmir
2010

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GASTRİK MUKOADEZİF FORMÜLASYONLARIN
HAZIRLANMASI VE İN-VİTRO İN-VİVO OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Uzm. Ecz. Zeynep ŞENYİĞİT

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tamer GÜNERİ

İzmir
2010

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Başkan : Prof. Dr. Tamer GÜNERİ
(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Gökhan ERTAN

Üye : Prof. Dr. Makbule AŞIKOĞLU

Üye : Prof. Dr. Sevda ŞENEL

Üye : Prof. Dr. Esra BALOĞLU

Doktora tezinin kabul edildiği tarih:

ÖNSÖZ

Tezimin tüm aşamalarında bilgi, deneyim ve önerilerinden faydalandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Tamer Güneri'ye,

İlgi ve yardımlarıyla bana her zaman destek olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Gökhan Ertan'a,

Innsbruck Üniversitesi'nin tüm imkanlarını açan, bilgi ve deneyimleri ile bilimsel bakış açımın gelişmesinde çok büyük katkısı bulunan Sayın Prof. Dr. Andreas Bernkop-Schnürch'a,

Her zaman yardım ve desteğiyle yanımda olan ve bu tezin gerçekleşmesinde büyük emeği olan Sayın Prof. Dr. Esra Baloğlu'na,

Çalışmalarım boyunca gösterdikleri yardım ve anlayışlarından dolayı başta Sayın Prof. Dr. Özgen Özer olmak üzere tüm Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Innsbruck Üniversitesi'ndeki çalışmalarım boyunca, hiçbir bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen Sayın Dr. Anja Vetter'e,

Çalışmalarım sırasında bana destek olan Sayın Yard. Doç. Dr. Sinem Yaprak Karavana'ya,

Birlikte çalışmayı keyif haline getiren ve manevi destekleri ile yanımda olan başta Araş. Gör. Dr. İpek Özcan olmak üzere tüm Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Hayatımın her döneminde koşulsuz destek ve yardımlarını esirgemeyen anneme, anneanneme ve kardeşime,

Her zaman yanımda olan ve güç veren değerli eşim Araş. Gör. Dr. Taner Şenyiğit'e,

Varlığı ile hayatıma anlam getiren oğlum Mert Şenyiğit'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 08/ECZ/010 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Çalışmaların bir bölümü TÜBİTAK Yurt Dışı Araştırma Burs Programı çerçevesinde Innsbruck Üniversitesinde yürütülmüştür.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	III
İÇİNDEKİLER	V
TABLO DİZİNİ.....	X
ŞEKİL DİZİNİ.....	XI
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
I. BÖLÜM	3
1 GENEL BİLGİLER	3
1.1 MİDENİN ANATOMİSİ VE FİZYOLOJİSİ	3
1.1.1 Midenin anatomik bölümleri	5
1.1.2 Midenin radyolojik anatomisi	5
1.1.3 Sekresyon fizyolojisi yönünden midenin bölümleri	5
1.1.4 Mide duvarının yapısı	5
1.1.4.1 Mide mukozası	6
1.1.5 Midenin fizyolojisi.....	7
1.1.5.1 Midenin motilitesi.....	8
1.1.5.2 Midenin sekresyonu	10
1.1.5.2.1 Midenin asit ifrazatı	11
1.1.5.2.2 Pepsin	13
1.1.5.2.3 İntrinsek faktör (İF).....	13
1.1.5.2.4 Mukus.....	13
1.1.5.2.4.1 Mukoza ve mukus engeli.....	14
1.2 MİDEDE TUTULAN SİSTEMLER.....	16
1.2.1 Dansite Kontrollü Sistemler.....	17
1.2.1.1 Midede yüzen düşük dansiteli sistemler	17
1.2.1.1.1 Hidrodinamik denge sistemleri.....	18
1.2.1.1.2 Efervesan özellikte yüzen sistemler	20
1.2.1.1.3 Düşük dansiteli çekirdeğe sahip sistemler.....	23
1.2.1.2 Midede çöken yüksek dansiteli sistemler.....	24
1.2.2 Midede Şişerek Büyüklüğü Pilordan Geçemeyecek Kadar Artan Sistemler	25
1.2.3 Manyetik Sistemler.....	31
1.2.4 Mukoza Yüzeyine Yapışan Biyoadezif Sistemler.....	32
1.3 BİYOADEZYON İLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER.....	36
1.3.1 Biyoadezif Dozaj Şekilleri.....	37
1.3.1.1 Biyoadezif dozaj şekillerinin üstünlükleri	37
1.3.2 Biyoadezyon Teorileri	37
1.3.3 Biyoadezyonu Etkileyen Faktörler	39
1.3.3.1 Mukusun özellikleri	39
1.3.3.1.1 Müsin glikoproteinlerinin yapısı.....	40
1.3.3.2 Polimere ilişkin faktörler.....	41
1.3.3.2.1 Molekül ağırlığı, zincir uzunluğu ve yapısı.....	41
1.3.3.2.2 Moleküler esneklik.....	41
1.3.3.2.3 Viskozite.....	41
1.3.3.2.4 Şişme, hidrasyon ve jel oluşturma özellikleri.....	42
1.3.3.2.5 Biyoadezif polimerin konsantrasyonu.....	42
1.3.3.3 Ortama ilişkin faktörler.....	42

1.3.4	Biyoadezyon Tayininde Kullanılan Ölçüm Yöntemleri.....	43
1.4	YENİ NESİL MUKOADEZİF POLİMERLER: TİYOLLENMİŞ POLİMERLER (TİYOMERLER).....	44
1.4.1	Tiyomerlerin Sınıflandırılması.....	45
1.4.1.1	Anyonik tiyomerler.....	45
1.4.1.2	Kasyonik tiyomerler.....	46
1.4.2	Tiyomerlerin Özellikleri.....	48
1.4.2.1	Mukoadezif özellikleri.....	48
1.4.2.2	Kohezif özellikleri.....	54
1.4.2.3	Enzim inhibitör özellikleri.....	55
1.4.2.4	Permeasyon artırıcı özellikleri.....	56
1.4.2.5	Stabilite ve güvenilirlik.....	60
1.4.3	Tiyomerler İle Hazırlanan Dozaj Şekilleri.....	61
1.4.3.1	Matriks tabletler.....	61
1.4.3.2	Mikro ve nano-partiküller.....	62
1.4.3.3	Jeller.....	67
1.4.3.4	Sıvı formülasyonlar.....	68
1.5	RİBOFLAVİN.....	70
1.5.1	Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	70
1.5.2	Farmakokinetik Özellikleri.....	71
1.5.3	Etki Mekanizması.....	72
1.5.4	Kullanılışı ve Yan Etkileri.....	72
1.5.5	Riboflavin ile Yapılmış Bazı Araştırmaların Özetleri.....	72
1.5.6	Farmakopelerde Kayıtlı Preparatları.....	75
1.5.7	Türkiye'deki Ticari Preparatları.....	75
II.	BÖLÜM.....	76
2	PRATİK ÇALIŞMALAR.....	76
2.1	KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER.....	76
2.1.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	76
2.1.2	Kullanılan Araçlar.....	77
2.2	KULLANILAN TAMPONLAR VE ÇÖZELTİLER.....	78
2.2.1	Enzimsiz Suni Mide Vasatı Hazırlanması (pH 1.2).....	78
2.2.2	0.5 M pH 8.0 Fosfat Tamponu (Ellman Tamponu) Hazırlanması.....	78
2.2.3	Ellman Reaktif Hazırlanması.....	79
2.2.4	TNBS Çözeltisi Hazırlanması.....	79
2.2.5	Tris-Tamponu Hazırlanması.....	79
2.2.6	Ussing Tamponu Hazırlanması.....	80
2.2.7	HEPES Tamponu Hazırlanması.....	80
2.3	RİBOFLAVİN ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR.....	81
2.3.1	RF5'PNa'nın Florometrik Miktar Tayininde Kullanılmak Üzere Standart Doğrularının Hazırlanması.....	81
2.3.1.1	RF5'PNa'nın florometrik miktar tayininde kullanılmak üzere enzimsiz suni mide vasatındaki (pH 1.2) standart doğrularının çizilmesi.....	81
2.3.1.2	RF5'PNa'nın florometrik miktar tayininde kullanılmak üzere HEPES tamponunda (pH 7.4) standart doğrusunun çizilmesi.....	81
2.3.2	Miktar Tayini Yönteminin Analitik Validasyonu.....	82
2.3.2.1	Doğrusallık.....	83
2.3.2.2	Doğruluk ve geri elde edilebilirlik.....	83
2.3.2.3	Kesinlik.....	84
2.3.2.3.1	Tekrar edilebilirlik.....	84

2.3.2.3.2	Tekrar elde edilebilirlik	84
2.3.2.4	Özgünlük, seçicilik	85
2.3.2.5	Stabilite	85
2.4	POLİMER SENTEZİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR	86
2.4.1	PAA-Sistein Konjugatının Sentezlenmesi Üzerine Çalışmalar	86
2.4.2	Kitozan-TBA Konjugatının Sentezlenmesi Üzerine Çalışmalar.....	87
2.4.3	Sentezlenen Polimerlerde Yapılan Kontroller.....	88
2.4.3.1	Ellman testinde kullanılmak üzere L-sisteinin 0.5 M pH 8 fosfat tamponu (Ellman tamponu) içerisinde standart doğrusunun çizilmesi	88
2.4.3.2	TNBS testinde kullanılmak üzere L-sisteinin %0.5 NaCl çözeltisi içerisinde standart doğrusunun çizilmesi.....	89
2.4.3.3	Disüfit bağı testinde kullanılmak üzere L-sisteinin Tris-tamponu içerisinde standart doğrusunu çizilmesi	89
2.4.3.4	Sentezlenen PAA-sistein konjugatında yapılan kontroller	90
2.4.3.4.1	Ellman testi	90
2.4.3.4.2	TNBS testi	90
2.4.3.4.3	Disüfit bağı testi.....	91
2.4.3.5	Sentezlenen kitozan-TBA konjugatıda yapılan kontroller.....	91
2.4.3.5.1	Ellman testi	91
2.4.3.5.2	Disüfit bağı testi.....	92
2.5	RİBOFLAVİNİN SIÇAN MİDE MUKOZASINDAN GEÇİŞ ÇALIŞMALARI	93
2.6	FORMÜLASYON ÇALIŞMALARI	95
2.6.1	Tablet Formülasyonları	95
2.6.1.1	Tablet formülasyonlarının hazırlanması	95
2.6.1.2	Tabletlerde yapılan farmasötik kontroller	95
2.6.1.2.1	Ağırlık sapması kontrolü	95
2.6.1.2.2	Sertlik kontrolü	96
2.6.1.2.3	Ufalanma-aşınma (friabilite) kontrolü	96
2.6.1.2.4	Çap ve kalınlık kontrolü.....	96
2.6.1.3	İn vitro dağılma çalışması	96
2.6.1.4	Tabletlerde yapılan su absorplama kapasitesi çalışması.....	97
2.6.1.5	Tabletlerin mukoadezif kuvvetlerinin tayini	98
2.6.1.6	Tabletlerin mukoadesyon sürelerinin tayini.....	100
2.6.1.7	Tablet formülasyonlarından RF5'PNa'nın in vitro çözünme profilinin incelenmesi	101
2.6.1.8	Tabletlerde yapılan in vivo çalışmalar	101
2.6.2	Partikül Formülasyonları.....	105
2.6.2.1	Partikül formülasyonlarının hazırlanması	105
2.6.2.2	Hazırlanan partikül formülasyonlarda yapılan kontroller.....	106
2.6.2.2.1	Partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyeli ölçümleri ...	106
2.6.2.2.2	Partiküllerin yüzey morfolojisi tayini	106
2.6.2.2.3	Partiküllerin içinde bulunan RF5'PNa miktarının belirlenmesi... ..	106
2.6.2.2.4	Partiküllerde yapılan su absorplama kapasitesi çalışması.....	107
2.6.2.2.5	Partikül formülasyonlarından RF5'PNa'nın in vitro çözünme profilinin incelenmesi	107
2.6.2.2.6	Partikül formülasyonlarının mukoadesyon çalışmaları	108
2.7	SONUÇLARIN İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ....	109

III. Bölüm.....	110
3 BULGULAR.....	110
3.1 RİBOFLAVİNİN FLOROMETRİK MİKTAR TAYİNİNDE KULLANILMAK ÜZERE STANDART DOĞRULARININ HAZIRLANMASINA AİT BULGULAR	110
3.1.1 RF5'PNa'ın Florometrik Miktar Tayininde Kullanılmak Üzere pH 1.2 Suni Mide Vasatındaki Standart Doğrularının Çizilmesine Ait Bulgular.....	110
3.1.2 RF5'PNa'ın Florometrik Miktar Tayininde Kullanılmak Üzere pH 7.4 HEPES Tamponunda Standart Doğrusunun Çizilmesine Ait Bulgular	112
3.1.3 Miktar Tayini Yönteminin Analitik Validasyonuna Ait Bulgular ...	113
3.1.3.1 Doğrusallık çalışmalarına ait bulgular	113
3.1.3.2 Doğruluk ve geri elde edilebilirlik çalışmalarına ait bulgular.....	113
3.1.3.3 Kesinlik çalışmalarına ait bulgular	115
3.1.3.3.1 Tekrar edilebilirlik çalışmalarına ait bulgular	115
3.1.3.3.2 Tekrar elde edilebilirlik çalışmalarına ait bulgular.....	117
3.1.3.4 Özgünlük, seçicilik çalışmalarına ait bulgular	118
3.1.3.5 Stabilite çalışmalarına ait bulgular	118
3.2 SENTEZLENEN POLİMERLERDE YAPILAN KONTROLLERE AİT BULGULAR	120
3.2.1 Ellman Testinde Kullanılmak Üzere L-Sisteinin 0.5 M pH 8 Fosfat Tamponu İçerisinde Standart Doğrusunun Çizilmesine Ait Bulgular	120
3.2.2 TNBS Testinde Kullanılmak Üzere L-Sisteinin %0.5 NaCl Çözeltisi İçerisinde Standart Doğrusunun Çizilmesine Ait Bulgular	121
3.2.3 Disülfid Bağı Testinde Kullanılmak Üzere L-Sisteinin Tris-Tamponu İçerisinde Standart Doğrusunu Çizilmesine Ait Bulgular.....	122
3.2.4 Sentezlenen PAA-Sistein Konjugatında Yapılan Kontrollere Ait Bulgular	123
3.2.4.1 Ellman testine ait bulgular.....	123
3.2.4.2 TNBS testine ait bulgular.....	123
3.2.4.3 Disülfid bağı testine ait bulgular	123
3.2.5 Sentezlenen Kitozan-TBA Konjugatında Yapılan Kontrollere Ait Bulgular	124
3.2.5.1 Ellman Testine Ait Bulgular.....	124
3.2.5.2 Disülfid Bağı Testine Ait Bulgular.....	124
3.3 RİBOFLAVİNİN SIÇAN MİDE MUKOZASINDAN GEÇİŞ ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR	126
3.4 FORMÜLASYON ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR	128
3.4.1 Tablet Formülasyonlarına Ait Bulgular	128
3.4.1.1 Tabletlerde yapılan farmasötik kontrollere ait bulgular.....	128
3.4.1.2 İn vitro dağılma çalışmasına ait bulgular	128
3.4.1.3 Tabletlerde yapılan su absorplama kapasitesi çalışmasına ait bulgular	129
3.4.1.4 Tabletlerin mukoadhezif kuvvetlerinin tayinine ait bulgular.....	131
3.4.1.5 Tabletlerin mukoadhezyon sürelerinin tayinine ait bulgular	131
3.4.1.6 Tablet formülasyonlarından RF5'PNa'ın in vitro çözünme profilinin incelenmesine ait bulgular	132
3.4.1.7 Tabletlerde yapılan in vivo çalışmalara ait bulgular.....	132
3.4.2 Partikül Formülasyonlarına Ait Bulgular.....	135
3.4.2.1 Partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyeli ölçümlerine ait bulgular	135

3.4.2.2	Partiküllerin yüzey morfolojisi tayinine ait bulgular.....	136
3.4.2.3	Partiküller içinde bulunan RF5'PNa miktarının belirlenmesine ait bulgular	137
3.4.2.4	Partiküllerde yapılan su absorplama kapasitesi çalışmasına ait bulgular	137
3.4.2.5	Partikül formülasyonlarından RF5'PNa'nın in vitro çözünme profilinin incelenmesine ait bulgular.....	138
3.4.2.6	Partikül formülasyonlarının mukoadesyon çalışmalarına ait bulgular	138
IV. BÖLÜM		140
TARTIŞMA VE SONUÇ		140
V. BÖLÜM		169
ÖZET		169
ABSTRACT		172
VI. BÖLÜM		175
YARARLANILAN KAYNAKLAR		175
ETİK KURUL KARARI		197
ÖZGEÇMİŞ		198
TEZ ÇALIŞMASINDAN HAZIRLANAN MAKALELER		199
TEZ ÇALIŞMASINDAN SUNULAN POSTER BİLDİRİLERİ		201

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Mide motilitesi üzerine etkili olan gastrointestinal hormonlar.....	10
Tablo 2. Duodenumda yer alan reseptörlere yiyecek ve içeceklerin etkisi.....	10
Tablo 3: Adezif bağlanma üzerine değişik parametrelerin etkisi.....	38
Tablo 4. Tiyomerlerin ve modifiye edilmemiş polimerlerin mukoadezif özelliklerinin karşılaştırılması.....	50
Tablo 5. Bazı tiyomerlerin modifiye edilmemiş polimerlere kıyasla hayvan mukozal dokuları üzerine permeasyon artırıcı etkileri	59
Tablo 6. RF5'PNa'ın enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde 0.781-25 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen standart doğrusu için doğruluk ve geri elde edilebilirlik testine ait veriler	114
Tablo 7. RF5'PNa'ın enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde 3.125-100 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen standart doğrusu için doğruluk ve geri elde edilebilirlik testine ait veriler	114
Tablo 8. RF5'PNa'ın HEPES tamponu (pH 7.4) ortamında yapılan doğruluk ve geri elde edilebilirlik testine ait veriler	115
Tablo 9. RF5'PNa'ın enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde 0.781-25 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen standart doğrusu için yapılan tekrar edilebilirlik testi sonuçları	116
Tablo 10: RF5'PNa'ın enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde 3.125-100 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen standart doğrusu için yapılan tekrar edilebilirlik testi sonuçları.....	116
Tablo 11. RF5'PNa'ın HEPES tamponunda (pH 7.4) yapılan tekrar edilebilirlik testi sonuçları	116
Tablo 12. RF5'PNa'ın enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde 0.781-25 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen standart doğrusu için tekrar elde edilebilirlik testi sonuçları	117
Tablo 13. RF5'PNa'ın enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde 0.781-25 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen standart doğrusu için tekrar elde edilebilirlik testi sonuçları	117
Tablo 14. RF5'PNa'ın HEPES tamponunda (pH 7.4) yapılan tekrar elde edilebilirlik testi sonuçları.....	118
Tablo 15. RF5'PNa'ın enzimsiz suni mide vasatında (pH 1.2) yapılan stabilite testi sonuçları	119
Tablo 16. RF5'PNa'ın HEPES tamponunda (pH 7.4) yapılan stabilite testi sonuçları	119
Tablo 17. Sentezlenen konjugatlara immobilize olan serbest tiyol grubu miktarları ve disülfid bağı şeklinde bulunan okside olmuş tiyol grubu miktarları	125
Tablo 18. Permeasyon katsayısı (P_{app}) değerlerine ait bulgular	127
Tablo 19. Tabletlerde yapılan kontrollerin sonuçları.....	128
Tablo 20. Hazırlanan tablet formülasyonlarının mukoadesyon kuvvetlerinin tayinine ait bulgular.....	131
Tablo 21. Partiküllerin ortalama partikül çapı ve zeta potansiyeli değerleri	135

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Sindirim sisteminin anatomik yapısının şematik olarak gösterilmesi.....	3
Şekil 2. Midenin anatomik yapısının şematik gösterilmesi	4
Şekil 3. Midenin asit sekresyonu kontrolünün şematik gösterimi.....	12
Şekil 4: HBS sisteminden etkin maddenin salım aşamaları.....	19
Şekil 5: İki tabakalı efervesan sistemlerin yapısal özellikleri (a) ve yüzme mekanizmaları (b).....	20
Şekil 6: Efervesan özellikte yüzen ilaç taşıyıcı sistemlerin şematik görünümü.....	21
Şekil 7. Midede çöken yüksek dansiteli sistemlerin şematik olarak gösterilmesi.....	24
Şekil 8. Değişik geometrik şekillerdeki katları açılan sistemler	26
Şekil 9. Midede katları açılarak genişleyen sistem.....	26
Şekil 10. Midede açılarak genişleyen çok tabakalı ilaç şeklinin polimerik tabakalarının şematik gösterimi.....	27
Şekil 11. Midede açılarak genişleyen çok tabakalı ilaç şeklinin üstten çekilmiş fotoğrafı.....	27
Şekil 12. Şişerek büyüklüğü artan sistem	28
Şekil 13. Kuru halde yutulan hidrojelın şişmesi ve ardından midede kalış süresinin uzatılmasının şematik gösterimi.	29
Şekil 14. Çok gözenekli hidrojellerin kuru ve su alarak şişmiş halinin gösterilmesi.....	30
Şekil 15. Manyet içeren basınçla kaplanmış tabletin şematik gösterimi.	32
Şekil 16: Mukozaya yapışarak kontrollü salım sağlayan biyoadeziv sistemlerin şematik görünümü	38
Şekil 17: Müsin glikoprotein moleküllerinin şematik yapısı	40
Şekil 18. Tiyollenmiş polimerlerin (= tiyomerlerin) yapısının şematik gösterilmesi.....	44
Şekil 19. Bazı anyonik tiyomerlerin kimyasal yapısı	46
Şekil 20. Bazı katyonik tiyomerlerin kimyasal yapısı	47
Şekil 21. Mukus glikoproteinleri (müsinler) ile tiyomerler arasında disülfid bağlarının oluşum mekanizması.....	48
Şekil 22. Mukoadezyonun in situ çapraz bağlanma ile zincir bağlanmasına kıyasla artırılması	53
Şekil 23. Kitozan-4-tiyobutilamidin konjugatı jelinin [%1.5 (a/h)] pH 5.5’de ve 37°C’de elastik özelliklerinin artışının zamana bağlı gösterilmesi	54
Şekil 24. Sıkı bağların açılma ve kapanmasından sorumlu olan enzimler.....	57
Şekil 25. Tiyollenmiş poli(akrilik asit) mikrokürelerinin SEM görüntüsü.....	64
Şekil 26. RF5’PNa RF5’PNa’ın (C ₁₇ H ₂₀ N ₄ NaO ₉ P.2H ₂ O) açık kimyasal yapısı.....	71
Şekil 27. PAA-sistein konjugatının sentez basamaklarının şematik olarak gösterilmesi	87
Şekil 28. Kitozan-TBA konjugatının sentez basamaklarının şematik olarak gösterilmesi	88
Şekil 29. Ussing tipi hücrelerin görünümü	93
Şekil 30. RF5’PNa’ın Ussing tipi hücreler ile yapılan mide mukozasından in vitro geçiş çalışmalarının şematik görünüşü	94
Şekil 31. Tabletlerde yapılan su absorplama kapasitesi çalışmasının şematik görünümü	97
Şekil 32. Texture Profile Analyzer cihazının görünüşü.....	98
Şekil 33. Tabletlerin mukoadezyonlarının tayininde kullanılan kuvvet-mesafe eğrisi	99

Şekil 34. Tabletlerin mukoadazyon sürelerinin tayininde kullanılan döner silindir yönteminin şematik görünümü	100
Şekil 35. Tablet formülasyonlarının sıçanların ağız boşluğunun ilerisine yerleştirilmesi	103
Şekil 36. Sıçanlara bir miktar su verilerek yutma refleksleri harekete geçirilmesi..	103
Şekil 37. Sıçanlara mide gavağı yapılması	104
Şekil 38. Sıçanların karın boşluklarının açılarak midelerinin çıkartılması.....	104
Şekil 39. Partiküllerin mukoadazyon çalışmasının şematik olarak gösterilmesi	109
Şekil 40. RF5'PNa'nın enzimsiz suni mide vasatında (pH 1.2) 0.781-25 µg/mL konsantrasyon aralığındaki standart doğrusu	110
Şekil 41: RF5'PNa'nın enzimsiz suni mide vasatında (pH 1.2) 3.125-100 µg/mL konsantrasyon aralığındaki standart doğrusu	111
Şekil 42. RF5'PNa'nın pH 7.4 HEPES tamponundaki standart doğrusu.....	112
Şekil 43. L-sisteinin 0.5 M pH 8 fosfat tamponu içerisindeki standart doğrusu.....	120
Şekil 44. L-sisteinin %0.5 NaCl çözeltisi içerisindeki standart doğrusu.....	121
Şekil 45. L-sisteinin Tris-tamponu içerisindeki standart doğrusu.....	122
Şekil 46: Mide mukozasından geçen RF5'PNa miktarının karşılaştırmalı olarak gösterilmesi (Δ PAA, ▲ PAA+GSH, □ PAA-sistein, ■ PAA-sistein+GSH).....	126
Şekil 47: Mide mukozasından geçen RF5'PNa miktarının karşılaştırmalı olarak gösterilmesi (Δ kitozan, ▲ kitozan+GSH, □ kitozan-TBA, ■ kitozan-TBA+GSH).....	127
Şekil 48. Tabletlerin in vitro dağılma çalışmaları sonuçları	129
Şekil 49. Modifiye edilmemiş PAA (□) ve kitozan (Δ) tabletlerinin 37°C'de enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisindeki su absorplama oranları	129
Şekil 50. Tiyollenmiş PAA-sistein (■) ve kitozan-TBA (▲) tabletlerinin 37°C'de enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisindeki su absorplama oranları.....	130
Şekil 51. Enzimsiz suni mide vasatına (pH 1.2) bırakılan PAA-sistein tabletlerinin resimleri (A: t=6. saat; B: t=0. saat)	130
Şekil 52. Enzimsiz suni mide vasatına (pH 1.2) bırakılan kitozan-TBA tabletlerinin resimleri (A: t=6. saat; B: t=0. saat)	130
Şekil 53. PAA (□), PAA-sistein (■), kitozan (Δ) ve kitozan-TBA (▲) tabletlerinden RF5'PNa'nın çözünme profillerinin karşılaştırmalı olarak gösterilmesi	132
Şekil 54. İn vivo çalışmaların 5. saatinde şişmiş PAA-sistein tabletlerinin sıçan midesinde görünümü (A) ve in vivo çalışmaların 6. saatinde dağılmış PAA-sistein tabletlerinin görünümü (B).....	134
Şekil 55. İn vivo çalışmaların 5. saatinde şişmiş kitozan-TBA tabletlerinin sıçan midesinde görünümü (A) ve in vivo çalışmaların 6. saatinde dağılmış kitozan-TBA tabletlerinin görünümü (B).....	134
Şekil 56. PAA (beyaz bar) ve PAA-sistein (siyah bar) partiküllerinin büyüklük dağılımı	135
Şekil 57. Kitozan (beyaz bar) ve kitozan-TBA (siyah bar) partiküllerinin büyüklük dağılımı	136
Şekil 58. PAA (A), PAA-sistein (B), kitozan (C), kitozan-TBA (D) partiküllerinin SEM fotoğrafları.....	136
Şekil 59. PAA, PAA-sistein, kitozan ve kitozan-TBA partiküllerinin pH 1.2 suni mide vasatındaki su absorplama çalışmasına ait sonuçlar	137
Şekil 60. PAA (□), PAA-sistein (■), kitozan (Δ) ve kitozan-TBA (▲) partiküllerinden RF5'PNa'nın in vitro çözünme profillerinin karşılaştırmalı olarak gösterilmesi	138
Şekil 61. PAA (□), PAA-sistein (■), kitozan (Δ) ve kitozan-TBA (▲) partiküllerinin mukoadezif özellikleri	139

GİRİŞ VE AMAÇ

Gastrointestinal kanal, ilaçların sistemik dolaşıma verilmesinde halen en önemli yol olarak kabul edilmektedir. Ancak oral uygulanan bazı ilaçların biyoyararlanımı, ilacın üst gastrointestinal kanalda kalış süresinin kısa olması nedeniyle sınırlıdır. Eğer, üst gastrointestinal kanaldan emilen bir ilacın formülasyonu, ilaç salımı bitmeden gastrointestinal sistemin alt kısımlarına geçerse ilacın absorpsiyonu ve biyoyararlanımı azalır. Bu nedenle midede kalış süresi uzatılmış ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesiyle bu tip ilaçlar için daha uzun absorpsiyon süresi ve artan biyoyararlanım oranı sağlanabilir.

İlaçların midede kalış süresinin uzatılması amacıyla dansite kontrollü sistemler, midede şişerek büyüklüğü pilordan geçemeyecek kadar artan sistemler, manyetik sistemler ve mukoza yüzeyine yapışan biyoadezif sistemler gibi çok değişik yöntem geliştirilmiştir. Bu önerilen yöntemler içerisinde, mide mukozasına yapışan biyoadezif sistemler ile ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. Ancak bu sistemler, kullanılan biyoadezif polimerlerin mukoadezif özelliklerinin yetersiz olması nedeniyle istenilen potansiyele tam olarak ulaşamamışlardır. Mukoadezif özellikleri iyileştirmek ve dolayısıyla mide mukozasında kalış süresini uzatmak için daha etkili mukoadezif sistemlere ihtiyaç vardır.

Tiyollenmiş polimerler veya bilinen diğer adıyla tiyomerler, yeni nesil biyoadezif polimerler olarak kabul edilen, güçlü mukoadezif özellik gösteren hidrofilik makromoleküllerdir. Poli(akrilatlar), polikarbofil, aljinat veya kitozan gibi iyi bilinen mukoadezif polimerlerin zincirlerine tiyol taşıyıcı fonksiyonel grupların immobilizasyonu ile elde edilirler. Tiyomerlerin geliştirilmiş mukoadezif özellikleri, taşıdıkları bu tiyol grupları ile mukus glikoproteinlerinin sistein yönünden zengin

yan grupları arasında tiyol/disülfid değişim reaksiyonuna ve/veya basit oksidasyon yöntemi ile kovalent bağların oluşmasına dayanmaktadır. Ayrıca tiyomerler, polimer zincirleri içinde ve arasında oluşan disülfid bağları sayesinde hazırlanan formülasyonların kohezif özelliklerini artırır ve ilacın kontrollü bir şekilde salınmasını sağlarlar. Bunların yanında, tiyollenmiş polimerlerin enzim inhibe edici ve permeasyonu artırıcı özellikleri de bilinmektedir.

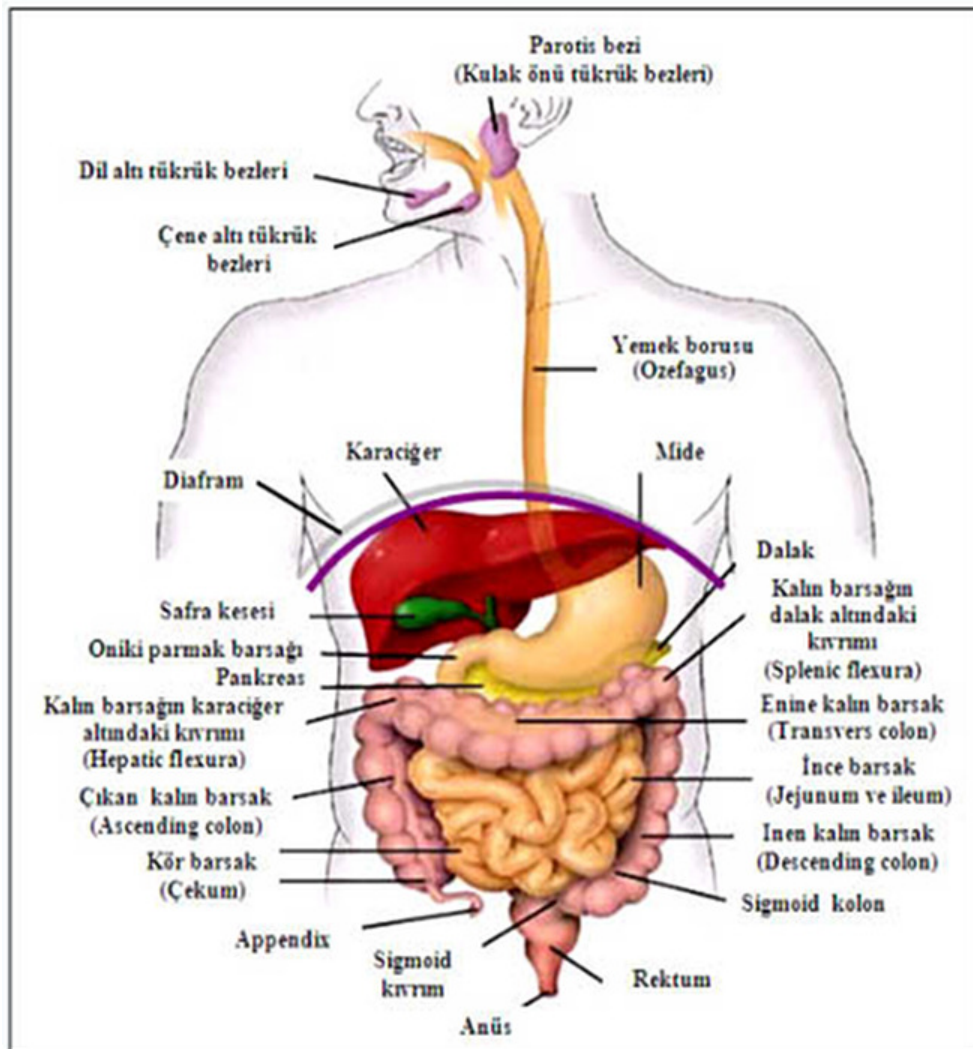
Bu çalışmanın amacı, model ilaç olarak riboflavin-5'-monofosfat sodyum tuzu dihidrat kullanılarak gastrik mukoadezif formülasyonların hazırlanması ve etkinliklerinin incelenmesidir. Bu amaç için öncelikle, anyonik özellikte tiyollenmiş poli(akrilik asit)-sistein konjugatı ve katyonik özellikte tiyollenmiş kitozan-4-tiyobutilamidin konjugatı sentezlenmesi ve kimyasal karakterizasyonlarının yapılması planlandı. Daha sonra, riboflavin-5'-monofosfat sodyum tuzu dihidrat'ın sıçan mide mukozasından geçişi üzerine modifiye edilmiş ve edilmemiş polimerlerin etkisinin, permeasyon artırıcı özellikleri bilinen L-glutasyon ile birlikte incelenmesi planlandı. Ayrıca, sentezlenen tiyomerler ile gastrik mukoadezif matriks tabletler ve partiküler formülasyonlar hazırlanması ve bunların özelliklerinin modifiye edilmemiş poli(akrilik asit) ve kitozan ile hazırlanan formülasyonlar ile karşılaştırılması amaçlandı. Literatür kayıtları incelendiğinde; seçilen model ilaç riboflavinin, tiyomerler kullanılarak gastrik mukoadezif formülasyonlarının hazırlanması üzerine herhangi bir çalışma bulunmadığı görülmüştür. Bu bilgilere dayanarak, daha sonra tablet formülasyonlarında elde edilen in vitro deney sonuçlarının sıçanlarda minitabeller kullanılarak yürütülecek olan in vivo çalışmalar ile desteklenmesi düşünüldü.

I. BÖLÜM

1 GENEL BİLGİLER

1.1 MİDENİN ANATOMİSİ VE FİZYOLOJİSİ

Sindirim sisteminin genel anatomisi şematik olarak Şekil 1’de görülmektedir.



Şekil 1. Sindirim sisteminin anatomik yapısının şematik olarak gösterilmesi

1.1.1 Midenin anatomik bölümleri

Anatomik olarak mide başlıca iki büyük kısım ve bunların alt bölümlerine ayrılır:

1. Pars kardiyaka (dikey mide): Midenin yukarıdan aşağıya ilk 2/3 kısmıdır. Fundus, korpus (gövde) ve insisüra kardiyaka alt bölümlerinden oluşur.
2. Pars pilorika (yatay-horizontal mide): Midenin 1/3 distal kısmıdır. Pilorik antrum (vastibül), pilor kanalı ve insisüra angularis alt bölümlerinden oluşur.

1.1.2 Midenin radyolojik anatomisi

Radyolojik olarak mide; fundus (forniks), korpus, pars pilorika (pilorik antrum) ve pilor kanalı olmak üzere 4 bölgeye ayrılır. Bunlara, “bulbus duodeni” de tamamlayıcı bir parça olarak eklenebilir.

1.1.3 Sekresyon fizyolojisi yönünden midenin bölümleri

Sekresyon fizyolojisi yönünden ise mide başlıca iki bölüme ayrılır:

1. Proksimal kısım: HCl, pepsin ve mukus salgılar. Bu kısma “fundus bezleri bölgesi” de denir. Bu bölge kabaca *pars kardiyaka*’ya karşılık gelir.
2. Distal kısım: Mukus (dış salgı) ve gastrin (iç salgı) salgılar. Bu bölgeye “pilor bezleri bölgesi” de denir. Kabaca *pars pilorika*’ya karşılık gelir.

1.1.4 Mide duvarının yapısı

Mide duvarı dıştan içe doğru, seroza, kas tabakası, submukoza ve mukoza olmak üzere 4 tabakadan oluşur.

1.1.4.1 Mide mukozası

Mide mukozası, mide fizyopatolojisi açısından en önemli kattır ve midenin iç yüzünü kesintisiz olarak örter. Pilor civarında ince bağırsak mukozasına çevrilir. Sağlıklı insanlarda oldukça sağlam ve dirençlidir. Mide mukozasında ancak büyüteç ile bakılınca görülebilen pek çok çöküntüler vardır. Bunlara “gastrik pit” (*fovea gastrica*) denir ve mukoza yüzeyinin % 25-50’sini oluştururlar. Bunların diplerine mide bezleri açılır. Mide mukozası mikroskopik olarak 4 tabakaya ayrılabilir: 1) yüzey epiteli, 2) mide bezleri tabakası (glandüler tabaka), 3) lamina propria, 4) muskularis mukoza.

Yüzey epiteli, mukozanın iç yüzünü örter. Tek katlı silindirik hücrelerden yapılıdır. Görevi “mukus” salgılamaktır.

Mide bezleri tabakası (Glandüler tabaka), aşağıda anlatılacak 3 tip mide bezini oluşturan veya bu bezlerin yapısında yer alan çeşitli tipten hücreler vardır. Bu hücreler şöyle sıralanabilir:

- a. Mukus hücreleri
- b. Mukus boyun hücreleri
- c. Diferansiye olmamış boyun hücreleri
- d. Paryetal hücreler (HCl yaparlar) veya kenar hücreleri
- e. Peptik hücreler veya esas hücreler
- f. Endokrin hücreler: Bu güne kadar bulunan endokrin hücre tipleri şunlardır:
 - G (Gastrin) hücreleri: Gastrin oluştururlar.
 - EC (Enterochromaffin) hücreleri: Substance P ve Motilin oluştururlar.
 - D (veya A1) hücreleri: Somatostatin yaparlar.
 - P hücreleri: Bombesin yaparlar.
 - Enterochromaffin’e benzer hücreler: Bilinen bir hormonları yoktur.

Mide bezleri tabakasında kardial bezler, fundus bezleri ve pilor bezleri olmak üzere 3 tip bez vardır.

1. Kardia Bezleri: Bu bezlerde mukus hücreleri vardır ve mukus maddeleri ile az miktarda elektrolitler salgırlar.
2. Fundus Bezleri (Oksintik bezler): Mide mukozasında fonksiyonları bakımından en önemli olan bezler bunlardır. Kardial ve pilor bezleri bölgeleri arasında kalan total mide mukozasının %75-80'ini kaprlarlar. Fundus bezlerinde sekresyon yapan en az 5 tip hücre tespit edilmiştir. Bunlar:
 - a. Boyun mukus hücreleri: Boyundaki parietal hücreler arasında ve her fundus bezinin üst kısmında yer alrlar. Sayıları nispeten azdır.
 - b. “Gastrik pit”leri örten epitel hücreleri ile bu bezlerin boyun bölgesinin birleştiği yerde differansiye olmamış boyun hücreleri bulunur. Bunların oksintik bez hücrelerinin ve yüzey epitelinin “ana” hücreleri olduğu sanılmaktadır.
 - c. Parietal hücreler (Kenar hücreleri, oksintik hücreler): “Gastrik pit”in hemen altında ve bezin üst yarısında bulunurlar. Görevi konsantre HCl oluşturmaktır.
 - d. Peptik (Esas) hücreler: Bez tübülüslerinin alt yapısında bulunurlar. Sitoplazmalarında pepsin ön maddesi olan pepsinojen granüller halinde görülür.
 - e. Çeşitli tipte endokrin hücreleri: Bu hücreler genellikle bazal membranla peptik hücreler arasında serpiştirilmiştir. Bu hücreler ürünlerini ya çevredeki ekstraselüler sıvı içine dökerler ya da kan dolaşımının içine dökerler.
3. Pilor Bezleri: Midenin distal kısmını örteler. Pilor bezleri mukus, kalsiyum fosfat, sodyum ve potasyum bikarbonat ve klorürler gibi bazı elektrolitler salgırlar.

1.1.5 Midenin fizyolojisi

Midenin başlıca önemli iki fizyolojik aktivitesi vardır: Motilite ve Sekresyon.

1.1.5.1 Midenin motilitesi

Mide motilitesinin görevi, yenen ve içilen yiyeceklerin depo edilmelerini, öğütülmesini, birbiri ile ve mide sekresyonu ile karışmalarını sağlayarak bu materyalin duodenuma düzenli bir şekilde geçmesini sağlamaktır. Mide anatomik olarak bu görevini etkin bir şekilde yerine getirmesini sağlayan bütün özelliklere sahiptir. Fazla miktarda yiyecek depo edecek kadar geniştir. Mukozası, sindirime yardım edecek asit ve pepsin (pepsinojen) salgılar. Yiyecekleri öğütecek ve içindekileri duodenuma atacak kadar güçlü kasları vardır.

Midede bu fonksiyonlar birbiri ile ilgili ve birbirini tamamlayan şu iki motor olayla yerine getirilir: 1. Midenin kontraksiyonları, 2. Midenin boşalması

Midenin kontraksiyonları

Midede başlıca 3 tip kontraksiyon görülür:

1. Peristaltik dalgalar: Mide kaslarının kontraksiyonundan doğarlar. Bunların yiyecekleri karıştırma ve ilerletme olmak üzere başlıca iki fonksiyonu vardır. Midede 3 tip basınç dalgası tespit edilmiştir. Bunlara Tip I, II ve III dalgalar denir.

Tip I - Karıştırma (ilk planda)

Tip II - Mide içinde bulunan materyali ilerletme (propülasyon-peristaltizm)

Tip III - Bazal basınç değişiklikleri

2. Sistolojik kontraksiyon: Antrum kaslarının hep birden kontraksiyon yapmasından doğar. Lümen tıkanır ve yiyecekler tekrar mide boşluğuna döner. Bu, yiyeceklerin birbiri ile daha çok ve daha iyi karışmasına yardım eder.

3. Korpusun hacminin küçülmesi: Mide boşaldıkça fundus ve korpus, içinde kalan materyalin hacmine uyarak küçülür. Aç insanlarda mide içindeki boşluk en çok 50 mL kadardır.

Midenin boşalması

Gastrik boşalma mide içeriğinin yapısına bağlı olan gastrik kasılmaların sonucu olarak gerçekleşir ve sıvıların, sindirilebilen ve sindirilemeyen katıların gastrik atılması farklılık gösterir. Sıvılar esas olarak proksimal mide kaynaklı yavaş kasılmalar ile oluşan gastrik basıncın etkisi ile mideden atılır.

Sindirilebilen katılar, önce proksimal midede birikir ve yalnızca kimus adı verilen ince, krem kıvamında bir yapıya dönüştüklerinde mideden atılabilirler. Genel olarak 1-2 mm'den büyük partiküller boyutları küçülünceye kadar midede kalırlar. Mide belli bir miktarda dolunca peristaltik hareketler başlar ve bu sayede yiyecekler pilora doğru ilerler. Distal midedeki peristaltik kasılmalar katı besinlerin mideden atılması için gerekli şekli oluşturmak üzere karıştırma ve öğütme işleminin gerçekleşmesini sağlar. Peristaltik dalga distal *antruma* ulaştığında yiyecekler eğer duodenuma geçecek hale henüz gelmemişler ise, sistolik kontraksiyon sonucu pilorik kanal kapanır ve büyük katı partiküller tekrar mide korpusuna geri gönderilirler (59).

Mide fundusuna “yutma” ile yiyecek ve içecekler girince ve antrum kadar ilerlemiş yiyecekler antral sistol ile antrumun kapanması sonucu tekrar mide korpusuna atılınca “reseptif relaksasyon” meydana gelir. “Reseptif relaksasyon” mideye belli bir hacimde yiyecek ve içecekler girmesine karşın mide için intralüminal basıncın değişmemesini sağlar.

Mide motilitesini ve boşalmasını etkileyen ve düzenleyen mekanizmalar

Midenin motor fonksiyonunu yenen yemekler başlatır. Ancak bu fonksiyonu nöral sinirler ve refleksler, hormonlar, şimik cevaplar ve yiyeceklerin taşıdığı enerjinin yoğunluğu düzenler (Tablo 1).

Tablo 1. Mide motilitesi üzerine etkili olan gastrointestinal hormonlar

Hormonlar	Etkileri
Gastrin	Düz kas aktivitesini stimüle eder, antrum kası üzerine selektif aktivitesi olduğu için burada hızla darlık yapar. Sıvı ve katıların mideden boşalmasını geciktirir. Midenin boşalmasında fizyolojik rolü olabilecek tek G.İ. hormondur.
Motilin	Fundusun motor aktivitesini artırır.
Sekretin	Mide motilitesini azaltırlar. Fizyolojik rollerinin olup olmadığı henüz bilinmemektedir.
VİP (vazoaktif inhibitör peptit)	
Glukagon (pankreatik)	

Mide motilitesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir diğer komponent “reseptörler”dir. Midede bulunan reseptörleri pasif veya aktif kontraksiyon ve intraluminal pH değişikliği stimüle eder. Duodenumda yer alan reseptörleri ise yiyecek ve içecekler etkiler (Tablo 2). Yapılan araştırmalar sonucunda yüksek enerjili yemeklerin mideyi daha yavaş terk ettiği görülmüştür.

Tablo 2. Duodenumda yer alan reseptörlere yiyecek ve içeceklerin etkisi

Yiyecek ve içeceklerin özelliği	Reseptörün yeri	Motiliteye etkisi
Sıvı içinde asit	Duodenum	Boşalmayı geciktirir.
Ozmotik basınç (Elektrolitler, karbonhidratlar, amino asitler)	Duodenum, proksimal jejunum	Ozmolalite yükseldikçe midenin boşalması yavaşlar
Kıvamı	Duodenum, jejunum	Sıvılar, mideyi katılardan daha çabuk terk eder.
Yağ asitleri	Duodenum, jejunum	Mide boşalmasını inhibe eder.

1.1.5.2 Midenin sekresyonu

Mide suyu, su ile değişik oranlarda bir çok organik ve inorganik maddelerin karışımından ibaret kompleks bir sıvıdır. Bazal şartlarda insan midesi 24 saatte 1-1.5 L mide suyu salgılar. Saf mide suyu saydam ve renksizdir. Dansitesi 1002-1007’dir. İçinde az miktarda asit varsa viskozitesi suyunkine eşittir. Aklorhidrik mide suyunun viskozitesi ise içinde fazla mukus bulunduğu için çok daha fazladır. Mide suyunda aşağıda sayılan maddeler bulunur:

1. Su

2. İnorganik maddeler (hidroklorik asit, bikarbonat) ve elektrolitler (Katyonlar: sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum; Anyonlar: klorür, fosfat, sülfat)
3. Organik maddeler (Makromoleküller: pepsin, mukus, intransek faktör)
4. Diğer maddeler (Kan proteinleri, laktik asit, non-protein nitrojen)

Bunlar içinde mide patolojisi yönünden önemli olanlar hidroklorik asit, pepsin ve mukustur.

1.1.5.2.1 Midenin asit ifrazatı

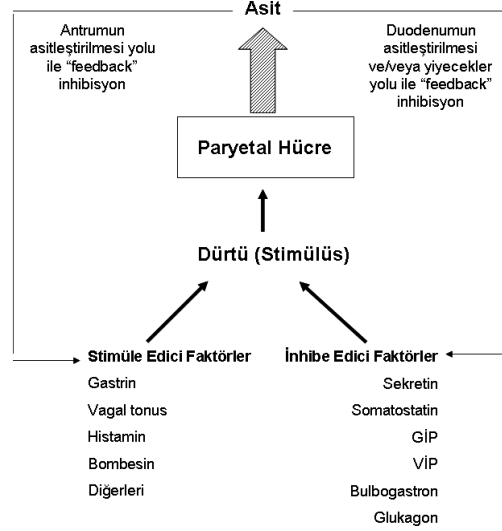
Mide suyunun en önemli komponenti paryetal hücreler tarafından salgılanan hidroklorik asittir (HCl). Paryetal hücrelerin sekresyonunun HCl konsantrasyonu sabittir ve litrede 150-170 mEq'dir. Klinikte yapılan mide suyu analizlerinde ise asit konsantrasyonunun hastadan hastaya değiştiği görülmüştür ancak çoğunlukla litrede 50-60 mEq'i aşmaz.

Asit ifrazatında en önemli olay bu sırada H^+ konsantrasyonunun plazmaya oranla mide suyunda en az 3 milyon kere artmasıdır (plazmada 0.00005 mEq olan H^+ konsantrasyonu mide suyundan 150-170 mEq'a yükselir.). H^+ iyonu ve dolayısıyla HCl sekresyonunu oluşturan mekanizma henüz tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Ancak olayın temelini paryetal hücreler tarafından H^+ iyonunun interstisyel sıvıya ve mide lümenine salgılanması oluşturur.

Vücutta bulunan ve mide sekresyonunu stimüle eden başlıca dört madde vardır: Gastrin, asetilkolin, histamin ve kalsiyum. Bunlar mide sekresyonunun stimülasyonunda birbirlerini etkiler ve etkilerini daha güçlü hale getirirler.

İnsan midesi, günlük hayat ritmi içinde birbirinden farklı 2 durum karşısında HCl salgılar. Bu sebeple HCl sekresyonu *interdijestif* ve *dijestif* olarak ikiye ayrılır.

Midenin asit sekresyonu Şekil 3’te özetlendiği gibi kompleks bir mekanizmalar sistemi tarafından düzenlenmektedir.



Şekil 3. Midenin asit sekresyonu kontrolünün şematik gösterimi

İnterdijestif Mide Sekresyonu

Farkına varılabilen, istemli veya kaçınılabilen hiçbir stimülasyon var olmadan oluşan mide sekresyonudur. Buna “bazal sekresyon” veya “spontan sekresyon” da denir. Bazal sekresyondan sorumlu olan faktörlerin vagal tonusun yaptığı stimülasyon ve devamlı suretle salıverilen az miktarda gastrin olduğu sanılmaktadır.

Dijestif Mide Sekresyonu (Sindirim Sekresyonu)

Yenilen bir yiyeceğe cevap olarak meydana gelen HCl sekresyonudur. Bu sekresyon aşağıda görüldüğü gibi stimülasyonda başlıca rol oynayan mekanizmaların oturduğu yere göre 3 safhaya ayrılır:

- I. Sefalik faz: Mide sekresyonu tamamen nervus vagus aracılığı ile stimüle olur.
- II. Gastrik (antral) faz: Yenen yiyeceklerin mide içinde bulunan reseptörler üzerine etki etmesiyle oluşur. Yiyecekler mideye girer girmez başlar ve yemek bittikten sonra 3-4 saat sürer.

III. İntestinal faz (ince bağırsak fazı): Yiyecekler duodenuma girince başlar ve yiyecekler mideyi tamamen terk ettikten sonra saatlerce sürer.

1.1.5.2.2 Pepsin

Mide özsuyunda bulunan başlıca proteolitik enzimdir. Mide mukozasında inaktif ön maddesi olan pepsinojen (molekül ağırlığı 42000) şeklinde bulunur. Pepsinojen asit ortamda ($\text{pH} < 5$) otokatalitik bir biçimde aktif proteolitik enzim olan pepsine (molekül ağırlığı 35000) dönüşür. Bu sırada kendisinden birkaç küçük peptit ayrılır. Pepsin asit pH 'da aktiftir. pH yükseldikçe pepsinojenin pepsine dönüşü yavaşlar. Nötr veya hafif alkali pH 'larda ($\text{pH} > 6$) pepsin irreversibl şekilde denatüre olur. Pepsinojen kanda ve doku sıvılarında bulunur ve idrarla dışa atılır.

Pepsinojen mide lümenine; bazal şartlarda ve çeşitli uyarıcılara cevap olarak salgılanır. Pepsinojen sekresyonunda esas olarak HCl ifrazatında rol oynayan mekanizmalar mekanizmalar rol oynar.

1.1.5.2.3 İntrinsek faktör (İF)

Molekül ağırlığı yaklaşık 60000 olan bir makroproteindir. B_{12} vitamini ile birleşerek oluşturduğu kompleksler distal ince bağırsaklarda spesifik reseptörlere bağlanır ve böylece B_{12} vitamininin absorpsiyonunu kolaylaştırır.

1.1.5.2.4 Mukus

Mukus midenin iç yüzünü örten saydam, parlak ve yapışkan-jelimsi bir maddedir. Mide yüzey epitelyal hücreleri; mukus boyun hücreleri; kardial ve pilor bezlerinin mukus hücreleri tarafından salgılanan maddelerle bunların degradasyonu

ve erimesinden doğan bazı maddelerin karışımından ibarettir. Mukus sekresyonu devamlıdır.

Midede iki şekilde bulunur:

- a. Görülebilen mukus: mide mukozasının iç yüzünü parlak bir tabaka halinde örter.
- b. Erimiş mukus: mide suyu içinde bulunur.

Mide mukusu içinde proteinler, glikoproteinler, mukopolisakkaritler ve kan grubu maddeleri gibi aktif olan bir çok makromolekülün var olduğu anlaşılmıştır. Klinik yönden mide mukusunun önemi, mukozanın zararlı etkenlere karşı savunulmasına katılmasından ileri gelir.

1.1.5.2.4.1 Mukoza ve mukus engeli

Mide duvarının bir yandan mide içine salgılanan ve içinde asit ve pepsin bulunan mide suyu; diğer yandan mide içine giren diğer zararlı maddelerden (örneğin salisilat gibi bazı ilaçlardan) zarar görmemesini açıklamak için “*iki kademeli mukus engeli*” adı verilen bir savunma teorisi öne sürülmüştür. Bu teoriye göre ilk savunma kademesini mide mukozasının iç yüzünü örten mukus tabakası (buna mukus engeli denir) oluşturur (139).

Mukus engeli

Mide mukozasının iç yüzünü örten ince, parlak mukus tabakasından ibarettir. Bu tabaka biraz kayganlık oluştursa da tam bir fiziki engel teşkil etmez; iritanlara karşı mide mukozasını bir miktar koruyabilir. Su ve H^+ elektrolitlerinin bile içinden geçmelerine pek az karşı koyabilir. Bazal şartlarda tampon edici etkisi asidi bir miktar nötralize eder ve pepsinin aktivitesini inhibe edebilir. Fakat mide sekresyonu stimüle olunca oluşan HCl konsantrasyonunda bu özelliklerin mide duvarının korunmasında önemli bir etkisi kalmaz. Normal şartlarda midenin iç yüzünü örten

mukus tabakası devamlı suretle mukozadan ayrılır ve yerini yeni oluşan mukus alır. Mukusun ayrılıp gitme hızı, yeni mukus sekresyonu hızını aşarsa ilk savunma kademesi parçalanır ve saldırıyı karşılama görevini ikinci savunma kademesi “mukoza engeli” üstlenir.

Mukoza engeli

Mukoza engelini yüzey epitel hücrelerinin apikal lipoprotein membranı ve mukoza hücreleri arasındaki “*sıkı birleşme-tight junction*”lar teşkil eder. Bu engel yüzünden H^+ iyonları mide mukozasına pek az girebilir (mide mukozasının H^+ iyonlarına karşı permeabilitesi azdır) ve içinde asit-pepsin bulunan mide suyu, mide duvarına zarar vermeden mide içinde kalabilir. Bu “mukoza engeli”, hiç aşılamaz bir engel değildir. Endojen ve ekzojen bir çok maddelerin bu engele zarar verdikleri tespit edilmiştir. Bu engelin parçalanması, gastrointestinal kanamaların gelişmesine, kronik gastrit ve mide ülseri oluşumuna kadar varabilen ciddi fizyopatolojik değişiklikler meydana getirebilir.

1.2 MİDEDE TUTULAN SİSTEMLER

Oral yolla kontrollü salımı istenen çoğu ilacın midede uzun süre kalması, çözünme ve absorpsiyon açısından avantaj sağlayabilir. Midede tutulan sistemler bazı etkin maddelerin biyoyararlanımının artmasında özellikle çok etkilidir. Bunlar:

- Mide pH sında çözünen, bağırsağın nötral veya alkali ortamında çözünmeyen ilaçlar: Taşıyıcı sistemin bağırsağa geçişi ilacın çözünmesini ve absorpsiyonunun olumsuz etkiler (örneğin; klordiazepoksit hidroklorür).
- Midede yerel etki göstermesi istenen ilaçlar (örneğin antasitler).
- Yalnızca belli bir bölgede, ince bağırsağın üst bölümünde absorbe olan ilaçlar: Vitaminler, mineraller v.b. ilaçları taşıyan sistemler optimum absorpsiyon bölgesini geçtikten sonra uygun kan düzeyi sağlayamaz. Bu bölgeyi geçişleri geciktirilmelidir.
- Sindirim sisteminde çözünürlüğü az olan ilaçlar: Geçiş süresinin uzamasıyla biyoyararlanımları artar.
- Absorpsiyon hızı düşük olan ilaçlar: Geçiş yavaşlatılamaz ise yeterince madde absorbe olmadan atılır (59).

İlaç taşıyıcı sistemlerin mideden boşalmasını geciktirmek için çeşitli sistemler geliştirilmiştir:

- **Dansite kontrollü sistemler (Midede yüzen düşük dansiteli sistemler ve midede çöken yüksek dansiteli sistemler)**
- **Midede şişerek büyüklüğü pilordan geçemeyecek kadar artan sistemler**
- **Manyetik sistemler**
- **Mukoza yüzeyine yapışan biyoadezif sistemler**

1.2.1 Dansite Kontrollü Sistemler

1.2.1.1 Midede yüzen düşük dansiteli sistemler

Bu sistemlerde, ilaç şeklinin dansitesinin suyun dansitesinden düşük olması mide sıvısında yüzmesini sağlamaktadır. İlaç şekli yüzer konumdayken, midenin üst kısmında *fundusa* yakın bölgede yer alacağı için pilorik açıklıktan uzak kalmış olur. Bu durum, uzun gastrik kalış süresi ve esas olarak GI sistemin üst bölgelerinde emilen etkin maddelerin biyoyararlanımında artış sağlamaktadır. İlaç taşıyıcı sistem gastrik sıvıda yüzerken, etkin madde belirlenen hızda yavaşça salınmaktadır. İlaç şeklinin yüzme kabiliyeti, ilaç şekli tamamen battığında yukarı doğru çeken güç ile yerçekimi gücü (ağırlık) arasındaki fark olan bileşke ağırlıkla tayin edilmektedir. Bu fark pozitif olduğunda cisim yüzecektir (59).

Yapılan çalışmalar, yüzen birimlerin gastrik kalış süresini önemli derecede artırabilmesi için midede besinlerin varlığına ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir. Ayrıca, besinlerin yapılarına, kalori içeriklerine ve alınma sıklıklarına göre ilaç şekillerinin midedeki kalış süresine etkileri değişmektedir.

Oth ve arkadaşları (147) tarafından yapılan bir çalışmada, misoprostolün iki tabakalı yüzen kapsülünün ortalama gastrik kalış süresinin hafif bir öğünden (kahvaltı gibi) sonra 199 ± 69 dakika olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, yeterli sayıdaki öğünden sonra ölçülen veriler, ortalama kalış süresinin 618 ± 208 dakikaya çıktığını göstermiştir.

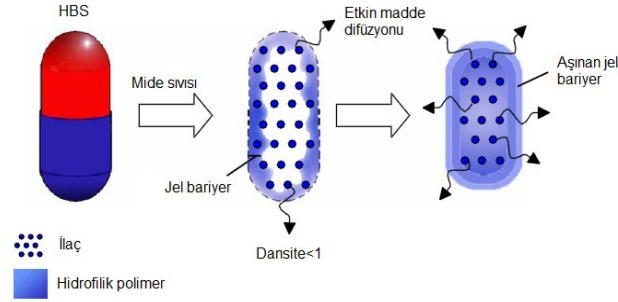
Agyilirah ve arkadaşlarının (1) yaptıkları çalışmada, besin varlığında, yüzen tabletlerin mideden atılma süresinin 6 saatin üzerinde uzadığı; bununla birlikte, açlık durumunda, yüzen tabletlerin mideden atılma süresinin uzamadığı tespit edilmiştir. Açlık durumundaki hızlı boşalma, sindirilmemiş maddeleri mideden etkili şekilde süpüren güçlü kasılma aktivitesine bağlanmıştır.

Midede yüzen sistemler; hidrodinamik denge sistemleri, efervesan özellikte yüzen sistemler ve düşük dansiteli çekirdeğe sahip sistemler olmak üzere 3 gruba incelenebilirler.

1.2.1.1.1 Hidrodinamik denge sistemleri

Hidrodinamik denge sistemleri (Hydrodynamically Balanced System: HBS), sudan daha düşük dansiteye sahip taşıyıcının yüzme özelliğinden yararlanan ilk formülasyon tipidir. Bu preparatlar mide sıvısı ile şiştiğinde kütle yoğunluğu mide sıvısının yoğunluğundan az olur (mide sıvısının özgül ağırlığı 1.004-1.010 g/cm³ arasındadır), dolayısıyla mide içeriğinin üstünde yüzer ve mideden çıkışı 4-10 saat gecikir (165).

HBS, basit şekliyle, etkin madde ve jel oluşturan hidrofilik polimer karışımından oluşan dozaj şeklidir. Bu sistemlerde en çok kullanılan polimer hidroksipropil metilselülozdur. Ayrıca; hidroksietil selüloz, hidroksipropil selüloz, sodyum karboksimetilselüloz, agar, karragenler ve aljinik asit de kullanılan diğer polimerlerdendir (13). Genellikle polimer etkin madde ile karıştırılır ve jelatin kapsül içerisinde uygulanır. Oral yolla alındıktan sonra, mide sıvısı ile temas ettiğinde, etkin madde-hidrokolloid karışımı suyu emerek yumuşak bir jel tabakası oluşturmak üzere şişer. Hidrate olan dış tabaka parçalandığında, yeni bir jel tabakası oluşur. Bu işlem sırasında, etkin madde hidrate tabakadan difüzyonla salınır (Şekil 4) (13, 59).



Şekil 4: HBS sisteminden etkin maddenin salım aşamaları

Bu sistem ilk kez, Sheth ve Tossounian (164) tarafından geliştirilmiş ve 6 saatlik gastrik kalış süresi elde edilmiştir. Valrelease® (diazepam) ve Madopar® (levodopa ve benserazid) 1980’lerde bu prensip kullanılarak geliştirilmiş iki ticari üründür.

Babu ve Khar (12), hidrokolloidlerin farklı kombinasyonlarını kullanarak salbutamol sülfat içeren yüzen kapsüller hazırlamıştır. İn vivo X-ışını çalışmaları, yüzen kapsüllerin midede yüzmeyen kapsüllerden daha uzun süre (8-9 saat) kaldığını göstermiştir.

Khattar ve arkadaşları (111), propranolol HCl’ün HBS kapsüllerini hazırlamıştır. İn vitro yüzme kapasitesi tayinleri, kapsüllerin yapay gastrik sıvı yüzeyinde 12 saatten daha uzun süre kaldığını göstermiştir. HBS kapsüllerin *in vivo* davranışı sağlıklı gönüllülerde endoskopi ile izlenmiş ve kapsüllerin midede yüzdüğü gösterilmiştir.

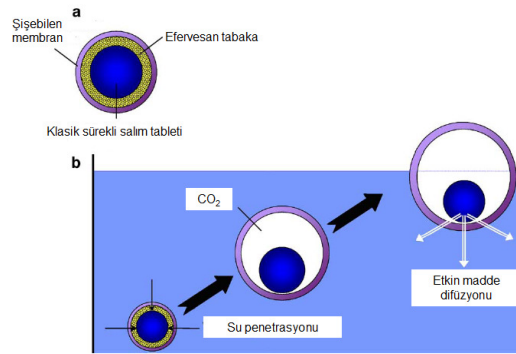
Tek birimli HBS’lerin tamamının mideden atılması ya da tamamının midede kalması nedeniyle gastrik kalış süresi büyük değişkenlik göstermektedir. Bu sorunun üstesinden gelmek için, Iannuccelli ve arkadaşları (86, 87) hava kompartmanı içeren çok birimli bir sistem geliştirmiştir. Sistemi oluşturan birimler, kalsiyum aljinat veya kalsiyum aljinat/polivinil alkol membranından hava kompartmanı ile ayrılmış kalsiyum aljinat çekirdeğinden oluşmaktadır. Yüzme yeteneği, hava kompartmanının

varlığına ve membran gözenekliliğine bağlıdır. Hazırlanan birimler yapay mide sıvısı ile temas ettiklerinde, pH'dan bağımsız olarak, uzun süre (24 saatten fazla) yüzmeye kabiliyeti göstermişlerdir.

Ayrıca, Harrigan (80) mide duvarına teması önlemek için ilacın mikroporöz bir kompartmanda enkapsüle edildiği bir yüzen sistem önermiştir. Chitnis ve arkadaşları (44), tabletleri Carbopol® veya çapraz bağlı metakrilik ve akrilik asitler ile kaplayarak biyoadesif yüzen sistemler geliştirmiştir. Krogel ve Bodmeier (120), her iki tarafı da ilaç içeren matriks hidrofilik polimer (hidroksipropilmetil selüloz) ile kapatılmış geçirgen olmayan bir polipropilen silindir önermiştir. Silindirin ortasında hapsedilmiş olan hava formülasyonun yüzmesini sağlamaktadır.

1.2.1.1.2 Efervesan özellikte yüzen sistemler

Efervesan özellikte yüzen ilaç taşıyıcı sistemler; Methocel® veya polisakkaritler, kitozan gibi şişebilen polimerler ve sodyum bikarbonat ve sitrik asit gibi efervesan bileşikler ile hazırlanmış matrislerdir. Sistem mideye ulaştığında, mide içeriğinin asiditesi ile açığa çıkan karbondioksit jelleşmiş hidrokolloid içinde hapsolmaktadır. Bu durum, ilaç şekline yukarı doğru hareket kazandırır ve suya batmasını engeller (59, 120) (Şekil 5).



Şekil 5: İki tabakalı efervesan sistemlerin yapısal özellikleri (a) ve yüzme mekanizmaları (b) (13)

boyunca yüzer konumda kalmıştır. 8 kg/cm² sertlikteki tabletler ise, yüzme özelliği göstermemiştir. Tabletın yüzmesi, hem gastrik sıvı ile temas ettiğinde tablet yüzeyindeki hidrokolloid partiküllerin hacminde artış ile sonuçlanan hidrasyonu, hem de tablet çekirdeğindeki boşlukların varlığı ile kontrol edilmektedir. Bu iki faktör, tabletin dansitesinin 1'in altında olmasını ve böylece gastrik sıvıda yüzmesini sağlamaktadır. Bu nedenle, tabletlerin yüksek sertlikte basılması, tablet gözenekliliğini azaltır ve tablet yüzeyindeki hidrokolloid partiküller gastrik sıvı ile hızla hidrate olamadığı için, tabletin yüzme kabiliyeti önemli ölçüde azalır.

Özdemir ve arkadaşları (148), furosemidin biyoyararlanımını artırmak için, kontrollü salım sağlayan iki tabakalı yüzen tabletlerini tasarlamıştır. Yüzmeyi sağlayan tabakada matris maddesi olarak HPMC 4000, salım tabakasında etkin maddenin kontrollü salımını sağlamak amacıyla ise hidrofilik matris maddesi olarak HPMC 100 kullanılmıştır. Hedef profile en yakın etkin madde çıkışı sağlayan formülasyon, sağlıklı erkek gönüllülere uygulanarak *in vivo* testler gerçekleştirilmiştir. BaSO₄ eklenerek hazırlanan yüzen tabletlerin radyografileri, tabletlerin midede 6 saat boyunca kaldığını göstermiştir.

Li ve arkadaşları (129), farklı viskozite derecelerine sahip HPMC ve Carbopol® 934P kullanarak midede yüzen ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirmiştir. Sonuçta, ilaç şekillerinin yüzme özelliğinin artırılmasında, düşük viskoziteli polimerin yüksek viskoziteli polimerde daha etkili olduğu görülmüştür. Carbopol® 934P'ün eklenmesi, yüzen ilaç şekillerinin yüzme kabiliyetini olumsuz yönde etkilemiştir. Bu durum, nem izotermelerinde Carbopol® 934P'nin HPMC'den daha büyük nem emilim eğrisine sahip olmasına ve dolayısıyla dansitesindeki belirgin artışa bağlı olarak yüzme kapasitesinin azalmasına bağlıdır.

Yang ve arkadaşları (181), *Helicobacter pylori* kaynaklı peptik ülserin üçlü ilaç (tetrasiklin, metronidazol ve bizmut tuzu) tedavisi için midede kalış süresini uzatmak amacıyla, yüzme özelliğine sahip şişebilen asimetrik üç tabakalı tabletler geliştirmiştir. Hidroksimetil selüloz ve poli(etilenoksit) hız kontrol edici polimerler olarak kullanılmıştır. Bizmut tuzu hemen salım için dıştaki tabakalardan birine yerleştirilirken, tetrasiklin ve metronidazol kontrollü salım için çekirdek tabakasına yüklenmiştir. Salınan tetrasiklin ve metronidazol konsantrasyonlarına bakıldığında, tablet midede yüzerken 6-8 saatlik sürekli salımın elde edildiği görülmüştür.

Polimer olarak kitozanın kullanıldığı yüzen sistemler üzerinde de çalışılmıştır (91, 141). Kitozan şişerek pH 1.2'de asidik ortamda granüllerin yüzmesini sağlamaktadır. Buna ek olarak, kitozan granülleri, düşük pH aralığında jel tabakası oluşturma özelliğine sahiptir ve oluşan jel mideyi irritasyona karşı korumaktadır. Üstelik, kitozan antiasit ve antiülser aktiviteye de sahiptir. Bu özellikleri, indometazinin midedeki irritasyonunu önlemek amacıyla kullanılmıştır (141).

Ayrıca, yüzen ilaç şekillerinin geliştirilmesinde iyon değiştirici reçinelerden de yararlanılmıştır (10, 11).

1.2.1.1.3 Düşük dansiteli çekirdeğe sahip sistemler

Sistemin yüzmesi, düşük dansiteli, yüksek poroziteli katı sistemler kullanılarak da sağlanabilir. Bu tip sistemlerde, çekirdek maddesi, sert jelatin kapsül, polistiren köpük veya patlamış pirinç granülleri gibi düşük dansiteli maddelerden oluşmaktadır. Düşük dansiteli maddelerin dış yüzeyi, etkin madde ve etkin maddenin salım özelliklerini kontrol eden selüloz asetat ftalat veya etil selüloz gibi çeşitli polimerlerle kaplanmaktadır.

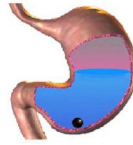
Düşük dansiteli çekirdeğe sahip sistemler, genellikle, mikropartiküller şeklinde hazırlanmış ve bazı mikropartiküller “mikrobalon” adını almıştır (94, 107,

108,). Mikrobalonlar (boş mikroküreler) çok birimli sistemlerin avantajlarına sahip olması ve mikrokürenin merkezinde yer alan boş alan sayesinde iyi yüzme özelliğine sahip olması nedeniyle umut verici yüzen sistemlerdendir (59, 107, 108).

Yapılan çalışmalarda, mikrobalonların yüzme özelliğinin partikül büyüklüğü ile doğrudan ilişkili olduğu bulunmuştur. Azalan partikül büyüklüğü ile kavite hacminin azalmasına bağlı olarak yüzme kabiliyeti azalmıştır. Mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan, özellikle suda çözünen yardımcı maddeler, gözenek oluşturuıcı özellikleri ve mikrokürelerin hızlı hidrasyonu nedeniyle, etkin madde salımı üzerinde önemli etkiye sahiptir. Polietilen glikol ve sukroz gibi hidrofilik maddelerin eklenmesi, mikrokürelerden etkin madde salımını arttırmıştır (59, 171).

1.2.1.2 Midede çöken yüksek dansiteli sistemler

Mideden çıkışı geciktirmek için dansitesi yüksek olan ve mide tabanında kalan sistemlerdir. Dansitesi mide içeriğinin dansitesinden (1.004 g/cm^3) daha büyük olan bu ilaç taşıyıcı sistemler hasta dik durumdayken Şekil 7’de görüldüğü gibi midenin tabanına çökerler. Burada antrumun kıvrımları arasında kalır ve gastrik boşalmayı sağlayan mide duvarının peristaltik hareketlerine karşı direnirler (13).



Şekil 7. Midede çöken yüksek dansiteli sistemlerin şematik olarak gösterilmesi (13)

Multipartiküler sistemlerle yapılan bir çalışmada, midede kalış süresinin uzaması için gerekli kritik dansitenin $2.4\text{-}2.6 \text{ g/cm}^3$ olduğu hem aç hem de tok deneklerde saptanmıştır (46, 47). Baryum sülfat, çinko oksit, demir tozu ve titanyum dioksit bu sistemlerde kullanılan yardımcı maddelere örnek olarak gösterilebilir (13).

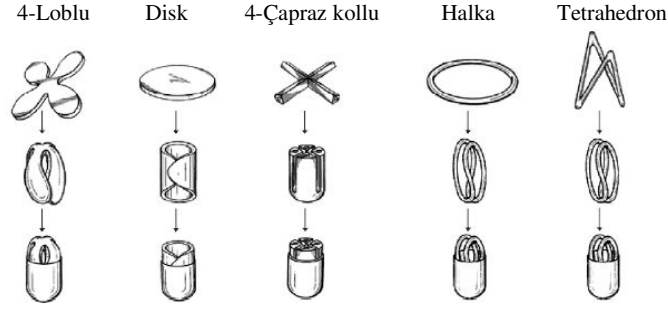
Veteriner uygulamalarına uygun elik silindir veya elik top gibi ağır maddelerden yapılmış yüksek dansiteli sistemler ile ruminantlarda ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. Ancak bu sistemlerin insan deneylerinde etkinlikleri kanıtlanamamıştır ve piyasaya sürölmüş bir preparatı bulunmamaktadır (13).

1.2.2 Midede Şişerek Büyüklüğü Pilordan Geçemeyecek Kadar Artan Sistemler

İlaç şekillerinin midede kalmasının diğerk bir yolu, pilorik açıklıktan geçemeyecek büyüklüğe ulaşmalarını sağlamaktır. Amaç, ilaç şeklini kolayca yutabilecek kadar ufak fakat gastrik sıvı ile temas ettiğinde midede kalmasını sağlayacak kadar büyük boyutlara genişleyebilen şekilde hazırlamaktır. Şişerek genişleyen sistemler, aynı zamanda midenin güçlü kasılmalarına karşı koyabilecek kadar yüksek sertliğe sahip olmalıdır. Etkin madde salındıktan sonra ise boyutları mideden atılmalarını sağlayacak şekilde küçölmelidir. Şişerek genişleyen ilaç şekillerinin gastrik kalış sürelerinin değerkendirildiğı preklinik ve klinik çalışmalarda olumlu sonuçlar elde edilmiş, dar emilim penceresine sahip etkin maddelerin emilme özelliklerinde düzelme sağlanmıştır (59).

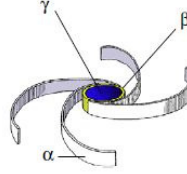
Büyüklüğü artan sistemler, midede katları açılarak genişleyen sistemler ve şişen sistemler olarak iki alt gruba ayrılabilir.

Midede katları açılarak genişleyen sistemler, biyoparçalanabilir polimerlerden üretilmişlerdir. Amaç; taşıyıcıyı midede genişleyen kapsöl gibi bir sıkıştırılmış sistemin içinde toplamaktır. Bu amaç için Şekil 8’de göröldüğü gibi değerkik geometrik şekiller önerilmiştir (38).



Şekil 8. Değişik geometrik şekillerdeki katları açılan sistemler

Curatolo ve Lo (55), kolları sisteme jelatin bantlarla sabitlenmiş midede katları açılarak genişleyen bir sistem tasarlamışlardır. Bu sistem mideye ulaşınca jelatin çözünür ve genişlemiş şekline dönüşür (Şekil 9).

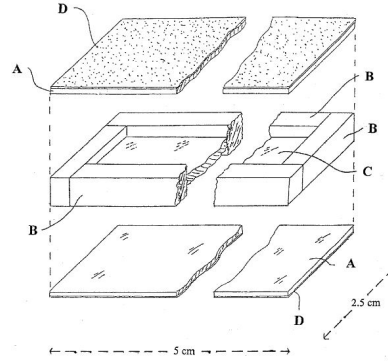


Şekil 9. Midede katları açılarak genişleyen sistem.

α: Midede kalış süresini uzatan kollar, β: tablet yuvası, γ: kontrollü salım tableti

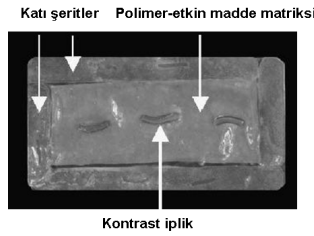
Sonobe ve arkadaşları (167), midede kalış süresini uzatmak için “Y” şeklinde bir sistem önermişlerdir. Sistemin merkezi, şekil verici bir materyalden oluşmuştur. “Y” şeklinin üç kolu da ilaç rezervuarı olarak görev yapan ve aşınan bir materyalden yapılmıştır. Bu materyalin aşınma hızı aynı zamanda, midede kalış süresini de kontrol eder. Üçüncü bileşen ise sistemin kolları ve merkezini birbirine bağlar.

Klausner ve arkadaşları (111), etkin madde olarak riboflavin içeren ve katları açılarak genişleyen farklı boyut ve mekanik özelliklerde çok tabakalı polimerik filmler hazırlanmış ve sert bir çerçeve ile kaplanmıştır (Şekil 10). Ayrıca, ilaç şeklinin gastrointestinal bölgedeki yerini belirleyebilmek için koruyucu dış tabakaya radyoopak kontrast iplikler yerleştirilmiştir (Şekil 11).



Şekil 10. Midede açılarak genişleyen çok tabakalı ilaç şeklinin polimerik tabakalarının şematik gösterimi.

A- Koruyucu (dış) tabaka (%48 hidrolize jelatin, %30 Eudragit S®, %20 gliserin, %2 gluteralaldehit), B- Katı çerçeve şeritler (L-polilaktik asit-etil selüloz, 9:1), C- Polimer-ilaç matrisi (şellak-riboflavin, 7:3), D- Yapışmayı önleyici tabaka (Mikrokristalin selüloz)



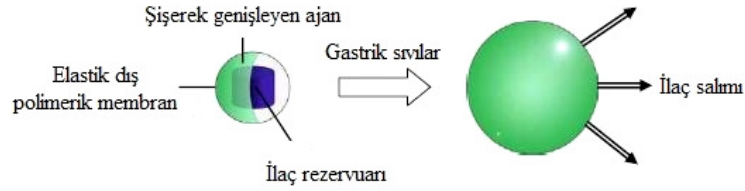
Şekil 11. Midede açılarak genişleyen çok tabakalı ilaç şeklinin üstten çekilmiş fotoğrafı

Klausner ve arkadaşları (113) yaptıkları diğer bir çalışmada, açılarak genişleyen polimerik membran sistemi kullanarak levodopanın kontrollü salım yapan ilaç şeklini hazırlamıştır. Sistemin açılmadan önceki boyutları 5 cm x 2.5 cm'dir ve sert bir çerçeve ile kaplanmıştır. Sistemin katlanmış hali jelatin kapsüller içerisinde av köpeklerine verilmiştir. Gastroskopi çalışmaları, sistemin alındıktan sonra 15 dakika içinde açılarak genişlemiş boyutlarına ulaştığını ve en az 2 saat bu boyutlarda kaldığını göstermiştir. X-ışını resimleri ise, sistemin en az 24 saat midede kaldığını ve levodopanın terapötik konsantrasyonunun 9 saatin üzerinde sabit kalmasını sağladığını göstermiştir (113). Levodopa içeren açılarak genişleyen polimerik

membran sistemleri ile insanlarda yapılan in vivo çalışmalarda ise, sistemin % 67 oranında 5 saat süre boyunca midede kaldığı görülmüştür (114).

Şişen sistemlerde dozaj şekli yutulabilecek kadar küçük boyuttadır ve gastrik sıvılar ile temasta suyun osmotik absorpsiyonu ile şişme gerçekleşir.

1980 yılında Mamajek ve Moyer (134), şişerek genişleyen ajan ile çevrelenmiş bir ilaç rezervuarının patentini almıştır (Şekil 12). Sistemin dışı elastik polimerik membran ile kaplanmıştır. Bu membran, hem ilaç hem de vücut sıvıları için geçirgendir ve ilaç salımını kontrol eder. Sistemin hacmi ve sertliği, ilaç ve şişen ajanın azalmasına bağlı olarak zamanla azalır ve böylece sistemin eliminasyonu mümkün olur.



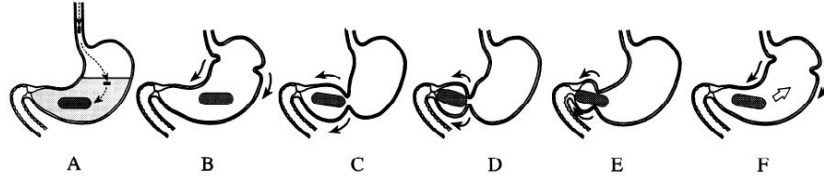
Şekil 12. Şişerek büyüklüğü artan sistem

Kedzierewicz ve arkadaşları (109), silikon dozaj şekilleri hazırlamışlar ve etkinliğini insanlarda test etmişlerdir. Levha, mini-matriks ve çubuk olmak üzere 3 değişik şekilde hazırlanan dozaj şekilleri iki değişik izotop kullanılarak işaretlenmiş ve midede kalış süreleri gama kamera ile tespit edilmiştir. Bu sistemler mide sıvıları ile temas edince, ilk olarak midede kalış süresini geciktirmek için şişme ve arkasından mideden atılımı sağlamak için küçülme eğilimindedirler. Hazırlanan formülasyonlar 12 gönüllüye standart bir yemeğin ardından verilmiştir. Sonuç olarak midede kalış süreleri mini-matriksler için 3 saatten fazla, çubuklar için 4 saat 20 dakika, levha için ise 4 saat 40 dakika olarak bulunmuştur.

Midede katları açılarak genişleyen sistemler ve şişen sistemlerin bazı sakıncaları da vardır. İlk olarak kolaylıkla su çekebilen ve parçalanabilen polimerlerden üretildikleri için muhafazaları güçtür. Özellikle katları açılarak genişleyen sistemlerin endüstriyel boyuttaki üretimleri zordur ve maliyeti yüksektir. Sert ve büyük boyuttaki tek birimli dozaj şekillerinin mide ve bağırsak kanalında sürekli kalması bağırsak tıkanmasına, intestinal yapışmaya ve gastropatiye neden olabilir. Bu sistemlerin vücuttan atılma süreleri önemlidir. Son olarak bu sistemlerin mide hareketlerine engel olmaması, kolaylıkla parçalanabilir olması, sivri kenarlara sahip olmaması ve midede lokal hasara neden olmaması istenir (13).

Cok gözenekli hidrojel

Çok gözenekli hidrojel, yapısında çok sayıda gözenek taşıyan yeni bir hidrojel tipidir. Çok gözenekli hidrojellerin şişerek genişleyen diğer sistemlerden farkı, su ile temas ettiğinde hızla şişerek pilordan geçemeyecek boyutta dayanıklı bir jel kütlesi oluşturmastır. Bu hızlı şişme özelliğinden yararlanılarak, midede kalış süresi uzatılmıştır (Şekil 13).



Şekil 13. Kuru halde yutulan hidrojinin şişmesi ve ardından midede kalış süresinin uzatılmasının şematik gösterimi (39).

Gözenek boyutları 10 nm ile 10 µm arasında değişen konvansiyonel hidrojellerin su absorplayarak şişmesi oldukça yavaş bir süreçtir ve denge durumuna gelmesi birkaç saat sürebilir. Bu esnada sistemin mideden erken atılması söz konusu olabilir. Çok gözenekli hidrojellerin ise ortalama gözenek boyutu 100 µm'den büyüktür. Bu hidrojel, çok sayıda birbirine bağlı açık gözenek sayesinde kapiller

ıslanma ile hızla su alır ve dakikalar içinde denge durumuna ulaşır (39). Ayrıca bu sistemlerin Şekil 14'te görüldüğü gibi ve şişme oranları 100'ün üzerine çıkabilir (77).



Şekil 14. Çok gözenekli hidrojellerin kuru ve su alarak şişmiş halinin gösterilmesi

Tam olarak şişmiş hidrojel, ağırlığının büyük bir kısmını su oluşturduğu için mekanik olarak oldukça zayıftır. Gastrik kalış süresinin uzatılabilmesi amacıyla, şişen hidrojelin mekanik direncin yüksek olması gerekmektedir. Aksi takdirde, şişen jel yüksek viskozlukta bir çözelti gibi davranarak mideden atılacaktır (59). Bunu önlemek için, Chen ve Park (40), akrilamit (AM), 3-sülfopropil akrilat potasyum tuzu (SPAK), akrilik asit (AA), poli(AM-ko-SPAK) ve poli(AM-ko-AA) bileşenleri sentezleyerek çok gözenekli hidrojeller hazırlayarak mekanik direnci arttırmışlardır.

Çok gözenekli hidrojel bileşiklerinin hızla şişmesi gerektiği için, beraberinde hidrofilik özellikleri yüksek maddelerin kullanılması idealdir. Bu nedenle, Chen ve Park (40, 41), sentezledikleri poli(akrilamit-ko-3-sülfopropil akrilat) hidrojelleri ile birlikte tablet ve kapsül formülasyonlarında da yaygın olarak kullanılan Ac-Di-Sol®, Primojel®, Explotab® ve Crospovidone® gibi dağıtıcıları kullanmışlardır. Bunlar içinde şişme hızını en iyi destekleyen Ac-Di-Sol® olmuştur.

1.2.3 Manyetik Sistemler

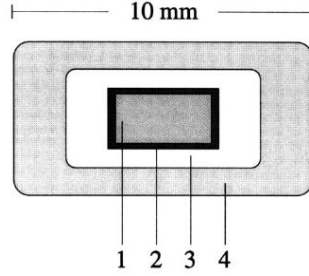
Manyetik özellikte sistemler vücut dışından uygulanan mıknatıs etkisiyle istenen bölgede tutulabilir. Sistem, içerisinde küçük bir manyet bulunan dozaj şekli ve karın üzerinden mide hizasında tutulan bir manyetten ibarettir.

Ito ve arkadaşları (92), bu sistemi özofagus kanseri tedavisinde ultrasaf ferrit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ve biyoadezif polimerler (hidroksipropil selüloz ve Carbopol® 934) içeren biyoadezif granüleler ile tavşanlarda denemişlerdir. Granüleler tavşanlara bir kateter yardımıyla yaklaşık 2 mL %0.65 hidroksipropil selüloz çözeltisi içerisinde verilmiştir. İlk 2 dakika boyunca dış bir manyet (~1700 G) ile manyetik alan uygulanmıştır. Daha sonra 2 saat süre boyunca neredeyse bütün granülelerin özofagusta tutulmaya devam ettiği görülmüştür.

Fujimori ve arkadaşları (64), %50 (a/a) oranında ultrasaf ferrit, hidroksipropil selüloz ve sinnarizin içeren manyetik tablet hazırlamışlardır. Köpeklerde yapılan in vivo çalışma sonucunda, 1000-2600 G manyetik alan uygulamasıyla tabletlerin midede 8 saat kaldığı görülmüştür. Sonuç olarak sinnarizinin plazma konsantrasyonu-zaman eğrisindeki eğri altı alan değeri artırılmıştır.

Gröning ve arkadaşları (68), asiklovirin oral manyetik depo tabletlerini hazırlamıştır. İlaç şeklinin gastrik kalış süresini uzatmak ve asiklovirin emilim süresini etkilemek için tabletin dış tabakasına da manyet yerleştirilmiştir. Manyet içeren depo tabletlerde, karnauba mumu ile kaplanmış manyet, asiklovir içeren tablet çekirdeği içine yerleştirilmiştir (Şekil 15). Dış tabakadaki hidroksipropilmetil selüloz ile etkin maddenin kontrollü salımı sağlanmıştır. Dış manyetin ise asiklovirin salım hızı üzerine etkisinin olmadığı görülmüştür. Dış manyetin kullanılması depo tabletin midede uzun süre kalmasını sağlamıştır. İnsanda yapılan in vivo çalışmalar sonucu elde edilen ortalama kan konsantrasyonu-zaman profilleri incelendiğinde, dış manyet

içeren formülasyonlar ile daha yüksek kan konsantrasyonu elde edildiği ve elde edilen kan düzeyinin daha uzun süre sabit kaldığı görülmüştür.



Şekil 15. Manyet içeren basınçla kaplanmış tabletin şematik gösterimi.

1: manyet, 2: karnauba mumundan oluşan tabaka, 3: iç kaplama, 4: dış kaplama

Bu sistemler ümit verici gibi görünse de dış manyetin hasta uyuncunu etkilemeyecek bir seviyede ve doğru olarak yerleştirilmesi oldukça önemlidir (13).

1.2.4 Mukoza Yüzeyine Yapışan Biyoadeziv Sistemler

Kontrollü salım sistemlerinin sindirim sisteminden geçişini geciktirmek üzere geliştirilen bir başka şekil mukozaya yapışan sistemlerdir. Bu sistemlerde kullanılan polimerler mide mukozasına, mütisine bağlanan tiptedir. İlaç şekli mukozal yüzeye sıkı bir şekilde yapıştığında, müsin salgılanması ile uzaklaştırılincaya kadar uzatılmış kalış süresi sağlanmaktadır. Adezyon; kimyasal, fiziksel veya mekanik bağlarla gerçekleşebilir. Kullanılan polimerler arasında özellikle sodyum karboksimetil selüloz, jelatin, sodyum aljinat, Carbopol®, polikarbofil polimerleri sayılabilir. Yapılan çalışmalar, en iyi mukoadhezif özelliğin polikarbofil ve Carbopol® ticari adıyla bilinen çapraz bağlı poli(akrilik asit) ile sağlandığını göstermiştir. Etkin madde, salıma kadar mukozaya yapışan polimerden ayrılmamalıdır, aksi halde etkin madde polimerden önce sindirim sisteminden uzaklaşır (2, 95, 138).

Jackson ve arkadaşları (93), iyon değıştirici reçinelerin yüzey yüklerinin mukoadhezif özellikleri üzerindeki etkisini incelemiştir. Kolestiramin ve katyonik

iyon değiştirici olan Amberlite® IRP-69'un, kaplanmamış ve yzey yklerini maskelemek için polimerle kaplanmış formulasyonlarının davranışı gama sintigrafı ile incelenmiştir. Kolestiramin katyonik bir polimerdir ve biyoadhezif özelliği pH 2 ve üzerinde negatif yüklü olan mukus ile elektrostatik etkileşmeler sonucu sağlanır. Elde edilen bulgular, *in vivo* koşullarda, koleştiraminin negatif yüklü IRP-69'dan daha uzun gastrik kalış süresine sahip olduğunu göstermiştir. *In vitro* alışmalar sırasında da, pozitif yüklü reçinelerle (kolestiramin ve Ambertile® CG-400) negatif yüklü reçinelere (Ambertile® IRP-69, CG-50 ve IR 120) göre daha iyi mukoadhezyon elde edilmiştir. Bu durum, yzey yklerin elektrostatik glerinin etkisi ile meydana gelen mukoadhezyon ve midede kalış süresi üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.

Thairs ve arkadaşlarının (173) yaptığı çalışmaya göre, iyon değiştirici reçineler, a deneklerde az miktarda su ile birlikte verildiğinde uzatılmış midede kalış süresi göstermiş ve gastrik mukozayı homojen şekilde kaplamıştır. Bu durumu, tok deneklerde reçinenin iyonik mukoadhezyonu ile açıklamak mümkündür. Reçine ile birlikte uygulanan az miktardaki su yavaş gastrik geçiş sağlar ve böylece midenin homojen şekilde kaplanması ve tokluk aşamasındaki motilitenin önlenmesi sağlanmış olur.

Ayrıca, biyoadhezif sistemler ile yüzen sistemler arasındaki sinerjizm de incelenmiştir. Chitnis ve arkadaşları (44), metakrilik asit ve akrilik asitin çapraz bağlı polimerleri olan bir seri biyoadhezif polimer sentezlemiştir. İzosorbit mononitrat'ın yüzen tabletleri hazırlanmış ve daha sonra Carbopol® süspansiyonları veya biyoadhezif polimerlerin % 0.5'lik Carbopol® jeli içindeki süspansiyonu ile kaplanmıştır. Sonuçlar, biyoadhezif polimer ile kaplanmış tabletlerin, Carbopol®

süspansiyonu ile kaplanmış tabletlere göre pH 1’de daha iyi biyoadhezif özelliğe sahip olduğunu göstermiştir.

Umamaheshwari ve arkadaşları (175), selüloz asetat bütirat kaplı kolestiramin mikrokapsülleri hazırlamıştır. Mukoadezif mikrokapsüller, aynı zamanda gastrik sıvı ile temas ettiğinde açığa çıkan CO₂ sayesinde yüzme kabiliyetine sahiptir. Selüloz asetat bütirat kaplı formülasyonların yüzme sürelerinin, kaplanmamış reçine partiküllerinden daha iyi olduğu bulunmuştur. Tüm mikrokapsüller kısa süre içinde çözünme ortamının üstüne çıkmış ve etkin madde salımı tamamlanıncaya kadar yüzmeye devam etmiştir.

Düşük molekül ağırlıklı heparin; antikoagülan tedavi, trombozis profilaksisi ve koroner sendromların profilaksisi için kullanılan bir ajandır. Ancak, terapötik kullanımı, oral biyoyararlanımının az olması nedeniyle kısıtlıdır. Bu nedenle, Schmitz ve arkadaşları (161) hedeflendirilmiş taşıyıcı formülasyonlarını hazırlamışlardır. Tablet formülasyonunun hazırlanmasında mukoadezif polimer olarak polikarbofil-sistein konjugatı kullanılmıştır ve tablet formülasyonlarına permeasyon artırıcı ajan olarak glutatyon ilave edilmiştir. Bu formülasyon, kontrol grubu olarak hidroksietil selüloz içeren taşıyıcı matriks ile karşılaştırılmıştır. Bu tabletlerde yapılan in vitro salım çalışmaları; 4 saatin sonunda tiyollenmiş polikarbofil ile hazırlanan tabletlerden yaklaşık % 90 oranında, hidroksietil selüloz ile hazırlanmış tabletlerden ise yaklaşık % 80 oranında etkin madde salımı olduğunu göstermiştir. Sıçanlarda yapılan in vivo çalışmalarda ise, heparin içeren mini tabletlerin biyoyararlanımı incelenmiştir ve elde edilen plazma değerleri, relatif biyoyararlanımın hesaplanabilmesi için subkütan olarak uygulanan heparin çözeltisi ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, tiyollenmiş polikarbofil-sistein tabletlerinin absorpsiyon ve plazma konsantrasyonlarında hidroksietil selüloz tabletlerine göre

belirgin bir şekilde artış olduğunu göstermiştir. Ayrıca tabletlerin midede kalış süresi sıçanlarda görsel olarak incelenmiş ve 4 saatin sonunda tiyollenmiş polimerler ile hazırlanan tabletin midede kaldığı saptanmıştır. Bu sonuçlara dayanarak, tiyollenmiş polikarbofil tabletlerinin gastrik mukoadezif taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında ümit verici olduğu görülmüştür.

Guggi ve arkadaşları (73) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, tiyollenmiş kitozan-4-tiyobutilamidin konjugatının midede kalış süresi uzatılmış formülasyonlarda kullanılması, etkin madde olarak salmon kalsitonin kullanılarak incelenmiştir ve ümit verici in vivo sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca, yine bu çalışmada, bir pepsin inhibitörünün kitozana bağlanması ile, kitozan-pepstatin A konjugatı sentezlenmiştir. Sentezlenen bu yeni konjugatın salmon kalsitonini pepsinden koruyucu etkisi in vitro olarak incelenmiştir ve salmon kalsitonini pepsinik degradasyondan koruyucu etkisinin oldukça kuvvetli olduğu görülmüştür.

1.3 BİYOADEZYON İLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER

Biyoadезyon, en az biri biyolojik kaynaklı olan iki yüzeyin, yüzeylerarası kuvvetler etkisiyle, belirli bir süre boyunca temas etmeleri, yani birbirine yapışmaları durumudur. Bu tanımın kapsadığı yüzeyler genel olarak sentetik veya biyolojik kaynaklı makromoleküller ve hidrokolloitlerdir (61, 162). İlaç taşıyıcı sistem olarak biyoadезyon, ilaç taşıyıcı sistemin spesifik olarak biyolojik doku veya organa lokalize edilmesidir. Eğer substrat olarak mukus söz konusu ise, tanım olarak “**mukoadezyon**” kullanılabilir. Biyoadезif sistemler mukozal membranlara uygulandığında bu sistemlere “**mukoadezif sistemler**” veya “**mukozaya yapışan sistemler**” denilebilir (98). Biyoadезyonun daha iyi anlaşılması için öncelikle bazı tanımlamalar önemlidir (56).

Adezyon: Temas halindeki iki yüzeyi birbirinden ayırmak için gerekli kuvvet veya enerjidir.

Aderen (Aderent): Dış yüzeyiyle başka bir yüzeye yapışan fazdır.

Adezif (Adhesive): Yüzeye bağlanma ile aderenle bir arada olan, bağ oluşturan şekilde tanımlanabilir.

Biyodezyon yeni bir kavram olmayıp, hücrelerin birbirine sıkıca bağlanmaları ve bakterilerin insan vücudunda birçok yüzeye yapışması kadar eskidir. Yeni olan biyoadезif veya mukoadezif polimerlerin ilaç taşıyıcı amaçla kullanılma imkanının her geçen gün artmasıdır (56).

1.3.1 Biyoadezif Dozaj Şekilleri

Son yıllarda mukoz membranlar yolu ile bazı ilaçların (peptitler, gastrointestinal kanaldan absorpsiyonları sınırlı olan ilaçlar vb.) kontrollü salımı sağlayabilmek amacıyla adezif dozaj formları üzerine çalışmalar yoğunlaştırılmıştır (98). Biyoadezif kontrollü salım sistemleri, ilaç salımını istenen süre içinde lokal olarak sağlayabilmek amacıyla tasarlanan yeni ilaç taşıyıcı sistemlerdir (76).

1.3.1.1 Biyoadezif dozaj şekillerinin üstünlükleri

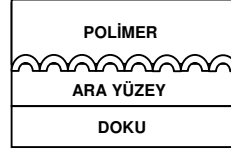
Biyoadezif sistemler, konvansiyonel formülasyonlara göre daha pahalı olduklarından, tedavide kullanımlarının anlamlı olması için klinik ve pratik açıdan bazı üstünlüklere sahip olmalıdırlar. Bu üstünlükler şu şekilde sıralanabilir (70);

- Belirli bölgede lokalizasyon sağlayarak ilacın biyoyararlanımını iyileştirir, artırır.
- Dozaj şeklinin kalış süresi uzatılarak günlük doz uygulama sayısı azaltılır
- Hastanın tedaviye uyuncu artırılır
- Absorpsiyon bölgesi ile optimum temas sonucu doku geçirgenliği modifikasyonla artırılır, proteaz aktivitesi de inhibe edilerek peptit, protein absorpsiyonu sağlanır.
- Uygulama bölgesine bağlı olarak ilk geçiş etkisi elimine edilebilir.

1.3.2 Biyoadezyon Teorileri

Polimer ile mukus arasındaki adezif bağların oluşması için etkin olan üç bölge vardır (150, 151). Bu bölgeler Şekil 16’da görülmektedir.

1. Biyoadezif materyalin yüzeyi
2. Mukozanın ilk tabakası
3. Mukoza ve biyoadezif materyal arasındaki ara yüzey



Şekil 16: Mukozaya yapışarak kontrollü salım sağlayan biyoadezif sistemlerin şematik görünümü

Biyoadezif materyal ile mukoza arasındaki ara yüzeyin nemlenmesine bağlı olarak polimerin şişmesi, polimer ile mukus makromoleküllerinin karşılıklı olarak yüzeylerarası penetrasyonu ve son olarak da düşük enerjili bağların oluşması mukozal membranlarda meydana gelen biyoadezyonun safhalarıdır (60, 61). Tablo 3'te değişik parametrelerin adezyon üzerine etkileri özetlenmiştir (56).

Tablo 3: Adezif bağlanma üzerine değişik parametrelerin etkisi

Parametre	Etkilenen Mekanizma	Etki
Temas yüzeylerinin polaritesi	Islanma	Adezyon işinin artması
Aderenin viskozitesinin artması	Aderenin difüzyon ve ıslanma hızının azalması	Adezyon işinin azalması
Sıcaklığın artması	-Viskozite azalması -Difüzyon hızının artması	Adezyon hızı ve işinin artması
Temas süresi	Teması ve aderen difüzyonunu kolaylaştırır	Adezyon işinin artması
Uygulanan basınç	Teması kolaylaştırır	Adezyon işini artırır
Aderenin molekül ağırlığının artması	-Polimer zincirinin hareketliliğini azaltır -Viskoziteyi artırır -Birleşmenin mekanik direncini artırır	Genelde adezyon hız ve işi azalır
Aderen konsantrasyonu	Difüzyon hızını artırır	Adezyon hızını artırır
Fonksiyonel gruplar	-İki yüzey arasında kimyasal bağ oluşumunu artırır -Aderenin fiziksel özellikleri (ıslanma, mekanik direnç) bozulur	Genelde adezyon artışı
Yüzeyin pürüzlü olması	-Etki yüzeyinin artması -Islanmanın kolaylaşması -Adezif ve aderen arasındaki yüzeylerarası penetrasyonun artması	Adezyon işinde artış

Biyoadezyon olayı birçok araştırmacı tarafından farklı teoriler öne sürülerek açıklanmaya çalışılmıştır. Bu teoriler; ıslanma teorisi (78, 100, 56), adsorpsiyon

teorisi (70), kırılma teorisi (103), elektron transfer teorisi (152) ve yüzeylerarası interpenetrasyon teorisidir (140, 180, 154).

1.3.3 Biyoadezyonu Etkileyen Faktörler

Biyoadezyonu etkileyen faktörleri açıklayabilmek için öncelikle biyoadezif dozaj şeklinin adezyonla bağlandığı mukusun yapısı ve fonksiyonları üzerinde bilgi verilecektir.

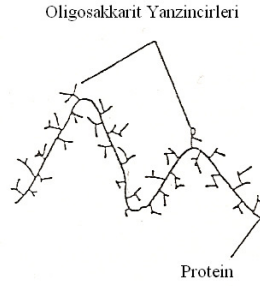
1.3.3.1 Mukusun özellikleri

Mukus, bazı spesifik ekzokrin bezleri ve epiteldeki goblet hücrelerinden salgılanan ve gastrointestinal kanal, solunum sistemi ve genitoüriner kanaldaki epitelyum yüzeyindeki mukozayı kaplayan viskoz bir sıvıdır. Başlıca görevi, mekanik, kimyasal veya bakteriyel etkilere karşı mukozayı korumaktır. Koruyucu etkisinin yanında lubrikan olarak da görev yapar. Ayrıca, epitelyal dokudan absorpsiyonda en önemli difüzyon bariyeri olarak kabul edilir (56).

Mukus kaynağına ve lokasyonuna bağlı olarak, glikoproteinler (müsin), su, elektrolit, ölü epitel hücreler, enzimler, bakteriler, bakteri ürünleri ve değişik minerallerin bir karışımıdır. Genel olarak; % 95 su, %0.5-5 glikoprotein, %1 mineral tuzları, %0.5-1 serbest protein ve az miktarda lipid içeren bir metabolizma ürünüdür. Bu bileşimdeki, yüksek molekül ağırlıklı glikoproteinik bileşiğe “**müsin**” adı verilmektedir. Müsin, mukusun viskozluğunu ve dolayısıyla interstisiyel sıvının viskozluğunu belirleyen, daha önemli olarak, biyoadezyon olayına katılan makromoleküldür (5). Mukus sekresyonu yapan hücreler tükürük bezleri, larinks, overler, bronşlar, ince ve kalın bağırsak, mide gibi vücudun değişik organlarında bulunur.

1.3.3.1.1 Müsin glikoproteinlerinin yapısı

Mukus jelinin temel bileşimi müsin glikoproteinleridir. Müsin glikoproteinleri, bir protein çekirdeği ve buna kovalent bağlarla bağlanmış karbonhidrat yan zincirlerinden oluşur. Mekanik açıdan mukusun jel benzeri özelliklerinden glikoprotein fraksiyonu sorumludur (Şekil 17) (56).



Şekil 17: Müsin glikoprotein moleküllerinin şematik yapısı

160-200 oligosakkarit yan zinciri, glikoproteinin glikolize olmuş kısmında bulunur ve glikoproteinin ağırlığının %50-80'ini oluşturur. Oligosakkarit yan zincirlerinin terminal uçları çoğunlukla pH 2.8'in üstünde negatif yüklü olan ve proteini anyonik bir polielektrolit haline getiren siyalik asitlerden oluşur. Karbonhidrat yan zincirleri yoğun, oldukça tekdüze ve hidrofilik bir kaplayıcı rolü oynamaktadır. Sıkıca paketlenmiş bu oligosakkaritler, proteinleri proteazlardan korumaktadır (56). Müsin yapısı temel alındığında mukusun, biyoadezyonla ilgili 4 özelliği bulunmaktadır (6):

1. Mukus lineer, esnek, rastgele sarmal yapı ve müsin moleküllerinden oluşan bir örgüdür.
2. Mukus, siyalik asit ve sülfat artıklarından dolayı negatif yüklüdür.
3. Mukus, müsin moleküllerinin arasındaki fiziksel girişim ve disülfid bağlarından dolayı çapraz bağlı bir örgüdür.
4. Mukus yüksek oranda hidratedir.

1.3.3.2 Polimere ilişkin faktörler

1.3.3.2.1 Molekül ağırlığı, zincir uzunluğu ve yapısı

Biyoadezif sistemlerde, polimerin substrata interpenetrasyonunu etkileyen faktörlerden birinin molekül uzunluğunun olduğu öne sürülmektedir. Dolayısıyla; polimerin molekül ağırlığı, zincir uzunluğu ve yapısı biyoadezyonu etkileyen önemli bir parametredir (56, 76). Örneğin düzlemsel bir yapıya sahip polietilen glikol, molekül ağırlığı 20.000 Dalton iken hiçbir adezif özellik göstermezken, molekül ağırlığı 200.000 Dalton'da iyi bir adezif özellik göstermektedir. Molekül ağırlığı 4.000.000 Dalton'a çıkarıldığında ise mükemmel adezivite göstermektedir (42, 70).

1.3.3.2.2 Moleküler esneklik

Biyoadezif polimerler, sulu ortamda bulunduklarında şişerek jel oluştururlar. Polimerin hareketliliği ve esnekliği, polimer-substrat etkileşmesi açısından önemlidir. Belli bir sıcaklıkta daha yüksek zincir segment hareketliliği daha fazla yüzeylerarası difüzyon demektir (154).

1.3.3.2.3 Viskozite

Biyoadezif polimerin en önemli özelliklerinden biri çözücü etkileşimi ile oluşan viskozitedir. Viskozite molekülün esnekliğine, çözücünün tipine, polimer konsantrasyonuna ve pH'a bağlıdır. Pek çok biyoadezif polimer hidrofilik grup içerir. Su molekülleriyle temasta, polimerin zincir örgü yapısı genişleyerek serbest hareket yeteneği kazanır. Biyoadezif polimer hidrofilik substrat ile temas ettiğinde polimer molekülleri gerilip karmaşık bir hal alır ve aktif grupları, substrata adezif bağ oluşturur. Bu nedenle iyi şişme yeteneği biyoadezyonda ön şarttır (70).

1.3.3.2.4 Şişme, hidrasyon ve jel oluşturma özellikleri

Biyoadeziv polimerler sulu ortamla temas ettiklerinde şişerek jel oluştururlar. Şişmenin erken dönemlerinde polimer zinciri tamamen açılmamış, zincir segmentleri optimum esnekliğe ve mobiliteye ulaşmamıştır. Maksimum biyoadezyon için optimum su içeriği gerektiğini kanıtlayan Chen ve Cry'a göre (42), katı bir madde için suyun biyoadezyon mekanizmasındaki rolü öncelikli bir öneme sahiptir.

Hidrasyon ve buna bağlı olarak adeziv polimerin şişmesi gergin polimer zincirinin gevşemesi ve hareket yeteneği kazanması anlamına gelmektedir. Böylece polimer zincirleri müsin molekülleri ile bağ yapabilme yeteneği kazanır. Biyoadeziv polimerlerin hidrasyonu ve buna bağlı olarak şişmesi yetersiz ise, polimer zincirlerinin hareketli ve yüzeylerarası penetrasyona uygun hale gelmesi mümkün olmaz. Bu durumda adeziv kuvvetler azalır (42).

Biyoadeziv polimerin çapraz bağlanma derecesinin, şişme yeteneği ve kapasitesi üzerinde önemli rolü bulunmaktadır. Biyoadeziv polimerin sentezi sırasında kullanılan çapraz bağlanma maddelerinin konsantrasyonunun artması ile birim hacimdeki zincir segment hareketliliği etkilenir ve dolayısıyla hidrasyon miktarındaki azalmadan dolayı biyoadeziv gerilim azalmaktadır (60).

1.3.3.2.5 Biyoadeziv polimerin konsantrasyonu

Yapılan çalışmalar sonucunda, iyi bir adezyon için optimum bir biyoadeziv polimer konsantrasyonunun olması gerektiği gösterilmiştir. Konsantre sistemlerde adeziv gerilimin belirgin olarak düştüğü gözlenmiştir (56).

1.3.3.3 Ortama ilişkin faktörler

Biyoadezyonun gerçekleştiği ortama ait pH, iyonik gerilim, temas süresi, uygulanan basıncın etkisi gibi çeşitli faktörler biyoadezyonu etkiler.

Bazı polimerlerin şişme dereceleri ve adezyonları ortamın pH'sı ile değiştirilebilmektedir. Örneğin, ortamın pH'sının değişmesi ile polikarbofilin şişme ve biyoadezif kuvvetinin değiştiği bulunmuştur. Polikarbofil pKa (4.75) değerinden daha düşük pH değerlerinde yüksek bağ yapabilme yeteneğine sahiptir.

İyonik gerilim, biyoadezyon çalışmalarında göz önünde bulundurulması gereken bir parametredir. Park ve Robinson (149) tarafından yapılan bir çalışmada, pH 2 ve pH 7'de farklı iyonik gerilimlere sahip çözeltiler hazırlanmış ve iyonik gerilimin fonksiyonu olarak denge halindeki görünür şişme hacmi ölçülmüştür. Bu çalışmada elde edilen veriler, polikarbofilin görünür şişme hacminin, ortamın iyonik gerilimine bağlı olarak düştüğü gösterilmiştir.

Polimer-müsin ve müsin-müsin sistemlerinde temas zamanı ile adezif gerilim arasında belirli bir optimum değere kadar doğrusal bir ilişki vardır, yani mukoadesyon zamana bağımlı bir işlemdir. Biyoadezif sistemlerin mukozal yüzeylere yapışabilmesi için biyoadezif sistemin belirli süre, belirli basınç ile mukoza yüzeyine temas ettirilmesi gerekmektedir (56).

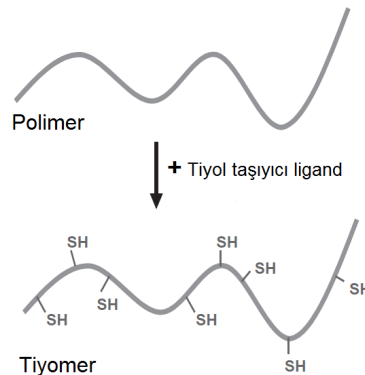
1.3.4 Biyoadezyon Tayininde Kullanılan Ölçüm Yöntemleri

Polimer ile mukus arasındaki biyoadezif kuvvetin ölçümünde kullanılan teknikler; in vitro, ex-vivo (veya in situ) ve in vivo teknikler şeklinde üç ana gruba ayrılmaktadır. Son zamanlarda ex-vivo analiz yöntemlerinin daha çok ilgi çektiği gözlemlenmektedir (151). Bu yöntemler arasında; Wilhelmy tablası yüzey gerilim yöntemi (110), floresans işaretleme yöntemi (8), değiştirilmiş yüzey gerilim yöntemi (43), özofagusa yapışma yöntemi (137), akış kanal yöntemi (140) ve gerilme direnci yöntemi (153) sayılabilmektedir.

1.4 YENİ NESİL MUKOADEZİF POLİMERLER: TİYOLLENMİŞ POLİMERLER (TİYOMERLER)

1980’lerde mukoadezyon kavramının öne çıkmasıyla polimerlerin adeziv özelliklerinin artırılması için çok sayıda deneme yapılmıştır. Bu denemeler, hidrojellerde adezyonu artırmak için lineer poli(etilen glikol) kullanılması (158), iyonik polimerlerin nötralizasyonu (166), uzatılmış hidrasyon yöntemiyle mukoadezyon sağlanması (36) ve epitele spesifik bağlanmanın sağlanması için polimer-adezin konjugatlarının geliştirilmesi (19, 144) gibi yöntemleri kapsamaktadır. Buna rağmen, mukoadezyon; hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri ve iyonik etkileşimler gibi kovalent olmayan bağların oluşmasına dayanmaktadır. Dolayısıyla, zayıf mukoadezyon sağlanır ve ilaç taşıyıcı sistemin hedef bölgede lokalizasyonunu sağlamada yetersiz kalırlar. Bu nedenle mukoadeziv polimerlerin etkinliği henüz tam potansiyeline ulaşamamıştır (14).

Tiyollenmiş polimerler veya diğer adıyla tiyomerler, eczacılık alanında yeni nesil biyoadeziv polimerler olarak kabul edilen, daha güçlü adeziv özellik gösteren hidrofilik makromoleküllerdir. Mukoadeziv polimerlerin zincirine tiyol taşıyıcı fonksiyonel grupların immobilizasyonu ile elde edilirler. Tiyomerler Şekil 18’de görüldüğü gibi yan zincirlerinde tiyol grubu taşıyan mukoadeziv polimerlerdir.



Şekil 18. Tiyollenmiş polimerlerin (= tiyomerlerin) yapısının şematik gösterilmesi

Bu yeni nesil polimerler, iyi bilinen mukoadezif polimerlerin aksine kovalent bağ yapabilme kapasitesine sahiptirler. Biyolojik sistemlerde en çok karşılaşılan bağ yapısı disülfid bağlarıdır. Bu nedenle, bu bağlar tiyomerlerin mukus jel tabakasına kovalent olarak bağlanması için temel olarak alınmıştır. Diğer bağların tersine bu kovalent bağlar, daha kuvvetlidir ve iyonik kuvvet veya pH gibi dış etkenlerden etkilenmezler (20).

1.4.1 Tiyomerlerin Sınıflandırılması

Tiyollenmiş polimerler kimyasal yapılarına göre katyonik ve anyonik tiyomerler olarak 2 grupta incelenebilir.

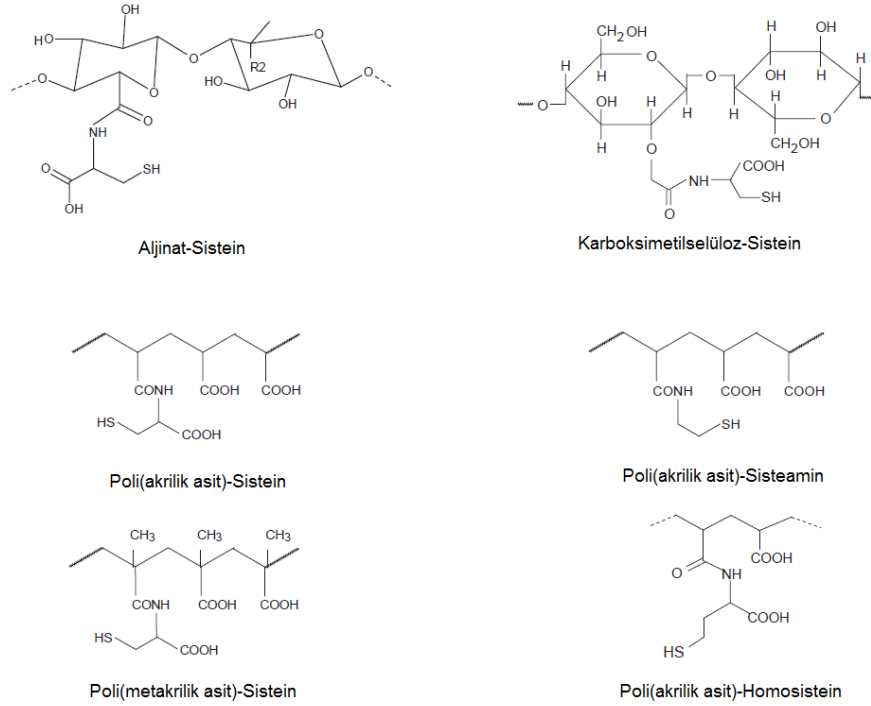
1.4.1.1 Anyonik tiyomerler

Anyonik tiyollenmiş polimerler, anyonik altyapı olarak karboksilik asit grupları taşımaktadır. Bu karboksilik asit grupları, sülfidril gruplarının amit bağlarının oluşması ile kolaylıkla polimere bağlanmasını sağlar. Amit bağlarının oluşmasına karbodiimidler aracılık eder. En çok kullanılan ligandlar sistein, homosistein ve sisteamindir. Poli(akrilik asit), polikarbofil, karboksimetil selüloz ve aljinat kullanılan anyonik polimerlere örnek olarak verilebilir.

Sentez aşamasında tiyol gruplarının istenmeyen oksidasyonu, reaksiyonun inert koşullarda gerçekleştirilmesi ile önlenabilir. Buna alternatif olarak; sentez, ortamın pH değerinin 5'in altında olduğu asidik koşullarda gerçekleştirilebilir. Bu pH değerinde tiyol gruplarının oksidasyonu için reaktif form olan tiyolat anyonlarının konsantrasyonu düşüktür ve disülfid bağlarının oluşumu göz ardı edilebilir. Ayrıca,

sentezden sonra disülfid bağları ditiyotritol, sodyum borohidrit (NaBH_4) ve tris(2-karboksietil)fosfin gibi indirgeyici ajanların ilavesi ile indirgenebilir (14).

Şekil 19’da anyonik tiyomerlere örnek olarak aljinat-sistein (26), karboksimetilselüloz-sistein (29, 32), poli(akrilik asit)-sistein (32), poli(akrilik asit)-sisteamin (17), poli(akrilik asit)-homosistein (28) ve poli(metakrilik asit)-sisteinin (27) kimyasal yapıları görülmektedir.



Şekil 19. Bazı anyonik tiyomerlerin kimyasal yapısı

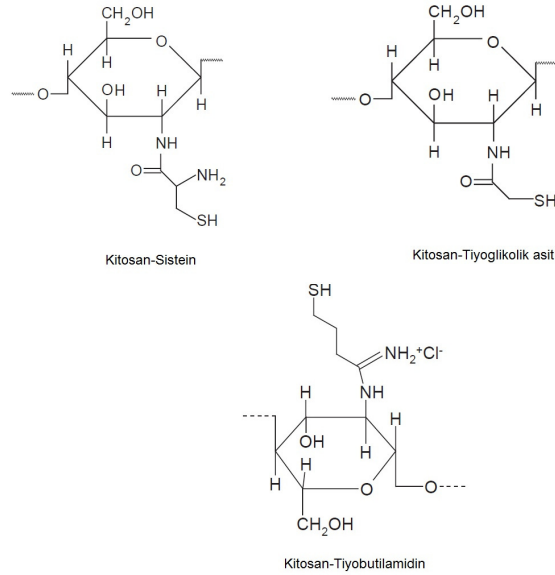
1.4.1.2 Katyonik tiyomerler

Katyonik tiyomerler esas olarak kitozan temellidir. Bu polimerin glukozamin alt biriminin C2 konumundaki primer amino grubu, tiyol gruplarının immobilizasyonu için başlıca hedeftir. Bu primer amino grubuna sülfhidril taşıyan bileşikler, amit veya amidin bağları ile kovalent olarak bağlanırlar. Amit bağlarının oluşması için, ligandlar aracılığıyla gerçekleşen bağlanma reaksiyonu anyonik tiyomerlerin sentezinde olduğu gibidir. Sisteinin karboksilik asit grubu veya

tiyoglikolik asit, bir karbodiimid aracılığı ile kitozanın primer amino grubu ile reaksiyona girer ve kitozan-sistein veya kitozan-tiyoglikolik asit oluşur (16, 22).

Amidin bağlarının oluşması için ise, bağlayıcı ajan olarak 2-iminotiyolan (Traut reaktifi) veya izopropil-S-asetiltiyoasetimidat kullanılabilir. Sonuçta, kitozan-4-tiyobutilamidin veya kitozan-tiyoetilamidin oluşur. Bu sentezlerin tek bir basit basamakla gerçekleştirilmesi avantajı vardır. Ayrıca her iki konjugatın da tiyol grupları sentez aşamasında oksidasyondan, reaktiflerin kimyasal özellikleri sayesinde korunur. Kitozan-4-tiyobutilamidinin sülfhidril grupları tetrahidrotiyofen halka yapısı sayesinde, kitozan- tiyoetilamidin'in sülfhidril grupları ise asetilasyon ile korunur (23, 101, 156). Sentez aşamasında tiyol gruplarının oksidasyonu ise yukarıda anlatıldığı gibi önlenir.

Şekil 20'de katyonik tiyomerlere örnek olarak kitozan-sistein (16), kitozan-tiyoglikolik asit (22, 106) ve kitozan-tiyobutilamidinin (23, 156) kimyasal yapıları görülmektedir.

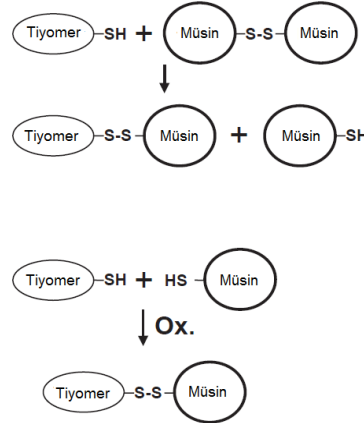


Şekil 20. Bazı katyonik tiyomerlerin kimyasal yapısı

1.4.2 Tiyomerlerin Özellikleri

1.4.2.1 Mukoadezif özellikleri

Tiyomerlerin geliştirilmiş mukoadezif özellikleri, bu polimerin tiyol grupları ile mukus glikoproteinlerinin sistein yönünden zengin yan grupları arasında ilave kovalent bağların oluşmasına dayanmaktadır. Tiyomerler ile mukus glikoproteinlerinin sistein yönünden zengin yan grupları arasında Şekil 21’de görüldüğü gibi tiyol/disülfid değişim reaksiyonu ve/veya basit oksidasyon yöntemi ile disülfid bağları oluşur. Bu nedenle tiyomerler, mukus tabakasına disülfid bağlarının oluşmasıyla kovalent olarak bağlanan mukus glikoproteinlerinin doğal mekanizmasını taklit ederler (128). Bu kovalent bağlar, kitozan ile mukus tabakasının siyalik asit grupları arasında oluşan iyonik etkileşmelerden veya poli(akrilat)lar ile mukus tabakası arasında oluşan hidrojen bağlarından daha kuvvetlidir.



Şekil 21. Mukus glikoproteinleri (müsinler) ile tiyomerler arasında disülfid bağlarının oluşum mekanizması (128)

Kovalent olmayan bağların tersine, disülfid bağları iyonik kuvvet veya pH gibi faktörlerden etkilenmezler. Disülfid bağlarının oluşum hızı ve derecesi, tiyol/disülfid değişim reaksiyonu ve oksidasyon için gerekli olan tiyolat anyonlarının

konsantrasyonuna bağlıdır. Tiyolat anyonlarının konsantrasyonu ise tiyol grubunun pKa değerine, tiyomerin pH'ına ve ortamın pH'ına bağlı olarak değişir.

- Tiyol grubunun pKa değeri

Örneğin, kitozan-tiyobutilamidinin pKa değeri 9.9 (23) iken poli(akrilik asit-sistein) konjugatının pKa değeri 8.35'dir (157). Polimerin ve ligandın pKa değerine ve kimyasal yapısına bağlı olarak daha fazla veya daha az reaktif tiyomerler sentezlenebilir.

- Tiyomerin pH değeri

Tiyomerlerin hepsi iyonik yapıda olduğu için yüksek tamponlama kapasiteleri vardır. Örneğin, sodyum poli(akrilat) matriks tabletlerinin tamponlama kapasitesi en az 25 M asetat tamponuna eşittir. Yüklü gruplar polimerik ağda yoğun bir şekilde bulunduğu için bir çeşit "mikroiklim" oluştururlar (15). Tiyol gruplarının reaktivitesi bundan dolayı polimerin pH'ını belli bir dereceye ayarlayarak kontrol edilebilir. pH daha yüksek bir değere ayarlandıkça tiyol gruplarının reaktivitesi artar yada bunun tam tersi geçerlidir.

- Ortamın pH değeri

Polimerik ağdaki tiyol gruplarının reaktivitesi esas olarak tiyomerin pH değeri tarafından kontrol edilir. Diğer taraftan, polimer yüzeyindeki reaktivite ise daha çok ortamın pH değeri tarafından kontrol edilir. Epitele yakın mukus jel tabakasının pH değeri 7 civarındadır ve mukusa penetre olan tiyol grupları bu pH seviyesinde genellikle yeteri kadar reaktiftir.

Tiyomerlerin mukoadezif özellikleri Grabovac ve arkadaşları (66) tarafından detaylı olarak iyi bilinen polimerlerle kıyaslanarak incelenmiştir ve tiyol gruplarının immobilizasyonu ile tiyomerlerin mukoadezif özelliklerin belirgin bir şekilde arttığı

tespit edilmiştir. Tiyollenmiş polimerler ve mukus jel tabakası arasında kovalent bağlarının oluşması, Leitner ve arkadaşları (128) tarafından yürütülen reolojik, diffüzyonal, jel permeasyonu ve mukoadesyon çalışmaları ile kanıtlamışlardır. Başka bir çalışmada ise müsinin modifiye edilmemiş poliakrilata bağlanmadığı ancak, tiyollenmiş poliakrilata etkin bir şekilde bağlandığı kanıtlanmıştır. Oluşan disülfid bağlarını kırmak için ortama ditiyotritol ilavesiyle ise müsinin tiyollenmiş polimerden uzaklaştırıldığı gösterilmiştir (30).

Tiyomerlerin geliştirilmiş mukoadesif özellikleri, Tablo 4'te özetlendiği gibi iki farklı şekilde yapılan mukoadesyon çalışmalarının sonuçları ile desteklenmektedir. Mukoadesyon çalışmaları gerilme testi ve döner silindir yöntemi ile yapılmıştır. Gerilme testi sonuçları, total adezyon işi (TWA) üzerinden, döner silindir yöntemi sonuçları ise adezyon zamanı (AT) üzerinden verilmiştir.

Tablo 4. Tiyomerlerin ve modifiye edilmemiş polimerlerin mukoadesif özelliklerinin karşılaştırılması.

Polimer	TWA (μ J)	AT (saat)	Referans
Kitozan-4-tiyobutilamidin	682 $\pm$ 100	>170	21
Kitozan-tiyoetilamidin	105 $\pm$ 39	24 $\pm$ 1.0	101
Kitozan-tiyoglikolik asit	200 $\pm$ 17	4.0 $\pm$ 0.1	106
Kitozan HCl	23 $\pm$ 10	1.2 $\pm$ 0.8	106
Poli(akrilik asit) ₄₅₀ -sistein	695 $\pm$ 80	22 $\pm$ 3.0	126
Poli(akrilik asit) ₄₅₀	171 $\pm$ 53	1.5 $\pm$ 0.1	126
Polikarbofil-sistein	242 $\pm$ 59	>10	32
Polikarbofil	91 $\pm$ 27	4.8 $\pm$ 1.4	32
Sodyum karboksimetil selüloz-sistein	157 $\pm$ 6	3.0 $\pm$ 0.4	32
Sodyum karboksimetil selüloz	108 $\pm$ 17	2.5 $\pm$ 0.5	32

Tiyomerler ile yapılan mukoadesyon çalışmaları sonucu polimere daha fazla miktarda tiyol grubu immobilizasyonu ile daha iyi mukoadesif özelliklerin elde edildiği görülmüştür. Ayrıca, daha düşük pH değerine sahip tiyomerlerin mukoadesif özelliklerinin daha iyi olduğu görülmüştür (21, 75).

Marschütz ve arkadaşları (135), poli(akrilik asit)/müsin karışımının viskozitesinin polimerin mukus ile etkileşimine bağlı olduğunu ve mukoadesif

özellikler ile korele edilebileceğini göstermiştir. Anyonik mukoadezif polimerlerden poli(akrilik asit)-sistein konjugatı bunun için iyi bir örnektir. Tiyollenmiş polimerler ile mukoadezif özelliklerin 10 kattan fazla artırılabilceğini, aynı tiyollenmiş polimerin modifiye edilmemiş polimere kıyasla mukoadezif özelliklerinin gerilme testi sonucu 2 kat, döner silindir yöntemi ile yapılan çalışmalar sonucu 20 kat artış gösterdiği görülmüştür. Ayrıca, poli(akrilik asit) mikropartiküllerinin tiyol grubu immobilizasyonu ile ince bağırsak mukozasındaki kalış süresinin 3 kattan daha fazla arttığı görülmüştür (116).

Kasyonik tiyomerlerden ise kitozan-tiyobutilamidin konjugatının mukoadezif özellikleri bir çok farklı mukoadezyon test sistemi ile incelenmiştir. Kitozan-tiyobutilamidin konjugatının viskozitesinde modifiye edilmemiş kitozana kıyasla 100 kattan daha fazla artma görülmüştür. Ayrıca, gerilme testi çalışmaları sonucu mukoadezif özelliklerinin 100-kat, döner silindir çalışmaları sonucu ise mukoadezyon süresinin 140-kat artış gösterdiği saptanmıştır (23, 156).

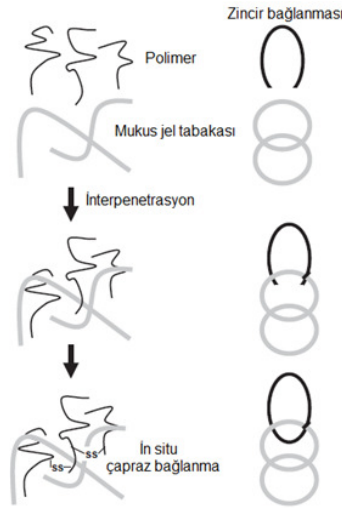
Tiyollenmiş polimerlerle hazırlanan tabletlerle yapılan gerilme çalışmaları sonucu, polimer üzerine immobilize edilmiş tiyol gruplarının derecesi ile total adezyon işi arasında bir korelasyon olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar ayrıca döner silindir yöntemi ile tabletlerin domuz ince bağırsağında adezyon süresi tayin edilerek desteklenmiştir. Tiyollenmiş konjugatların adezyon süresinin yine polimere immobilize olan tiyol grupları ile orantılı olarak arttığı görülmüştür (106, 135).

Oluşan kovalent bağların yanı sıra, kitozan-4-tiyobutilamidin veya kitozan-tiyoetilamidin konjugatlarının kasyonik amidin yapıları ile anyonik mukus glikoproteinleri arasında oluşan iyonik etkileşmeler de güçlü mukoadezif özelliklerin oluşmasında etkilidir (101, 156).

Tiyomerlerde polimer zincirinin moleküler ağırlığının da mukoadezif özellikler üzerine etkisi büyüktür. Hem anyonik hem de katyonik tiyomerlerde en iyi mukoadezif özellikler orta molekül ağırlığında polimerler kullanıldığında elde edilmiştir. Örneğin, günümüze kadar sentezlenen anyonik tiyomerler içinde 450 kDa molekül ağırlığındaki poli(akrilik asit)-sistein konjugatının daha düşük molekül ağırlığındaki (2 kDa, 45 kDa, 250 kDa) tiyollenmiş poli(akrilat)lara ve çapraz bağlı polikarbofil-sistein konjugatına göre daha iyi mukoadezif özellik gösterdiği görülmüştür. Bu nedenle, polimerin molekül ağırlığı üzerinden ifade edilen zincir uzunluğunun ve zincir esnekliğinin mukoadezif özellikleri üzerinde etkili olduğu saptanmıştır (75, 126). Diğer taraftan, tiyollenmiş kitozanlar ile yapılan gerilme testi sonuçları da, orta molekül ağırlıklı kitozanlar kullanıldığında daha iyi mukoadezif özelliklerin elde edildiğini göstermiştir. 264 µM/g tiyol grubu içeren orta molekül ağırlıklı kitozan-tiyobutilamidin konjugatının mukoadezif özelliğinin modifiye edilmemiş kitozana göre 100 kat daha iyi olduğu görülmüştür (156).

Anyonik ve katyonik tiyomerlerin pH değeri de önemli bir parametredir. pH değeri 3'e ayarlanan konjugatlar en iyi mukoadezif özellikleri gösterirler, aynı konjugatların pH değeri daha yüksek değerlere ayarlandıkça mukoadezif özelliklerinin azaldığı görülmüştür (21). Bu durum, tiyol gruplarının reaktivitesinin pH'a bağlı olması ile açıklanabilir. pH değerinin 5'den büyük olduğu durumlarda, tiyol grupları daha reaktif hale gelir. Böylece, tiyol grupları, mukus glikoproteinleri ile etkileşmeye girmeden önce polimerik ağ içinde kendi aralarında disülfid bağı oluştururlar. Daha düşük pH değerlerinde ise, tiyomerler daha az reaktiftir. Bu polimerlerin tiyol grupları sadece pH değeri 5-7 arasında olan mukus jel tabakasına penetre olduğunda reaktif hale gelir. Sonuç olarak, daha düşük pH değerindeki tiyomerlerin mukus jel tabakası ile disülfid bağı oluşturması daha olasıdır (20).

Tiyomerlerin mukoadezif özelliklerinin artırılmasından sorumlu diğer bir mekanizma ise in situ çapraz bağlanma özelliğidir. Tiyomerler, fizyolojik pH değerlerinde tiyol gruplarının oksidasyonuna bağlı olarak in situ jelleşme özelliği gösterirler (135, 177). Şekil 22’de gösterildiği gibi interpenetrasyon süreci boyunca ve sonrasında tiyomer ağının içinde de disülfid bağları oluşur ve bu da mukus jel tabakası ile ilave bağların oluşmasını sağlar (14).

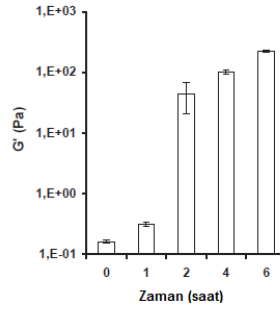


Şekil 22. Mukoadezyonun in situ çapraz bağlanma ile zincir bağlanmasına kıyasla artırılması (14)

Tiyomerlerin bu in situ jelleşme özelliği reolojik ölçümler ile karakterize edilebilir. Fizyolojik pH değerlerinde, polimer içindeki oksidasyon için aktif şekil olan negatif tiyolat anyonları yeteri kadar yüksek miktardadır. Bu oksidasyon, viskozitenin artmasından da sorumlu olan molekül içi ve moleküller arası disülfid bağlarının oluşmasına neden olur.

Örneğin, tiyollenmiş kitozanların sol-jel geçişleri pH 5.5’da çapraz bağlı jellerin oluşması ile 2 saatte tamamlanmıştır. Buna paralel olarak, disülfid bağlarının oluşmasının bir göstergesi olarak, polimerlerin tiyol grubu içeriğinde belirgin bir azalma görülmüştür. Modifiye edilmemiş kitozanların ise reolojik özelliklerinin bu

süre boyunca değişmeden kaldığı görülmüştür. Tiyollenmiş kitozanların reolojik özelliklerinin incelenmesi, aynı zamanda polimere bağlı tiyol grubu içeriği ve oluşan jelin elastikliğinde artış arasında bir korelasyon olduğunu da göstermiştir. Kitozana daha fazla tiyol grubu bağlanmasıyla tiyollenmiş kitozan çözeltisinin elastik modulus değerinde (G') daha fazla artış tespit edilmiştir (Şekil 23) (23).



Şekil 23. Kitozan-4-tiyobutilamidin konjugatı jelinin [%1.5 (a/h)] pH 5.5’de ve 37°C’de elastik özelliklerinin artışının zamana bağlı gösterilmesi (23)

Deasetile jellan zamkının ortamda elektrolit varlığında in situ jelleşme özelliği polimere tiyol gruplarının immobilizasyonu ile önemli ölçüde artırılmıştır (117). Ayrıca, poli(akrilik asit)-sistein, kitozan-tiyoglikolik asit ve kitozan-4-tiyobutilamidin konjugatlarının in situ jelleşme özelliklerinin polimere bağlı tiyol grubu miktarı ve oluşan jelin viskozitesine bağlı olduğu görülmüştür (82). Bu in situ jelleşme özellikleri özellikle uygulama bölgesinde stabilize edilmesi gereken sıvı veya yarı katı vajinal, nazal ve oküler formülasyonlar için önemlidir.

Tiyomerlerle hazırlanan taşıyıcı sistemlerin adezyonu, bu polimerlerin oldukça iyileştirilmiş mukoadezif özelliklerine rağmen mukusun doğal devri (turnover) yüzünden yine de sınırlıdır.

1.4.2.2 Kohezif özellikleri

Mukoadezif özelliklerine ilave olarak tiyomerler oldukça yüksek kohezif özellik gösterirler. Disülfid bağları, sadece polimerin tiyol grubu ve müsinlerin sistein

yönünden zengin yan grupları arasında değil, tiyomer içinde de oluşur. Bu teori, oksidasyon çalışmaları sırasında tiyomerlerin içindeki serbest tiyol gruplarının azalması ve polimerin viskozitesinin artması ile kanıtlanmıştır (26). Polimerik zincirin molekülleri arasında ve içinde oluşan disülfid bağları nedeniyle çapraz bağlanması sonucu, polimerik ağın stabilitesi oldukça artırılmıştır. Örneğin, poli(akrilik asit)₄₅₀-sistein tabletlerinin disintegrasyon süresi, modifiye edilmemiş polimere kıyasla 70 kattan fazla artmıştır. Ayrıca, tiyollenmiş poliakrilik asit ve tiyollenmiş polikarbofil tabletlerinin suni bağırsak sıvısında 48 saatten daha uzun bir süre, hiçbir erozyona uğramadan stabil kaldığı görülmüştür (126).

Taşıyıcı sistemin kohezyonu ve stabilitesi, istenen sürede kontrollü ilaç salımının sağlanması için önemlidir. Tiyomerlerin kontrollü ilaç salımının sağlanmasında taşıyıcı matris olarak kullanılmasının faydaları klotrimazol (23, 105), salmon kalsitonin (73), heparin (161), floresans işaretli insülin (50) gibi birçok model ilaç kullanılarak gösterilmiştir. Salmon kalsitonin içeren kitozan-TBA tabletlerinden suni bağırsak sıvısı içinde yapılan salım çalışmaları sonucu, ilk 8 saat içinde sıfırıncı derece salım kinetiği görülmüştür (73).

1.4.2.3 Enzim inhibitör özellikleri

Salgılanan peptidazlar nedeniyle görülen pre-sistemik enzimatik bozulma, peptit ve protein yapılı ilaçlarda kısıtlı biyoyararlanımın en önemli sebeplerindendir. Enzimatik bariyeri geçerek penetrasyon artırma amacıyla günümüzde düşük molekül ağırlıklı enzim inhibitörleri veya enzim inhibitörü özelliği gösteren polimerik yardımcı maddelerin kullanılmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı enzim inhibitörlerine kıyasla polimerlerin kullanılması, sistemik toksik yan etkileri önlemesi açısından avantajlıdır. Poliakrilatların intestinal proteazlar üzerindeki inhibitör etkileri ilk

olarak Hutton ve arkadaşları (85) tarafından bulunmuştur ve daha sonra Luessen ve arkadaşları (132) tarafından doğrulanmıştır.

Tiyomerler polimerik inhibitörler grubu için ümit verici adaylardır. Örneğin, sistenin polikarbofile kovalent bağlanması ile bu polimerin karboksipeptidaz A, karboksipeptidaz B ve α -kimotripsine karşı olan inhibitör etkisi önemli ölçüde artırılmıştır (34). Ayrıca tiyollenmiş polikarbofilin intestinal mukozada bulunan aminopeptidaz N üzerine inhibitör etkisi de modifiye edilmemiş polikarbofilden oldukça fazladır.

Ayrıca, tiyomerlerin, intestinal enzimlerin yanı sıra vajinal (178) ve bukkal (123) mukoza enzimleri üzerinde inhibitör etkisinin olduğu görülmüştür.

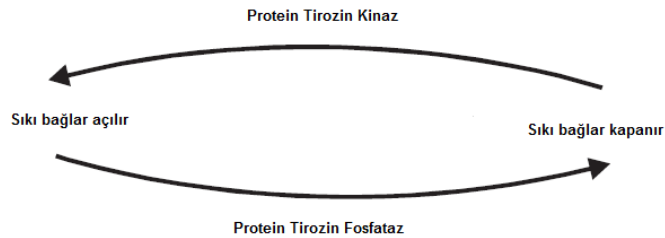
1.4.2.4 Permeasyon artırıcı özellikleri

Mukozal yollardan verilen peptid ve protein yapılı ilaçların biyoyararlanımının artırılması mekanizması genel olarak permeasyon artırıcıların kullanılmasına dayanmaktadır. Değişik sınıflardaki düşük molekül ağırlıklı permeasyon artırıcılar (örneğin safra tuzları, fosfolipidler, yağ asitleri, şelasyon yapıcı ajanlar) veya permeasyon artırıcı özellikleri olan yüksek molekül ağırlıklı polimerler (örneğin, poliakrilatlar veya kitozan) kullanılarak absorpsiyon bariyerinin üstesinden gelinebilir. Ancak, düşük molekül ağırlıklı permeasyon artırıcılar, gastrointestinal kanalda çoğu zaman ilacın kendisinden bile daha hızlı absorbe olurlar. Ayrıca, sistemik toksik etkiye de neden olabilirler. Yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin küçük molekül ağırlıklı permeasyon artırıcılara göre bazı avantajları vardır. Bunlar gastrointestinal kanaldan absorbe olmazlar ve dolayısıyla sistemik yan etki göstermezler. Ayrıca, mukoadhezif özellikleri sayesinde ilaç absorpsiyonunun

olduğu bölgede daha uzun süre kalarak daha uzun süre permeasyon artırıcı etki gösterirler (20, 25).

Bu polimerler içinde tiyomerler, özellikle hidrofilik makromoleküllerin gastrointestinal kanaldan absorpsiyonunda kuvvetli permeasyon arttırıcı etki gösterir ve bu etki önemli ölçüde indirgenmiş glutatyon (GSH) ilavesiyle artar. Tiyomerlerin taşıdıkları tiyol grupları, GSH aracılığıyla gerçekleşen bir mekanizma ile, sıkı bağların kapanmasından sorumlu olan protein tirozin fosfataz (PTP) enzimini inhibe eder. PTP, hücrelerin sıkı bağlanma bariyerinin (tight junctional barrier) kohezifliğinden sorumlu olan okkludin proteinin tirozin gruplarının defosforilasyonundan sorumludur ve defosforilasyon sonucu sıkı bağlar kapanır (52). PTP enziminin inhibe edilmesi, daha fazla fosforillenmiş okkludin oluşmasına ve dolayısıyla sıkı bağların açılmasıyla hidrofilik moleküllerin geçişinin artmasına neden olur (Şekil 24).

İndirgenmiş GSH'ın tek başına kullanıldığında PTP enzimidaki sistein grupları ile disülfid bağları oluşturarak enzim aktivitesini inhibe eder. Ancak, inhibitör etkisi, hücre yüzeylerinde hızlı bir şekilde okside olduğu için diğer stabil PTP inhibitörlerine göre (fenilarsin oksit veya prevanadat gibi) oldukça sınırlıdır. Tiyollenmiş polimerlerin kullanılması ise, mukozal yüzeydeki okside glutatyon ve indirgenmiş glutatyon arasındaki dengeyi indirgenmiş glutatyon yönüne taşır (48).



Şekil 24. Sıkı bağların açılma ve kapanmasından sorumlu olan enzimler

Tiyomer/GSH sistemlerin permeasyon artırıcı etkinliği, birçok in vivo çalışma ile kanıtlanmıştır. Ayrıca, tiyomerlerin permeasyon artırıcı etkileri, bazı hidrofilik model ilaçlar (rodamin 123, sodyum floresein, floresein isotiyosiyanat [FTIC]-dekstran) ve peptid ilaçlar için sığır nazal mukozası, tavşan korneası, domuz bukkal mukozası, Gine domuzu intestinal mukozası ve sıçan intestinal mukozası kullanılarak in vitro koşullarda Ussing tipli difüzyon hücreleri ile incelenmiştir. Tablo 5'te bazı tiyomerlerin indirgenmiş glutatyon ile birlikte gösterdikleri permeasyon artırıcı etkileri özetlenmiştir (20).

Langoth ve arkadaşlar (123), tip 2 diyabet tedavisinde kullanılmak için hipofizer adenilat siklaz aktive edici polipeptitin (PACAP) bukkal uygulaması üzerine çalışmışlardır. Ancak bukkal mukozanın geçirgenliği, ilaç konsantrasyonunun yeterli terapötik plazma düzeyine ulaşması için çok düşüktür. Bu yüzden sodyum deoksikolat ve setrimit gibi iyi bilinen permeasyon artırıcılar ile kitozan ve kitozan-4-tiyobutilamidinin GSH ile kombinasyonunun permeasyon artırıcı etkilerini domuz bukkal mukozasında incelemişlerdir. Sonuç olarak, %5 oranında sodyum deoksikolat veya setrimit kullanılmasıyla sırasıyla 18.6 ve 46.5 kat permeasyon artırma oranı elde edilmiştir. Diğer taraftan, permeasyon oranlarında %1 oranında kitozan-4-tiyobutilamidin kullanılmasıyla 38.9 kat, %1 kitozan-4-tiyobutilamidin ile birlikte %2 oranında GSH'ın kombine kullanılması ile de 77.5 kat artış elde etmişlerdir. Modifiye edilmemiş kitozanın ise tek başına permeasyon artırıcı bir etkisi olmadığı görülmüştür. Permeasyon çalışması sonuçları aynı zamanda model ilaç olarak hidrofilik bir makromolekül olan floresein isotiyosiyanat-dekstran kullanılarak da desteklenmiştir (121).

Tablo 5. Bazı tiyomerlerin modifiye edilmemiş polimerlere kıyasla hayvan mukozal dokuları üzerine permeasyon artırıcı etkileri (20)

Tiyomer	Model bileşik	Mukozal Doku	$P_{app} \times 10^{-6}$ (cm/s)	Permeasyon katsayısı artırma oranı ($P_{app-tiyomer}/P_{app-modifiye\ edilmemiş\ polimer}$)
Polikarbofil-sistein/GSH	FITC-hGH	Nazal	5.1±1.0	3.00
Polikarbofil-sistein/GSH	FD4	Nazal	18.0±5.0	2.28
Polikarbofil-sistein/GSH	LMWH	İntestinal	0.39±0.02	1.86
Polikarbofil-sistein	NaFlu	Korneal	4.55±0.84	2.19
Polikarbofil-sistein	FITC-Ins	İntestinal	5.48±0.41	1.25
Polikarbofil-sistein	FITC-bac	İntestinal	5.94±0.09	1.31
Karboksimetil selüloz-sistein	NaFlu	İntestinal	12.92±0.41	1.38
Poli(akrilik asit) ₄₅₀ -sistein	NaFlu	İntestinal	7.48±1.43	1.11
Poli(akrilik asit) ₄₅₀ -sistein/GSH	NaFlu	İntestinal	10.48±1.43	1.56
Poli(akrilik asit) ₄₅₀ -homsistein/GSH	NaFlu	İntestinal	5.91±1.97	2.94
Kitozan-4-tiyobutilamidin/GSH	Rho-123	İntestinal	3.0±1.2	3.61
Kitozan-4-tiyobutilamidin	Rho-123	İntestinal	1.5±0.7	1.81

[FD4=Floresein isotiyosiyanat-dekstran (molekül ağırlığı=4 kDa), FITC-bac= floresein isotiyosiyanat işaretli basitrasin, FITC-hGH= floresein isotiyosiyanat işaretli insan büyüme hormonu, FITC-Ins= floresein isotiyosiyanat işaretli insülin, GSH= indirgenmiş glutatyon, LMWH= düşük molekül ağırlıklı heparin, NaFlu= sodyum floresein, PACAP= hipofizer adenilat siklaz aktive edici polipeptit, Papp= permeasyon katsayısı (apparent permeability coefficient), Rho-123= Rodamin 123]

Başka bir çalışmada, ise sodyum karboksimetil selüloz ve sodyum karboksimetil selüloz-sistein konjugatının; sodyum floresein, basitrasin ve insülin model ilaçları ile intestinal permeasyonları üzerine etkisi incelenmiştir. Permeasyon çalışmaları, Gine domuzu ince bağırsak mukozası kullanılarak Ussing hücreleri ile yapılmıştır. Permeasyon çalışmaları sırasında, intestinal mukozanın transepitelyal elektrik resistansı da ölçülmüştür. Sonuç olarak; %7.3 oranında sistein konjuge edilmiş sodyum karboksimetil selülozun; sodyum floresein, basitrasin ve insülinin permeasyonlarını sırasıyla 1.80, 1.32 ve 1.31 kat artırdığı görülmüştür. Çalışma boyunca, transepitelyal elektrik resistansı değerlerinin ise hücrelerarası bağların sıkılığının gevşemesinin bir kanıtı olarak % 10.6-18.1 oranında azaldığı tespit edilmiştir (51).

Son yıllarda, Guggi ve Bernkop-Schnürch (71), tiyomerlerin bromelain gibi proteolitik enzimler ile kombine halde kullanılmasının permeasyon artırmada sinerjik

etkisi olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlara dayanarak, tiyomerlerin permeasyon artırıcı etki mekanizmalarının bromelain veya düşük molekül ağırlıklı permeasyon artırıcılardan farklı olduğu; bu yüzden de tiyomer/GSH sistemlerinin farklı sınıflardan bazı permeasyon artırıcılar ile kombine kullanılmasının hidrofilik ilaçların invaziv olmayan uygulamalarında in vivo etkinliğin artırılması için ümit verici olduğu düşünülmektedir.

1.4.2.5 Stabilite ve güvenilirlik

Daha önce de belirtildiği gibi, tiyomerlerin modifiye edilmemiş polimerlere kıyasla sahip oldukları avantajları, polimer üzerine tiyol gruplarının kovalent bağlanmasından ileri gelir. Dolayısıyla, tiyol gruplarının aşırı oksidasyonu disüfit bağlarının oluşmasına neden olur ve tiyollenmiş polimerlerin kullanılmasında istenmeyen bir durum yaratır. Bu nedenle, tiyomerlerin kimyasal stabilitesi değişik saklama koşullarında incelenmiştir.

Yapılan bir çalışmada, anyonik tiyomer olarak polikarbofil-sistein ve katyonik tiyomer olarak kitozan-tiyoglikolik asit, liyofilize toz ve matriks tablet halinde -20°C (%56 bağıl nem), 4°C (%53 bağıl nem), 20°C (%70 bağıl nem) ve 22°C'de (25% bağıl nem) 6 ay boyunca saklanmıştır. Sonuç olarak her iki tiyomerin de matriks tablet halinde bu süre boyunca bütün saklama koşullarında stabil olduğu görülmüştür. Sadece 20°C sıcaklıkta (%70 bağıl nem) liyofilize toz halde saklandığında tiyomerlerin serbest tiyol gruplarında azalma olduğu görülmüştür (24).

Tiyollenmiş poli(akrilik asit) ve kitozan ile yapılan sitotoksisite çalışmaları, tiyomerlerin modifiye edilmemiş polimerlere göre sitotoksisite potansiyellerinde anlamlı bir artış olmadığını göstermiştir. Poli(akrilik asit)-sistein tiyollenmiş polimerinin bağıl sitotoksisitesi, murin fibroblastlarının L-929 hücre serisi ile

incelenmiştir. Hücre viyabilitesinin tespiti için üç farklı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler; hücre membranı hasarı testi (laktat dehidrogenaz salımı), metabolik aktivite testi (dimetiltiazolildifeniltetrazolyum bromür, MTT) ve DNA sentezi testidir (5-bromo-2'-deoksiüridin, BrdU) (122).

Ayrıca, kitozan-4-tiyobutilamidin konjugatının toksisite profili; MTT testi, BrdU testi ve kırmızı kan hücrelerinin lizis testi ile araştırılmıştır (74). Bu çalışmalar, denenen bütün polimerlerin konsantrasyona bağlı toksisite gösterdiğini ve tiyollenmiş polimerlerin ve ilgili modifiye edilmemiş polimerlerin toksisite profilinin benzer olduğunu göstermiştir. Ayrıca, tiyollenmiş poli(akrilik asit) ile yapılan klinik çalışmalar; bu tiyomerin oldukça hassas bir membran olan korneal membranda bile irritasyona sebep olmadığını göstermiştir (83).

Kast ve Bernkop-Schnürch (106); kitozan ve kitozan-TGA konjugatının lizozim enzimi varlığında biyodegradasyonunu incelemişlerdir. Bu çalışma, tiyomerlerin yavaş degrade olduğunu göstermiştir. Özellikle poliakrilat türevi tiyomerler oldukça az biyodegrade olur. Oral kullanımdan sonra dozaj şekli tam olarak parçalanmadıysa atılımları bağırsak motilitesine ve mukus tabakasının devrine bağlı olarak gerçekleşir.

1.4.3 Tiyomerler İle Hazırlanan Dozaj Şekilleri

1.4.3.1 Matriks tabletler

Mukoadezif matriks tabletler intraoral, peroral, oküler ve vajinal yollardan lokal veya sistemik etki için kullanılabilirler. Tiyomerlerin in situ çapraz bağlanma özellikleri sayesinde şişmiş matriks taşıyıcının kohezifliği ve dolayısıyla da stabilitesi artırılabilir (51).

Örneğin, yapılan dağılma çalışmaları sonucunda, modifiye edilmemiş karbofil ile hazırlanan tabletlerin 2 saatten az dayanıklılık gösterdiği, diğer taraftan tiyollenmiş polikarbofil tabletlerinin bu süre boyunca dağılmadığı saptanmıştır (29). Ayrıca, bu tiyollenmiş tabletlerde yapılan 24 saatlik bir gözlem sonucunda ilaç taşıyıcı şişmiş matriksten herhangi bir erozyon olmadığı saptanmıştır. Matriks tabletlerin kuru halde iken mukozaya bağlandığında, taşıyıcı sistemin şişmesine ve dolayısıyla uzatılmış interpenetrasyon sürecine bağlı olarak mukoadesyonunun uzadığı saptanmıştır. Bu basit hidrasyon sürecini kullanabilmek için peroral uygulamalarda matriks tabletler enterik kaplanabilir. Adezyonun midede olması isteniyorsa da ağız boşluğuna veya özofagusa istenmeyen yapışmaları önlemek için trigliseridlerle kaplama oldukça faydalıdır (73).

Ayrıca tiyomer matriks tabletleri ile birçok ilaçta görüldüğü gibi kontrollü ilaç salımı da sağlanabilir (33, 50, 105). Örneğin, Hornof ve arkadaşları (83), tiyomer ve model ilacın basit homojenizasyon işlemi ardından tabletlerin basılması ile hazırlanan formülasyon ile neredeyse sıfırıncı derece salım profili elde etmiştir. İlaç salım hızı ağırlıklı olarak hidrasyon ve difüzyon süreci ile kontrol edilmektedir.

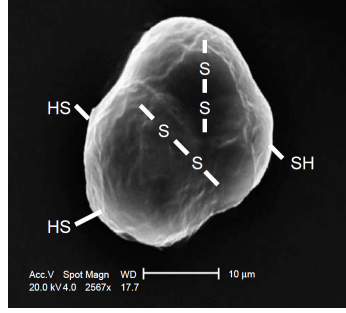
1.4.3.2 Mikro ve nano-partiküller

Küçük boyutta olan mikro ve nanopartiküllerin mukoadesif özellikleri olmasa bile mukus jel tabakasına difuze olarak daha uzun gastrointestinal kalış süresi gösterdiği görülmüştür. Coupe ve arkadaşları (54), partiküler sistemlerin ve tek birimli dozaj şekillerinin gastrointestinal geçiş sürelerini sağlıklı deneklerde radyonüklidler ile işaretleyerek gama sintigrafi ile incelemişlerdir. Sonuç olarak, partiküler sistemlerin mide ve ince bağırsaktan geçiş sürelerinin tek birimli dozaj şekillerine kıyasla daha uzun olduğunu kanıtlamıştır. Dolayısıyla, ilaç taşıyıcı

sistemlerin mukozal membranlarda kalış süresinin uzatılması için mukoadezif polimerler ile mikro ve nanopartikül teknolojilerinin birleştirilmesi ümit vericidir. Ancak, anyonik ve katyonik mukoadezif polimerlerle hazırlanan mikro ve nano partiküllerin stabiliteleri, Ca^{++} veya sülfat iyonları gibi çok değerlikli bileşenler ilave edilerek iyonik çapraz bağlanma ile artırılabilir çok çabuk dezentegre olur. Ayrıca, bu iyonik çapraz bağlayıcıların ilavesi polimerlerin mukoadezif özelliklerini oldukça azaltır (65, 115).

İyi bilinen polimerlere tiyol grubu immobilizasyonu ile mikro ve nanopartiküllerin mukoadezif özellik artırılabilir. Ayrıca, polimerik ağ yapısında disülfid bağlarının oluşumu ile mikro ve nanopartiküllerin stabilitesi artar ve dağılma süresi uzatılabilir. Böylece tiyollenmiş mikro ve nanopartiküllerden kontrollü ilaç salımı da sağlanabilir (18).

Yapılan bir çalışmada, 308 $\mu\text{mol/gram}$ tiyol grubu içeren poli(akrilik asit)-sistein konjugatı kullanılarak çözücü buharlaştırma emülsifikasyon yöntemi ile bromelain içeren mikropartiküller hazırlanmıştır. Mikropartiküllerin hazırlanma aşamasında ortamın pH değeri değiştirilerek tiyol gruplarının disülfid bağları ile çapraz bağlanmasına ortam pH'nın etkisi incelenmiştir. Sonuçta sulu fazın pH değeri yükseldikçe partiküller içinde çapraz bağlanma oranının artma gösterdiği saptanmıştır. Şekil 25'te görüldüğü gibi bu mikropartiküller küresel ve kısmen poröz yapıdadır ve ortalama boyutları 20-60 μm arasındadır. Yapılan dağılma ve salım çalışmaları sonucunda; bu partiküllerin, içlerinde disülfid bağlarının oluşumuna bağlı olarak fizyolojik koşullarda 48 saat dağılmadan kaldığı ve kontrollü ilaç salımı sağladığı görülmüştür. Ayrıca, poli(akrilik asit)'e tiyol grubu immobilizasyonu ile mikropartiküllerin mukoadezif özelliklerinin modifiye edilmemiş polimerle hazırlanan mikropartiküllere göre 3 kat artırıldığı saptanmıştır (18).



Şekil 25. Tiyollenmiş poli(akrilik asit) mikrokürelerinin SEM görüntüsü

Krauland ve Bernkop-Schnürch (116) tarafından yapılan bir çalışmada, peptit yapılı ilaçlar için, peroral mukoadeziv mikropartiküler bir sistem geliştirilmiştir. % 70 oranında Eudragit RS, % 15 oranında insülin ve mukoadeziv polimer olarak poli(akrilik asit)-sistein veya modifiye edilmemiş poli(akrilik asit) içeren mikropartiküller, çözücü buharlaştırma emülsifikasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Hazırlama aşamasında, molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlanmalar meydana geldiği saptanmıştır. Bu çapraz bağlanmaların miktarı, partiküllerdeki disülfid bağlarının miktarı ile tespit edilmiştir ve bu da tiyol gruplarının toplam miktarının % 69.2'si olarak belirlenmiştir. Bu çapraz bağlanmalar, partiküllere yüksek stabilite özelliği kazandırmaktadır. Partikül büyüklüğü dağılımlarının 1-100 µm arasında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, Eudragit RS'nin miktarı arttıkça, daha uzun süre insülin salımı elde edilmiştir. Tiyole mikropartiküllerin ise, modifiye edilmemiş PAA ile hazırlanan partiküllere göre 14 kata kadar daha yüksek mukoadeziv özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmanın tüm sonuçları gözönüne alındığında; PAA-sistein-Eudragit RS mikropartiküllerinin, peptit yapılı etkin maddelerin peroral uygulanmasında ümit verici bir formülasyon olabileceği belirlenmiştir.

Albrecht ve arkadaşları (4) tarafından yapılan bir çalışmada, tiyollenmiş polikarbofil-sistein konjugatı ile hazırlanan tablet ve mikropartiküler ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlanmış ve bunların daha iyi mukoadezyon gösterdiği in vivo olarak

kanıtlanmıştır. Floresan ile işaretli polimerin uygulamadan 3 saat sonra bağırsak mukozasında kalıldığı tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada, poli(vinilprolidon) ve poli(akrilik asit)-sistein arasında hidrojen bağı oluşumuna bağlı olarak, insülin yüklü nanopartiküller hazırlanmıştır. Nanopartiküllerin süspansiyonunun ve enterik kaplı tablet formülasyonunun oral uygulamasını takiben, serum insülin konsantrasyonu ve kan şekeri seviyesindeki düşmeler belirlenmiştir. Sonuçlar; enterik kaplı tabletlerin oral uygulamasını takiben, düşük serum-insülin konsantrasyonu ve buna bağlı olarak düşük farmakolojik etki oluştuğunu göstermektedir. Buna karşılık, nanopartikül süspansiyonları anlamlı bir derecede yüksek serum insülin konsantrasyonu göstermektedir. Bununla birlikte, modifiye edilmemiş poli(akrilik asit) yerine tiyollenmiş poli(akrilik asit) kullanılmasının, insülinin eğri altı alan değerini 2-3 kat arttırdığı belirlenmiştir. Genel sonuç olarak, etkinliği kanıtlanan yeni kompleks nanopartiküler sistem, peptit yapılı ilaçların non-invaziv olarak verilmesinde ümit verici bulunmuştur (58).

Krauland ve arkadaşları (118) tarafından yapılan bir çalışmada, peptit yapılı etkin maddelerin nazal yolla uygulanması için, tiyole kitozan konjugatı bazlı mikropartiküler bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Model peptit yapılı etkin madde olarak insülin seçilmiştir. Kitozanın tiyollenmesi için, 2-iminotiyolan kitozana kovalen bağlarla bağlanmıştır. Elde edilen kitozan-4-tiyobutilamidin konjugatı, 304.89 ± 63.45 $\mu\text{mol/g}$ tiyol grubu taşımaktadır. Mikropartiküllerinin hazırlanmasında, kitozan-4-tiyobutilamidin konjugatı, insülin ve permeasyon mediyatörü olarak glutatyon karışımı kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak kullanılan mikropartiküller ise, modifiye edilmemiş kitozan ve insülin içermektedir. İkinci kontrol grubu olarak da mannitol-insülin mikropartikülleri kullanılmıştır. Kitozan-4-tiyobutilamidin-insülin mikropartikülleri, fosfat tamponunda 4.32 ± 0.52 kat şişme

gösterirken, kitozan bazlı mikropartiküllerin şişme özelliği göstermediği belirlenmiştir. Ayrıca; kitozan-TBA mikropartiküllerinin, 6 saatin üzerinde kontrollü insülin salımı sağladığı saptanmıştır. Sıçanlara nazal yolla uygulanan kitozan-TBA mikropartiküllerinin mutlak biyoyararlanımı, % 7.24 ± 0.76 olarak hesaplanmıştır. Buna karşılık; kontrol grubu olarak verilen kitozan-insülin ve mannitol-insülin mikropartiküllerinin mutlak biyoyararlanımı, sırasıyla % 2.04 ± 1.33 ve % 1.04 ± 0.27 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar; kitozan-4-tiyobutilamidin ve glutatyon içeren mikropartikül formülasyonunun, peptit yapılı ilaçların nazal yolla uygulanmasında ümit verici bir formülasyon olduğunu göstermiştir.

Bernkop-Schnürch ve arkadaşları (35) tarafından yapılan bir çalışmada, mukoadezif nanopartiküler formülasyonu geliştirilmiştir. Nanopartiküller; tiyollenmiş kitozan-4-tiyobutilamidin konjugatının tripolifosfat (TPP) ile in situ jelasyonunu takiben, farklı konsantrasyonlarda hidrojen peroksit (H_2O_2) ile oksidasyon sonucu oluşan disülfid bağlarını stabilize edilerek hazırlanmıştır. Daha sonra, TPP diyaliz ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Model bileşik olarak florosein diasetat (FDA) kullanılmıştır. Sonuçlar; 268 ± 15 nm partikül büyüklüğünde ve % 2 FDA yükleme etkinliğinde nanopartiküllerin hazırlanabileceğini göstermektedir. Anyonik çapraz bağlayıcı TPP'ın uzaklaştırılmasına bağlı olarak, nanopartiküllerin zeta potansiyel değeri stabilitede herhangi bir bozulma olmaksızın 4 ± 1 mV'tan 19 ± 2 mV'a yükselmiştir. H_2O_2 'in formülasyondaki konsantrasyonu arttıkça, daha fazla molekül içi ve moleküllerarası disülfid bağlarının oluştuğu saptanmıştır. Partiküllerde daha fazla tiyol grubunun okside olmasının, mukoadezif özellikte azalmaya sebep olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte; partiküllerdeki tüm tiyol gruplarının % 91'i okside olsa bile, mukoadezif özelliğin modifiye edilmemiş partiküllere göre 2 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Leitner ve arkadaşları (125) tarafından yürütülen bir çalışmada, insan büyüme hormonunun (hGH) nazal yolla uygulanması için, polikarbofil-sistein ve glutatyon bazlı bir mikropartiküler ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Mikropartiküller; polikarbofil-sistein/glutatyon/hGH, polikarbofil/hGH veya mannitol/hGH karışımlarının demineralize suda çözündürülmesini takiben liyofilizasyon ve mikronizasyon ile hazırlanmıştır. Mikropartiküller, partikül büyüklüğü dağılımı ve şişme özelliklerine göre karakterize edilmiştir. Floresans ile işaretli hGH'nun salımı, Franz difüzyon hücreleri kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca, nazal biyoyararlanımı belirlemek için sıçanlarda in vivo çalışmalar yapılmıştır. Polikarbofil-sistein/glutatyon/hGH mikropartikülleri, polikarbofil/hGH partikülleriyle karşılaştırıldığında, benzer partikül büyüklüğü dağılımı ve benzer şişme özelliği göstermiştir. Ayrıca, her iki formülasyon benzer uzatılmış salım özelliği göstermiştir. Polikarbofil-sistein/glutatyon/hGH mikropartiküllerinin intranazal uygulaması sonucunda, sıçanlarda % 8.11 ± 2.15 relatif biyoyararlanım elde edilmiştir. Bu biyoyararlanım değeri, polikarbofil/hGH ve mannitol/hGH mikropartiküllerinin biyoyararlanım değerine göre sırasıyla 3 ve 3.3 kat daha yüksektir. Sonuçlar; hGH'nun sistemik uygulaması için, polikarbofil-sistein/glutatyon/hGH mikropartiküller formülasyonunun ümit verici olabileceğini göstermektedir.

Ayrıca son yıllarda, tiyollenmiş polimerler ile hazırlanan partiküler formülasyonların, gen taşıyıcı sistemlerde taşıyıcı matriks olarak kullanılma potansiyeli araştırılmıştır. Kitozan-EDTA ve kitozan-tiyobutilamidin ile hazırlanan partikülerle yapılan çalışmalarda, ümit verici sonuçlar elde edilmiştir (130, 160).

1.4.3.3 Jeller

Mukoadezif jellerin kullanım alanları; intraoral, vajinal, nazal ve oküler sistemlerde oldukça fazladır. Ancak şimdiye kadar mukoadezif jel formülasyonları,

adezif özelliklerinin genellikle yetersiz olması nedeniyle tam potansiyellerine ulaşamamıştır. Tiyomerlerin jel formülasyonlarında kullanılmasının sağladığı avantajlar, hem mukoadezif özelliklerin artırılması, hem de in sitü jelleşme özelliklerinin olmasıdır (117).

Yapılan bir çalışmada, model ilaç olarak insan büyüme hormonu (hGH) içeren polikarbofil-sistein/glutasyon jel formülasyonu hazırlanmıştır. Bu formülasyondan, sığır nazal mukozasından permeasyon çalışması yapılmış, model ilacın salım profili incelenmiş ve sıçanlarda in vivo çalışmalar yürütülmüştür. Permeasyon çalışmaları, etkin maddenin permeasyon oranında üç kata kadar bir artış olduğunu göstermiştir. Salım çalışmaları sonucunda ise, etkin maddenin formülasyondan matriks kontrollü olarak salım yaptığı görülmüştür. Son olarak, hazırlanan jel formülasyonları sıçanlara nazal yol ile uygulanmış ve modifiye edilmemiş polikarbofil ve serum fizyolojik ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta polikarbofil-sistein/glutasyon/hGH jelinin artırılmış ve uzatılmış bir hGH plazma konsatrasyonu-zaman profili gösterdiği saptanmıştır (127).

1.4.3.4 Sıvı formülasyonlar

Tiyomerler kuru halde saklandığında stabil haldedir (24). Sulu çözeltilerde ise, pH'a bağlı şekilde disülfid bağı oluşturdıkları görülmüştür. Tiyomerler, sulu çözeltilerdeki bu instabilitesi nedeniyle genellikle sıvı formülasyonlarda kullanılmazlar. Yine de son yıllarda yapılan çalışmalar, sıvı formülasyon inert koşullarda hazırlanırsa ve kullanılan kaplar içerisine demir oksitler gibi oksijen uzaklaştırıcılar ilave edilip alüminyum folyo ile kaplanırsa, tiyomerlerin sulu çözeltilerde stabil olabileceğini göstermiştir.

Özellikle oftalmik alanda sıvı formülasyonlar için tiyomerlerin kullanılabileceği gösterilmiştir. Örneğin, gözde en çok rastlanan hastalıklardan biri olan kuru göz sendromunda sıvı tiyomer formülasyonları oldukça faydalıdır (9). Bu hastalığın başlıca tedavisi yapay gözyaşı kullanılmasıdır ve bu kullanılan formülasyonlar çoğunlukla karbomer veya sodyum hiyalüronat gibi hidrofilik polimer içerirler. Ancak, bu polimerlerin mukoadezif özellikleri oldukça yetersizdir ve sık aralıklarla damlatarak uygulama gereklidir. Bu nedenle oküler yüzeydeki sistein yönünden zengin yan gruplar içeren mukus glikoproteinleri ile etkileşen tiyomer içeren göz damlaları, prekorneal gözyaşı film tabakasının stabilitesini daha uzun süre korur.

1.5 RİBOFLAVİN

Riboflavin veya diğer adıyla B₂ vitamini; süt, et (özellikle karaciğer ve böbrek), yumurta, fındık ve fıstık gibi çerezler ve zenginleştirilmiş unda bulunur. Yeşil sebzeler gibi bitkisel besinlerde (hububat türleri dışında) az, ancak yaygın olarak bulunur. Riboflavin eksikliği en sık görülen vitaminlerden biridir. Aktif şekli riboflavin fosfat (flavin mononükleotid, FMN) ve flavin adenin dinükleotid (FAD)'dir. İnsanlarda B₂ vitamini eksikliği belirtileri selim nitelikli bozukluklardır. Riboflavin, B₂ vitamini eksikliğinin profilaksisi ve tedavisinde kullanılır. Suda çözünen B vitaminlerinin çoğu birçok metabolik yolakla ilgili olduklarından hastalık durumu çoğu zaman multipl vitamin eksikliğine işaret eder. Pellegra hastalığında hem niasin hem de riboflavin eksikliği söz konusudur. Riboflavin splenomegali ve glutatyon redüktaz eksikliği ile ilgili mikrositik aneminin tedavisinde kullanılmıştır. Yüksek dozda migren ağrısını etkin bir şekilde önlediği gösterilmiştir (176).

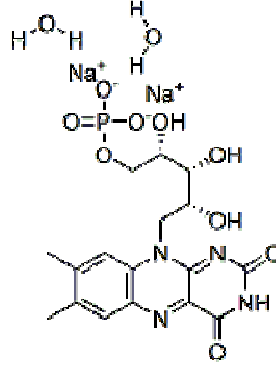
1.5.1 Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Riboflavin, sarıdan turuncu sarıya değişen renkte, kokusuz veya çok hafif kokulu, kristal yapıda higroskopik bir tuzdur.

Pratik çalışmalarımızda, daha iyi çözünürlük özellikleri nedeniyle riboflavin-5'-monofosfat sodyum tuzu dihidrat (RF5'PNa) kullanılmıştır. RF5'PNa'nın 1.37 g'ı yaklaşık 1 g riboflavin'e eşdeğerdir. İngiliz Farmakopesi (BP) ve Amerikan Farmakopesi (USP)'ye göre suda çözünür; alkolde çok hafif çözünür; pratik olarak eterde çözünmez. BP'ye göre sudaki %2'lik çözeltisinin pH'sı 4.0-6.3'tür. USP'ye

göre sudaki %1'lik çözeltisinin pH'sı 5-6.5'tir. RF5'PNa'nın açık kimyasal yapısı Şekil 26'da görülmektedir.

RF5'PNa, 15-30°C arasında kontrollü oda sıcaklığında ve sıkıca kapalı hava geçirmeyen kaplarda saklanmalıdır. Kuru halde ışıktan etkilenmez, fakat çözeltileri ışıktan etkilenerek hızla bozunur (63, 174, 176).



Şekil 26. RF5'PNa RF5'PNa'nın ($C_{17}H_{20}N_4NaO_9P \cdot 2H_2O$) açık kimyasal yapısı

1.5.2 Farmakokinetik Özellikleri

Riboflavin çoğunlukla oral yoldan verilir. Parenteral uygulanan multivitamin kombinasyonları içinde de yer alır. Gastrointestinal kanalın üst bölümündeki hızla absorbe olur besinler absorbe edilen miktarını artırır. Hepatit, siroz ve safra tıkanması gibi durumlar absorpsiyonunu azaltır.

Riboflavin 5-fosfat, gastrointestinal lümende absorpsiyon öncesi hızla FMN'ye defosforile olur. FAD ve FMN vücut dokularına geniş dağılım gösterir. FAD'nin esas olarak depolandığı yerler kalp, karaciğer, dalak ve böbreklerdir. Riboflavin plesentayı aşar ve anne sütüne geçer. Yarı ömrü 66-84 dakikadır. Karaciğer, gastrointestinal mukoza ve eritrositlerde önce FMN'ye fosforile olur; daha sonra karaciğerde FAD'ye dönüştürülür. Ana bileşiğin yaklaşık %9'u idrarda değişmeden elimine edilir. İdrarla atılan riboflavin miktarı dozun artmasına paralel olarak artar.

1.5.3 Etki Mekanizması

Flavoproteinler riboflavinin proteinlerle oluşturduğu kombinasyonlardır. Riboflavin in vivo ortamda önce FMN'e, sonra da FAD'e dönüştürülür. FMN sitokrom C redüktaz'ın ve L-amino asit dehidrojenaz enzimi koenzimidir. FAD yağların oksidasyonunda ilk basamağı katalize eden açıl-koenzim A dehidrojenaz enziminin koenziminin bir bölümünü oluşturur. FAD ayrıca D-amino asit dehidrojenaz, ksantin oksidaz ve diğer bazı enzimlerin de koenzimidir. Riboflavin indirekt olarak eritrosit bütünlüğünün sürdürülmesini sağlar. Migren patojenezinde mitokondrial disfonksiyonun rolü olabilir; bu nedenle migren baş ağrısı azaltması riboflavinin mitokondriyal metabolizma üzerindeki etkileriyle açıklanabilir.

1.5.4 Kullanılışı ve Yan Etkileri

Anemi, migren profilaksisi ve riboflavin eksikliği durumlarında endikedir. Yan etki olarak idrarda renklenme görülebilir. Riboflavin ile ilgili herhangi bir kontrendikasyon bildirilmemiştir.

1.5.5 Riboflavin ile Yapılmış Bazı Araştırmaların Özetleri

Riboflavin gastrointestinal kanalın üst kısmında dar bir absorpsiyon penceresine sahiptir. Midede kalış süresi uzatılmış formülasyonlarının hazırlanması, riboflavinin biyoyararlanımının ve terapötik etkinliğinin artırılması açısından faydalıdır (81, 111). Bu nedenle, birçok araştırmacı tarafından model ilaç olarak riboflavin içeren midede kalış süresi uzatılmış formülasyonlar geliştirilmiştir ve bunlardan bazıları aşağıda özetlenmektedir.

Stops ve arkadaşları (170); model ilaç olarak riboflavin içeren yüzen kalsiyum aljinat boncukları hazırlamıştır ve boncukların yapısı, yüzme kapasitesi,

sulu ortam içerisinde boncuklarda meydana gelen değişiklikler ve riboflavin salım özelliklerini incelemiştir. Kalsiyum aljinat boncuklarının dansitesinin 1 g/cm^3 'den az olduğu ve 13 saatten daha uzun bir süre yüzebilme kapasitesi olduğu saptanmıştır. Ayrıca riboflavin salım özellikleri 0.1 M HCl tamponu (pH 1.2), sitrat tamponu (pH 3), asetat tamponu (pH 5), distile su (pH 6.7) ve fosfat tamponu (pH 7.4) içerisinde incelenmiş ve riboflavin salımının alkali ortamlarda asit ortamlara göre daha hızlı olduğu görülmüştür.

Sato ve arkadaşları (168, 169) tarafından yapılan çalışmalarda, riboflavin içeren yüzen mikroküreler (mikrobalonlar), enterik akrilik polimerler kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlar; intragastrik yüzme özelliği olmayan mikroküreler ve riboflavin tozu ile in vitro ve in vivo olarak karşılaştırılmıştır. Riboflavinin farmakokinetiği, sağlıklı deneklerde riboflavinin üriner atılımı ile incelenmiştir. Sonuç olarak; yüzen mikrobalonlar ile, açlık durumunda riboflavinin üriner atılımının değişmediği; fakat tok deneklerde riboflavinin üriner atılımının, belirgin bir şekilde geciktiği görülmüştür.

Kagan ve arkadaşları (102) tarafından yapılan bir çalışmada ise, riboflavin içeren midede kalış süresi uzatılmış akordeon hap (Accordion Pill™) şeklinde bir formülasyon geliştirilmiştir. Bu formülasyon, düzlemsel polimerik levhaların akordeon şeklinde katlanarak standart bir jelatin kapsüle yerleştirilmesi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların midede kalış süresi, sağlıklı deneklerde manyetik rezonans görüntüleme yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuç olarak, formülasyonun ilk 4.5 saatte deneklerin %100'ünde; 10.5 saatte deneklerin %67'sinde ve 24 saatte de deneklerin %17'sinde midede kaldığı saptanmıştır.

Yapılan başka bir çalışmada ise, riboflavin içeren kollajen süngerler ile 3.5mmx9mmx18mm boyutlarında oblong tabletler hazırlanmıştır. Bu tabletlerin

boyu, gastrointestinal sıvılar ile temas edince birkaç dakika içerisinde 4-6 cm'e kadar artabilmektedir ve buna bağlı olarak midede kalış süreleri uzatılmıştır. Yapılan in vitro çalışmalar; riboflavin salımının 12 saate kadar uzatıldığını göstermiştir (69).

Deshpande ve arkadaşları (57) tarafından geliştirilen ve etkin maddeler olarak klorfeniramin maleat ve riboflavin içeren matriks tabletler; geçirgen ve elastik bir polimer olan Eudragit® ile kaplanmıştır. Bu tablet formülasyonlarının yapay mide vasatı içerisinde 10-15 dakika içerisinde pilordan geçemeyecek kadar şiştiği ve ilaç salımının gerçekleştiği 18-20 saat boyunca şişmiş halde kaldığı görülmüştür. Bu sürenin sonunda ise, tablet parçalanarak atılmıştır.

Hamdani ve arkadaşları (79) tarafından yapılan bir çalışmada, bağlayıcı olarak Compritol® ve Precirol® ve gaz-üretici ajan olarak da sodyum bikarbonat ve tartarik asit kullanılarak yüzen pelletler hazırlanmıştır. Riboflavin içeren bu pelletlerin in vitro olarak yüzmeye kapasitesi tayin edilmiştir ve formülasyonun etkinliği sağlıklı gönüllülerde in vivo olarak incelenmiştir.

Akiyama ve arkadaşları (3) tarafından yapılan bir çalışmada ise, riboflavin ve furosemit kullanılarak karboksivinil polimeri ile gastrik mukoadezif mikroküreler hazırlanmıştır. Hazırlanan mikroküreler jelatin kapsüllere doldurulduktan sonra in vitro salım çalışmaları yapılmış ve sıçanlar ile insanlarda in vivo çalışmalar yürütülmüştür. Sonuç olarak, adezif mikrokürelerin sağlıklı gönüllülerdeki üriner geri eldesinin adezif özelliği olmayan mikrokürelere göre 2.1 kat daha fazla olduğu ve daha uzun midede kalış süresi gösterdiği saptanmıştır.

1.5.6 Farmakopelerde Kayıtlı Preparatları

BP 2008 Vitamins B and C Injection
BPC 1973 Compound Vitamin B Tablets
BPC 1973 Strong Compound Vitamin B Tablets
USP 31 Riboflavin Injection
USP 31 Riboflavin Tablets

1.5.7 Türkiye’deki Ticari Preparatları

Kullanıldığı Müstahzar	Miktar	Firma
Enjektabl Preparat (Kombine)		
Aminosteril L-400 500 mL inf. şişe	1 mg	Fresenius Kabi
Polybion Ampul 5x2 mL ampul/kutu	4 mg	Palmer
Kapsül (Kombine)		
Tanepar Kapsül 30 kapsül/kutu	50 mg	Naturem
Solüsyon (Kombine)		
Beheptal Damla 10 mL şişe/kutu	2.6 mg/mL	Osel
Biogenol Vitamin Şurup 150 mL şişe/kutu	1.5 mg	Hakay
Diason 1000 mL torba	1.6 mg	Numil
Diason Low Energy 1000 mL torba	1.6 mg	Numil
Ferro Sanol B Şurup 150 mL şişe/kutu	0.43 mg	Adeka
Pharmaton Kiddi Şurup 100 mL şişe/kutu	3.5 mg	Boehringer Ingelheim
Zinko Fish Multivit. Şurup 150 mL şişe/kutu	1.03 mg	Merkez İlaç
Tablet (Kombine)		
Female Multiple Tablet 60 tablet/kutu	2 mg	Solgar
Male Multiple Tablet 60 tablet/kutu	2 mg	Solgar
Vita-Kid Wafers 50 tablet/kutu	2 mg	Solgar
VM-Prime 60 tablet/kutu	2 mg	Solgar

II. BÖLÜM

2 PRATİK ÇALIŞMALAR

2.1 KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Riboflavin 5'-monofosfat sodyum tuzu dihidrat (RF5'PNa)	Sigma (Almanya)
Sodyum klorür (NaCl)	Fluka (İsviçre)
Hidroklorik asit (HCl)	Gatt-Koller (Avusturya)
Mono potasyum fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Almanya)
Di-sodyum hidrojen fosfat dodekahidrat (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O)	Gatt-Koller (Avusturya)
Ellman [5,5'-ditiyobis (2-nitro benzoik asit)]	Sigma-Aldrich (Almanya)
Pikrilsülfonik asit çözeltisi (%5'lik, TNBS)	Sigma-Aldrich (Almanya)
Sodyum bikarbonat (NaHCO ₃)	Fluka (İsviçre)
Magnezyum sülfat heksahidrat (MgSO ₄ .6H ₂ O)	Fluka (İsviçre)
Potasyum klorür (KCl)	Gatt-Koller (Avusturya)
D-(+) Glukoz anhidrit	Fluka (Fransa)
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Sigma (Almanya)
Sodyum hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich (Almanya)
Poli(akrilik asit) [(C ₃ H ₄ O ₂) _n , MW. 450]	Aldrich (Almanya)
N-(3-dimetilaminopropiletil karboimid HCl (EDAC)	Sigma (Almanya)
L-Sistein HCl, anhidrit	Sigma (Almanya)
Selüloz membran (Dialysis Tubing Celulose, MWCO:12 kDa)	Sigma-Aldrich (Almanya)
Kitozan (Orta molekül ağırlıklı)	Aldrich (Almanya)
2-iminotiyolan HCl (Traut reaktifi)	Sigma (Almanya)
Asetik asit	Fluka (Almanya)
Tris(hidroksimetil)aminometan HCl	Fluka (İsviçre)
Sodyum borohidrit (NaBH ₄)	Sigma-Aldrich (Almanya)
Dietil eter	Merck (Almanya)
Müsin (Tip II)	Sigma-Aldrich (Almanya)

2.1.2 Kullanılan Araçlar

Hassas terazi	Sartorius CP224S-OCE
Hassas terazi (mg için)	Sartorius Genius
pH metre	Inolab, WTW 720
Manyetik Karıştırıcı	IKA Labortechnik
Florometre	Tecan, Fluostar Infinite M200
Vortex	Stuart Vortex Mixer SA7
Derin Dondurucu	Revco
Liyofilizator	Benchtop 2K, VirTis
Santrifüj	Eppendorf Mini Spin
Ultrasantrifüj	Sigma, 3-18K
İnkübatör	Heraeus Instruments D 6450
Çalkalayıcı su banyosu	Haake Thermo-Temp MgW
Su banyosu	Bartelt, GFL 1083
Tablet makinesi	Paul Weber
Friabilitör	Erweka TAR 10
Dijital kamera	Panasonic Lumix, FX10
Texture Profile Analyzer cihazı	TA-XTplus, Texture Analyzer, Stable Micro Systems
Dissolüsyon cihazı	Erweka DT700
Hava püskürtmeli değirmen (Air jet mil)	Hosokawa Alpine Aeroplex spiral jet mil 50 AS
Zeta potansiyeli/partikül boyutu ölçüm cihazı	Nicomp™ Zeta potential/Particle sizer 380 ZLS
Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)	Jeol SM, 5310LV
Dijital kumpas	Mitutoyo Absolute Digimatic Caliper
Peristaltik pompa	Ismatec IPC

2.2 KULLANILAN TAMPONLAR VE ÇÖZELTİLER

2.2.1 Enzimsiz Suni Mide Vasatı Hazırlanması (pH 1.2)

NaCl	2 g
Derişik HCl	7 mL
Distile su	k.m. 1000 mL

Enzimsiz suni mide vasatının hazırlanması için, öncelikle 2 gram sodyum klorür hassas terazide tartıldı. Bir miktar distile suda çözündürüldü. Üzerine 7 mL derişik hidroklorik asit ilave edildi ve distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Böylece 1000 mL pH 1.2 enzimsiz suni mide vasatı hazırlanmış oldu (174) .

2.2.2 0.5 M pH 8.0 Fosfat Tamponu (Ellman Tamponu)

Hazırlanması

KH ₂ PO ₄	1.871 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	84.613 g
Distile su	k.m. 500 mL

0.5 M pH 8.0 fosfat tamponunun hazırlanması için, 1.871 g potasyum dihidrojen fosfat ve 84.613 g sodyum monohidrojen fosfat hassas terazide tartıldı. Bir miktar distile suda çözündürüldü. 1 M sodyum hidroksit çözeltisi ile pH'ı 8'e ayarlandı. Daha sonra distile su ile 500 mL'ye tamamlandı. Böylece 0.5 M pH 8.0 fosfat tamponu (Ellman tamponu) hazırlanmış oldu (30).

2.2.3 Ellman Reaktifi Hazırlanması

5,5'-ditiyobis (2-nitro benzoik asit) 3 mg

0.5 M pH 8 fosfat tamponu (Ellman tamponu) 10 mL

Ellman reaktifinin hazırlanması için, 3 mg 5,5'-ditiyobis (2-nitro benzoik asit) hassas terazide tartıldı. 10 mL 0.5 M pH 8 fosfat tamponu (Ellman tamponu) içerisinde çözündürüldü. Böylece Ellman reaktifi hazırlanmış oldu (30).

2.2.4 TNBS Çözeltisi Hazırlanması

%5 Pikrilsülfonik asit çözeltisi (TNBS) 200 µL

%8'lik NaHCO₃ çözeltisi 9.8 mL

TNBS çözeltisi, 200 µL %5'lik pikrilsülfonik asit çözeltisi (TNBS) ve 9.8 mL %8'lik sodyumbikarbonat çözeltisinin karıştırılmasıyla hazırlandı (30).

2.2.5 Tris-Tamponu Hazırlanması

Tris-HCl 0.788 g

Distile su k.m. 100 mL

Tris-tamponu hazırlanması için, 0.788 g Tris HCl hassas terazide tartıldı. Bir miktar distile su içerisinde çözündürüldü. pH değeri 7.6'ya ayarlandı. Daha sonra distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Böylece Tris-tamponu hazırlanmış oldu (75).

2.2.6 Ussing Tamponu Hazırlanması

NaCl	7.25 g
MgSO ₄ .6H ₂ O	319.8 mg
KCl	370 mg
Glukoz anhidrat	4.98 mg
NaHCO ₃	2.1 g
Distile Su	k.m. 500 mL

Ussing tamponu hazırlanması için öncelikle, 7.25 g sodyum klorür, 319.8 mg magnezyum sülfat hegzahidrat, 370 mg potasyum klorür, 4.98 mg glukoz ve 2.1 g sodyum bikarbonat hassas terazide tartıldı. Bu maddeler bir miktar distile suda çözündürüldü. Daha sonra distile su ile 500 mL'ye tamamlandı (51).

2.2.7 HEPES Tamponu Hazırlanması

HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	953.2 mg
Ussing tamponu	k.m. 100 mL

HEPES tamponunun hazırlanması için, 953.2 mg HEPES hassas terazide tartıldı. Bir miktar Ussing tamponu içinde çözündürüldü. pH'ı 7.4'e ayarlandı ve Ussing tamponu ile 100 mL'ye tamamlandı (51).

2.3 RİBOFLAVİN ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

2.3.1 RF5'PNa'nın Florometrik Miktar Tayininde Kullanılmak Üzere Standart Doğrularının Hazırlanması

2.3.1.1 RF5'PNa'nın florometrik miktar tayininde kullanılmak üzere enzimsiz suni mide vasatındaki (pH 1.2) standart doğrularının çizilmesi

RF5'PNa'nın miktar tayininde kullanılmak üzere enzimsiz suni mide vasatındaki (pH 1.2) standart doğrusu çizildi. Bunun için, öncelikle 1 mg RF5'PNa hassas terazide tartıldı ve 10 mL suni mide vasatı (pH 1.2) içinde çözündürüldü. Bu stok çözeltiden Eppendorf otomatik pipetler kullanılarak 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 ve 0.781 µg/mL konsantrasyonlarında seyreltmeler yapıldı. Her bir seyreltmeden mikropalakaların kuyucuklarına 100 µL örnek konuldu. Florometre ile, 444 nm ekzitasyon ve 530 nm emisyon dalga boylarında bu konsantrasyonlara karşılık gelen floresan şiddeti değerleri okundu (174). RF5'PNa konsantrasyonuna karşı, floresan şiddeti değerleri grafiğe geçirilerek standart doğruları çizildi ve doğru denklemleri hesaplandı. Yapılan çalışmaların hassasiyeti açısından iki farklı konsantrasyon aralığında iki farklı standart doğru çizildi.

2.3.1.2 RF5'PNa'nın florometrik miktar tayininde kullanılmak üzere HEPES tamponunda (pH 7.4) standart doğrusunun çizilmesi

RF5'PNa'nın miktar tayininde kullanılmak üzere HEPES tamponunda (pH 7.4) standart doğrusunun çizilmesi için, öncelikle 1 mg RF5'PNa hassas terazide tartıldı ve 10 mL HEPES tamponu (pH 7.4) içinde çözündürüldü. Bu stok çözeltiden

Eppendorf otomatik pipetler kullanılarak 0.390, 0.195, 0.097, 0.048, 0.024 ve 0.012 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında seyreltmeler yapıldı. Her bir seyreltmeden mikropalakaların kuyucuklarına 100 μL örnek konuldu. Florometre ile, 444 nm ekzitasyon ve 530 nm emisyon dalga boylarında bu konsantrasyonlara karşılık gelen floresan şiddeti değerleri okundu (174). RF5'PNa konsantrasyonuna karşı, floresan şiddeti değerleri grafiğe geçirilerek standart doğru denklemi bulundu.

2.3.2 Miktar Tayini Yönteminin Analitik Validasyonu

Validasyon, etken maddenin miktar tayini için yöntemin, doğru ve kesin bir şekilde sürekli olarak bekleneni gerçekleştirdiğinin kanıtlanması için yapılması gereken bütün işlemleri kapsar. Böylece analizi yapılacak maddenin miktar tayininde kullanılan yöntemin güvenilirliği kanıtlanmış olur. Bu nedenle çalışmamızda kullanılacak miktar tayini yöntemlerinin kabul edilebilirliğini sağlayan ve aşağıda anlatılan bazı validasyon parametreleri incelenmiştir (179):

- Doğrusallık (Linearity)
- Doğruluk ve geri elde edilebilirlik (Accuracy and recovery)
- Kesinlik (Precision)
 - ✓ Tekrar edilebilirlik (Repeatability)
 - ✓ Tekrar elde edilebilirlik (Reproducibility)
- Özgünlük, seçicilik (Specificity)
- Stabilitate (Stability)

2.3.2.1 Doğrusallık

Örnekteki maddenin belli sınırlar içindeki konsantrasyonu ile, elde edilen yanıtın orantılı olduğunun göstergesidir. Bunun için konsantrasyona karşılık gelen floresan şiddeti değerlerinin doğrusal regresyon yöntemi ile regresyon doğrusu hazırlanır. Bu amaçla, RF5'PNa'nın enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) ve HEPES tamponu (pH 7.4) içerisinde stok çözeltileri hazırlandı. Stok çözeltilerden farklı oranlarda enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) ve HEPES tamponu (pH 7.4) ile seyreltme yapıldı. Her konsantrasyon ve bu konsantrasyona karşılık gelen floresan şiddeti değerleri yardımıyla standart doğrunun denklemi ve determinasyon katsayısı bulundu.

2.3.2.2 Doğruluk ve geri elde edilebilirlik

Saptanan değer gerçeğe yakınlığıdır. Miktar tayini yönteminin doğruluğunu gösterir. Geri elde edilebilirlik ile hesaplanır. Yöntemin doğruluğu geri alma yüzdesine bağlıdır.

Bu amaçla, RF5'PNa'nın enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisindeki stok çözeltilerinden 3 farklı konsantrasyonda ve aynı şekilde HEPES tamponu (pH 7.4) içerisinde stok çözeltisinden de 3 farklı konsantrasyonda 6 seri çözelti hazırlandı ve floresan şiddeti değerleri florometre ile 444 nm ekzitasyon ve 530 nm emisyon dalga boylarında okundu. Okunan floresan şiddeti değerleri kalibrasyon denkleminde yerine konarak elde edilen konsantrasyonlardan % geri elde değerleri bulundu:

$$\%Geri\ Elde = \frac{C_{Pratik}}{C_{Teorik}} 100 \dots\dots\dots (Denklem 1)$$

C_{Pratik}: Etkin maddenin kalibrasyon denkleminde elde edilen konsantrasyon değeri

C_{Teorik}: Etkin maddenin enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) veya HEPES tamponu (pH 7.4) içerisindeki konsantrasyonları

2.3.2.3 Kesinlik

Miktar tayininde kullanılan yöntemin birbirini takip eden ölçümleri arasındaki yakınlık derecesidir. Kesinlik, bir yöntemin tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik derecelerinin de bir ölçüsüdür. Analitik yöntemin kesinliği için, istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda aynı konsantrasyondaki örnek ardarda ölçülerek aritmetik ortalama ve standart sapma (SS) hesaplanarak değerlendirildi.

2.3.2.3.1 Tekrar edilebilirlik

Standart doğru denklemi oluşturmak için hazırlanan stok çözeltiden bir konsantrasyon seçildi ve bu konsantrasyondaki çözeltinin floresan şiddeti art arda 6 kez ölçüldü. Floresan şiddetine karşılık gelen konsantrasyonların ortalaması ve standart sapması hesaplandı.

2.3.2.3.2 Tekrar elde edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik için, aynı stoktan hareket edilerek seyreltmeyle hazırlanan 6 adet aynı konsantrasyondaki çözeltinin floresan şiddeti değerleri ölçüldü ve bunlara karşılık gelen konsantrasyon değerlerinin ortalama ve SS hesaplandı.

2.3.2.4 Özgünlük, seçicilik

Miktar tayini yönteminin sadece analiz edilmesi istenen yapıyı saptayabilmesi için, enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) ve HEPES tamponunun (pH 7.4) floresan şiddeti değerleri florometre ile 444 nm ekzitasyon ve 530 nm emisyon dalga boylarında okundu.

2.3.2.5 Stabilité

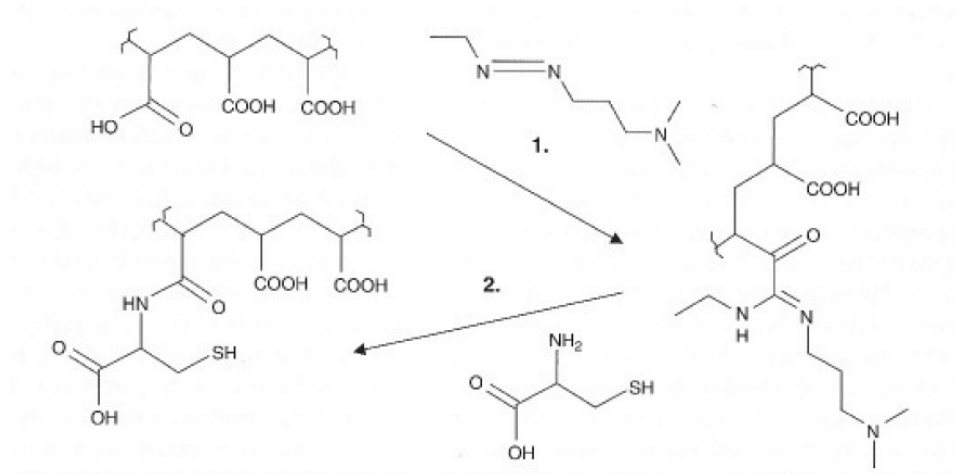
RF5'PNa'nın enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) ve HEPES tamponunda (pH 7.4) belli konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri, deney koşullarında ve ışıktan korunarak saklandı ve stabiliteleri değerlendirildi. Bu amaçla RF5'PNa'nın enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde 5 µg/mL, HEPES tamponu (pH 7.4) içeririnde ise 0.195 µg/mL konsantrasyonda çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerin hazırlandığı andan itibaren 1., 3., 6., 12. ve 24. saatlerde floresan şiddeti değerleri okunarak konsantrasyondaki değişim saptandı.

2.4 POLİMER SENTEZİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

2.4.1 PAA-Sistein Konjugatının Sentezlenmesi Üzerine Çalışmalar

1 g poli(akrilik asit) (PAA) (Molekül ağırlığı 450.00) 100 mL distile su içerisinde manyetik karıştırıcıda şişmeye bırakıldı. Polimer tamamen şiştikten sonra 1 N NaOH ile polimer çözeltisinin pH'ı 5.8'e ayarlandı ve manyetik karıştırıcıda tamamen homojen hale gelene kadar karıştırılmaya devam edildi. Bu sırada, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karboimid hidroklorür'ün (EDAC) 4 mL distile su içerisinde 100 mM konsantrasyonda çözeltisi hazırlandı ve hidrate olmuş polimerin karboksilik asit gruplarını aktive etmesi için polimer çözeltisine ilave edildi. Manyetik karıştırıcıda, oda sıcaklığında 20 dakika boyunca karıştırmaya devam edildi. 20 dakikanın sonunda L-sistein'in 10 mL distile su içerisindeki %10 konsantrasyonunda hazırlanan çözeltisi ilave edildi ve pH 6'ya ayarlandı. Reaksiyonun gerçekleşmesi için 3 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırmaya devam edildi. 3 saatin sonunda, ortamda bağlanmadan kalan L-sisteinin uzaklaştırılması için selüloz membranlardan (Dialysis tubing cellulose, M.W.C.O.: 12 kDa) diyaliz işlemi yapıldı. Diyaliz işlemi 10°C sıcaklıkta ve karanlıkta 12'şer saat süre ile, 2 kere 0.2 mM HCl tamponu, 2 kere %1 NaCl içeren 0.2 mM HCl tamponu ve son olarak yine 2 kere 0.2 mM HCl tamponuna karşı yapıldı. Diyaliz işleminden sonra polimer çözeltisi petri kutularına alındı ve derin dondurucularda -70°C'de donduruldu. Son olarak, dondurulmuş polimer çözeltisi -78°C'de ve 0.01 mbar basınçta liyofilize edildi. Hazırlanan liyofilize polimer kullanılıncaya kadar buzdolabında 4°C'de saklandı (30, 135)

PAA-sistein konjugatının sentez basamakları Şekil 27'de görülmektedir.

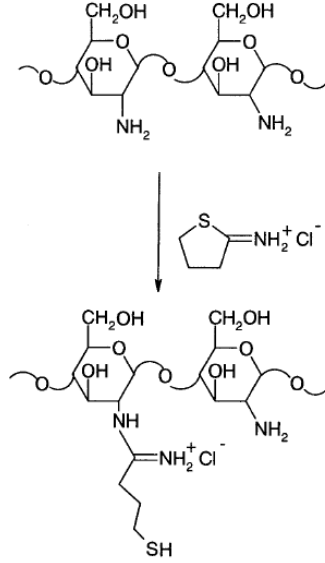


Şekil 27. PAA-sistein konjugatının sentez basamaklarının şematik olarak gösterilmesi (20)

2.4.2 Kitozan-TBA Konjugatının Sentezlenmesi Üzerine Çalışmalar

Öncelikle, 1 g orta molekül ağırlığında olan kitozan tartıldı ve 200 mL %1'lik asetik asit çözeltisi içinde şişmeye bırakıldı. Tamamen çözündükten sonra, 1 M NaOH ile çok yavaş bir şekilde pH'ı 6.5'e ayarlandı. Üzerine 400 mg 2-iminotiyolan HCl (Traut reaktifi) ilave edildi. Ağzı sıkı bir şekilde parafilm kaplanarak oda sıcaklığında 12-24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılarak, reaksiyonun gerçekleşmesi beklendi. Hazırlanan kitozan çözeltisi, ortamdaki bağlı olmayan 2-iminotiyolanın uzaklaştırılması için 1 kere 5 mM HCl çözeltisi, 2 kere % 1 NaCl içeren 5 mM HCl çözeltisi, 1 kere 5 mM HCl çözeltisi ve son olarak da 0.4 mM HCl çözeltisi içinde selüloz membranlardan (Dialysis tubing cellulose, M.W.C.O.: 12 kDa) 12'şer saat diyaliz edildi. Diyaliz işleminden sonra polimer çözeltisi petri kutularına alındı ve derin dondurucularda -70°C'de donduruldu. Son olarak, dondurulmuş polimer çözeltisi -78°C'de ve 0.01 mbar basınçta liyofilize edildi. Hazırlanan liyofilize polimer, kullanılıncaya kadar buzdolabında 4°C'de saklandı.

(89, 156). Sentezlenen kitozan-TBA konjugatının sentez basamakları Şekil 28’de görülmektedir.



Şekil 28. Kitozan-TBA konjugatının sentez basamaklarının şematik olarak gösterilmesi (72)

2.4.3 Sentezlenen Polimerlerde Yapılan Kontroller

2.4.3.1 Ellman testinde kullanılmak üzere L-sisteinin 0.5 M pH 8 fosfat tamponu (Ellman tamponu) içerisinde standart doğrusunun çizilmesi

Sentezlenen konjugatlara immobilize olan serbest tiyol grubu miktar tayininde kullanılmak üzere, L-sisteinin 0.5 M pH 8 fosfat tamponu (Ellman tamponu) içerisinde standart doğrusu hazırlandı. Bunun için, 1 mg L-sistein HCl tartıldı ve 1 mL 0.5 M pH 8 fosfat tamponu (Ellman tamponu) içinde çözündürüldü. Daha sonra bu stok çözeltiden 1.56-50.0 µg/mL konsantrasyon aralığında seyreltmeler yapıldı ve seyreltmelerin üzerine Ellman reaktifi ilave edildi. Bu hazırlanan örnekler oda sıcaklığında, karanlıkta 2 saat süre boyunca inkübe edildi. Bu sürenin sonunda örnekler 13400 rpm hızda 5 dakika santrifüje edildi. Santrifüj işleminden sonra üstteki sıvı kısımdan alınan 300 µL örnekler mikropiplakalara

konuldu ve 450 nm dalga boyunda florometre ile floresan şiddetleri ölçüldü. L-sistein konsantrasyonuna karşı, floresan şiddeti değerleri grafiğe geçirilerek standart doğru denklemi bulundu.

2.4.3.2 TNBS testinde kullanılmak üzere L-sisteinin %0.5 NaCl çözeltisi içerisinde standart doğrusunun çizilmesi

Sentezlenen PAA-sistein konjugatına immobilize olmayan ve ortamdan diyaliz ile uzaklaştırılmayan L-sistein miktarının tayininde kullanılmak üzere, L-sisteinin %0.5 NaCl çözeltisi içerisinde standart doğrusu hazırlandı. Bunun için, 1 mg L-sistein HCl tartıldı ve 1 mL %0.5 NaCl çözeltisi içinde çözündürüldü. Daha sonra, bu stok çözeltiden 1.56-25.0 µg/mL konsantrasyon aralığında seyreltmeler yapıldı ve seyreltmelerin üzerine TNBS çözeltisi ilave edildi. Bu hazırlanan örnekler, karanlıkta çalkalayıcı su banyosunda 37°C sıcaklıkta 90 dakika süre ile inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda, 13400 rpm hızda 5 dakika santrifüje edildi. Santrifüj işleminden sonra, üstteki sıvı kısımdan alınan 300 µL örnekler mikrotiplalara konuldu ve 450 nm dalga boyunda florometre ile floresan şiddeti değerleri ölçüldü.

2.4.3.3 Disülfid bağı testinde kullanılmak üzere L-sisteinin Tris-tamponu içerisinde standart doğrusunu çizilmesi

Sentezlenen konjugatlarda, disülfid bağı şeklinde bulunan okside olmuş tiyol grubu miktar tayininde kullanılmak üzere, L-sisteinin Tris-tamponu içerisinde standart doğrusu hazırlandı. Bunun için, 1 mg L-sistein HCl tartıldı ve 1 mL Tris-tamponu içinde çözündürüldü. Daha sonra, bu stok çözeltiden 3.13-100 µg/mL konsantrasyon aralığında seyreltmeler yapıldı. Bu seyreltmelerin üzerine taze olarak

hazırlanmış %4 (a/h) konsantrasyondaki sodyumborohidrit (NaBH_4) çözeltisi ilave edildi. Bu hazırlanan örnekler, karanlıkta çalkalayıcılı su banyosunda 37°C sıcaklıkta, 60 dakika süresince inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, önce her bir örneğe damla damla 5N HCl ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve arkasından pH 8 fosfat tamponu (1 M) ilave edildi. Üzerine yine taze olarak hazırlanmış Ellman reaktifi ilave edildi ve 1 saat boyunca karanlıkta inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, çözeltiden alınan 300 μL örnekler mikrotiplakalara konuldu ve 450 nm dalga boyunda florometre ile floresan şiddeti değerleri ölçüldü.

2.4.3.4 Sentezlenen PAA-sistein konjugatında yapılan kontroller

2.4.3.4.1 Ellman testi

Sentezlenen PAA-sistein konjugatından 0.5 mg tartıldı ve 500 μL 0.5 M fosfat tamponu içinde 30 dakika boyunca şişmeye bırakıldı. Daha sonra üzerine 500 μL Ellman reaktifi ilave edildi ve oda sıcaklığında ışıktan korunarak 2 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda, 13400 rpm hızda 5 dakika boyunca santrifüje edildi. Santrifüj işleminden sonra örneklerden alınan 300 μL mikrotiplakalara konuldu ve 450 nm dalga boyunda florometre ile floresan şiddeti ölçüldü.

2.4.3.4.2 TNBS testi

Sentezlenen PAA-sistein konjugatından 0.5 mg tartıldı ve 500 μL %0.5 NaCl çözeltisi içinde 30 dakika boyunca şişmeye bırakıldı. Daha sonra üzerine 500 μL TNBS çözeltisi ilave edildi ve 37°C sıcaklıkta, karanlıkta 90 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda, 13400 rpm hızda 5 dakika boyunca santrifüje edildi.

Santrifüj işleminden sonra örneklerden alınan 300 µL mikroplakalara konuldu ve 450 nm dalga boyunda florometre ile floresan şiddetleri ölçüldü.

2.4.3.4.3 Disülfit bağı testi

Sentezlenen PAA-sistein konjugatından 0.5 mg tartıldı üzerlerine 200 µL distile su ilave edildi ve şişmesi için 30 dakika beklendi. 30 dakika sonunda, üzerine 300 µL Tris-tamponu (pH 7.6) ilave edildi. Üzerine taze olarak hazırlanmış %4 konsantrasyonda NaBH₄ çözeltisi ilave edilerek disülfit bağlarının indirgenmesi sağlandı. Bu hazırlanan örnekler, karanlıkta çalkalayıcı su banyosunda 37°C sıcaklıkta, 60 dakika süresince inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda, reaksiyonu durdurmak için her bir örneğe damla damla 200 µL 5N HCl ve arkasından 1 mL pH 8 fosfat tamponu (1 M) ilave edildi. Üzerine yine taze olarak hazırlanmış 100 µL Ellman reaktifi ilave edildi ve 1 saat boyunca karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda, örneklerden alınan 300 µL mikroplakalara konuldu ve 450 nm dalga boyunda florometre ile floresan şiddeti değerleri ölçüldü.

2.4.3.5 Sentezlenen kitozan-TBA konjugatıda yapılan kontroller

2.4.3.5.1 Ellman testi

Sentezlenen kitozan-TBA konjugatından 0.5 mg tartıldı ve 500 µL 0.5 M fosfat tamponu içinde 30 dakika boyunca şişmeye bırakıldı. Daha sonra üzerine 500 µL Ellman reaktifi ilave edildi ve oda sıcaklığında ışıktan korunarak 2 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda, 13400 rpm hızda 5 dakika boyunca santrifüje edildi. Santrifüj işleminden sonra örneklerden alınan 300 µL

mikroplakalara konuldu ve 450 nm dalga boyunda florometre ile floresan şiddeti ölçüldü.

2.4.3.5.2 Disülfid bağı testi

Sentezlenen kitozan-TBA konjugatından 0.5 mg tartıldı üzerlerine 200 µL distile su ilave edildi ve şişmesi için 30 dakika beklendi. 30 dakika sonunda üzerine 300 µL Tris-tamponu (pH 7.6) ilave edildi. Üzerine taze olarak hazırlanmış %4 konsantrasyonda NaBH₄ çözeltisi ilave edildi. Bu hazırlanan örnekler, karanlıkta çalkalayıcı su banyosunda 37°C sıcaklıkta, 60 dakika süresince inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda, reaksiyonu durdurmak için her bir örneğe damla damla 200 µL 5 N HCl ve arkasından 1 mL pH 8 fosfat tamponu (1 M) ilave edildi. Üzerine yine taze olarak hazırlanmış 100 µL Ellman reaktifi ilave edildi ve 1 saat boyunca karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda, örneklerden alınan 300 µL mikroplakalara konuldu ve 450 nm dalga boyunda florometre ile floresan şiddeti değerleri ölçüldü.

2.5 RİBOFLAVİNİN SIÇAN MİDE MUKOZASINDAN GEÇİŞ ÇALIŞMALARI

RF5'PNa'nın sıçan mide mukozasından geçiş çalışmaları, apikal (donör) ve bazolateral (akseptör) hücrelerinin hacmi 1 mL (=1 cm³) ve permeasyon alanı 0.64 cm² olan Ussing tipi hücreler (Şekil 29) kullanılarak yapıldı.

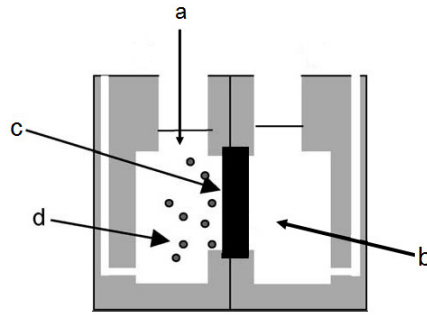


Şekil 29. Ussing tipi hücrelerin görünümü

Bu amaçla, 250-300 g ağırlığında olan erkek sıçanlar kurban edilerek mideleri hızlı bir şekilde çıkarıldı ve mide içeriği boşaltıldı. Mide, glanduler mide ve ön mide olmak üzere iki kısma ayrıldı. Glanduler mide kısmı, dikkatli bir şekilde Ussing hücresine monte edildi. Önceden 37°C'ye getirilmiş HEPES tamponundan 1 mL apikal ve bazolateral hücrelere konuldu. Bu şekilde hazırlanan Ussing hücreler 30 dakika süre ile karanlıkta, 37°C'lik su banyosunda inkübasyona bırakıldı (104).

Apikal hücredeki HEPES tamponu, 30 dakikanın sonunda enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde %0.25 (a/h) konsantrasyonda L-glutasyon (GSH) içeren veya içermeyen polimer çözeltisi (%0.5 a/h) ile yer değiştirildi. Kontrol grubu olarak, GSH içeren (%0.25, a/h) veya içermeyen enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde 20 µg/mL konsantrasyonda RF5'PNa çözeltisi kullanıldı.

Çalışma boyunca hücrelerin sıcaklığı $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutuldu. 3 saat boyunca her 30 dakikada bir bazolateral hücrelerden $100\ \mu\text{L}$ örnek alındı ve bu hücrelere aynı miktar enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) ilave edildi. Örnekler mikropalakalara konuldu ve RF5'PNa miktarı, florometre ile floresan şiddeti değerleri okunarak hesaplandı. Çalışmalar en az 3 paralel olarak tekrarlandı. RF5'PNa'nın Ussing tipi hücreler ile yapılan in vitro geçiş çalışması şematik olarak Şekil 30'da görülmektedir.



Şekil 30. RF5'PNa'nın Ussing tipi hücreler ile yapılan mide mukozasından in vitro geçiş çalışmalarının şematik görünüşü
[a: apikal (donör) hücre; b: bazolateral (akseptör) hücre; c: sıçan mide mukozası; d: RF5'PNa çözeltisi] (136)

Çalışmanın sonunda, elde edilen verilerden hareketle permeasyon katsayısı (apparent permeability coefficient, P_{app}) değerleri aşağıda verilen denklem yardımı ile hesaplandı:

$$P_{app} = Q / (A * c * t) \dots\dots\dots (\text{Denklem 2})$$

P_{app} = Permeasyon katsayısı (cm/saniye)

Q = Sıçan mide mukozasından geçen RF5'PNa miktarı (μg)

A = Ussing hücrelerin difüzyon alanı (cm^2)

c = RF5'PNa'nın apikal hücredeki ilk konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)

t = Deneyin süresi (saniye)

2.6 FORMÜLASYON ÇALIŞMALARI

2.6.1 Tablet Formülasyonları

2.6.1.1 Tablet formülasyonlarının hazırlanması

Her bir tablet için hassas terazide tartılmış 20 mg modifiye edilmemiş PAA polimeri veya tiyollenmiş PAA-sistein konjugatı distile su içerisinde; 20 mg modifiye edilmemiş kitozan polimeri veya tiyollenmiş kitozan-TBA konjugatı ise %6'lık asetik asit çözeltisi içerisinde şişmeye bırakıldı. Şişme tamamlanıp homojen jeller oluşunca, bu jellere her bir tablet için 10 mg RF5'PNa ilave edildi. Jeller manyetik karıştırıcıda homojen hale gelene kadar karıştırıldı ve liyofilize edildi. Daha sonra, 30 mg liyofilize edilmiş polimer-model ilaç karışımı, 5 mm çaplı, düz yüzlü tablet kalıpları ile 5 kN basınçta ve 10 saniye süre ile basılarak tabletler hazırlandı.

2.6.1.2 Tabletlerde yapılan farmasötik kontroller

Basılan tabletlerde USP XXX'a göre ağırlık sapması, sertlik, friabilite ve çap-kalınlık oranı kontrolleri yapıldı (174).

2.6.1.2.1 Ağırlık sapması kontrolü

Ağırlık sapması kontrolü her formülasyon için 20 tabletin teker teker hassas terazide tartılmasıyla yapıldı. Daha sonra ortalama ağırlık ve standart sapma hesaplandı.

2.6.1.2.2 Sertlik kontrolü

Her formülasyon için 6 tablet üzerinden sertlik kontrolü yapıldı. Tabletler teker teker aletin yuvasına yerleştirildi. Sıkıştırma sonucunda tabletin kırıldığı andaki sertlik aletin skalasından okundu. Tabletlerin ortalama sertliği ve standart sapması hesaplandı.

2.6.1.2.3 Ufalanma-aşınma (friabilite) kontrolü

Her tablet formülasyonundan 10 adet tablet hassas terazide tam olarak tartıldı ve friabilitöre konuldu. Alet 25 devir/dakika hızda 4 dakika çalıştırıldı. Süre sonunda tabletler aletten çıkarılarak tekrar hassas terazide tartıldı ve ağırlık farkı saptandı. % ufalanma miktarı hesaplandı ve %0.8'i geçip geçmediği kontrol edildi.

2.6.1.2.4 Çap ve kalınlık kontrolü

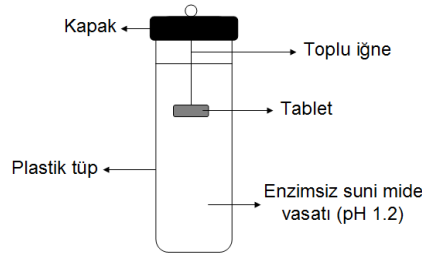
Her bir formülasyon için 20 tablette çap ve kalınlık ölçümleri dijital kumpas aleti ile yapıldı. Elde edilen değerlerin ortalaması ve standart sapmaları hesaplandı. Standart sapmanın $\pm\%5$ 'i geçip geçmediği kontrol edildi. Ayrıca tabletlerin çap/kalınlık oranları hesaplandı ve tablet kalınlıklarının çapın dörtte biri oranına uyup uymadığı kontrol edildi.

2.6.1.3 İn vitro dağılma çalışması

Tabletlerin in vitro dağılma çalışmaları, USP XXX'a göre suni mide vasatı (pH 1.2) içinde, 37°C'de sıcaklıkta ve 0.5 s^{-1} osilasyon frekansında yapıldı.

2.6.1.4 Tabletlerde yapılan su absorplama kapasitesi çalışması

Tabletlerin su absorplama kapasitesi, gravimetrik olarak tayin edildi. 30 mg ağırlığındaki tabletler plastik bir tüpün kapağının içerisinden geçirilmiş toplu iğnelerin ucuna sabitlendi ve içlerinde 37°C sıcaklıkta enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) bulunan tüplerin içlerine daldırıldı (Şekil 31). Belirli zaman aralıklarında, tabletler ortamdan çıkartıldı, üzerlerindeki fazla su dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı ve tabletler hassas terazide tartılarak absorplanan su miktarı gravimetrik olarak belirlendi. Çalışma süresi boyunca, tüpler bir su banyosu içerisine yerleştirilerek deney sıcaklığı 37±0.5°C’de sabit tutuldu.



Şekil 31. Tabletlerde yapılan su absorplama kapasitesi çalışmasının şematik görünümü

Tabletlerin su absorplama kapasitesi oranları aşağıdaki denklem yardımı ile hesaplandı:

$$\text{Su absorplama kapasitesi oranı} = W_{at}/W_o \dots \dots \dots \text{Denklem 3}$$

W_{at} : t anındaki absorplanan su miktarı

W_o : kuru tabletlerin ilk ağırlığı

Ayrıca, tabletlerin morfolojik özelliklerinin incelenmesi için, tabletler bir dijital kamera ile görüntülendi. Tiyomerler ile hazırlanan tabletler enzimsiz suni

mide vasatı (pH 1.2) içerisinde 6 saat bekletildikten sonra ortamdan çıkarıldı, fazla su dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı ve tabletlerin resmi çekildi.

2.6.1.5 Tabletlerin mukoadezif kuvvetlerinin tayini

Mukoadezif tabletlerin mukozaya yapışma kuvvetini ölçmek için, Şekil 32’de görülen Texture Profile Analyzer (TPA) cihazı kullanıldı. Tabletlerin mukoadezif kuvvetleri, tablet formülasyonunun hazırlanan müsin disklerden kopması için gereken kuvvetin TPA kullanılarak ölçülmesi ile tayin edildi (37, 96, 97).



Şekil 32. Texture Profile Analyzer cihazının görünüşü

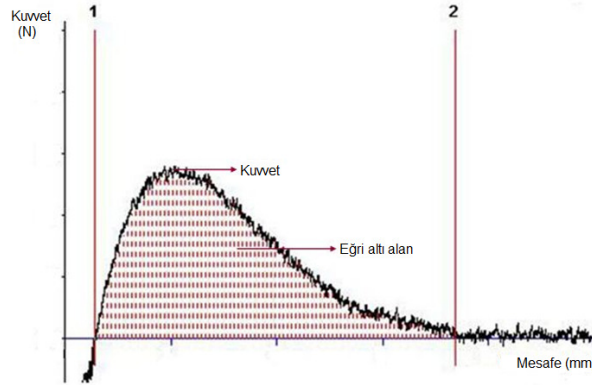
Bu çalışma için öncelikle müsin diskler hazırlandı. Bu diskler, domuz midesinden elde edilen 300 mg müsinin, 13 mm çaplı düz yüzü tablet kalıpları kullanılarak tablet makinesinde basılmasıyla hazırlandı. Mukoadezyon testine başlamadan önce; müsin diskler, hazırlanan %5’lik müsin çözeltisi ile 30 saniye boyunca ıslatıldı. 30 saniye sonunda, müsin diskin yüzeyindeki fazla çözelti dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Müsin diskler, TPA’ın alt tablasına, silindirik probun altına gelecek şekilde çift taraflı yapışkan bantlar ile yapıştırıldı. Tablet formülasyonları ise, probun ucuna yine çift taraflı bantlar kullanılarak yapıştırıldı. Tableti taşıyan prob, sabit hızda inerek müsin disk yüzeyi ile 0.1 N kuvvet ile 180 saniye boyunca

temas ettirildi. Bu sürenin sonunda prob, 0.1 mm.s^{-1} sabit hızıyla yukarı doğru çekildi ve tableti müsin diskten koparmak için gerekli kuvvet bulundu.

Bu çalışmanın sonunda, Şekil 33'de şematik olarak görülen kuvvet-mesafe eğrisi elde edildi. Bu eğrinin tepe noktası tabletlerin mukoadezif kuvvet değerini verir. Bu eğriden ayrıca, eğri altı alan değeri (mukoadezyon) hesaplandı. Bu alan değerinden hareketle de, aşağıdaki denklem kullanılarak 1 cm^2 'ye düşen mukoadезyon işi (mJ/cm^2) hesaplandı.

$$\text{Mukoadezyon işi (mJ/cm}^2\text{)} = \text{AUC} / \pi r^2 \dots\dots\dots \text{Denklem 4}$$

πr^2 :Müsin disk ile temasta olan tabletin yüzey alanı



Şekil 33. Tabletlerin mukoadезyonlarının tayininde kullanılan kuvvet-mesafe eğrisi

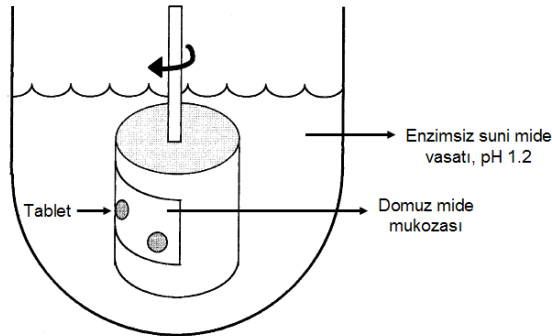
Tabletlerin mukoadezif kuvvetlerinin tayini testi, her bir formülasyonu için 6 farklı tablet ile tekrarlandı ve standart sapmalar hesaplandı. Test parametreleri aşağıda toplu bir şekilde görülmektedir.

Test Parametreleri

Prob:	Perspex (çap 10cm, uzunluk 4cm)
Test öncesi probun hızı:	0.5 mm/saniye
Test esnasında probun hızı:	0.5 mm/saniye
Test sonrası probun hızı:	0.1 mm/saniye
Uygulanan kuvvet:	0.1 N
Dönüş mesafesi:	5 mm
Kontakt süresi:	180 saniye
Hedef modu:	Oto
Teste başlamak için probun hissetmesi gereken kuvvet:	0.04903 N

2.6.1.6 Tabletlerin mukoadazyon sürelerinin tayini

Tabletlerin mukoadezif özellikleri, döner silindir yöntemi adıyla da bilinen ikinci bir yöntemle de tayin edildi. Mezbahadan temin edilen ve paslanmaz çelik silindirlere (çap 4.4 cm, yükseklik 5.1 cm, USP-XXX, aparat 4-silindir) yapıştırılan domuz mide mukozası yüzeyine, hazırlanan tablet formülasyonları Şekil 34'te görüldüğü gibi tutturuldu. Bu silindirler, dissolüsyon aleti içerisindeki 37°C'deki enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisine batırıldı ve 100 rpm hızda döndürüldü. Tabletlerin mukozadan koptukları zamanlar, görsel olarak sistemin 24 saat boyunca her 30 dakikada bir kontrol edilmesiyle saptandı. Bu test, her bir formülasyon için en az 5 farklı tablet ile tekrarlandı (31).



Şekil 34. Tabletlerin mukoadazyon sürelerinin tayininde kullanılan döner silindir yönteminin şematik görünümü

2.6.1.7 Tablet formülasyonlarından RF5'PNa'nın in vitro çözünme profilinin incelenmesi

Matriks tabletlerden RF5'PNa'nın in vitro çözünme profili, USP XXX'a göre döner palet yöntemi ile incelendi. Tabletler, 37°C'de 500 mL enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içeren dissolüsyon kaplarına yerleştirildi. Çalışma 37±0.5°C sıcaklıkta yürütüldü ve paslanmaz çelikten yapılmış paletler, 100 rpm döndürme hızında dissolüsyon kaplarının dibinden 25±2 mm mesafeyle döndürüldü. Belirli zaman aralıklarında örnekler çekildi. Alınan örnek ile aynı miktar ve sıcaklıktaki çözünme ortamı dissolüsyon kaplarına ilave edilerek ortamın hacmi sabit tutuldu.

Belirlenen zaman aralıklarında alınan örneklerin floresan şiddetleri, florometre ile okundu. Elde edilen floresan şiddeti değerlerinden hareket ile, Yöntem 2.3.1.1'de hazırlanması anlatılan standart doğru denklemleri ile örneklerin içerdiği RF5'PNa konsantrasyonu hesaplandı. Daha sonra bu konsantrasyonlar % salıma çevirilip, zamana karşı grafiğe geçirildi. Çalışma her bir tablet formülasyonu için en az 3 paralel olarak yapıldı.

2.6.1.8 Tabletlerde yapılan in vivo çalışmalar

Tabletlerin in vivo çalışmaları, 350-400 g ağırlığında ve 6-8 haftalık, beyaz, Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanılarak yapıldı. Sıçanların beslenmelerinde *ad libitum* olarak standart diyet uygulandı. Deneyler, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi DeneySEL Cerrahi bölümünde, önceden alınan yerel etik kurul kararına göre yürütüldü (Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Deney Hayvanları Etik Kurulu, Karar No: 2007/11-1).

Modifiye edilmiş ve edilmemiş PAA ve kitozan tablet formülasyonların midede kalış sürelerinin gözlenmesi amacıyla, sıçanlara verilmesi için 5 mg

ağırlığında olan (çap: 2.5 mm, kalınlık: 1 mm) mini-tabletler özel tablet kalıpları kullanılarak basıldı.

Sıçanlar 2 gruba ayrıldı. Birinci gruba PAA ve PAA-sistein tabletleri; ikinci gruba ise kitozan ve kitozan-TBA tabletleri verildi. Sıçanlara önce eter anestezisi uygulandı. Tablet formülasyonları sıçanların ağız boşluğunun ilerisine yerleştirildi (Şekil 35) ve hemen arkasından bir miktar su verilerek yutma refleksleri harekete geçirildi (Şekil 36). Daha sonra mide gavajı yapılarak bir miktar daha su verildi ve böylece sıçanların tableti yuttuğundan emin olundu (Şekil 37). Sıçanlar yiyecek verilmeden kafeslerinde bekletildi. Belirli saatlerde, her bir formülasyon için 6 adet sıçan hafif eter anestezisi altında iken servikal dislokasyon yöntemi kullanılarak sakrifiye edildi. Sıçanların karın boşlukları açılarak mideleri çıkartıldı (Şekil 38) ve tabletlerin durumu görsel olarak incelendi (73).



Şekil 35. Tablet formülasyonlarının sıçanların ağız boşluğunun ilerisine yerleştirilmesi



Şekil 36. Sıçanlara bir miktar su verilerek yutma refleksleri harekete geçirilmesi



Şekil 37. Sıçanlara mide gavajı yapılması



Şekil 38. Sıçanların karın boşluklarının açılarak midelerinin çıkartılması

2.6.2 Partikül Formülasyonları

2.6.2.1 Partikül formülasyonlarının hazırlanması

Partiküler formülasyonların hazırlanması için öncelikle 2 g PAA veya PAA-sistein 50 mL distile su içerisinde; 2 g kitozan veya kitozan-TBA ise % 6'lık asetik asit çözeltisi içerisinde homojen jeller oluşuncaya kadar şişmeye bırakıldı. 1 g RF5'PNa 50 mL distile su içerisinde çözündürüldü ve bu jellere ilave edildi. Jeller hem polimer hem de ilaç için çözücü özelliği olmayan 250 mL aseton ilavesi ile çöktürüldü ve çökmenin tamamen sağlanabilmesi için 14 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin sonunda, üstteki sıvı kısım uzaklaştırıldı ve tekrar 250 mL aseton ilave edildi ve çökmenin tamamen sağlanabilmesi için bu işlem üç kez tekrarlandı.

Bu işlemin sonunda, çökelti oda sıcaklığında sabit ağırlığa gelene kadar kurutuldu. Kurumuş ilaç/polimer kompleksinin çapı, havan kullanılarak, hava püskürtmeli değirmene verilmek için uygun büyüklük olan 1.5 mm'ye getirildi.

Son olarak, partiküllerin hazırlanması için hava püskürtmeli değirmen (air jet mill) kullanıldı. Kullanılan hava püskürtmeli değirmenin öğütücü kısmının çapı 50 mm, yüksekliği ise 4.5 mm'dir. Ayrıca, çapı 0.8 mm, eğimi 50° olan 4 adet standart püskürtme başlığı bulunmaktadır. Katı besleme hızı ise 0.1-1 kg/saattir. Sıcaklık sensörü (Lutron, DH-802C, MingChuan, Tayvan) donanımı vardır.

1 g ilaç/polimer kompleksi, 6 bar enjektör basıncı ve 4 bar öğütücü hava basıncı altında 10 dakika süre ile öğütüldü ve böylece partikül formülasyonları hazırlandı. Hava püskürtmeli değirmenin bütün donanımı, bir sonraki kullanıma kadar -18°C'de saklandı (84, 159).

2.6.2.2 Hazırlanan partikül formülasyonlarda yapılan kontroller

2.6.2.2.1 Partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyeli ölçümleri

Öncelikle, hazırlanan partiküllerin partikül büyüklüğü dağılımı ve elektrokinetik potansiyelleri Zeta potansiyeli/partikül boyutu ölçüm cihazı kullanılarak ölçüldü.

Partikül büyüklüğü dağılımı ölçümlerinde çözücü olmayan ortam olarak Miglyol 840 (viskozitesi 10.5 cP, refraktif indeksi 1.441) kullanıldı. Ölçümler; 90° sabit açıda, oda sıcaklığında ve 15 dakika süre ile yapıldı. Her bir formülasyon için en az 6 defa ölçüm yapıldı.

Partiküllerin zeta potansiyeli ölçümlerinde ise, distile su (viskozitesi 0.933 cP, refraktif indeksi 1.333) içerisinde 1:5 oranındaki seyreltmeler yapıldı. Ölçümlerde dağılma açısı 14.7°, elektriksel alan kuvveti 20 V/cm olarak ayarlandı. Her bir örnek, en az 3 defa ölçüldü ve her ölçüm 60 saniye sürdü. Bütün ölçümler oda sıcaklığında yapıldı.

2.6.2.2.2 Partiküllerin yüzey morfolojisi tayini

Partiküllerin yüzey morfolojisi; kaplama yapılmadan, taramalı elektron mikroskopisi (scanning electron microscopy, SEM) ile incelendi. Partiküller, 25 kV hızlandırılmış voltaj altında görüntülendi.

2.6.2.2.3 Partiküllerin içinde bulunan RF5'PNa miktarının belirlenmesi

PAA ve PAA-sistein partikülleri distile su içerisinde, kitozan ve kitozan-TBA partikülleri ise %6 asetik asit çözeltisi içerisinde ultrasonik banyoda çözündürüldü. Bu çözeltilerden alınan örneklerin floresan şiddetleri, mikropilaka okuyucular ile 444 nm ekzitasyon ve 530 nm emisyon dalga boylarında tayin edildi. RF5'PNa'nın distile

su ve %6'lık asetik çözeltisi içerisindeki farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri kullanılarak hazırlanan standart doğru denklemleri yardımı ile partiküllerin içerisindeki RF5'PNa miktarı tayin edildi.

2.6.2.2.4 Partiküllerde yapılan su absorplama kapasitesi çalışması

Partiküllerin su absorplama çalışmaları, enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde gravimetrik olarak yapıldı. Hassas terazide tartılmış 1 mg partikül formülasyonu ve önceden 37°C'ye getirilmiş 200 µL suni mide vasatı, darası alınmış eppendorf tüplere konuldu. Tüpler, çalkalayıcı osilasyon su banyosunda 37°C'de inkübasyona bırakıldı. 1 saat sonra tüpler su banyosundan alındı, 5 dakika santrifüje edildi (24000g, Sigma 3-18G). Daha sonra dikkatli bir şekilde üstteki sıvı kısım ortamdan uzaklaştırıldı ve partiküllerin ağırlığı gravimetrik olarak tayin edildi (116).

Su absorplama oranları aşağıdaki denklem ile hesaplandı:

$$\text{Su absorplama oranı} = (W_s - W_d) / W_d \dots\dots\dots \text{Denklem 5}$$

W_s : su absorplamış partiküllerin ağırlığı

W_d : kuru partiküllerin ağırlığı

2.6.2.2.5 Partikül formülasyonlarından RF5'PNa'nın in vitro çözünme profilinin incelenmesi

Partikül formülasyonlarından RF5'PNa'nın in vitro çözünme çalışmaları, enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde gerçekleştirilmiştir.

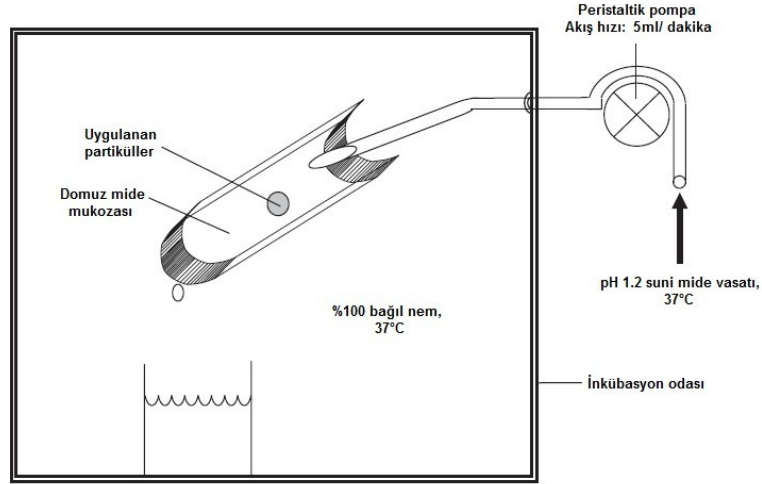
Hassas terazide tartılan 1 mg PAA veya PAA-sistein partikülleri ve 10 mg kitozan veya kitozan-TBA partikülleri 10 mL 37°C'deki enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içeren eppendorf tüplerine konuldu. Tüpler kapatılarak 37°C'ye ayarlanmış

osilasyon su banyosuna bırakıldı (100 rpm, GFL 1092). Her 30 dakikada bir, 100 µL örnek bu tüplerden alındı ve yerine aynı miktar 37°C'deki pH 1.2 suni mide vasatı ilave edilerek çözünme ortamının hacminin sabit kalması sağlandı. Örnekler mikropalakalara konuldu ve RF5'PNa miktarı florometrik olarak tayin edildi (116).

2.6.2.2.6 Partikül formülasyonlarının mukoadesyon çalışmaları

Partikülerin formülasyonlarının mukoadesyon çalışmaları domuz mide mukozası kullanılarak, Şekil 39'de görülen ve daha önceden Albrecht ve arkadaşları (4) tarafından tanımlanan bir yöntemle gerçekleştirildi.

%100 bağıl nem içeren 37°C'deki inkübasyon odasına 45°'lik bir açı ile yerleştirilen yarısı kesilmiş boruların üzerine domuz mide mukozası yerleştirildi. Partiküllerin uygulanmasından önce, domuz mide mukozası 5 dakika süre ile 37°C'deki enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) damlatılarak nemlendirildi. Bunun için, bir peristaltik pompa yardımı ile 5 mL/dakika hızında sabit bir akış hızı sağlandı. Bu sürenin sonunda, hassas terazide tartılmış 10 mg ağırlığındaki partikül formülasyonları, kuru bir halde mukozanın üzerine konuldu ve 37°C'deki pH 1.2 suni mide vasatı ile yıkama işlemine devam edildi. 1. ve 2. saatin sonunda, düzeneğin altında toplanan örnekler ultrasonik su banyosunda çözündürüldü ve örneklerdeki RF5'PNa miktarı hesaplandı. Bu miktar, çalışmanın başında mukozaya konulan partiküllerin içindeki RF5'PNa miktarından çıkarılarak mukoza yüzeyinde kalan miktar hesaplandı.



Şekil 39. Partiküllerin mukoadesyon çalışmasının şematik olarak gösterilmesi

2.7 SONUÇLARIN İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Deneysel çalışmaların sonucunda elde edilen bulgular arasındaki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı Student t-testi ile değerlendirildi. Anlamlı farklılık seviyesi %95 olarak alındı ($p < 0.05$).

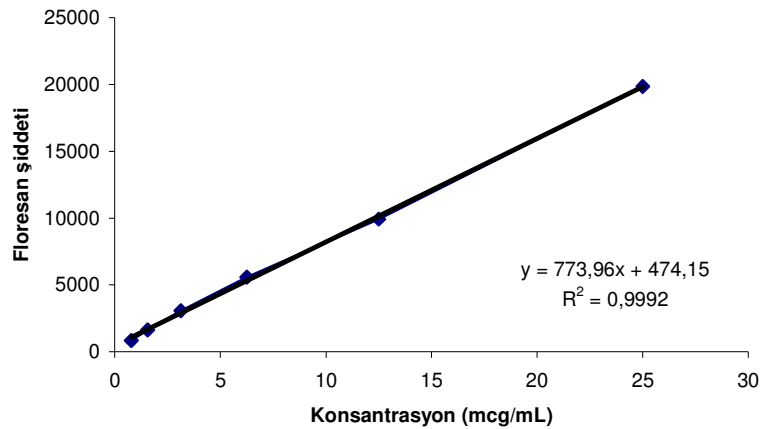
III. Bölüm

3 BULGULAR

3.1 RİBOFLAVİNİN FLOROMETRİK MİKTAR TAYİNİNDE KULLANILMAK ÜZERE STANDART DOĞRULARININ HAZIRLANMASINA AİT BULGULAR

3.1.1 RF5'PNa'nın Florometrik Miktar Tayininde Kullanılmak Üzere pH 1.2 Suni Mide Vasatındaki Standart Doğrularının Çizilmesine Ait Bulgular

RF5'PNa'nın standart doğrusunun çizimi, Yöntem 2.3.1.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. Şekil 40 ve Şekil 41'de RF5'PNa'nın enzimsiz suni mide vasatındaki (pH 1.2) standart doğruları görülmektedir.



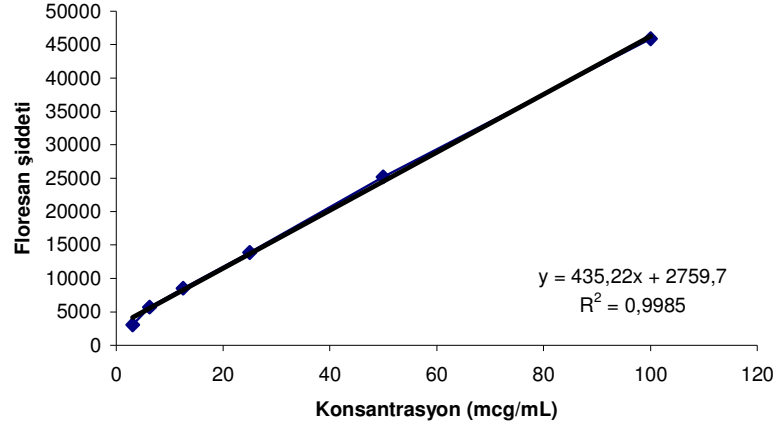
Şekil 40. RF5'PNa'nın enzimsiz suni mide vasatında (pH 1.2) 0.781-25 µg/mL konsantrasyon aralığındaki standart doğrusu

Standart eğrinin denklemi: $y = 773.96x + 474.15$

x = Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)

y = Floresan şiddeti

Determinasyon katsayısı: $R^2 = 0.9992$ olarak bulundu.



Şekil 41: RF5'PNa'nın enzimsiz suni mide vasatında (pH 1.2) 3.125-100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığındaki standart doğrusu

Standart eğrinin denklemi: $y = 453.22x + 2759.7$

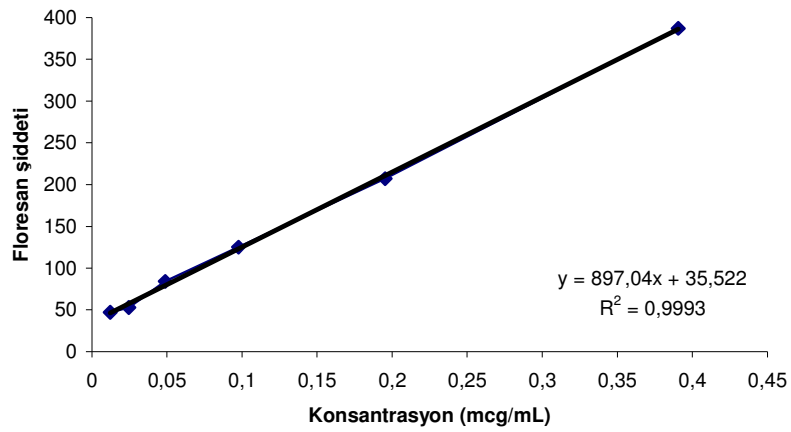
x = Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)

y = Floresan şiddeti

Determinasyon katsayısı: $R^2 = 0.9985$ olarak bulundu.

3.1.2 RF5'PNa'nın Florometrik Miktar Tayininde Kullanılmak Üzere pH 7.4 HEPES Tamponunda Standart Doğrusunun Çizilmesine Ait Bulgular

RF5'PNa'nın standart doğrusunun çizimi Yöntem 2.3.1.2'de anlatıldığı gibi yapıldı. Şekil 42'de RF5'PNa'nın pH 7.4 HEPES tamponundaki standart doğrusu görülmektedir.



Şekil 42. RF5'PNa'nın pH 7.4 HEPES tamponundaki standart doğrusu

Standart doğrunun denklemi: $y = 897,04x + 35,522$

x = Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)

y = Floresan şiddeti

Determinasyon katsayısı: $R^2 = 0,9993$ olarak bulundu.

3.1.3 Miktar Tayini Yönteminin Analitik Validasyonuna Ait Bulgular

3.1.3.1 Doğrusallık çalışmalarına ait bulgular

Yöntem 2.3.1’de anlatıldığı gibi, RF5’PNa’nın enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) ve pH 7.4 HEPES tamponu içerisinde standart doğruları çizildi. Elde edilen standart doğrular ve determinasyon katsayıları Şekil 40 - Şekil 42’de gösterilmiştir.

3.1.3.2 Doğruluk ve geri elde edilebilirlik çalışmalarına ait bulgular

RF5’PNa’nın enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde 0.781-25 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen standart doğrusu için 3.125, 6.25 ve 25 µg/mL konsantrasyonlarda; 3.125-100 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen standart doğrusu için 100, 50, 12.5 µg/mL konsantrasyonlarda ve pH 7.4 HEPES tamponu içerisinde ise 0.390, 0.097 ve 0.048 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan örneklerinin floresan şiddeti değerleri 6 kez art arda okundu. Bu değerlere karşılık gelen konsantrasyon değerleri (µg/mL) olarak standart doğrular yardımıyla hesaplandı. Geri elde edilebilirlik değerleri de konsantrasyon değerlerinden hareketle hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 6 - Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 6. RF5'PNa'n enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde 0.781-25 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen standart doğrusu için doğruluk ve geri elde edilebilirlik testine ait veriler

Okuma Numarası	1. Konsantrasyon (3.125 µg/mL)			2. Konsantrasyon (6.25 µg/mL)			3. Konsantrasyon (25 µg/mL)		
	Floresan Şiddeti	Bulunan C (µg /mL)	% Geri Elde	Floresan Şiddeti	Bulunan C (µg /mL)	% Geri Elde	Floresan Şiddeti	Bulunan C (µg /mL)	% Geri Elde
1	2895	3.127	100.092	5332	6.276	100.425	19870	25.060	100.242
2	2896	3.129	100.133	5329	6.272	100.363	19852	25.037	100.149
3	2890	3.121	99.885	5330	6.274	100.384	19841	25.023	100.092
4	2893	3.125	100.009	5327	6.270	100.322	19875	25.066	100.268
5	2895	3.127	100.092	5340	6.286	100.591	19839	25.020	100.081
6	2894	3.126	100.050	5328	6.271	100.343	19855	25.041	100.164
Ort.	2893.833	3.126	100.043	5331	6.275	100.405	19855.33	25.041	100.166
SS	2.136	0.002	0.088	4.732	0.006	0.097	14.73318	0.019	0.076

Tablo 7. RF5'PNa'n enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde 3.125-100 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen standart doğrusu için doğruluk ve geri elde edilebilirlik testine ait veriler

Okuma Numarası	1. Konsantrasyon (12.5 µg/mL)			2. Konsantrasyon (50 µg/mL)			3. Konsantrasyon (100 µg/mL)		
	Floresan Şiddeti	Bulunan C (µg /mL)	% Geri Elde	Floresan Şiddeti	Bulunan C (µg /mL)	% Geri Elde	Floresan Şiddeti	Bulunan C (µg /mL)	% Geri Elde
1	8402	12.449	99.594	25453	50.071	100.142	48325	100.536	100.536
2	8425	12.500	100.000	25396	49.945	99.891	48102	100.044	100.044
3	8413	12.473	99.789	25656	50.519	101.038	48812	101.611	101.611
4	8385	12.411	99.294	25368	49.883	99.767	48733	101.437	101.437
5	8392	12.427	99.418	25530	50.241	100.482	48601	101.145	101.145
6	8431	12.513	100.106	25654	50.514	101.029	48803	101.591	101.591
Ort.	8408	12.462	99.700	25509.5	50.195	100.391	48562.670	101.061	101.061
SS	18.242	0.040	0.322	125.586	0.277	0.554	289.520	0.638	0.638

Tablo 8. RF5'PNa'ın HEPES tamponu (pH 7.4) ortamında yapılan doğruluk ve geri elde edilebilirlik testine ait veriler

Okuma Numarası	1. Konsantrasyon (0.390 µg/mL)			2. Konsantrasyon (0.097 µg/mL)			3. Konsantrasyon (0.048 µg/mL)		
	Floresan Şiddeti	Bulunan C (µg /mL)	% Geri Elde	Floresan Şiddeti	Bulunan C (µg /mL)	% Geri Elde	Floresan Şiddeti	Bulunan C (µg /mL)	% Geri Elde
1	385	0.390	100.230	121	0.095	98.236	79	0.048	100.975
2	382	0.387	99.369	126	0.100	103.982	78	0.047	98.653
3	391	0.397	101.950	124	0.098	101.683	77	0.046	96.330
4	389	0.395	101.377	122	0.096	99.385	81	0.050	105.620
5	387	0.393	100.803	121	0.095	98.236	80	0.049	103.298
6	376	0.380	97.648	120	0.094	97.086	79	0.048	100.975
Ort.	385	0.390	100.230	122.333	0.096	99.768	79	0.048	100.975
SS	5.403	0.006	1.549	2.250	0.002	2.586	1.414	0.001	3.284

3.1.3.3 Kesinlik çalışmalarına ait bulgular

3.1.3.3.1 Tekrar edilebilirlik çalışmalarına ait bulgular

RF5'PNa'ın enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde 0.781-25 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen standart doğrusu için 3.125 µg/mL konsantrasyondaki örneği; 3.125-100 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen standart doğrusu için 12.5 µg/mL konsantrasyondaki örneği ve HEPES tamponundaki standart doğrusu için de 0.097 (µg/mL) konsantrasyondaki örneği florometre 6 kez art arda okundu. Bu ölçümlerde okunan floresan şiddeti değerleri, buna bağlı olarak hesaplanan etkin madde konsantrasyonları ve standart sapma (SS) değerleri Tablo 9 - Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 9. RF5'PNa'n enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde 0.781-25 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen standart doğrusu için yapılan tekrar edilebilirlik testi sonuçları

Örnek Numarası	Floresan şiddeti	Konsantrasyon (µg / mL)
1	2895	3.127
2	2892	3.123
3	2890	3.121
4	2896	3.129
5	2895	3.127
6	2894	3.126
Ort.	2893.667	3.126
SS	2.250	0.002

Tablo 10: RF5'PNa'n enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde 3.125-100 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen standart doğrusu için yapılan tekrar edilebilirlik testi sonuçları

Örnek Numarası	Floresan şiddeti	Konsantrasyon (µg / mL)
1	8412	12.471
2	8425	12.500
3	8483	12.628
4	8395	12.433
5	8389	12.420
6	8431	12.513
Ort.	8422.5	12.494
SS	33.845	0.074

Tablo 11. RF5'PNa'n HEPES tamponunda (pH 7.4) yapılan tekrar edilebilirlik testi sonuçları

Örnek Numarası	Floresan şiddeti	Konsantrasyon (µg / mL)
1	127	0.101
2	131	0.106
3	126	0.100
4	128	0.103
5	129	0.104
6	125	0.099
Ort.	127.666	0.102
SS	2.1602	0.002

3.1.3.3.2 Tekrar elde edilebilirlik çalışmalarına ait bulgular

RF5'PNa'nın enzimsiz suni mide vasatında (pH 1.2) ve HEPES tamponunda (pH 7.4) standart doğru çiziminde hazırlanan stok çözeltilerinden 6 farklı örneğinin gösterdiği floresan şiddeti değerleri florometre ile okundu. Bu ölçümlerde okunan floresan şiddeti değerleri, buna bağlı olarak hesaplanan etkin madde konsantrasyonları ve standart sapmaları (SS) Tablo 12 - Tablo 14'te verilmiştir.

Tablo 12. RF5'PNa'nın enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde 0.781-25 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen standart doğrusu için tekrar elde edilebilirlik testi sonuçları

Örnek Numarası	Floresan şiddeti	Konsantrasyon (µg / mL)
1	2891	3.122
2	2897	3.130
3	2890	3.121
4	2892	3.123
5	2893	3.125
6	2894	3.126
Ort.	2892.833	3.125
SS	2.483	0.003

Tablo 13. RF5'PNa'nın enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde 0.781-25 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen standart doğrusu için tekrar elde edilebilirlik testi sonuçları

Örnek Numarası	Floresan şiddeti	Konsantrasyon (µg / mL)
1	8421	12.491
2	8428	12.506
3	8432	12.515
4	8375	12.389
5	8359	12.354
6	8461	12.579
Ort.	8412.667	12.472
SS	38.244	0.084

Tablo 14. RF5'PNa'ın HEPES tamponunda (pH 7.4) yapılan tekrar elde edilebilirlik testi sonuçları

Örnek Numarası	Floresan şiddeti	Konsantrasyon (µg / mL)
1	127	0.101
2	131	0.106
3	126	0.100
4	125	0.099
5	124	0.098
6	130	0.105
Ort.	127.166	0.102
SS	2.786	0.003

3.1.3.4 Özgünlük, seçicilik çalışmalarına ait bulgular

Özgünlük tayini, Yöntem 2.3.2.4'de anlatıldığı gibi yapıldı. Çalışmada kullanılan enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) ve HEPES tamponunun (pH 7.4) floresan şiddeti değerleri florometre ile 444 nm ekzitasyon ve 530 nm emisyon dalga boylarında incelendi. Sonuçta, bu dalga boylarında herhangi bir floresan şiddeti değeri vermedikleri görüldü ve yöntemin etkin maddeye özgü olduğu bulundu.

3.1.3.5 Stabilité çalışmalarına ait bulgular

RF5'PNa'ın enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) ve HEPES tamponundaki (pH 7.4) stabilitesini incelemek için Yöntem 2.3.2.5'de anlatıldığı gibi çalışıldı ve elde edilen konsantrasyon değerlerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü. Bulgular Tablo 15 - Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 15. RF5'PNa'ın enzimsiz suni mide vasatında (pH 1.2) yapılan stabilite testi sonuçları

Zaman (saat)	Floresan şiddeti	Konsantrasyon (µg / mL)
1	4305	4.949
3	4296	4.938
6	4319	4.967
12	4385	5.053
24	4278	4.914
Ort.	4316.6	4.964
SS	41.028	0.053

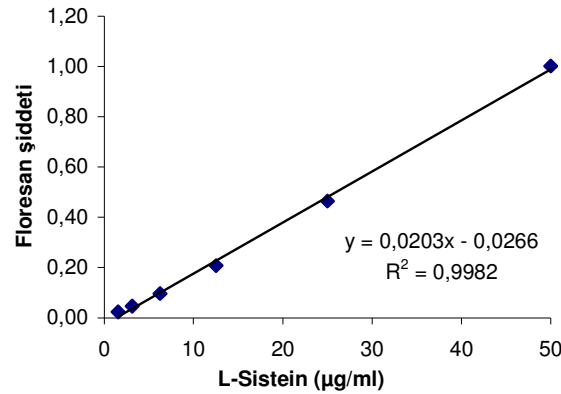
Tablo 16. RF5'PNa'ın HEPES tamponunda (pH 7.4) yapılan stabilite testi sonuçları

Zaman (saat)	Floresan şiddeti	Konsantrasyon (µg / mL)
1	212	0.196
3	213	0.197
6	211	0.195
12	212	0.196
24	210	0.194
Ort.	211.6	0.196
SS	1.140	0.001

3.2 SENTEZLENEN POLİMERLERDE YAPILAN KONTROLLERE AİT BULGULAR

3.2.1 Ellman Testinde Kullanılmak Üzere L-Sisteinin 0.5 M pH 8 Fosfat Tamponu İçerisinde Standart Doğrusunun Çizilmesine Ait Bulgular

Sentezlenen konjugatlara immobilize olan serbest tiyol grubu miktar tayininde kullanılmak üzere, L-sisteinin 0.5 M pH 8 fosfat tamponu (Ellman tamponu) içerisinde standart doğrusu Yöntem 2.4.3.1’de anlatıldığı gibi hazırlandı. L-sistein konsantrasyonuna karşı floresan şiddeti değerlerini gösteren standart doğru Şekil 43’te görülmektedir.



Şekil 43. L-sisteinin 0.5 M pH 8 fosfat tamponu içerisindeki standart doğrusu

Standart doğrunun denklemi: $y = 0.0203x - 0.0266$

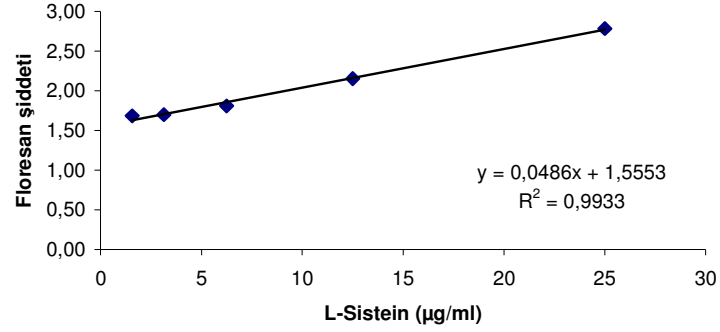
x = L-sistein konsantrasyonu (µg/mL)

y = Floresan şiddeti

Determinasyon katsayısı $r^2 = 0.9982$ olarak bulundu

3.2.2 TNBS Testinde Kullanılmak Üzere L-Sisteinin %0.5 NaCl Çözeltisi İçerisinde Standart Doğrusunun Çizilmesine Ait Bulgular

Sentezlenen PAA-sistein konjugatına immobilize olmayan ve ortamdan diyaliz ile uzaklaştırılmayan L-sistein miktarının tayininde kullanılmak üzere, L-sisteinin %0.5 NaCl çözeltisi içerisinde standart doğrusu Yöntem 2.4.3.2’de anlatıldığı gibi hazırlandı. L-sistein konsantrasyonuna karşı floresan şiddeti değerlerini gösteren standart doğru Şekil 44’te görülmektedir.



Şekil 44. L-sisteinin %0.5 NaCl çözeltisi içerisindeki standart doğrusu

Standart doğrunun denklemi: $y = 0.0486x + 1.5553$

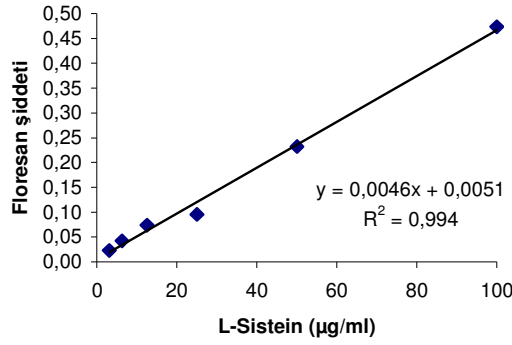
x = L-sistein konsantrasyonu (µg/mL)

y = Floresan şiddeti

Determinasyon katsayısı $r^2 = 0.9933$ olarak bulundu

3.2.3 Disülfid Bağı Testinde Kullanılmak Üzere L-Sisteinin Tris-Tamponu İçerisinde Standart Doğrusunu Çizilmesine Ait Bulgular

Sentezlenen konjugatlarda disülfid bağı şeklinde bulunan okside olmuş tiyol grubu miktar tayininde kullanılmak üzere, L-sisteinin Tris-tamponu içerisinde standart doğrusu Yöntem 2.4.3.3’de anlatıldığı gibi hazırlandı. L-sistein konsantrasyonuna karşı, floresan şiddeti değerlerini gösteren standart doğru Şekil 45’te görülmektedir.



Şekil 45. L-sisteinin Tris-tamponu içerisindeki standart doğrusu

Standart doğrunun denklemi: $y = 0.0046x + 0.0051$

x = L-sistein konsantrasyonu (µg/mL)

y = Floresan şiddeti

Determinasyon katsayısı $r^2 = 0.9940$ olarak bulundu

3.2.4 Sentezlenen PAA-Sistein Konjugatında Yapılan Kontrollere Ait Bulgular

3.2.4.1 Ellman testine ait bulgular

Yöntem 2.4.3.4.1’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Yöntem 2.4.3.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan standart doğru denklemi yardımı ile, örneklerin floresan şiddeti değerlerinden hareketle PAA-sistein konjugatına immobilize olan serbest tiyol grubu miktarları hesaplandı.

Sonuç olarak, PAA-sistein konjugatının $172.80 \pm 30.33 \text{ } \mu\text{mol/g}$ konsantrasyonda, ya da $\% 2.71 \pm 0.48$ oranında serbest tiyol grubu içerdiği görüldü.

3.2.4.2 TNBS testine ait bulgular

Yöntem 2.4.3.4.2’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Yöntem 2.4.3.2’de anlatıldığı gibi hazırlanan standart doğru denklemi yardımı ile, örneklerin floresan şiddeti değerleri kullanılarak diyaliz işlemi ile ortamdan uzaklaştırılmayan serbest tiyol gruplarının miktarları hesaplandı.

Sonuç olarak, PAA-sistein konjugatının $14.07 \pm 12.84 \text{ } \mu\text{mol/g}$ konsantrasyonda, ya da $\% 0.22 \pm 0.20$ oranında PAA-sistein konjugatına immobilize olmayan ve ortamdan diyaliz ile uzaklaştırılmayan L-sistein içerdiği görüldü.

3.2.4.3 Disülfid bağı testine ait bulgular

Yöntem 2.4.3.4.3’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Yöntem 2.4.3.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan standart doğru denklemi yardımı ile örneklerin floresan şiddeti değerleri kullanılarak polimer üzerinde disülfid bağı şeklinde bulunan okside olmuş tiyol gruplarının miktarı hesaplandı.

Sonuç olarak, PAA-sistein konjugatının $377.93 \pm 85.10 \mu\text{mol/g}$ konsantrasyonda, ya da $\% 5.94 \pm 1.34$ oranında disülfid bağı şeklinde bulunan okside olmuş tiyol grubu içerdiği görüldü.

3.2.5 Sentezlenen Kitozan-TBA Konjugatında Yapılan Kontrollere Ait Bulgular

3.2.5.1 Ellman Testine Ait Bulgular

Yöntem 2.4.3.5.1’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Yöntem 2.4.3.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan standart doğru denklemi yardımı ile, örneklerin floresan şiddeti değerlerinden hareketle, kitozan-TBA konjugatına immobilize olan tiyol grubu miktarları hesaplandı.

Sonuç olarak, kitozan-TBA konjugatının $371.11 \pm 72.74 \mu\text{mol/g}$ konsantrasyonda, ya da $\% 5.83 \pm 1.14$ oranında serbest tiyol grubu içerdiği görüldü.

3.2.5.2 Disülfid Bağı Testine Ait Bulgular

Yöntem 2.4.3.5.2’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Yöntem 2.4.3.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan standart doğru denklemi yardımı ile örneklerin floresan şiddeti değerleri kullanılarak polimer üzerinde disülfid bağı şeklinde bulunan okside olmuş tiyol gruplarının miktarı hesaplandı.

Sonuç olarak, kitozan-TBA konjugatının $572.74 \pm 186.26 \mu\text{mol/g}$ konsantrasyonda, ya da $\% 8.99 \pm 2.92$ oranında disülfid bağı şeklinde bulunan okside olmuş tiyol grubu içerdiği görüldü.

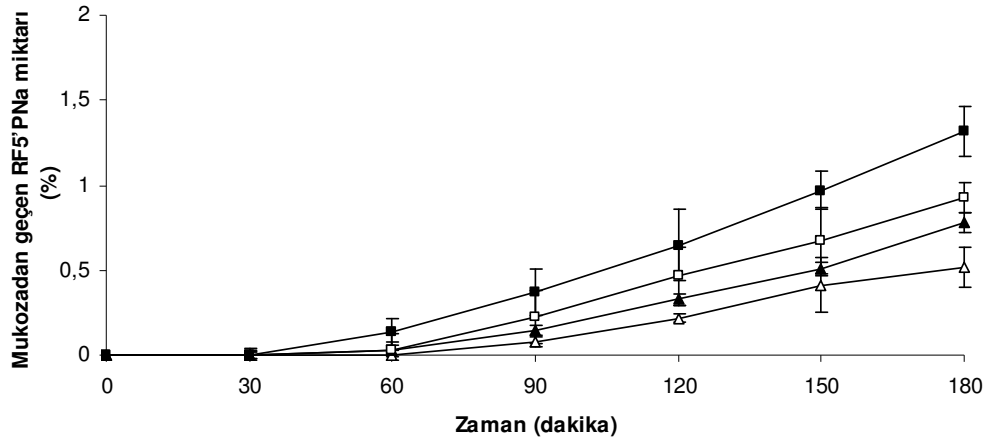
Sentezlenen konjugatlara immobilize olan serbest tiyol grubu miktarları ve disülfid bağı şeklinde bulunan okside olmuş tiyol grubu miktarları Tablo 17’de toplu halde verilmektedir.

Tablo 17. Sentezlenen konjugatlara immobilize olan serbest tiyol grubu miktarları ve disülfid bağı şeklinde bulunan okside olmuş tiyol grubu miktarları

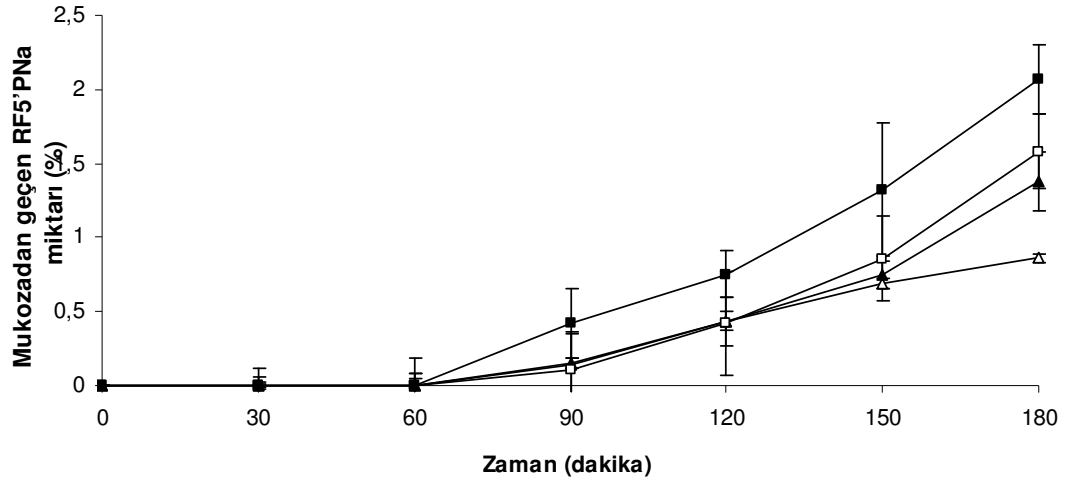
	-SH [$\mu\text{mol/g polimer} \pm \text{SS}$]	-S-S- [$\mu\text{mol/g polimer} \pm \text{SS}$]
PAA-sistein	172.80 $\pm$ 30.33	377.93 $\pm$ 85.10
Kitozan-TBA	371.11 $\pm$ 72.74	572.74 $\pm$ 186.26

3.3 RİBOFLAVİNİN SIÇAN MİDE MUKOZASINDAN GEÇİŞ ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR

RF5'PNa'ın sıçan mide mukozasından Ussing hücreleri ile yapılan geçiş çalışmaları Yöntem 2.5'de anlatıldığı yürütüldü.. Elde edilen sonuçların hesaplanması için Yöntem 2.3.1.2'de anlatıldığı gibi çizilen RF5'PNa'ın HEPES tamponundaki (pH 7.4) standart doğrusu kullanıldı ve sıçan mide mukozasından geçen RF5'PNa miktarı tayin edildi. RF5'PNa'ın sıçan mide mukozasından geçiş çalışması sonuçları Şekil 46 ve Şekil 47'de verilmiştir. Ayrıca hesaplanan permeasyon katsayısı değerleri Tablo 18'de görülmektedir.



Şekil 46: Mide mukozasından geçen RF5'PNa miktarının karşılaştırmalı olarak gösterilmesi (Δ PAA, ▲ PAA+GSH, □ PAA-sistein, ■ PAA-sistein+GSH)



Şekil 47: Mide mukozasından geçen RF5'PNa miktarının karşılaştırmalı olarak gösterilmesi (Δ kitozan, ▲ kitozan+GSH, □ kitozan-TBA, ■ kitozan-TBA+GSH)

Tablo 18. Permeasyon katsayısı (P_{app}) değerlerine ait bulgular (Belirtilen değerler en az 3 tekrarın ortalamasıdır $\pm$ S.S.)

RF5'PNa (μ g/mL)	PAA (%, a/h)	PAA- Sistein (%, a/h)	Kitozan (%, a/h)	Kitozan- TBA (%, a/h)	GSH (%, a/h)	P_{app} değeri (cm/saniye)	Artırma oranı
20	-	-	-	-	-	$1.27 \pm 0.16 \times 10^{-6}$	-
20	-	-	-	-	0.25	$1.66 \pm 0.08 \times 10^{-6}$	1.307
20	0.5	-	-	-	-	$0.75 \pm 0.17 \times 10^{-6}$	0.590
20	-	0.5	-	-	-	$1.34 \pm 0.12 \times 10^{-6}$	1.055
20	0.5	-	-	-	0.25	$1.13 \pm 0.09 \times 10^{-6}$	0.889
20	-	0.5	-	-	0.25	$1.92 \pm 0.17 \times 10^{-6}$	1.511
20	-	-	0.5	-	-	$1.25 \pm 0.05 \times 10^{-6}$	0.984
20	-	-	-	0.5	-	$2.29 \pm 0.36 \times 10^{-6}$	1.803
20	-	-	0.5	-	0.25	$2.00 \pm 0.29 \times 10^{-6}$	1.574
20	-	-	-	0.5	0.25	$2.99 \pm 0.33 \times 10^{-6}$	2.354

3.4 FORMÜLASYON ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR

3.4.1 Tablet Formülasyonlarına Ait Bulgular

3.4.1.1 Tabletlerde yapılan farmasötik kontrollere ait bulgular

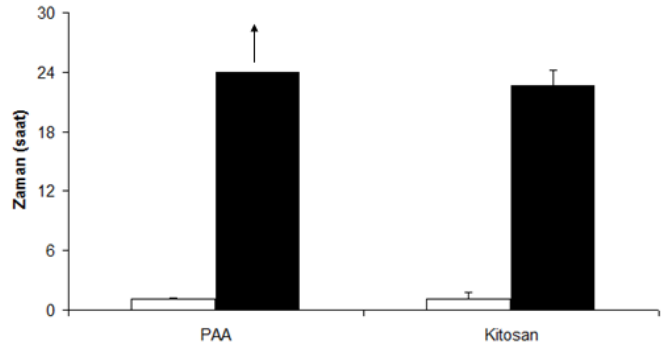
Tablet formülasyonları Yöntem 2.6.1.1’de anlatıldığı gibi hazırlandı ve hazırlanan formülasyonlarda Yöntem 2.6.1.2’de anlatıldığı gibi ağırlık sapması, sertlik, friabilite ve çap-kalınlık oranı kontrolleri yapıldı. Tablet kontrollerinin sonuçları ve standart sapma değerleri Tablo 19’da verilmektedir.

Tablo 19. Tabletlerde yapılan kontrollerin sonuçları

Tablet Formülasyonu	Ağırlık ± S.S. (g)	Sertlik ± S.S. (kg)	Friabilite (%)	Çap ± S. S. (mm)	Kalınlık ± S. S. (mm)
PAA	0.029±0.002	8.750±1.768	0.479	4.963±0.023	1.163±0.104
PAA-Sistein	0.030±0.001	10.250±0.212	0.389	4.964±0.008	1.144±0.092
Kitozan	0.030±0.001	3.833±0.707	0.714	4.986±0.072	1.206±0.075
Kitozan-TBA	0.029±0.001	5.167±0.577	0.594	4.933±0.005	1.243±0.046

3.4.1.2 İn vitro dağılma çalışmasına ait bulgular

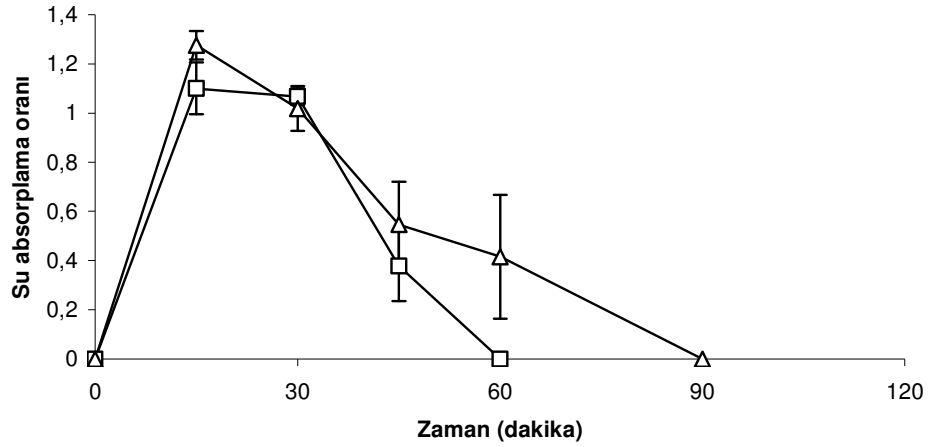
USP XXX’a göre enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içinde, 37°C’de sıcaklıkta ve 0.5 s⁻¹ osilasyon frekansında yapılan dağılma çalışmaları Yöntem 2.6.1.3’de anlatıldığı gibi yürütülmüştür. Sonuçlar, Şekil 48’de verilmiştir.



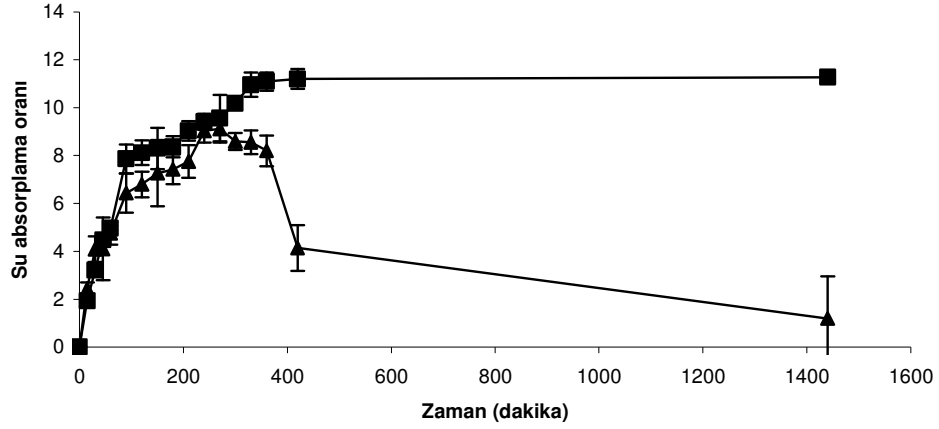
Şekil 48. Tabletlerin in vitro dağılma çalışmaları sonuçları (beyaz bar: modifiye edilmemiş polimerler ile hazırlanan tabletler, siyah bar: tiyomerler ile hazırlanan tabletler)

3.4.1.3 Tabletlerde yapılan su absorplama kapasitesi çalışmasına ait bulgular

Tabletlerin absorpladıkları su miktarı, Yöntem 2.6.1.4'te belirtildiği gibi gravimetrik olarak tayin edildi ve su absorplama oranları Denklem 3 yardımıyla hesaplandı. Sonuçlar Şekil 49 ve Şekil 50'de görülmektedir.

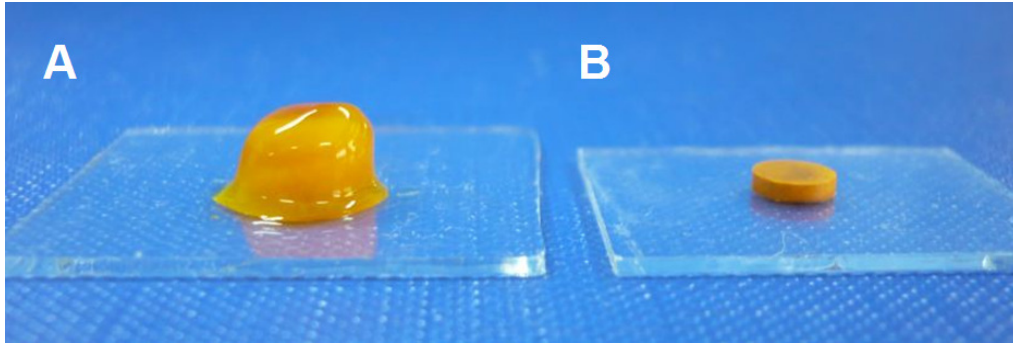


Şekil 49. Modifiye edilmemiş PAA (□) ve kitozan (Δ) tabletlerinin 37°C'de enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisindeki su absorplama oranları

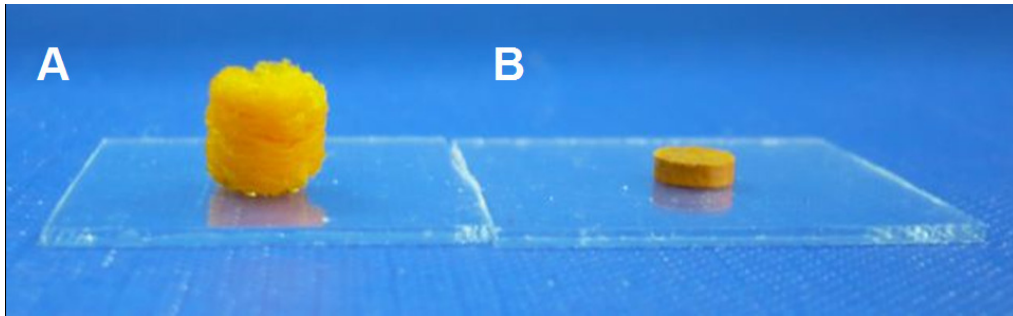


Şekil 50. Tiyoilenmiş PAA-sistein (■) ve kitozan-TBA (▲) tabletlerinin 37°C'de enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisindeki su absorplama oranları

Ayrıca, PAA-sistein ve kitozan-TBA tabletlerin enzimsiz suni mide vasatında (pH 1.2) 6 saat bekletildikten sonra morfolojik özelliklerini gösteren resimleri Şekil 51 ve Şekil 52'de verilmiştir.



Şekil 51. Enzimsiz suni mide vasatına (pH 1.2) bırakılan PAA-sistein tabletlerinin resimleri (A: t=6. saat; B: t=0. saat)



Şekil 52. Enzimsiz suni mide vasatına (pH 1.2) bırakılan kitozan-TBA tabletlerinin resimleri (A: t=6. saat; B: t=0. saat)

3.4.1.4 Tabletlerin mukoadezif kuvvetlerinin tayinine ait bulgular

Tabletlerin mukoadezif kuvvetleri, Yöntem 2.6.1.5’de anlatıldığı gibi, tablet formülasyonunun hazırlanan müsin disklerden kopması için gereken kuvvetin TPA cihazı kullanılarak ölçülmesi ile tayin edildi. Hazırlanan tablet formülasyonlarının mukoadezif kuvvet ve mukoadezyon işi bulguları Tablo 20’de verilmektedir. Bu tablodan da görüldüğü gibi PAA ve PAA-sistein tabletleri ile kitozan ve kitozan-TBA tabletlerinin mukoadezif kuvvetleri birbirinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklıdır ($p<0.05$).

Tablo 20. Hazırlanan tablet formülasyonlarının mukoadezyon kuvvetlerinin tayinine ait bulgular

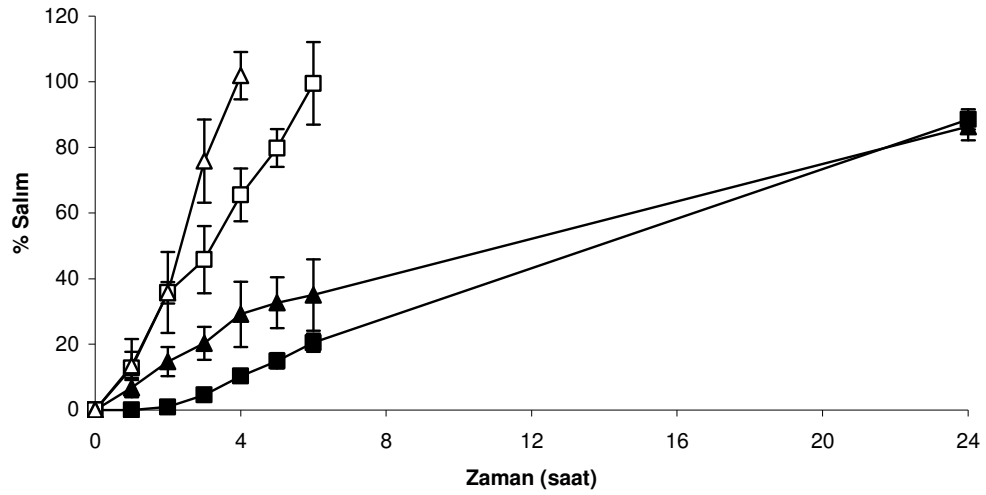
Formülasyon	Kuvvet (N)*	Mukoadezyon (AUC) (N.mm)	Mukoadezyon işi (N.mm.cm ⁻²)
PAA	0.746±0.045	0.231±0.070	1.175±0.357
PAA-sistein	1.391±0.065	0.309±0.011	1.576±0.056
Kitozan	1.056±0.030	0.253±0.004	1.289±0.020
Kitozan-TBA	1.619±0.096	0.541±0.112	2.758±0.572

3.4.1.5 Tabletlerin mukoadezyon sürelerinin tayinine ait bulgular

Tabletlerin mukoadezif özellikleri, döner silindir yöntemi adıyla da bilinen ikinci bir yöntemle daha incelendi. Sonuç olarak; PAA, PAA-sistein, kitozan ve kitozan-TBA tabletlerinin mukoadezyon sürelerinin sırasıyla 1.5±0.5, 21±1, 1±0.5 ve 17±1 saat olduğu tespit edildi.

3.4.1.6 Tablet formülasyonlarından RF5'PNa'nın in vitro çözünme profilinin incelenmesine ait bulgular

Hazırlanan matriks tabletlerden RF5'PNa'nın in vitro çözünme profili, Yöntem 2.6.1.7'de anlatıldığı gibi, USP XXX'a göre döner palet yöntemi ile incelendi. Tablet formülasyonlarından RF5'PNa'nın çözünme profilleri, karşılaştırmalı olarak Şekil 53'te görülmektedir.



Şekil 53. PAA (□), PAA-sistein (■), kitozan (Δ) ve kitozan-TBA (▲) tabletlerinden RF5'PNa'nın çözünme profillerinin karşılaştırmalı olarak gösterilmesi

3.4.1.7 Tabletlerde yapılan in vivo çalışmalara ait bulgular

Tabletlerde midede kalış süresini gözlemlemek için yapılan in vivo çalışmalar, Yöntem 2.6.1.8'de anlatıldığı gibi yürütüldü.

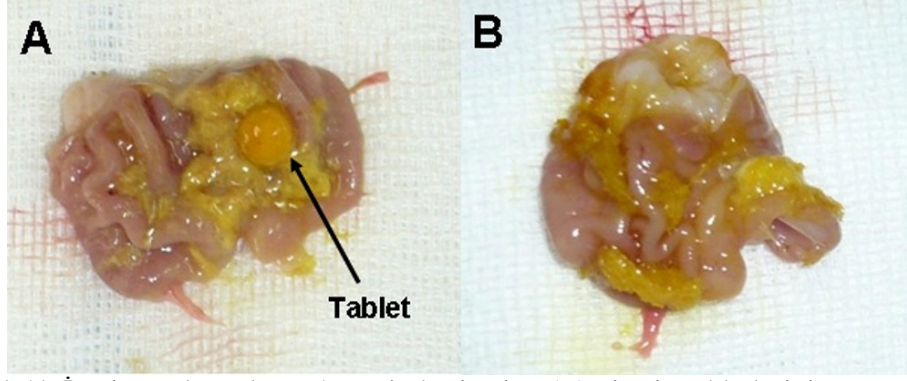
Midelerin görsel olarak incelenmesi sonucunda, PAA-sistein tabletleri uygulanmış 24 sıçandan 19'unda (% 79.17), tabletlerin 5 saat boyunca midede kaldığı gözlemlendi. 6. saatin sonunda ise tiyollenmiş tabletlerin parçalandığı görüldü (Şekil 54). 3 sıçanda (% 12.5) ise, tabletlerin ağız boşluğu veya özofagusa yapıştığı

ve mideye ulaşmadığı gözlemlendi. 2 sıçanda da (% 8.33), tabletlerin 4. ve 5. saatler arasında dağıldığı görüldü.

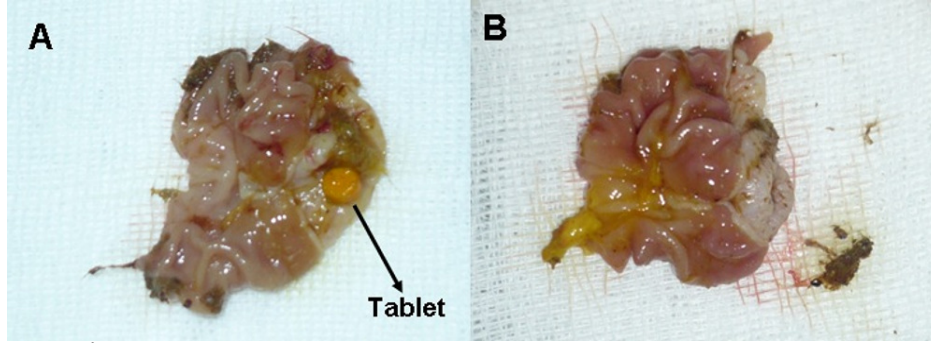
Modifiye edilmemiş PAA tabletleri ile yapılan çalışmada ise 1. saatin sonunda 22 sıçanda da (% 91.66) tabletlerin tamamen dağıldığı ve 2 sıçanda (% 8.33) damak veya özofagusa yapıştığı görüldü.

Kitozan-TBA tabletleri uygulanmış 24 sıçandan 16'sında (% 66.66), tabletlerin 5 saat boyunca midede kaldığı ve 6. saatin sonunda tabletlerin parçalandığı görüldü (Şekil 55). 2 sıçanda (% 8.33), tabletlerin ağız boşluğu veya özofagusa yapıştığı ve mideye ulaşmadığı gözlemlendi. 6 sıçanda da (% 25), tabletlerin 5. saatten önce dağıldığı görüldü.

Modifiye edilmemiş kitozan tabletleri ile yapılan çalışmada ise 1. saatin sonunda 21 sıçanda da (% 87.5) tabletlerin tamamen dağıldığı ve 3 sıçanda (% 12.5) damak veya özofagusa yapıştığı görüldü.



Şekil 54. İn vivo çalışmaların 5. saatinde şişmiş PAA-sistein tabletlerinin sıçan midesinde görünümü (A) ve in vivo çalışmaların 6. saatinde dağılmış PAA-sistein tabletlerinin görünümü (B).



Şekil 55. İn vivo çalışmaların 5. saatinde şişmiş kitozan-TBA tabletlerinin sıçan midesinde görünümü (A) ve in vivo çalışmaların 6. saatinde dağılmış kitozan-TBA tabletlerinin görünümü (B).

3.4.2 Partikül Formülasyonlarına Ait Bulgular

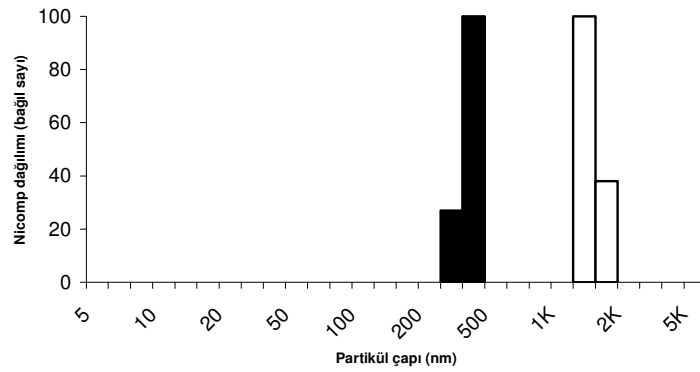
3.4.2.1 Partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyeli ölçümlerine ait bulgular

Yöntem 2.6.2.2.1’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Partiküllerin ortalama partikül çapı ve zeta potansiyeli değerleri Tablo 21’de verilmiştir.

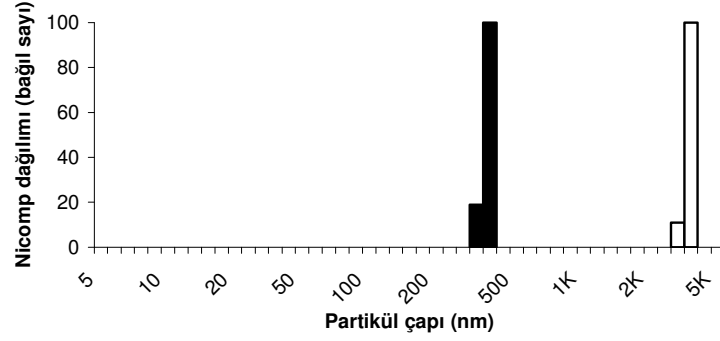
Tablo 21. Partiküllerin ortalama partikül çapı ve zeta potansiyeli değerleri

	Ortalama partikül çapı (nm)	Zeta potansiyeli (mV)
PAA partikülleri	1622.4 ± 241.4	-9.34 ± 1.999
PAA-sistein partikülleri	336.5 ± 16.5	-19.98 ± 1.015
Kitozan partikülleri	3308.6 ± 137.8	15.48 ± 0.296
Kitozan-TBA partikülleri	396.3 ± 17.0	27.15 ± 0.500

Partikül büyüklüğü dağılımları ise Şekil 56 ve Şekil 57’de görülmektedir. Büyüklük dağılımı sonuçları Gaussian dağılıma uymadığı için Nicomp dağılımı üzerinden verilmiştir.



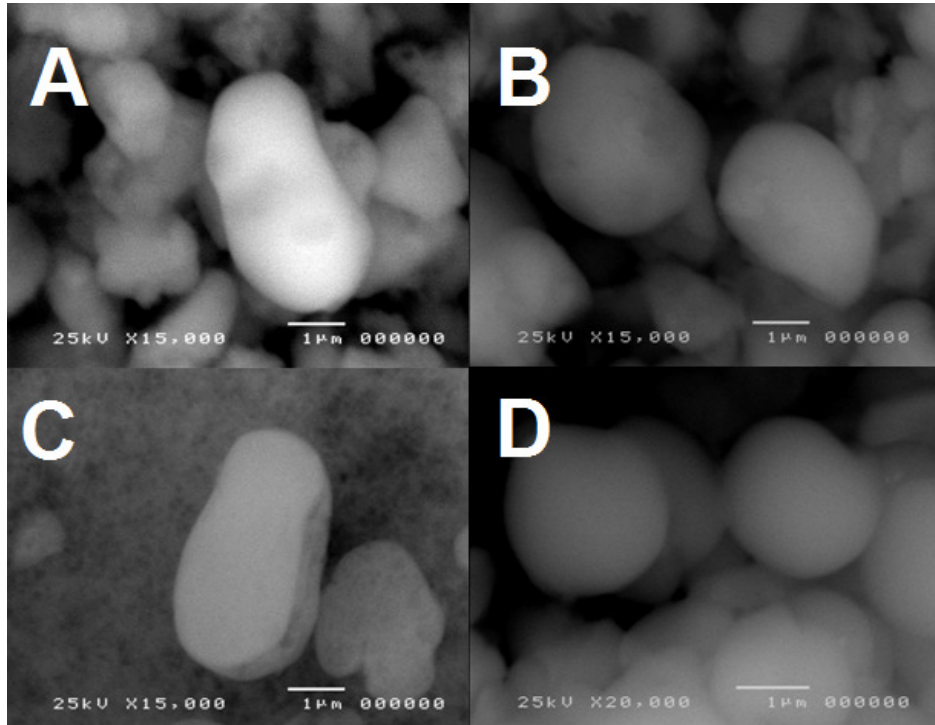
Şekil 56. PAA (beyaz bar) ve PAA-sistein (siyah bar) partiküllerinin büyüklük dağılımı



Şekil 57. Kitozan (beyaz bar) ve kitozan-TBA (siyah bar) partiküllerinin büyüklük dağılımı

3.4.2.2 Partiküllerin yüzey morfolojisi tayinine ait bulgular

Hazırlanan partiküllerin morfolojik özellikleri Yöntem 2.6.2.2.2’de anlatıldığı gibi değerlendirildi. Şekil 58’de görüldüğü gibi partiküller düzgün ve gözenekli olmayan yüzey özelliği göstermektedirler.



Şekil 58. PAA (A), PAA-sistein (B), kitozan (C), kitozan-TBA (D) partiküllerinin SEM fotoğrafları

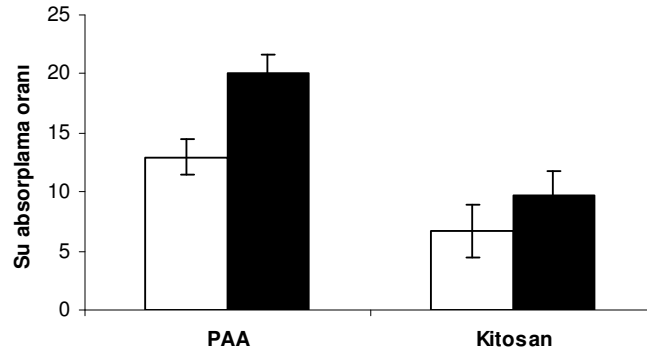
3.4.2.3 Partiküller içinde bulunan RF5'PNa miktarının belirlenmesine ait bulgular

Yöntem 2.6.2.2.3'de anlatıldığı gibi PAA ve PAA-sistein partikülleri distile su içerisinde, kitozan ve kitozan-TBA partikülleri ise %6 asetik asit çözeltisi içerisinde çözündürülerek partiküllerin içerdiği RF5'PNa miktarı tayin edildi.

Sonuç olarak, PAA, PAA-sistein, kitozan ve kitozan-TBA partiküllerinin içerdikleri RF5'PNa oranları sırasıyla, % 72.246 ± 2.335 , 65.975 ± 6.319 , 15.447 ± 0.381 ve 6.729 ± 0.411 olarak bulundu.

3.4.2.4 Partiküllerde yapılan su absorplama kapasitesi çalışmasına ait bulgular

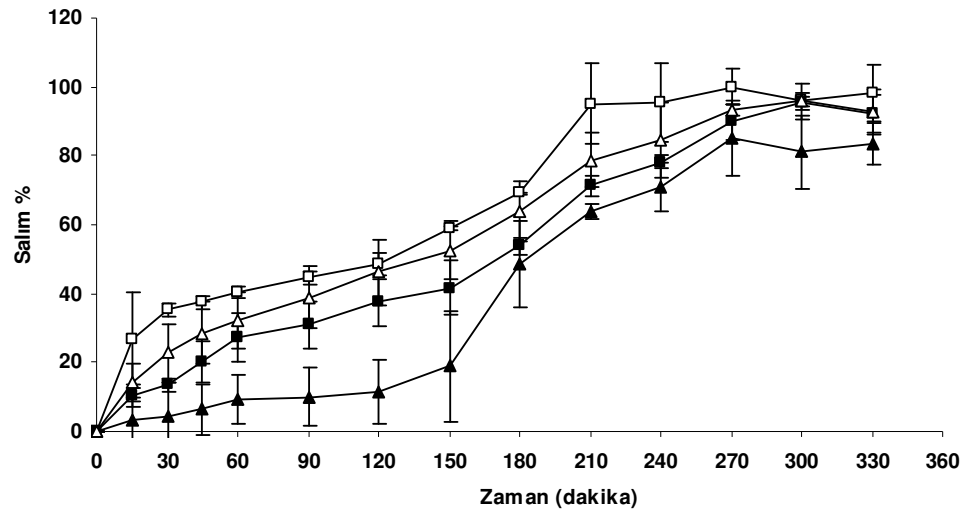
Partiküllerin su absorplama çalışması, Yöntem 2.6.2.2.4'de anlatıldığı gibi enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde gravimetrik yöntem kullanılarak yapıldı. Partiküllerin su absorplama oranları Şekil 59'de görülmektedir.



Şekil 59. PAA, PAA-sistein, kitozan ve kitozan-TBA partiküllerinin pH 1.2 suni mide vasatındaki su absorplama çalışmasına ait sonuçlar (siyah barlar tiyollenmiş partiküllerin, beyaz barlar ise modifiye edilmemiş partiküllerin su absorplama oranlarını göstermektedir).

3.4.2.5 Partikül formülasyonlarından RF5'PNa'nın in vitro çözünme profilinin incelenmesine ait bulgular

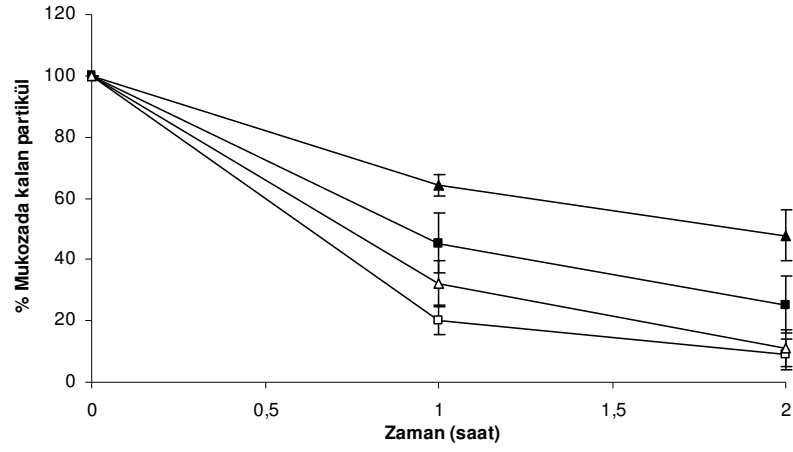
Partikül formülasyonlarından RF5'PNa'nın in vitro salım çalışmaları Yöntem 2.6.2.2.5'de anlatıldığı gibi enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde gerçekleştirilmiştir. PAA, PAA-sistein, kitozan ve kitozan-TBA partiküllerinden RF5'PNa'nın in vitro çözünme profilleri Şekil 60'da görülmektedir.



Şekil 60. PAA (□), PAA-sistein (■), kitozan (Δ) ve kitozan-TBA (▲) partiküllerinden RF5'PNa'nın in vitro çözünme profillerinin karşılaştırmalı olarak gösterilmesi

3.4.2.6 Partikül formülasyonlarının mukoadezyon çalışmalarına ait bulgular

Partiküllerin mukoadezyon çalışmaları domuz mide mukozası kullanılarak, Yöntem 2.6.2.2.6'da tanımlandığı gibi yürütüldü. Partiküllerin mukoadezif özellikleri Şekil 61'de karşılaştırmalı olarak görülmektedir



Şekil 61. PAA (□), PAA-sistein (■), kitozan (Δ) ve kitozan-TBA (▲) partiküllerinin mukoadezif özellikleri

IV. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ

Oral kontrollü salım sistemlerinin temel amacı, etkin maddeyi istenilen bölgede, belirli bir süre içerisinde, önceden belirlenen hızda salarak etkinliğini artırmak ve yan etkilerini azaltmaktır. Ancak; gastrointestinal geçiş süresi, kontrollü salım yapan oral ilaç şekillerinin geliştirilmesinde kontrol edilmesi gereken en önemli fizyolojik sınırlamalardan birisidir.

Midede kalış süresini uzatan ilaç şekilleri, midedeki hastalıkların lokal tedavisi için veya alt gastrointestinal kanalda düşük emilime sahip etkin maddeler için kontrollü salım sağlamak amacıyla geliştirilmiştir. Ayrıca, ilaç şeklini selektif olarak jejenuma veya ileuma hedeflendirmek oldukça zor olduğu için araştırmaların çoğu midede kalış süresini uzatmak yönünde olmuştur (59).

Dozaj şeklini midede daha uzun süre tutabilmek için çeşitli yaklaşımlar denenmiştir. Bu yöntemler başlıca; dansite kontrollü sistemler, midede şişerek büyüklüğü pilordan geçemeyecek kadar artan sistemler, manyetik sistemler ve mukoza yüzeyine yapışan biyoadezif sistemleri kapsamaktadır (13).

Gastrik mukoadezif (biyoadezif) sistemler, gastrik dokunun mukozal yüzeyine yapışabilen oral kullanılan dozaj şekilleridir. Dozaj şekli mukozal yüzeye sıkı bir şekilde yapıştığında; müsin salgılanması ile uzaklaştırılıncaya dek, uzatılmış kalış süresi sağlanmaktadır. Ancak; gastrik lümenin yüzey alanının küçük olması, midedeki mukus tabakasının kalın olması ve midede müsin salgılanmasının bağırsaktan daha hızlı olması gastrik mukoadezif sistemlerin kullanımını sınırlandırmaktadır ve yeterli kalış süresinin sağlanamamasına neden olmaktadır

(59). Günümüze kadar yapılan çalışmalar, en iyi mukoadezif özelliğın polikarbofil ve poli(akrilik asit) (PAA) ile sağlandığını göstermektedir (95). Bununla birlikte mukoadezif özellikleri iyileştirmek ve dolayısıyla dozaj şeklinin mide mukozasında kalış süresini uzatmak için daha etkili mukoadezif sistemlere ihtiyaç vardır.

Geleneksel mukoadezif polimerlerin mukus tabakasına yapışması, genellikle kovalent olmayan zayıf bağlar ile gerçekleşir ve bu bağlar çoğu durumda ilaç taşıyıcı sistemin hedef bölgede lokalizasyonunu sağlamada yetersiz kalmaktadır. Farmasötik teknoloji alanına son yıllarda giren tiyollenmiş polimerler ya da bilinen diğer adıyla tiyomerler, mukoadezif ilaç sistemleri için yeni nesil biyoadezif polimerler olarak kabul edilen ve daha güçlü mukoadezif özellik gösteren hidrofilik makromoleküllerdir. Tiyomerler; poli(akrilatlar), polikarbofil, aljinat, kitozan veya deasetile jellan zımkı gibi bilinen mukoadezif polimerlerin zincirine tiyol taşıyıcı fonksiyonel grupların immobilizasyonu ile elde edilirler. Tiyomerlerin geliştirilmiş mukoadezif özellikleri, taşıdıkları bu tiyol grupları ile mukus glikoproteinlerinin sistein yönünden zengin yan grupları arasında tiyol/disülfid değişim reaksiyonu ve/veya basit oksidasyon yöntemi ile kovalent bağların oluşmasına dayanmaktadır. Ayrıca tiyomerler, polimer zincirleri içinde ve arasında oluşan disülfid bağları sayesinde hazırlanan formülasyonların kohezif özelliklerini de artırır ve ilacın kontrollü bir şekilde salınmasını sağlarlar. Bunların yanında, tiyollenmiş polimerlerin enzim inhibe edici ve permeasyonu artırıcı özelliklere de sahip oldukları bilinmektedir (14).

Bu tez çalışmasının amacı; öncelikle tiyollenmiş polimerler olarak, anyonik özellikteki poli(akrilik asit)-sistein (PAA-sistein) konjugatı ve katyonik özellikteki kitozan-4-tiyobutilamidin (kitozan-TBA) konjugatı sentezleyerek kimyasal özelliklerini belirlemektir. Bu konjugatların seçilmesinin nedeni, günümüze dek

sentezlenen tiyomerler içerisinde en yüksek mukoadezif özellikleri göstermeleri nedeniyledir. Ayrıca; kitozanın, antiasit, yara iyileşmesini hızlandırıcı ve antiülser gibi önemli biyoaktif özelliklere sahip olmasının (62), midede kalış süresi uzatılmış formülasyonların geliştirilmesinde ilave faydalar sağlayabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızın sonraki aşamasında ise, bu konjugatları kullanarak farklı gastrik mukoadezif formülasyonların hazırlanması ve bunların özelliklerinin modifiye edilmemiş polimerler ile hazırlanan formülasyonlarla karşılaştırarak tiyomerlerin gastrik mukoadezif sistemlerde üstünlüğünün ortaya konması amaçlanmıştır.

RF5'PNa Üzerinde Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmada, model ilaç olarak, yan etkisi ve mide motilitesi üzerine herhangi bir farmakolojik etkisi olmayan riboflavin (B₂) vitamini seçildi (111). Riboflavin mide-bağırsak kanalın üst kısmında dar bir absorpsiyon penceresine sahiptir. Bu nedenle midede kalış süresi uzatılmış formülasyonlarının hazırlanması, biyoyararlanımının ve dolayısıyla terapötik etkinliğinin artırılması açısından faydalıdır (69, 102). Yapılan pratik çalışmalarda ise; riboflavin ile aynı absorpsiyon, metabolizma ve atılım özelliklerine sahip olan ve daha iyi çözünürlük özelliği gösteren RF5'PNa kullanıldı (99).

Çalışmamızda floresan özellikteki RF5'PNa'nın floresan şiddetleri, literatüre uygun olarak 444 nm ekzitasyon ve 530 nm emisyon dalga boylarında ölçülmüştür (174).

Öncelikle RF5'PNa'nın miktar tayininde kullanılmak üzere standart doğruların çizilmesi için, enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden, enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) kullanılarak gerekli seyreltmeler yapıldı. Florometre kullanılarak 444 nm ekzitasyon ve 530 nm emisyon dalga boylarında her bir konsantrasyona karşılık gelen floresan şiddeti değerleri

bulundu. RF5'PNa'nın enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisindeki standart doğru denklemleri 0.781-25 µg/mL konsantrasyon aralığı için $y = 773.96x + 474.15$ [x: konsantrasyon (µg/mL) y: floresan şiddeti, $R^2=0.9992$] ve 3.125-100 µg/mL konsantrasyon aralığı için de $y=453.22x+2759.7$ [x: konsantrasyon (µg/mL) y: floresan şiddeti, $R^2=0.9985$] olarak bulundu (Şekil 40 ve Şekil 41).

Ayrıca; RF5'PNa'nın permeasyon çalışmalarında kullanılmak üzere, HEPES tamponu (pH 7.4) içerisinde stok çözeltisi hazırlanarak bu stok çözeltiden gerekli seyreltmeler yapıldı. Florometre ile 444 nm ekzitasyon ve 530 nm emisyon dalga boylarında her bir konsantrasyonlara karşılık gelen floresan şiddeti değerleri ile standart doğruları çizildi. RF5'PNa'nın HEPES tamponu (pH 7.4) içerisindeki standart doğru denklemi $y = 897.04x + 35.522$ [x: Konsantrasyon (µg/mL), y: floresan şiddeti, $R^2=0.9993$] olarak bulundu (Şekil 42).

Polimer Sentezi Üzerine Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Tiyomer sentezi çalışmalarında, anyonik özellikteki PAA-sistein konjugatı ve katyonik özellikteki kitozan-TBA konjugatı sentezi yapılmasına karar verildi.

Şekil 27'de görüldüğü gibi, L-sisteinin primer amino grubu ile PAA polimerinin karboksilik asit grubu arasında kovalent amit bağlarının oluşması ile PAA-sistein konjugatı sentezlenmiştir. Elde edilen PAA-sistein konjugatı, beyaz renkte, kokusuz ve fibröz bir yapıdadır (135).

Kitozan-TBA konjugatının sentezlenmesi için ise, 2-iminotiyolan HCl (Traut reaktifi), kitozanın primer amino grubuna amit bağları ile kovalent olarak bağlanmıştır (Şekil 28). Elde edilen kitozan-TBA konjugatı ise hafif sarımsı renkte, kokusuz ve fibröz bir yapıdadır (72).

Tiyollenmiş polimerin içerdiği tiyol/disülfid grubu miktarı arttıkça, bu polimerler ile hazırlanan formülasyonların mukoadhezif ve kohezif özelliklerinin artış

gösterdiği bilinmektedir (75). Bu nedenle, öncelikle hazırlanan PAA-sistein ve kitozan-TBA konjugatlarının içerdiği tiyol/disülfid grubu miktarları tayin edildi.

Sentezlenen PAA-sistein ve kitozan-TBA konjugatlarında immobilize olan serbest tiyol grubu miktarı Ellman testi ile tayin edildi. Öncelikle Ellman testinde kullanılmak üzere L-sisteinin 0.5 M pH 8 fosfat tamponu (Ellman tamponu) içerisindeki standart doğrusu çizildi ve standart doğru denklemi $y = 0.0203x - 0.0266$ olarak bulundu. Artan L-sistein konsantrasyonu ile floresan şiddeti arasındaki bağlantının doğrusal olduğunu gösteren determinasyon katsayısı (r^2) değeri ise 0.9982 olarak hesaplandı (Şekil 43).

Bu testin sonucunda, PAA-sistein ve kitozan-TBA konjugatlarındaki serbest tiyol grubu miktarları sırasıyla 172.80 ± 30.33 ve 371.11 ± 72.74 $\mu\text{mol/g}$ olarak hesaplandı.

PAA-sistein konjugatına immobilize olmayan ve ortamdan diyaliz ile uzaklaştırılamayan L-sistein miktarı ise TNBS testi ile tayin edildi. TNBS testinde kullanılmak üzere, L-sisteinin %0.5 NaCl çözeltisi içerisinde standart doğrusu çizildi ve standart doğru denklemi $y = 0.0486x + 1.5553$ olarak bulundu. Çalışılan konsantrasyon aralığında, konsantrasyon-floresan şiddeti ilişkisinin doğrusal olduğu görüldü ve bu doğrusallığın göstergesi olan determinasyon katsayısı (r^2) değeri 0.9933 olarak hesaplandı (Şekil 44).

Bu testin sonucunda, PAA-sistein konjugatına immobilize olmayan ve ortamdan diyaliz ile uzaklaştırılamayan L-sistein miktarı 14.07 ± 12.84 $\mu\text{mol/g}$ olarak hesaplandı.

Polimer üzerine immobilize olmuş total tiyol grubu miktarı, serbest tiyol grupları ve disülfid bağları şeklinde bulunan okside haldeki tiyol gruplarının toplamıdır. Özellikle birbirine yakın pozisyonlardaki tiyol gruplarının, birbirinden

izole haldeki tiyol gruplarına göre molekül içi reaksiyonlarla disülfid bağlarına okside olma eğilimi fazladır. Bu nedenle tiyomerlerin içinde bulunan disülfid bağlarının da tayin edilmesi önemlidir. Disülfid bağı testinde kullanılmak üzere, L-sisteinin Tris-tamponu içerisindeki standart doğrusu çizildi ve standart doğru denklemi $y = 0.0046x + 0.0051$ olarak bulundu. L-sistein konsantrasyonu ve floresan şiddeti arasında doğrusal bir bağlantı olduğunu gösteren determinasyon katsayısı (r^2) değeri ise 0.994 olarak hesaplandı (Şekil 45).

Disülfid bağlarının tayin edilmesi için yapılan testte, öncelikle polimer çözeltilerine sodyum borohidrit (NaBH_4) ilavesi ile disülfid bağları indirgendi ve daha sonra polimerin içerdiği total tiyol grubu miktarı Ellman reaktifi ile tayin edildi (75). Bu test sonucu bulunan total tiyol grubu miktarından Ellman testi sonucu bulunan serbest tiyol grubu miktarının çıkartılması ile de konjugatlar üzerindeki disülfid bağı şeklinde bulunan okside olmuş tiyol grubu miktarı hesaplandı. Sonuç olarak, PAA-sistein ve kitozan-TBA konjugatlarındaki bulunan okside olmuş tiyol grubu miktarları sırasıyla 377.93 ± 85.10 ve 572.74 ± 186.26 olarak hesaplandı.

RF5'PNa'n Sıçan Mide Mukozasından Geçiş Çalışmalarına Ait Bulguların

Değerlendirilmesi

RF5'PNa'nın sıçan mide mukozasından geçiş çalışmaları, tiyollenmiş polimerler ve modifiye edilmemiş polimerler ile, permeasyon artırıcı özelliği bilinen L-glutasyon (GSH) varlığında ve yokluğunda Ussing hücreleri kullanılarak yürütüldü. Yapılan literatür incelemeleri sonucunda, tiyomerlerin Ussing hücreleri ile yapılan permeasyon çalışmalarında şu ana kadar; sığır nazal mukozası, tavşan korneası, domuz bukkal mukozası, Gine domuzu intestinal mukozası ve sıçan intestinal mukozasının kullanıldığı görülmektedir (21, 25, 51, 71). Çalışmamızda permeasyon çalışmalarında ilk defa mide mukozasının kullanılmış olmasının literatüre yenilik getireceği düşünülmektedir.

Histolojik olarak sıçan midesi, ön mide ve glanduler mide olarak iki kısma ayrılmıştır. Sıçan ön midesi keratinize bir dokudur, bu yüzden mide mukozasından geçiş çalışmaları için insan mide mukozasına daha çok benzeyen glanduler mide kısmı kullanılmıştır (131).

Mide mukozasından geçiş çalışmaları sonuçları; Şekil 46, Şekil 47 ve Tablo 18'de verilmiştir. Görüldüğü gibi, bütün örneklerde sıçan mide mukozasından geçen RF5'PNa miktarının tayini için 60 dakika kadar bir gecikme süresi saptanmıştır. Bu sürenin, RF5'PNa'nın sıçan mide mukozasından difüze olarak, tayin için yeterli miktara ulaşması için gerekli olduğu düşünülmektedir.

Şekil 46'da görüldüğü gibi, 3 saatlik çalışma süresinin sonunda, PAA çözeltisi ve PAA-sistein çözeltisi için sıçan mide mukozasından geçen RF5'PNa miktarı sırasıyla % 0.519 ± 0.116 ve % 0.781 ± 0.059 olarak bulunmuştur. Bu çözeltilere %0.25 (a/h) oranında GSH ilavesi ise PAA çözeltisi ve PAA-sistein

çözeltisinden difüze olan RF5'PNa miktarını % 0.928 ± 0.085 ve % 1.320 ± 0.145 'a çıkarmıştır.

Benzer bir şekilde, kitozan çözeltisi ve kitozan-TBA çözeltisinden sıçan mide mukozasına geçen RF5'PNa miktarı sırasıyla % 0.861 ± 0.029 ve % 1.581 ± 0.248 olarak bulunmuştur. Bu çözeltilere %0.25 (a/h) oranında GSH ilavesi ise, kitozan çözeltisi ve kitozan-TBA çözeltisinden difüze olan RF5'PNa miktarını % 1.382 ± 0.198 ve % 2.066 ± 0.230 'a çıkarmıştır (Şekil 47).

Tablo 18'de ise, hesaplanan permeasyon katsayısı (P_{app}) değerleri ve permeasyonu artırma oranları verilmiştir. GSH içeren veya içermeyen modifiye edilmemiş PAA çözeltisinin, kontrol grubu olarak kullanılan RF5'PNa çözeltisine kıyasla RF5'PNa'nın sıçan mide mukozasından geçişini azaltıcı bir etki yaptığı görülmüştür. Modifiye edilmemiş kitozan içeren RF5'PNa çözeltisinin permeasyonunun ise, RF5'PNa çözeltisinin permeasyonuna benzer olduğu; diğer taraftan GSH içeren modifiye edilmemiş kitozan çözeltisinin permeasyonunun RF5'PNa çözeltisine kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür.

GSH içeren PAA-sistein ve kitozan-TBA çözeltilerinin P_{app} değerlerinin kontrol grubuna, yani RF5'PNa çözeltisine kıyasla sırasıyla 1.51 ve 2.35 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Tiyollenmiş polimerler ve GSH'ın kombine olarak kullanılmasının, permeasyon üzerinde belirgin bir artışa sebep olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara benzer olarak, tiyollenmiş polimerlerin güçlü permeasyon artırıcı etkileri olduğu ve bu etkinin GSH varlığında artış gösterdiği daha önceden yapılmış çalışmalarda da gösterilmiştir (48, 49).

Ayrıca, GSH içeren kitozan-TBA çözeltisinin P_{app} değerinin, GSH içeren PAA-sistein çözeltisine oranla 1.557 kat daha büyük olduğu görülmektedir. GSH, hücreler arası sıkı bağların açılmasında önemli rol oynar ve bu mekanizma ile

paraselüler ilaç transportunu artırır. Modifiye edilmemiş kitozanın permeasyon artırıcı etkisi üzerine çok sayıda araştıma mevcuttur (119, 163). Ayrıca, kitozana tiyol gruplarının immobilizasyonu ile elde edilen kitozan-TBA, sıkı bağların kapanmasından sorumlu olan tirozin fosfataz proteinini inhibe ederek epitelyal sıkı bağların açılmasına katkıda bulunarak permeasyon artırıcı etki gösterir (25). Kitozan-TBA'nın GSH ile birlikte kullanılmasının güçlü bir şekilde permeasyonu artırma nedeni, bu iki mekanizmanın etkilerinin kombinasyonu ile açıklanabilir. Ayrıca, katyonik özellikte olan kitozan ile hafif katyonik özellik gösteren RF5'PNa'nın arasında oluşan elektriksel itme kuvvetlerinin de mide mukozasından permeasyonda bir artışa sebep olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, tiyollenmiş polimerlerin GSH ile birlikte kullanılmasının permeasyon artırma için oldukça avantajlı olduğu görülmüştür. RF5'PNa'nın sıçan mide mukozasından geçiş çalışmaları sonuçları, tiyomerlerin GSH ile kombine halde kullanılmasının permeasyon artırıcı özelliğini kanıtlayan diğer literatür verileriyle de uygunluk göstermektedir (48, 51)

Tablet Formülasyonu Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Sentezlenen tiyollenmiş PAA-sistein ve kitozan-TBA konjugatları ile gastrik mukoadezif formülasyonların hazırlanması için, formülasyon tipi olarak öncelikle üretimleri ve kullanımları kolay olan matriks tabletler seçildi. Matriks tablet formülasyonlarının başka bir avantajı da, üretim maliyetlerinin diğer formülasyonlara kıyasla oldukça düşük olmasıdır. Diğer taraftan, bu formülasyonlarda karşılaşılan en önemli sorun, büyük dozaj ağırlığına ve midenin şiddetli motilitesine bağlı olarak mukozal yüzeylere yapışma kuvvetinin zayıf olmasıdır (7). Çalışmamızda tiyollenmiş polimerler kullanılarak, bu formülasyonların mukoadezif özelliklerinin artırılmasıyla midede kalış sürelerinin uzatılması ve kontrollü ilaç salımı sağlanması amaçlandı.

Mukoadezif matriks tablet formülasyonları direkt basım yöntemi ile hazırlandı ve hazırlanan tabletlerde ağırlık sapması, sertlik, friabilite ve çap-kalınlık oranı kontrolleri yapıldı. Bu kontrollerin sonuçları Tablo 19’da verilmiştir.

Hazırlanan tabletlerde yapılan ağırlık sapması kontrolü sonuçlarına göre, bütün formülasyonların ağırlığının ortalama 0.029-0.030 g arasında değiştiği görüldü. Tespit edilen ağırlık sapmalarının ise, farmakope sınırlarını aşmadığı saptandı.

Tabletlerin sertliği, mekanik dayanıklılığı açısından önemli bir parametredir. Tabletlerin sertliğinin az olması, tabletlerin çabuk ufalanmasına ve aşınmasına neden olur. Bunun sonucu olarak da dağılma süreleri kısalmır. Tabletlerde yapılan sertlik kontrolleri sonucunda, tabletlerin sertliklerinin 3.833-10.250 kg arasında değiştiği ve formülasyonlar arasında farklılık olduğu görüldü. Tiyollenmiş polimerler ile hazırlanan tabletlerin, modifiye olmamış polimerler ile hazırlanan tabletlere göre daha sert olduğu saptandı. Tablo 19’da görüldüğü gibi, tiyollenmiş PAA-sistein ve

kitozan-TBA tabletlerinin, PAA ve kitozan tabletlerine göre sırasıyla 1.171 ve 1.348 kat daha sert olduğu hesaplandı. Ayrıca modifiye edilmiş ve edilmemiş kitozan tabletlerinin PAA tabletlerine göre daha kırılğan olduğu gözlemlendi.

Tablet formülasyonlarında yapılan ufalanma-aşınma (friabilite) testi sonucunda, tabletlerin ağırlık kaybı yüzdelерinin 0.389-0.714 arasında değıştiği görüldü. Bu değерler farmakope kriterlerinde kabul edilen % 0.8 değерinin altındadır. Ayrıca, friabilite sonuçları sertlik çalışması sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Tiyollenmiş polimerler ile hazırlanan tabletlerin, modifiye olmamış polimerler ile hazırlanan tabletlere göre daha sert olduğu ve dolayısıyla daha düşük friabilite değерleri gösterdiği saptandı. Modifiye olmamış PAA ve kitozan tabletlerinin ağırlık kaybı yüzdeleri, PAA-sistein ve kitozan-TBA tabletlerine göre 1.231 ve 1.812 kat daha fazladır. Ayrıca en düşük ağırlık kaybı yüzdesi, en sert olan PAA-sistein tableti ile elde edilmiştir. PAA tabletlerine göre daha kırılğan olan kitozan tabletlerinin ağırlık kaybı yüzdeleri de daha fazladır.

Son olarak tabletlerin çap ve kalınlık kontrolleri dijital kumpas kullanılarak yapıldı. Tabletlerin çaplarının 4.933-4.986 mm arasında; kalınlıklarının ise 1.144-1.243 mm arasında değıştiği görüldü. PAA, PAA-sistein, kitozan ve kitozan-TBA tabletlerinin çap/kalınlık oranları sırasıyla 4.289 ± 0.384 , 4.366 ± 0.397 , 4.145 ± 0.314 ve 3.971 ± 0.148 olarak hesaplandı.

Dağılma çalışmaları, USP XXX'a göre enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içinde, 37°C'de sıcaklıkta ve 0.5 s^{-1} osilasyon frekansında yapıldı. Modifiye edilmemiş PAA ve kitozan ile hazırlanan tabletlerin, sırasıyla 1.06 ± 0.18 ve 1.16 ± 0.28 saat içerisinde parçalandığı görüldü (Şekil 48). Bunun sebebinin, bu polimerlerin kohezif kuvvetlerinin tabletlerin bütünlüğünü korumak için yetersiz olmasından kaynakladığı düşünüldü. Diğer taraftan, tiyollenmiş PAA-sistein

tabletlerinin 24 saat süre boyunca dağılmadığı, kitozan-TBA tabletlerinin ise dağılma süresinin 22.66 ± 1.52 saat olduğu görüldü. Tiyollenmiş tabletlerin dağılma sürelerinin modifiye edilmemiş tabletlerin dağılma sürelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı olduğu hesaplandı ($p < 0.05$). Bu sonuç, tiyollenmiş polimerler ile hazırlanan matriks tabletlerin içinde çapraz bağlanma ile disülfid bağlarının oluştuğu ve böylece tabletlerin kohezif özelliklerinde artma olduğu görüşünü desteklemektedir (29).

Bu görüşe dayanarak; sentezlenen kitozan-TBA konjugatı, PAA-sistein konjugatına göre daha fazla miktarda serbest tiyol grubu ve okside disülfid bağları içerdiği için (Tablo 17); kitozan-TBA tabletlerinin PAA-sistein tabletlerine göre daha dayanıklı olması bekleniyordu. Ancak, kitozan-TBA tabletleri 23 saat içerisinde dağılırken, PAA-sistein tabletlerinin 24 saatten uzun bir süre stabilitesini koruduğu görüldü. Bunun sebebinin kitozanın asidik ortamlardaki çözünürlüğüne bağlı olduğu düşünülmektedir. Kitozan zayıf bir bazdır ve pKa değeri 6.2-7 arasında değişir. Alkali ve nötral pH değerlerinde çözünmez ancak pH 6'nın altında çözünür (155). Bu nedenle kitozan-TBA tabletleri, asidik özellikteki enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde PAA-sistein tabletlerinden daha kısa sürede dağılmıştır.

Sonuç olarak, tabletlerin dağılma davranışının, kohezif ve mukoadezif özellikleri üzerinde büyük bir etkisi vardır. Formülasyonun içerisindeki kohezifliği sağlayan bağlar kopar ve formülasyon dağılırsa, mukoza ile formülasyon arasındaki bağ ne kadar güçlü olursa olsun mukoadezyon etkisiz hale gelmektedir. Ayrıca, polimerik ağ çok çabuk parçalanırsa, mukoadezif polimerik taşıyıcı matriksten kontrollü ilaç salımı sağlanması başarısız olur. Bu nedenle, tiyomerlerin artırılmış kohezif özellikleri, midede kalış süresi uzatılmış matriks tabletlerin hazırlanması için önemli bir avantajdır.

Mukoadezif formülasyonların su absorplama kapasiteleri, adezif ve kohezif özellikleri ile ilaç salım mekanizmasını etkileyen en önemli parametrelerdendir. Tabletlerin su absorplama kapasitesi, enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde gravimetrik olarak tayin edildi ve sonuçlar Şekil 49 ve Şekil 50’de verilmiştir. Modifiye edilmemiş polimerler ile hazırlanan tabletlerle ve tiyollenmiş polimerlerle hazırlanan tabletler arasındaki su absorplama kapasitelerinin birbirinden oldukça farklı olduğu görülmektedir. Modifiye edilmemiş PAA ve kitozan ile hazırlanmış tabletler, çalışmanın 15. dakikasında en yüksek su absorplama oranına ulaşmıştır ve bu anda PAA tabletleri 1.100 ± 0.151 kat, kitozan tabletleri ise 1.275 ± 0.058 kat ağırlık artışı göstermişlerdir. Daha sonra yavaş yavaş ağırlıkları azalmaya başlamıştır ve PAA tabletleri 60 dakika içerisinde, kitozan tabletleri ise 90 dakika içerisinde dağılmıştır.

Diğer taraftan, tiyollenmiş PAA-sistein konjugatı ile hazırlanan tabletlerin ağırlığı 7 saat boyunca sürekli artmaya devam etmiş ve 7. saatte 1.20 ± 1.49 kat ağırlık artışına ulaşmıştır. Kitozan-TBA konjugatı ile hazırlanan tabletlerin ağırlığı ise 4.5 saat boyunca artmaya devam etmiş ve bu tabletlerin ağırlığı en fazla 9.12 ± 0.57 kat artmıştır. PAA-sistein tabletlerinin su absorplama oranı 24 saat boyunca neredeyse değişmezken, kitozan-TBA tabletleri 24 saat içerisinde dağılarak ağırlıklarının büyük bölümünü yitirmişlerdir.

PAA-sistein ve kitozan-TBA tabletlerinin enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde 6 saat bekletildikten sonra çekilen resimlerinde, PAA-sistein tabletlerinin oluşan viskoz jel tabakası ile şiştiği, diğer taraftan kitozan-TBA tabletlerinin yüzeyinde belirgin bir erozyon olduğu görülmektedir (Şekil 51).

Tabletlerin mukoadesif özellikleri, midede kalış sürelerini doğrudan etkilediği için oldukça hassas olarak tayin edilmesi gereken bir parametredir.

Çalışmamızda bu nedenle, tiyomerler ile hazırlanan tabletlerin mukoadezif özellikleri literatürde ilk olarak TPA (texture profile analyzer) cihazı ile domuz midesinden elde edilen müsin ile hazırlanan diskler kullanılarak tayin edildi. Bu çalışmada, doğal mukozal membranlar yerine kullanılan müsin diskler, hazırlanmalarının daha kolay olması ve çalışmada sağladıkları avantajlar nedeniyle tercih edilmiştir (96, 97).

Tabletlerin mukoadezif özellikleri, tablet ve müsin diskler arasında oluşan adezif bağları kopararak, tableti müsin diskten ayıran kuvvetin ölçülmesiyle tayin edildi (145). Bu çalışmanın sonucunda kuvvet-mesafe eğrileri elde edildi. Bu eğrilerin tepe noktası, tabletlerin mukoadezif kuvvet değerini verir. Ayrıca, eğri altı alanın hesaplanmasıyla elde edilen mukadezyon değeri, tabletin yüzey alanına bölünerek tabletlerin mukadezyon işi hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 20’de görülmektedir.

Bu sonuçlardan da görüldüğü gibi, PAA-sistein ve kitozan-TBA konjugatlarıyla hazırlanan tiyollenmiş tabletleri müsin disklerden ayırmak için gereken dikey kuvvetin; modifiye edilmemiş polimerler ile hazırlanan tabletlere göre sırasıyla 1.864 ve 1.533 kat daha fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca, tiyollenmiş PAA-sistein ve kitozan-TBA tabletlerinin mukadezyon işleri, modifiye edilmemiş PAA ve kitozan tabletlerine göre 1.341 ve 2.139 kat daha fazladır. Bu bulgular, polimerlere tiyol grubu immobilizasyonunun, formülasyonların mukoadezif özelliklerini artırdığını gösteren literatürdeki çalışmalar ile uyumludur (75).

Tablo 20’de görüldüğü gibi, kitozan-TBA tabletlerinin mukoadezif kuvvet ve mukadezyon işi değerleri PAA-sistein tabletlerinden daha fazladır. Kitozan-TBA’nın daha yüksek mukoadezif özellik göstermesi, kitozan-TBA konjugatına, PAA-sistein konjugatından daha fazla miktarda tiyol grubunun immobilize olması ile açıklanabilir. Tablo 17’de de görüldüğü gibi kitozan-TBA konjugatının serbest tiyol

grubu ve okside olmuş tiyol grubu miktarları sırasıyla 371.11 $\mu\text{mol/g}$ ve 572.74 $\mu\text{mol/g}$ 'dır ve bu değerler PAA-sistein konjugatına göre 2.147 ve 1.515 kat daha fazladır. Bu sonuç, polimerin modifikasyon derecesi arttıkça, mukoadezif özelliklerinin arttığını gösteren literatür verileri ile de uyumludur.

Tabletlerin mukoadezif özellikleri, döner silindir yöntemi adıyla da bilinen ikinci bir yöntemle daha incelendi. Bu yöntemin tabletlerin enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisindeki kohezif özelliklerini de göz önüne aldığı için in vivo koşulları daha iyi taklit edebildiği kabul edilmektedir. Sonuç olarak, PAA, PAA-sistein, kitozan ve kitozan-TBA tabletlerinin mukoadazyon sürelerinin sırasıyla 1.5 ± 0.5 , 21 ± 1 , 1 ± 0.5 ve 17 ± 1 saat olduğu görüldü.

Modifiye edilmemiş PAA ve kitozan tabletleri ile elde edilen sonuçlar, bu polimerlerin zayıf ve kısa süreli mukoadazyon sağladığına dair olan literatür verileri ile uyumludur (14). Tiyollenmiş PAA-sistein ve kitozan-TBA polimerleri ile hazırlanan tabletlerin mukoadazyon sürelerinin, modifiye edilmemiş tabletlere göre sırasıyla 14 ve 17 kat daha fazla olduğu hesaplandı. Ayrıca PAA ve kitozan tabletlerinin bu süreler içerisinde enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde dağıldığı, fakat tiyollenmiş polimerler ile hazırlanan tabletlerin mukozadan kopsa bile ortam içerisinde dağılmadan kaldığı ve kohezif özelliklerini koruduğu gözlemlendi.

Daha önceden belirtildiği gibi, tiyomerlerin mukozaya kovalent bağlarla bağlanması için gerekli olan serbest tiyol grubu miktarı, kitozan-TBA konjugatında, PAA-sistein konjugatına göre belirgin bir şekilde daha fazla miktardadır. Ayrıca, katyonik özellikte olan kitozan-TBA konjugatının, anyonik özellikte olan mucus tabakasına bağlanmasında oluşan disülfid bağlarına ilave olarak iyonik etkileşimler de görev alır. Bu sebeplerden dolayı, TPA cihazı ile ölçülen mukoadezif özelliklerle uyumlu olarak, kitozan-TBA tabletlerinin mukoadazyon sürelerinin PAA-sistein

tabletlerine göre daha uzun olması beklenmektedir. Ancak kitozan-TBA tabletlerinin mukoadazyon sürelerinin PAA-sistein tabletlerinden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha kısa olduğu saptandı ($p<0.05$). Formülasyonların mukoadazyon sürelerinin tayini enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde yapılmıştır. Bu nedenle kitozanın asidik ortamlardaki çözünürlüğünün, bu beklenmeyen sonuca neden olduğu düşünülmektedir.

Hazırlanan matriks tabletlerden RF5'PNa'nın in vitro çözünme profilleri, döner palet yöntemi ile USP XXX'a göre incelendi. Tablet formülasyonlarından RF5'PNa'nın çözünme profilleri Şekil 53'de görülmektedir.

RF5'PNa'nın salım oranının enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde, PAA tabletlerinden 6 saatte %98.45'e; kitozan tabletlerinden ise 4 saatte %100'e ulaştığı görülmektedir. Aynı tabletler ile yapılan dağılma çalışması sonuçları, bu tabletlerin neredeyse 1 saat içerisinde dağıldığını göstermişti (Şekil 48). Buna göre, tablet dağılsa bile, RF5'PNa'nın salımının dağılmış tablet parçalarından devam ettiği söylenebilir. PAA-sistein ve kitozan-TBA tabletlerinden % salım miktarının ilk 6 saat içerisinde sırasıyla % 20.51 ve 34.99 olduğu; 24 saatin sonunda ise %88.53 ve %86.34'e ulaştığı görülmektedir.

PAA-sistein ve kitozan-TBA tabletleri ile yapılan su absorplama çalışmaları sonucunda, bu tabletlerin oldukça hızlı bir şekilde ve yüksek oranlarda şiştiği bulunmuştur. Bu tabletlerden kontrollü bir şekilde gerçekleşen ilaç salımının bu yüksek su absorplama kapasitesi ile ilgisi olduğu düşünülmektedir. Tabletlere suni mide vasatının penetre olması, tablet yapısında değişiklik olmasına ve bir jel tabakası oluşmasıyla beraber tabletlerin kalınlığının artmasına neden olur. Bu oluşan jel tabakasıyla beraber tabletin kalınlığı arttıkça da tablettten etkin maddenin difüze olması için geçtiği yol uzar ve etkin madde salım hızı yavaşlar (53, 124).

Bu tabletlerden kontrollü ilaç salımı sağlanmasını sağlayan diğer bir etken de, matriks tablet formülasyonunun içerisinde disülfid bağlarının oluşmasıdır. Bu sayede oluşan çapraz bağlar, üç boyutlu sıkı bir polimerik ağ meydana getirir ve bunun sonucunda ilacın kontrollü bir şekilde salımı sağlanır.

Ayrıca, kitozan-TBA tabletlerinden salım hızının, PAA-sistein tabletlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha hızlı ($p<0.05$) olduğu görülmüştür. Bunun nedeninin kitozanın asidik ortamdaki çözünürlüğüne bağlı olarak uğradığı erozyon olduğu düşünülmektedir.

Yapılan literatür incelemesi sonucunda, tiyomerlerle hazırlanan tabletlerin midede kalış süresi uzatılmış ilaç taşıyıcı sistemi olarak kullanılmasını inceleyen iki çalışma olduğu görülmüştür. Schmitz ve arkadaşları (161), polikarbofil-sistein konjugatı kullanarak, düşük molekül ağırlıklı heparin içeren midede kalış süresi uzatılmış tablet formülasyonu geliştirmiştir ve bu formülasyon hidroksietil selüloz matriks tabletleri ile karşılaştırmıştır. Benzer bir şekilde, Guggi ve arkadaşları (73), kitozan-4-tiyobutilamidin konjugatı ile salmon kalsitonin içeren midede kalış süresi uzatılmış mukoadesif matriks tablet formülasyonu geliştirmişlerdir. Bu iki çalışma incelendiğinde, geliştirilen formülasyonlar için detaylı bir in vitro inceleme yapılmadığı, in vitro salım çalışmasının ardından in vivo çalışmalara geçildiği görülmüştür. Çalışmamızda hazırladığımız tablet formülasyonları ile yaptığımız detaylı in vitro çalışmaların, literatürdeki bu eksikliği de tamamlayacağı düşünülmektedir.

Son olarak tiyomerler ile hazırlanmış tabletlerin midede kalış sürelerinin daha uzun olduğunu kanıtlamak için sıçanlarda in vivo çalışmalar yapıldı. PAA, PAA-sistein, kitozan ve kitozan-TBA tabletleri için 4 gruba ayrılmış sıçanlara, eter anestezisi altındayken in vivo çalışmalar için hazırlanan mini tabletler yutturuldu.

Her saat başı, her bir formülasyon için 6'şar adet sıçan kurbanı kurbanı edildi. Sıçanların karın boşlukları açılarak mideleri çıkartıldı ve tabletlerin durumu görsel olarak incelendi.

Midelerin görsel olarak incelenmesi sonucunda, PAA-sistein tabletleri uygulanmış 24 sıçandan 19'unda (% 79.17), tabletlerin 5 saat boyunca midede kaldığı gözlemlendi. 6. saatin sonunda ise tiyollenmiş tabletlerin parçalandığı görüldü (Şekil 54). 3 sıçanda (% 12.5) ise, tabletlerin ağız boşluğu veya özofagusa yapıştığı ve mideye ulaşmadığı gözlemlendi. 2 sıçanda da (% 8.33), tabletlerin 4. ve 5. saatler arasında dağıldığı görüldü.

Modifiye edilmemiş PAA tabletleri ile yapılan çalışmada ise, 1. saatin sonunda 22 sıçanda da (% 91.66) tabletlerin tamamen dağıldığı ve 2 sıçanda (% 8.33) damak veya özofagusa yapıştığı görüldü.

Kitozan-TBA tabletleri uygulanmış 24 sıçandan 16'sında (% 66.66), tabletlerin 5 saat boyunca midede kaldığı ve 6. saatin sonunda tabletlerin parçalandığı görüldü (Şekil 55). 2 sıçanda (% 8.33), tabletlerin ağız boşluğu veya özofagusa yapıştığı ve mideye ulaşmadığı gözlemlendi. 6 sıçanda da (% 25), tabletlerin 5. saatten önce dağıldığı görüldü (Şekil 55).

Modifiye edilmemiş kitozan tabletleri ile yapılan çalışmada ise, 1. saatin sonunda 21 sıçanda da (% 87.5) tabletlerin tamamen dağıldığı ve 3 sıçanda (% 12.5) damak veya özofagusa yapıştığı görüldü.

İn vivo çalışmaları sonucunda, uygulanan her bir tablet formülasyonunun neredeyse sıçanların % 10'unda damak veya ağız boşluğuna yapışarak mideye ulaşmadığı ve bu durumun tabletlerin uygulanmasında ciddi bir kısıtlayıcı etken olduğu görüldü. Bu nedenle, tabletlerin ileride yapılacak çalışmalarda, uygulama sırasında mukoadesyonunu önlemek için kaplanması gerektiğine karar verildi.

Benzer olarak Guggi ve arkadaşları (73) tarafından yürütülen bir çalışmada, etkin madde olarak salmon kalsitonin kullanılarak midede kalış süresi uzatılmış mukoadezif tablet formülasyonları hazırlanmış ve bu formülasyonlar, bir trigliserid olan Miglyol 810 ile kaplanarak ağız boşluğu veya özofagusa yapışmaları önlenmiştir.

Ayrıca, yapılan in vivo çalışmanın sonuçlarının, tabletlerin dağılma çalışması ve döner silindir yöntemi ile yapılan mukoadezyon süresi tayini çalışması sonuçlarından oldukça farklı olduğu saptandı. Sıçanlarda yapılan in vivo çalışmalar, PAA-sistein ve kitozan-TBA tabletlerinin sadece 6 saate kadar mukoadezif ve kohezif özelliklerini koruduğunu gösterirken, aynı tabletlerle yapılan in vitro mukoadezyon ve dağılma çalışmaları bu tabletlerin 24 saate kadar yüksek kohezif ve mukoadezif özelliklerini koruduğunu göstermektedir. Formülasyonların dağılma çalışmaları ve döner silindir yöntemi çalışmalarında maruz kaldıkları mekanik stresin, in vivo koşullardaki midenin şiddetli motilitesinden farklı olmasının bu sonuca neden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, enzimsiz suni mide vasatından farklı olarak, mide sıvısı H^+ , Na^+ , K^+ , Cl^- , CO_3^- , mukus, intrinsik faktör, pepsinojen ve gastrik lipaz gibi çok farklı bileşenleri de içerir. Mide sıvısındaki bu farklılığın da bu sonuca neden olabileceği düşünülmektedir (13).

Partikül Formülasyonu Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Tablet şeklinde hazırlanan midede kalış süresi uzatılmış dozaj şekillerinin; dozaj şeklinin ağırlığına ve midenin şiddetli motilitesine bağlı olarak mide mukozası yüzeyine yapışmama olasılığı vardır. Mukoadezif tablet dozaj şekillerine kıyasla, partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin bazı avantajları vardır. Partiküler sistemler; mukoadesif özellikleri olmasa bile mukus jel tabakasına difüze olarak belirgin bir şekilde uzatılmış gastrointestinal kalış süresi gösterirler (54). Mukoadesif polimerlerin kullanılması ile hazırlanan partiküllerin ise gastrointestinal kalış sürelerinin daha da uzatılabileceği saptanmıştır. Örneğin; Akiyama ve arkadaşları (3) tarafından insanlarda yapılan bir çalışmada, model ilaç olarak kullanılan furosemidin adesif karboksivinil polimeri ile hazırlanan mikrokürelerinin plazma konsantrasyonu-zaman eğrisinin eğri altı alanının adesif olmayan mikrokürelere kıyasla 1.8 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca, bu sistemlerde partiküllerin ağırlığının düşük olması da tablet formülasyonlarına göre diğer bir avantajdır (45). Bu nedenlerle, çalışmamızda mukoadesif matriks tablet formülasyonlarının yanında partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin de hazırlanmasına karar verildi.

Mikropartiküler sistemlerin, tiyomerler kullanılarak çözücü buharlaştırma emülsifikasyon yöntemi ile hazırlanmasına ait birçok çalışma bulunmaktadır ve ümit verici sonuçlar elde edilmiştir (116). Ancak, bu yöntemle partiküllerin hazırlanması uzun zaman alır ve hazırlama aşamasında polimerdeki tiyol gruplarının oksidasyon sonucu disülfid bağlarına dönüşmesi olasılığı gibi dezavantajları vardır. Bu nedenle, çalışmamızda çöktürme, havanda ön öğütme ve hava püskürtmeli değirmen ile öğütme basamaklarından oluşan bir hazırlama yöntemi kullanıldı (84, 159). Bu yöntemde kullanılan hava püskürtmeli değirmenlerin kontaminasyonu önleme, sıcaklığa hassas maddelerin öğütülmesi için kullanılabilme ve küçük partilerden

büyük hacimli ticari ürünlerin imalatına kadar geniş bir ölçekte üretim yapabilme avantajları vardır. Ayrıca üretilen partiküller, daha küçük boyuttadır ve daha dar bir partikül büyüklüğü dağılımı gösterirler. Örneğin, çözücü buharlaştırma emülsifikasyon yöntemi ile elde edilen tiyolle partiküller geniş bir parikül büyüklüğü dağılımı göstermiştir ve ortalama 15 µm çapa sahiptir. Diğer taraftan, Hoyer ve arkadaşları (84) tarafından yapılan bir çalışmada hava püskürtmeli değirmen ile daha dar bir partikül büyüklüğü dağılımı gösteren ortalama 5 µm çapta partiküller elde edilmiştir.

Çalışmamızda, hava püskürtmeli değirmen kullanılarak ilk kez midede kalış süresi uzatılmış partikül formülasyonları hazırlanmıştır. Bu yöntemin endüstri ölçekli üretime uygun olması önemli bir avantajı olarak değerlendirilmektedir.

Partikül büyüklüğü dağılımı çalışmalarında Yöntem 2.6.2.2.1’de anlatıldığı gibi çözücü olmayan ortam olarak Miglyol 840 (viskozitesi 10.5 cP, refraktif indeksi 1.441) kullanıldı. Zeta potansiyeli ölçümlerinde ise distile su (viskozitesi 0.933 cP, refraktif indeksi 1.333) kullanıldı.

Partikül büyüklüğü dağılımı çalışması sonucunda; PAA, PAA-sistein, kitozan ve kitozan-TBA partiküllerinin ortalama büyüklüklerinin sırasıyla 1622.4 ± 241.4 , 336.5 ± 16.5 , 3308.6 ± 137.8 ve 396.3 ± 17.0 nm olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, tiyollenmiş partiküllerin modifiye edilmemiş polimerlerle hazırlanan partiküllere göre belirgin bir şekilde daha küçük olduğunu göstermektedir. Partiküllerin hazırlanması aşamasında partiküllerin içinde oluşan disülfid bağlarının oluşmasının buna neden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca elde edilen sonuçlar hava püskürtmeli değirmenler kullanılarak daha dar partikül büyüklüğü dağılımında ve daha küçük partiküller elde edilebileceği tezini desteklemektedir.

DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) teorisi, bir dispersiyondaki partiküllerin üzerindeki kuvvetin, elektrostatik itme ve van der waals çekme kuvvetlerinden ileri geldiğini öne sürmektedir. Bu prensibe göre, partikül yüzeyindeki yüksek elektrostatik yük, partiküllerin birbirinden ayrılmasını ve dispersiyonun fiziksel stabilitesini artırırken, van der waals çekme kuvvetleri agregasyona neden olmaktadır (172). Zeta potansiyeli, kolloidal bir sistemin sahip olduğu yüklerin toplamı olarak tanımlanmaktadır. Hazırlanan partiküllerin zeta potansiyellerinin belirlenmesi sistemin dayanıklılığı hakkında fikir vermesi açısından önemlidir. Sistemin yükü sıfıra ne kadar yakınsa, partiküllerin birleşme eğilimi de o kadar artmaktadır (143).

Çalışmamızda kullanılan partiküllerin yüzeyindeki elektriksel tabakanın değerlendirilmesi zeta potansiyeli ölçümü ile yapılmıştır. Partiküllerin zeta potansiyeli ölçümü sonucunda, PAA polimerinin karboksilik asit grubuna bağlı olarak, PAA ve PAA-sistein partiküllerinin negatif yükle yüklü olduğu ve zeta potansiyellerinin sırasıyla -9.34 ± 1.99 ve -19.98 ± 1.01 mV değerinde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, PAA-sistein partiküllerinin zeta potansiyelinin modifiye edilmemiş PAA partiküllerine kıyasla 2.13 kat azaldığı saptanmıştır. PAA ve PAA-sistein partiküllerinin zeta potansiyeli ölçümleri, distile su içerisindeki 1:5 oranında seyreltmeleri kullanılarak yapılmıştır. PAA ve PAA-sistein partiküllerinin suda çözünür özellikte olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, bu partiküllerin zeta potansiyeli ölçümlerinde distile su kullanılması çok uygun bir ortam gibi görünmeyebilir. Ancak, zeta potansiyeli ölçümleri her bir formülasyon için 180 saniyede tamamlanmıştır ve partiküllerin bu süre içindeki çözünme oranlarının göz ardı edilebileceği düşünülmüştür. Bu nedenle, PAA ve PAA-sistein partiküllerinin zeta

potansiyeli ölçümlelerinde, bu yöntemle doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edebilmek mümkündür.

Kitozanın serbest amino grupları nedeniyle, kitozan ve kitozan-TBA partiküllerinin pozitif yükle yüklü olduğu ve zeta potansiyellerinin sırasıyla 15.48 ± 0.29 ve 27.15 ± 0.50 mV değerinde olduğu görülmüştür. Bu partiküllerin pozitif yükle yüklü olması, negatif yüklü mukozal yüzeylerle güçlü bir elektrostatik etkileşmeye sebep olur. Bu yüzden pozitif zeta potansiyel değerine sahip olan partiküllerin daha fazla mukoadezif özellik göstermesi beklenmektedir. Sonuçlardan da görüldüğü gibi tiyollenmiş kitozanın zeta potansiyeli, modifiye edilmemiş kitozana göre 1.75 kat fazladır. Literatürde, ± 20 mV zeta potansiyelinin altında ve üstünde olan partiküllerin daha stabil olduğu kabul edilmektedir (84) ve tiyollenmiş polimerler ile hazırlanan partiküllerin modifiye edilmemiş polimerler ile hazırlanan partiküllere göre daha stabil olduğu görülmüştür. Bu nedenle, çalışmamızda bulunan zeta potansiyeli sonuçları bu teori ile uyumludur.

Hazırlanan partiküllerin yüzey morfolojisi, kaplama yapılmadan taramalı elektron mikroskopisi ile 25 kV hızlandırılmış voltaj altında incelendi.

Şekil 58'de görüldüğü gibi, tiyollenmiş polimerlerin, modifiye edilmemiş polimerlerle hazırlanan partiküllere göre daha küresel bir yapı gösterdiği saptanmıştır. Partiküllerin üretim aşamasında, partikül içerisinde oluşan disülfid bağlarının bu sonuca neden olduğu düşünülmektedir.

Partiküllerin içerdiği RF5'PNa miktarı, PAA ve PAA-sistein partikülleri için distile suda, kitozan ve kitozan-TBA partikülleri ise %6 asetik asit çözeltisi içerisinde çözündürüldükten sonra florometrik olarak tayin edildi. PAA, PAA-sistein, kitozan ve kitozan-TBA partiküllerinin içerdikleri RF5'PNa oranlarının sırasıyla, % 72.246 ± 2.335 , 65.975 ± 6.319 , 15.447 ± 0.381 ve 6.729 ± 0.411 olduğu hesaplandı.

Çözücü buharlaştırma emülsifikasyon yöntemi ile hazırlanan partiküllerde, partiküllere yüklenen model ilacın partikülün içerisinde mi olduğu yoksa sadece partikülün yüzeyine mi adsorbe olduğu tam olarak açık değildir. Diğer taraftan, çalışmamızda kullandığımız partikül hazırlama yönteminde yapılan yıkama basamağı nedeniyle partiküllerin yüzeyinde tutulan ilacın ortamdaki uzaklaştırıldığı ve elde edilen sonuçların, partikül içinde bulunan etkin madde miktarını gösterdiği kabul edilir.

Partiküllerin içinde bulunan RF5'PNa miktarının belirlenmesi çalışmaları sonucunda, hem tiyollenmiş hem de modifiye edilmemiş polimerler ile hazırlanan PAA partiküllerinin ilaç yükleme oranlarının kitozan partiküllerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kitozan partiküllerinin ilaç yükleme oranlarının düşük olduğu ve yükseltilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Partiküllerin su absorplama özellikleri, hem mukoadesyon hem de ilaç salım karakteristiklerini etkileyen önemli bir parametredir. Bu nedenle, partiküllerin su absorplama özellikleri enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde gravimetrik olarak incelenmiştir. 1 saat süren bu çalışma sonunda partiküllerin su absorplama oranları Şekil 59'da görülmektedir. Yapılan hesaplamalarda; PAA, PAA-sistein, kitozan ve kitozan-TBA partiküllerinin ağırlıklarının sırasıyla 12.94 ± 1.47 , 20.12 ± 2.21 , 6.7 ± 0.82 ve 9.64 ± 1.99 kat artma gösterdiği bulunmuştur.

Su absorplama çalışması sonuçlarından da görüldüğü gibi, PAA-sistein partiküllerinin en yüksek su absorplama kapasitesine sahip olduğu, diğer taraftan modifiye edilmemiş kitozan partiküllerinin en düşük su absorplama kapasitesi gösterdiği görülmüştür. Her iki tiyollenmiş partikülün de su absorplama oranlarının, modifiye edilmemiş partiküllere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. PAA partiküllerinin, kitozan partiküllerinden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde

($p<0.05$) ve PAA-sistein partiküllerinin kitozan-TBA partiküllerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ($p<0.05$) daha fazla su absorplama oranı gösterdiği görülmüştür.

Partikül formülasyonlarından RF5'PNa'nın in vitro çözünme çalışmaları, enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) içerisinde gerçekleştirilmiştir. 330 dakika süre boyunca, her 30 dakikada bir çözünme ortamından alınan örneklerdeki RF5'PNa miktarı florometrik olarak tayin edildi. RF5'PNa'nın partikül formülasyonlarından in vitro çözünme profilleri karşılaştırmalı olarak Şekil 60'da görülmektedir.

İn vitro salım çalışmalarının sonuçları, PAA, PAA-sistein, kitozan ve kitozan-TBA partiküllerinden çözünme ortamına geçen RF5'PNa miktarlarının yaklaşık 270-300. dakikalar arasında sabitlendiğini ve 330. dakikanın sonunda sırasıyla % 98.131 ± 8.150 , 92.196 ± 5.362 , 83.554 ± 5.866 ve 92.738 ± 6.497 değerlerine ulaştığını göstermektedir.

Çalışmanın ilk 4 saatlik bölümünde ise, tiyollenmiş partiküllerden RF5'PNa'nın çözünmesinin, modifiye edilmemiş partiküllere göre daha yavaş olduğu görülmüştür. Bu sonuca dayanarak, tiyollenmiş partiküllerin ilaçların salım hızını yavaşlattığı söylenebilir. Bu sonuç: tiyomerler ile hazırlanmış formülasyonların, ilaç salımını kontrol ederek neredeyse sıfırıncı dereceden salım sağladığını gösteren literatür verileri ile uyumludur (20, 23).

Katyonik yapılı kitozan ile hafif katyonik özellik gösteren RF5'PNa arasında oluşan elektriksel itme kuvvetleri ve kitozanın asit ortamlarda çözünür olması nedeniyle hem modifiye edilmemiş kitozan hem de kitozan-TBA partiküllerinin salım hızının PAA ve PAA-sistein partiküllerinden daha hızlı olması bekleniyordu. Ancak sonuçlar, kitozan partiküllerinin salım hızının PAA partiküllerine göre daha yavaş olduğunu göstermektedir. Kitozan partiküllerinin ilaç yükleme oranlarının,

PAA partiküllerine göre daha düşük olmasının buna neden olduğu düşünülmektedir. Partiküller içinde bulunan RF5'PNa miktarının belirlenmesi sonucunda, kitozan ve kitozan-TBA partiküllerinin yaklaşık olarak %85 ve %94 oranında polimer içerirken, PAA ve PAA-sistein partiküllerinin %18 ve %35 oranında polimer içerdiği saptanmıştı. Buna bağlı olarak partikül içerisindeki artan polimer oranının ilaç salım hızını yavaşlattığı söylenebilmektedir.

Elde edilen partiküllerin karakterizasyon çalışmaları, şimdiye kadar tiyomerler ile hazırlanan mideye hedeflendirilmiş partiküller ile yapılan çalışmalardan farklı olarak (58, 67, 133), ilk kez her çalışmada suni mide vasatı kullanılarak yürütüldü. Bu da in vivo koşullarda partikül davranışı hakkında fikir sahibi olabilmemiz için bir avantaj sunmaktadır.

Tiyomerler ile hazırlanan partiküllerin mukoadesyon çalışmaları, ilk kez bu çalışmada membran olarak domuz mide mukozası ve yıkama çözeltisi olarak enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) kullanılarak yürütüldü. Bu şekilde %100 bağıl nem içeren 37°C'deki inkübasyon ortamında (Şekil 39) in vivo koşulların taklit edilmesi sağlandı. Üzerinde partiküller olan domuz mide mukozasına bir peristaltik pompa yardımıyla 37°C'deki enzimsiz suni mide vasatı (pH 1.2) 5 mL/dakika hız ile damlatılarak yıkandı. Düzeneğin altındaki örnek toplama kabından alınan örneklerdeki RF5'PNa miktarı florometrik olarak tayin edildi. Bu sonuçtan hareketle, mukoza yüzeyinde kalan RF5'PNa miktarı ve partikül yüzdesi hesaplandı. Partiküllerin mukoadesif özellikleri Şekil 61'de karşılaştırmalı olarak görülmektedir.

1. saatin sonunda mukoza yüzeyinde kalan partikül yüzdeleri PAA, PAA-sistein, kitozan ve kitozan-TBA partikülleri için sırasıyla, % 20.250 ± 4.646 , 45.341 ± 9.939 , 32.162 ± 7.580 ve 64.224 ± 3.580 olarak bulundu. 2. saatin sonunda ise mukozada kalan PAA-sistein ve kitozan-TBA partiküllerinin miktarının sırasıyla % 25.3 ± 9.204

ve 47.915 ± 8.169 olduğu görüldü. İkinci saatin sonunda modifiye edilmemiş PAA ve kitozan polimerleriyle hazırlanan partiküllerin ise mukozada kalan oranlarının ise %10 civarında olduğu saptandı.

Bütün bu sonuçlar, kitozan partiküllerinin mukoadezif özelliklerinin artı yüklü kitozan ve eksi yüklü mukus arasındaki elektriksel etkileşme kuvvetlerinin de yardımıyla PAA partiküllerine göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca, tiyomerlerin mukus jel tabakası ile kovalent disülfid bağları oluşturması özelliğine bağlı olarak PAA-sistein ve kitozan-TBA partiküllerinin modifiye edilmemiş polimerler ile hazırlanan partiküllere göre belirgin bir şekilde daha yüksek mukoadezif özellik gösterdiği saptandı.

İn vitro mukoadезyon testleri, in vivo koşullar için bütün parametreleri tam olarak karşılayamasa da, yapılan birçok çalışmada, partiküler dozaj şekillerinin in vitro-in vivo mukoadезyon sonuçları arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir. Örneğin; Miyazaki ve arkadaşları (142) tarafından yapılan bir çalışmada, dekstran türevi mikrokürelerin in vitro mukoadезyon testi sonuçlarının, sıçanlar ile yapılan in vivo çalışmanın sonuçları ile benzer olduğu görülmüştür. Bu çalışmada, in vitro olarak 1.5 saatin sonunda mikrokürelerin %80'den fazlasının mukozaya yapıştığı görülmüştür. Formülasyonların sıçanlara verilmesinden 1 saat sonra ise, in vivo olarak benzer miktar mikroküre sıçan midesinde bulunmuştur. Yapılan başka bir çalışmada ise, yağ asitlerinin poligliserolesterleri/Carbopol 934P mikrokürelerinin in vitro ve in vivo mukoadезyon sonuçlarının birbiri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Ex vivo olarak yapılan mukoadезyon çalışmaları, 5 saatin sonunda mikrokürelerin %90'ından fazlasının çıkartılmış sıçan midesinde kaldığını gösterirken, in vivo çalışmalar, bu sürenin sonunda mikrokürelerin %89.6'sının sıçan mide ve ince bağırsağında kaldığını göstermiştir (2). Bu literatür bilgilerinin ışığında,

çalışmamızda elde edilen in vitro mukoadezyon çalışması bulgularının, ileride planlanan in vivo çalışmalardan elde edilecek veriler ile korelasyonlarının yapılması düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında;

➤ Anyonik özellikte PAA-sistein konjugatı ve katyonik özellikte kitozan-TBA konjugatı sentezlenmiş ve bunların kontrolleri yapılmıştır. Bu konjugatların seçilmesinin nedeni mukoadezif özelliklerinin oldukça yüksek olmasıdır. Ayrıca; kitozanın, herhangi bir toksisitesinin bulunmaması, alerji ve irritasyon yapıcı olmaması, biyoparçalanabilir ve biyogeçimli olmasının yanında antiasit, yara iyileşmesini hızlandırıcı ve antiülser gibi önemli biyoaktif özelliklere sahip olması, midede kalış süresi uzatılmış formülasyonlarda kullanılması açısından önemli bir avantajıdır.

➤ Bu konjuge polimerlerin, permeasyon artırıcı etkisi bilinen glutatyon ile birlikte RF5'PNa'nın sıçan mide mukozasından geçişi incelenmiştir. Çalışmamızda permeasyon çalışmalarında ilk defa sıçan mide mukozasının kullanılmış olmasının literatüre yenilik getireceği düşünülmektedir.

➤ Her iki tiyollenmiş polimerler ile, tablet ve partikül formülasyonları hazırlanmış ve bunların özellikleri detaylı olarak incelenerek modifiye edilmemiş polimerler ile hazırlanan formülasyonlar ile karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda hazırladığımız formülasyonlar ile yaptığımız detaylı karakterizasyon çalışmalarının, literatürdeki bu konudaki eksikliği tamamlayacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında PAA-sistein ve kitozan-TBA polimerleri kullanarak hazırlanan formülasyonların yüksek kohezif ve mukoadezif özellikler göstermelerinin yanı sıra model ilacı midede kontrollü bir şekilde salmalarına dayanarak hazırlanan tiyomer konjugatlarının gastrik mukoadezif sistemlerdeki üstünlüğü ortaya konmuştur.

V. BÖLÜM

ÖZET

Gastrik Mukoadezif Formülasyonların Hazırlanması ve İn-Vitro İn-Vivo Olarak Değerlendirilmesi

Bu çalışmanın amacı, tiyollenmiş polimerler kullanılarak gastrik mukoadezif ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve incelenmesidir. Bu amaçla; anyonik tiyomer olarak poli(akrilik asit)-sistein (PAA-sistein), katyonik tiyomer olarak da kitozan-4-tiyobutilamidin (kitozan-TBA) sentezlendi ve model ilaç olarak riboflavin-5'-monofosfat sodyum tuzu dihidrat (RF5'PNa) kullanıldı.

İlk olarak, sentezlenen PAA-sistein ve kitozan-TBA konjugatlarına immobilize olan serbest tiyol grubu miktarı ve disülfid bağı şeklinde bulunan okside tiyol grubu miktarı tespit edildi.

Daha sonra, polimerlerin glutatyon (GSH) ile birlikte sıçan mide mukozasından RF5'PNa'nın geçişi üzerine etkisi incelendi.

Formülasyon çalışmalarında ise öncelikle, direkt basım yöntemi ile gastrik mukoadezif matriks tabletler hazırlandı. Bu tabletlerde kalite kontrol çalışmaları yapıldı ve tabletler dağılma, su absorplama, mukoadezyon ve ilaç salım özellikleri açısından incelendi. Daha sonra tabletlerin midede kalış süresi, sıçanlarda minitabeller kullanılarak gözlemlendi.

Ayrıca, hava püskürtmeli değirmenler kullanılarak mukoadezif partiküller hazırlandı. Hazırlanan partiküller; partikül büyüklüğü dağılımı, zeta potansiyeli,

morfoloji, ilaç yükleme oranı, su absorplama, salım hızı ve mukoadesyon özellikleri açısından incelendi.

Tiyollenmiş polimerlerin kimyasal karakterizasyonu, PAA-sistein konjugatının ortalama olarak 172.80 ± 30.33 $\mu\text{mol/g}$ serbest tiyol grubu ve 377.93 ± 85.10 $\mu\text{mol/g}$ okside tiyol grubu içerdiğini göstermiştir. Kitozan-TBA'nın 371.11 ± 72.74 $\mu\text{mol/g}$ serbest tiyol grubu ve 572.74 ± 186.26 $\mu\text{mol/g}$ okside tiyol grubu içerdiği saptandı.

Sıçan mide mukozasından geçiş çalışmalarının sonuçları, PAA-sistein ve kitozan-TBA'nın GSH ile birlikte RF5'PNa'nın permeasyon katsayısının kontrol grubuna göre sırasıyla 1.511 ve 2.354 kat artırdığını gösterdi. Sonuçta, glutatyonun tiyomerler ile birlikte kullanılmasının mukozadan geçişi belirgin bir şekilde artırdığı görüldü.

Hazırlanan tablet formülasyonlarında yapılan dağılma çalışmaları sonucu, tiyollenmiş polimerlerle hazırlanmış tabletlerin 24 saat stabilitesini koruduğunu, diğer taraftan modifiye edilmemiş polimerler ile hazırlanan tabletlerin 1 saat içerisinde dağıldığını göstermiştir. Mukoadesyon çalışmalarının sonucuna göre tiyollenmiş tabletlerin hem mukoadesyon işlerinin hem de mukoadesyon sürelerinin modifiye edilmemiş tabletlerden daha fazla olduğu saptandı. Bu sonuç tiyol gruplarının musin glikoproteinleri ile kovalent bağlar oluşturduğu teorisini doğrulamaktadır. Salım çalışmaları sonuçları ise, tiyollenmiş tabletler ile 24 saate kadar kontrollü salım elde edilebileceğini gösterdi. Tiyollenmiş tabletlerde elde edilen bu ümit verici sonuçlar in vivo çalışmalar ile de desteklendi. İn vivo çalışmaların sonucunda, modifiye edilmemiş polimerler ile hazırlanan tabletlerin sıçan midesinde 1 saatte parçalanırken, tiyole polimerler ile hazırlanan tabletlerin 6 saat kadar midede kalış süresi gösterdiği saptandı.

Hazırlanan partiküller ile yapılan çalışmaların sonucunda, PAA-sistein ve kitozan-TBA partiküllerinin ortalama çaplarının sırasıyla 336.5 ± 16.5 ve 396.3 ± 17.0 nm; zeta potansiyeli değerlerinin ise -19.98 ± 1.015 ve 27.15 ± 0.500 mV olduğu saptandı. Modifiye edilmiş ve edilmemiş polimerler ile hazırlanan PAA partiküllerinin içerdiği RF5'PNa miktarının kitozan partiküllerine göre daha fazla olduğu görüldü. Yapılan salım çalışmaları sonucunda, RF5'PNa'nın tiyollenmiş partiküllerden salım hızının modifiye edilmemiş polimerler ile hazırlanan partiküllere göre daha yavaş olduğu saptandı. Ayrıca, tiyollenmiş partiküllerin modifiye edilmemiş partiküllere göre daha iyi mukoadezif özellik gösterdiği belirlendi.

Sonuç olarak bu çalışma; tiyollenmiş polimerlerin, midede kalış süresinin uzatılması için hazırlanan gastrik mukoadezif formülasyonlarda kullanılmasının ümit verici olduğunu göstermektedir.

ABSTRACT

Preparation and In Vitro - In Vivo Evaluation of Gastric Mucoadhesive Formulations

The objective of this study is to develop and evaluate gastric mucoadhesive drug delivery systems formulated with thiolated polymers. For this aim, Poly(acrylic acid)-cysteine (PAA-cys) and chitosan-4-thiobuthylamidine (chitosan-TBA) were synthesized as anionic and cationic thiolated polymers and riboflavin-5'-monophosphate sodium salt dihydrate (RF5'PNa) was used as model drug.

Firstly, the amount of free thiol groups and the amount of oxidized thiol groups in form of disulfide bonds immobilized on PAA-cys and chitosan-TBA backbones were quantified.

Thereafter, polymers and combination with glutathione (GSH) were evaluated for permeation enhancing properties of RF5'PNa from rat stomach mucosa.

For formulation studies, firstly gastric mucoadhesive matrix tablets were prepared by direct compression technique. Tablet quality control studies were performed and tablets were characterized in terms of disintegration, swelling, mucoadhesion and drug release properties.

Subsequently, the gastric residence time of tablets was evaluated in vivo with minitables in rats.

Furthermore, mucoadhesive particles were prepared by air jet milling. These particles were characterized in terms of particle size distribution, zeta potential, morphology, drug loading, swelling, release rate and mucoadhesion properties.

Chemical characterization of thiolated polymers showed that, on an average PAA-cys contained 172.80 ± 30.33 $\mu\text{mol/g}$ free thiol groups and 377.93 ± 85.10 $\mu\text{mol/g}$ oxidized thiol groups. Besides, chitosan-TBA showed 371.11 ± 72.74 $\mu\text{mol/g}$ free thiol groups and 572.74 ± 186.26 $\mu\text{mol/g}$ oxidized thiol groups.

Permeation studies from rat stomach mucosa indicated that the apparent permeability coefficients of RF5'PNa with PAA-cys and chitosan-TBS in combination with glutathione are 1.511-fold and 2.354-fold higher than control, respectively. It can be seen from the results glutathione in combination with thiomers has a significant influence for increasing permeation.

The results of disintegration studies demonstrated the stability of thiolated tablets up to 24 h, whereas unmodified tablets disintegrated within a time period of 1 h. Mucoadhesion studies showed that mucoadhesion work and time of thiolated tablets were higher than unmodified ones, confirming that the thiol groups react with mucin glycoproteins and form covalent bonds to the mucus layer. Release studies indicated that a controlled release was provided with thiolated tablets up to 24 h. These promising in vitro results of thiolated tablets were supported with in vivo studies. The thiolated tablets showed a gastroretention time up to 6 hours whereas unmodified tablets completely disintegrated within 1h in rat stomach.

PAA-cys and chitosan-TBA particles demonstrated a mean diameter of 336.5 ± 16.5 and 396.3 ± 17.0 nm and zeta potential of -19.98 ± 1.015 and 27.15 ± 0.500 mV, respectively. RF5'PNa loading of both modified and unmodified PAA particles was significantly higher than chitosan particles. The release studies revealed that, release rate of RF5'PNa from the thiolated particles was slower compared with unmodified particles. Moreover, thiolated particles showed higher mucoadhesive properties compared to unmodified particles.

Consequently, the study suggests that the usage of thiolated polymers might be promising for preparation of gastric mucoadhesive drug delivery systems to prolong the gastric retention time.

VI. BÖLÜM

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Agyilirah, G.A., Gren, M., duCret, R., Banker, G.S. (1991). Evaluation of the gastric retention properties of cross-linked polymer coated tablet versus those of a non-disintegrating tablet, *Int. J. Pharm.* 75:241-247.
2. Akiyama, Y., Nagahara, N., Kashiara, T., Hirai, S., Toguchi, H. (1995). In vitro and in vivo evaluation of mucoadhesive microspheres prepared for the gastrointestinal tract using polyglycerol esters for fatty acids and a poly(acrylic) derivative, *Pharm. Res.*, 12:397-405.
3. Akiyama, Y., Nagahara, N., Nara, E., Kitano, M., Susumu, I., Yamamoto, I., Azuma, J., Ogawa, Y. (1998). Evaluation of oral mucadhesive microspheres in man on the basis of the phatrmacokinetics of furosemide and riboflavin compounds with limited gastrointestinal absorption sites, *J. Pharm. Pharmacol.*, 50:159-166.
4. Albrecht, K, Zirm, EJ, Palmberger, TF, Schlocker, W, Bernkop-Schnürch, A. (2006). Preparation of thiomers microparticles and in vitro evaluation of parameters influencing their mucoadhesive properties, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 32:1149-1157.
5. Allen, A. (1978). The structure of gastrointestinal mucous glycoproteins and the viscosity and gel-forming properties of mucus, *British Medicinal Bulletin*, 34:28.
6. Allen, A., Pain, R.H., Robson, T. (1976). Model for the structure of the gastric mucus gel, *Nature*, 264:88.

7. Andrews, G.P., Laverty, T.P., Jones, D.S. (2009). Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 71:505-518.
8. Anlar, Ş., Çapan, Y., Hıncal, A. (1992). Bioadheziv Salım Sistemleri II. Mukus ile Polimer Arasındaki Biyoadheziv Kuvvetin Tayininde Kullanılan Deneysel Metodlar ve Biyoadheziv Dozaj Formları, *FABAD, Farm. Bil.Der.*, 17:277-297.
9. Argüeso, P., Gipson, I.K. (2001). Epithelial mucins on the ocular surface: structure, biosynthesis and function, *Exp. Eye Res.*, 281– 289.
10. Atyabi, F., Sharma, H.L., Mohammad, H.A.H., Fell, J.T. (1996). Controlled drug release from coated floating ion exchange resin beads, *J. Control. Release*, 42:25-28.
11. Atyabi, F., Sharma, H.L., Mohammad, H.A.H., Fell, J.T. (1996). In vivo evaluation of a novel gastric retentive formulation based on ion exchange resins, *J. Control. Release*, 42:105-113.
12. Babu, V.B.M., Khar, R.K. (1990). In vitro and in vivo studies of sustained-release floating dosage forms containing salbutamol sulfate, *Pharmazie*, 45:268-270.
13. Bardonnnet, P.L., Faivre, V. Pugh, W.J., Piffaretti, J.C., Falson, F. (2006). Gastroretentive dosage forms: Overview and special case of *Helicobacter pylori*, *J. Control. Release*, 111:1-18.
14. Bernkop-Schnürch, A. (2005). Thiomers: A new generation of mucoadhesive polymers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57:1569-1582

15. Bernkop-Schnürch, A. Gilge, B. (2000). Anionic mucoadhesive polymers as auxiliary agents for the peroral administration of (poly)peptide drugs: influence of the gastric fluid, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 26:107-113.
16. Bernkop-Schnürch, A., Brandt, U.M., Clausen, A.E. (1999). Synthesis and in vitro evaluation of chitosan-cysteine conjugates, *Sci. Pharm.*, 67:196-208.
17. Bernkop-Schnürch, A., Clausen, A.E., Hnatyszyn, M. (2001). Thiolated polymers: synthesis and in vitro evaluation of polymer–cysteamine conjugates, *Int. J. Pharm.*, 226:185– 194.
18. Bernkop-Schnürch, A., Egger, C., Elhassan, I.M., Krauland, A. (2003). Preparation and in vitro characterization of poly(acrylic acid)–cysteine microparticles, *J. Control. Release*, 93:29–38.
19. Bernkop-Schnürch, A., Gabor, F., Szostak, M.P., Lubitz, W. (1995). An adhesive drug delivery system based on K99-fimbriae, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 3:293–299.
20. Bernkop-Schnürch, A., Greimel, A. (2005). Thiomers, The next generation of mucoadhesive polymers, *Am. J. Drug Deliv.*, 3:141-154.
21. Bernkop-Schnürch, A., Guggi, D., Pinter, Y. (2004). Thiolated chitosans: development and in vivo evaluation of a mucoadhesive permeation enhancing oral drug delivery system. *J. Control. Rel.*, 94:177-186
22. Bernkop-Schnürch, A., Hopf, T.E. (2001). Synthesis and in vitro evaluation of chitosan-thioglycolic acid conjugates, *Sci. Pharm.*, 69:109-118.
23. Bernkop-Schnürch, A., Hornof, M., Zoidl, T. (2003). Thiolated polymers–thiomers: synthesis and in vitro evaluation of chitosan-2-iminothiolane conjugates, *Int. J. Pharm.*, 260:229–237.

24. Bernkop-Schnürch, A., Hornof, M.D., Kast, C.E., Langoth N. (2002). Thiolated polymers: Stability of thiol moieties under different storage conditions., *Sci. Pharm.*, 70:331-339.
25. Bernkop-Schnürch, A., Kast, C.E., Gugli D. (2003). Permeation enhancing polymers in oral delivery of hydrophilic macromolecules: thiomers/GSH systems, *J. Control. Release*, 93:95-103.
26. Bernkop-Schnürch, A., Kast, C.E., Richter, M.F. (2001). Improvement in the mucoadhesive properties of alginate by the covalent attachment of cysteine, *J. Control. Release*, 71:277-285.
27. Bernkop-Schnürch, A., König, V., Leitner, V., Krauland, A., Brodnyk, I. (2004). The preparation and characterisation of mucoadhesive thiolated poly(methacrylic acid)-starch compositions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57:219- 224.
28. Bernkop-Schnürch, A., Leitner, V., Moser, V. (2004). Synthesis and in vitro characterisation of a poly(acrylic acid)-homocysteine conjugate, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 30:1- 8.
29. Bernkop-Schnürch, A., Scholler, S., Biebel, R.G. (2000). Development of controlled drug release systems based on polymer-cysteine conjugates, *J. Control. Release*, 66:39- 48.
30. Bernkop-Schnürch, A., Schwarz, V., Steininger, S. (1999). Polymers with thiol groups: A new generation of mucoadhesive polymers?, *Pharm. Res.*, 16:876-881.
31. Bernkop-Schnürch, A., Steininger, S. (2000). Synthesis and characterisation of mucoadhesive thiolated polymers, *Int. J. Pharm.*, 194:239-247

32. Bernkop-Schnürch, A., Steininger, S. (2000). Synthesis and characterisation of mucoadhesive thiolated polymers, *Int. J. Pharm.*, 194:239–247.
33. Bernkop-Schnürch, A., Telsnig, J., Hornof, M. (2003). Development and in vitro evaluation of a mucoadhesive oral delivery system for antisense oligonucleotides, *Sci. Pharm.*, 71:165– 177.
34. Bernkop-Schnürch, A., Thaler, S.C. (2000). Polycarbophil-cysteine conjugates as platforms for oral peptide delivery systems, *J. Pharm. Sci.*, 89:901-909.
35. Bernkop-Schnürch, A., Weithaler, A., Albrecht, K., Greimel, A. (2006). Thiomers: Preparation and in vitro evaluation of a mucoadhesive nanoparticulate drug delivery system, *Int. J. Pharm.*, 317:76-81.
36. Bologna, W.J., Levine, H.L., Cartier, P., Ziegler, D. (1998). Extended release buccal bioadhesive tablets, WO00/10536.
37. Bruschi, M.L., Jones, D.S., Panzeri, H., Gremião, M.P.D., Freitas, O., Lara, E.H.G. (2007). Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: In vitro release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties, *J. Pharm. Sci.*, 96:2074-2089.
38. Caldwell L.J., Gardner C.R., Cargill R.C., Kans L. (1988). Drug delivery device which can be retained in the stomach for a controlled period of time, U.S. patent 4735804.
39. Chen J., Blevins W.E., Park, H., Park K. (2000). Gastric retention properties of superporous hydrogel composites, *J. Control. Release*, 64:39-51.
40. Chen, J., Park, K. (2000) Synthesis and characterization of superporous hydrogel composites, *J. Control. Release*, 65:73-82.

41. Chen, J., Park, K. (2000). Gastric retention properties of superporous hydrogel composites, *J. Control. Release*, 64:39-51.
42. Chen, J.L., Cry, G.N. (1970). Compositions producing adhesion through hydration in adhesive biological systems., Manly, R. S., (Edit.), Academic Press, New York, Bölüm 10.
43. Ching, H.S., Park, H., Kelly, P., Robinson, J.R. (1985). Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery II: Synthesis and evaluation of some swelling, water-insoluble bioadhesive polymers, *J. Pharm. Sci.*, 74:399-405.
44. Chitnis, V.S., Malshe, V.S., Lalla, J.K. (1991). Bioadhesive polymers synthesis, evaluation and application in controlled release tablets, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 17:879-892.
45. Chun, M.K., Sah, H., Choi, H.K. (2005). Preparation of mucoadhesive microspheres containing antimicrobial agents for eradication of *H. pylori*. *Int. J. Pharm.*, 297:172-179.
46. Clarke, G.M., Newton, J.M., Short, M.D. (1993). Gastrointestinal transit of pellets of different size and density, *Int. J. Pharm.*, 100:81-92.
47. Clarke, G.M., Newton, J.M., Short, M.D. (1995). Comparative gastrointestinal transit of pellet systems of varying density, *Int. J. Pharm.*, 114:1-11.
48. Clausen, A. E., Kast, C.E., Bernkop-Schnürch, A. (2002). The role of glutathione in the permeation enhancing effect of thiolated polymers, *Pharm. Res.*, 19:602-608.

49. Clausen, A.E., Bernkop-Schnürch, A. (2000). In vitro evaluation of the permeation-enhancing effect of thiolated polycarbophil, *J. Pharm. Sci.*, 89:1253-1261
50. Clausen, A.E., Bernkop-Schnürch, A. (2001). Development and in vitro evaluation of a peptide drug delivery system based on thiolated polycarbophil, *Pharm. Ind.*, 63:312-317.
51. Clausen, A.E., Bernkop-Schnürch, A. (2001). Thiolated carboxymethyl cellulose: in vitro evaluation of its permeation enhancing effect on peptide drugs, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 51: 25-32.
52. Collares-Buzato, C.B., Jepson, M.A., Simmons, N.L. (1998). Increased tyrosine phosphorylation causes redistribution of adherens junction and tight junction proteins and perturbs paracellular barrier function in MDCK epithelia, *Eur. J. Cell Biol.*, 76:85-92.
53. Colombo, P., Bettini, R., Santi, P., Peppas, N.A. (2000). Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance, *Pharm. Sci. Technol. Today*, 3, 198–204.
54. Coupe, A.J., Davis, S.S., Wilding, I.R. (1991). Variation in gastrointestinal transit of pharmaceutical dosage forms in healthy subjects, *Pharm. Res.*, 8:360-364.
55. Curatolo W. J., Lo J. (1988). Gastric retention drug system for controlled drug release, U.S. patent 5443843.
56. Çapan, Y. (2002). Mukozaya yapışan sistemler, Gürsoy, A. Z. (Edit.), *Kontrollü Salım Sistemleri*, İstanbul, Bölüm 9, 177-196.

57. Deshpande, A.A., Shah, N.H., Rhodes, C.T., Malick, W. (1997). Development of a novel controlled-release system for gastric retention, *Pharm. Res.*, 14:815-819.
58. Deutel, B., Greindl, M., Thaurer, M., Bernkop-Schnürch, A. (2008). Novel insulin thiomers nanoparticles: In vivo evaluation of an oral drug delivery system, *Biomacromolecules*, 9:278-285.
59. Devrim, B. Canefe, K. Midede kalış süresini uzatan ilaç şekilleri. (2006). *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 35:69-94
60. Duchêne, D., Ponchel, G. (1989). Bioadhesion a new pharmacotechnic for improving therapeutic efficiency, *STP Pharma Sciences*, 5:830.
61. Duchêne, D., Touchard, F., Peppas, N.A. (1988). Pharmaceutical and medical aspects of bioadhesive systems for drug administration, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 14:283-318.
62. Duman, S.S., Senel, S. (2004). Kitosan ve veteriner alandaki uygulamaları, *Veteriner Cerrahi Dergisi*, 10:62-72.
63. European Pharmacopoeia, Sixth Edition, Volume 2, Strasbourg, 2007.
64. Fujimori J., Machida Y., Nagai T. (1994). Preparation of a magnetically-responsive tablet and confirmation of its gastric residence in beagle dogs, *STP Pharma. Sc.i*, 4:425-430.
65. Fundueanu, G., Nastruzzi, C., Carpov, A., Desbrieres, J., Rinaudo, M. (1999). Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods, *Biomaterials*, 20:1427– 1435.
66. Grabovac, V., Guggi, D., Bernkop-Schnürch, A. (2005). Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57:1713– 1723

67. Greimel, A., Werle, M., Bernkop-Schnürch, A. (2007). Oral peptide delivery: in vitro evaluation of thiolated alginate/poly(acrylic acid) microparticles, *J. Pharm. Pharmacol.*, 59:1191-1198.
68. Gröning, R., Berntgen, M., Georgarakis, M. (1998). Acyclovir serum concentrations following peroral administration of magnetic depot tablets and the influence of extracorporal magnets to gastrointestinal transit, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 46:285-291.
69. Gröning, R., Cloer, C., Georgarakis, M., Müller, RS. (2007). Compressed collagen sponges as gastroretentive dosage forms: In vitro and in vivo studies, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 30:1–6.
70. Gu, J.M., Robinsonn, J.R., Leung, S. (1988). Binding of acrylic polymers to mucin/epithelial surfaces: Structure-property relationships. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 5: 21-67.
71. Guggi, D., Bernkop-Schnürch, A. (2005). Improved paracellular uptake by the combination of different types of permeation enhancers, *Int. J. Pharm.*, 288:141-150.
72. Guggi, D., Kast, C.E., Bernkop-Schnürch, A. (2003). In vivo evaluation of an oral salmon calcitonin –delivery system based on a thiolated chitosan carrier matrix, *Pharm. Res.*, 20:1989-1994.
73. Guggi, D., Krauland, A.H., Bernkop-Schnürch, A. (2003). Systemic peptide delivery via the stomach: in vivo evaluation of an oral dosage form for salmon calcitonin, *J. Control. Rel.*, 92:125-135.
74. Guggi, D., Langoth, N., Hoffer, M.H., Wirth, M., Bernkop-Schnürch, A. (2004). Comparative evaluation of cytotoxicity of a glucosamine-TBA conjugate and a chitosan-TBA conjugate, *Int. J. Pharm.*, 278:353-360.

75. Guggi, D., Marschütz, M.K., Bernkop-Schnürch, A. (2004). Matrix tablets based on thiolated poly(acrylic acid): pH-dependent variation in disintegration and mucoadhesion, *Int. J. Pharm.*, 274:97–105.
76. Gurny, R., Meyer, J. M., Peppas, N. A. (1984). Bioadhesive intraoral release systems: design, testing and analysis, *Biomaterials*, 5:336-340.
77. Gutierrez-Rocca, J., Omidian, H., Shah, K. (2003). Progresses in gastroretentive drug delivery systems, *Business Briefing: PharmaTech*, 152-156.
78. Gürsoy, A., Pişkin, E., Dortunç, B., Peppas, N. A. (1989). Kontrollü İlaç Serbestleştirilen Sistemler, *Marmara Üniversitesi Yayınları*, 214-223.
79. Hamdani, J., Möes, A.J., Amighi, K. (2006). In vitro and in vivo evaluation of floating riboflavin pellets developed using the melt pelletization process, *Int. J., Pharm.*, 323:86-92.
80. Harrigan, R.M. (1977). Drug delivery device for preventing contact of undissolved drug with the stomach lining. US Patent 4055178.
81. Hoffman, A., Stepensky, D., Lavy, E., Eyal, S., Klausner, E., Friedman, M. (2004). Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of gastroretentive dosage forms, *Int. J. Pharm.*, 277:141-153.
82. Hornof, M.D., Kast, C.E., and Bernkop-Schnürch, A. (2003). In vitro evaluation of the viscoelastic properties of chitosan-thioglycolic acid conjugates., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 55:185-190.
83. Hornof, M.D., Weyenberg, W., Ludwig, A., Bernkop-Schnürch, A. (2003). A mucoadhesive ocular insert: Development and in vivo evaluation in humans, *J. Control. Rel.*, 89:419-428.

84. Hoyer H, Schlocker W, Krum K, Bernkop-Schnürch A. (2008). Preparation and evaluation of microparticles from thiolated polymers via air jet milling. *Eur J Pharm Biopharm*, 69:476-485.
85. Hutton, D.A., Pearson, J.P., Allen, A. (1990). Mucolysis of the colonic mucus barrier by faecal proteinases: inhibition by interacting polyacrylate, *Clin. Sci.*, 78:265-271.
86. Iannuccelli, V., Coppi, G., Bernabei, M.T., Cameroni, R. (1998). Air compartment multi-unit system for prolonged gastric residence. Part I. Formulation study, *Int. J. Pharm.*, 174:47-54.
87. Iannuccelli, V., Coppi, G., Sansone, R., Ferolla, G. (1998). Air compartment multi-unit system for prolonged gastric residence. Part II. In vivo evaluation, *Int. J. Pharm.*, 174:55-62.
88. Ichikawa, M., Watanabe, S., Miyake, Y. (1991). A new multiple-unit oral floating dosage system. I: Preparation and in vitro evaluation of floating and sustained-release characteristics, *J. Pharm. Sci.*, 80:1062-1066.
89. Imam, M.E., Bernkop-Schnürch, A. (2005). Controlled drug delivery systems based on thiolated chitosan microspheres, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 31:557-565.
90. Ingani, H.M., Timmermans, J., Moes, A.J. (1987). Conception and in vivo investigation of oral sustained release floating dosage forms with enhanced gastrointestinal tract, *Int. J. Pharm.*, 35:157-164.
91. Inouye, K., Machida, Y., Sannan, T., Nagai, T. (1989). Buoyant sustained release granules based on chitosan, *Drug Design and Delivery*, 4:55-67.

92. Ito, R., Machida, Y., Sannan, T., Nagai, T. (1990). Magnetic granules: a novel system for specific drug delivery to esophageal mucosa in oral administration, *Int. J. Pharm.*, 61:109-117
93. Jackson, S.J., Bush, D., Washington, N., Perkins, A.C. (2000). Effect of resin surface charge on gastric mucoadhesion and residence of cholestyramine, *Int. J. Pharm.*, 205:173-181.
94. Jayanthi, G., Jayaswal, S.B., Srivastava, A.K. (1995). Formulation and evaluation of terfenadine microballoons for oral controlled release, *Pharmazie*, 50:769-770.
95. Jimenez-Castellanos, M.R., Zia, H., Rhodes, C.T. (1993). Mucoadhesive drug delivery systems, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 19:143-194.
96. Jones, D.S., Bruschi, M.L., Freitas, O., Gremião, M.P.D., Lara, E.H.G., Andrews, G.P. (2009). Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity, *Int. J. Pharm.*, 372:49–58.
97. Jones, D.S., Woolfson, A.D., Brown, A.F., Coulter, W.A., McClelland, C., Irwin, C.R. (2000). Design, characterization and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease, *J. Control. Release*, 67:357–368.
98. Junginger, H.E. (1990). Bioadhesive polymer systems for peptide drug delivery, *Acta Pharmaceutica Technologica*, 36:110.
99. Jusko, W.J., Levy, G. (1967). Absorption, metabolism, and excretion of riboflavin-5' phosphate in man, *J. Pharm. Sci.*, 56:58-62.

100. Kaelbe, D.H., Moacanin, J. (1977). A surface energy analysis of bioadhesion, *Polymer*, 18:479.
101. Kafedjiiski, K., Krauland, A.H., Hoffer, M.H., Bernkop-Schnürch, A. (2005). Synthesis and in vitro evaluation of a novel thiolated chitosan, *Biomaterials*, 26:819-826.
102. Kagan, L., Lapidot, N., Afargan, M., Kirmayer, D., Moor, E., Mardor, Y., Friedman, M., Hoffman, A. (2006). Gastroretentive accordion pill: Enhancement of riboflavin bioavailability in humans, *J. Control. Release*, 113:208–215.
103. Kamer, H. W. (1983). Adhesion Between Polymers, *Acta Polymerica*, 34:112-118.
104. Kast CE, Guggi D, Langoth N, Bernkop-Schnürch A. (2003). Development and *in vivo* evaluation of an oral delivery system for low molecular weight heparin based on thiolated polycarbophil, *Pharm. Res.*, 20, 931-936.
105. Kast, C. E., Valenta, C., Leopold, M., Bernkop-Schnürch, A. (2002). Design and in vitro evaluation of a novel bioadhesive vaginal drug delivery system for clotrimazole, *J. Control. Rel.*, 81:347-354.
106. Kast, C.E., Bernkop-Schnürch, A. (2001). Thiolated polymers–thiomers: development and in vitro evaluation of chitosan–thioglycolic acid conjugates, *Biomaterials*, 22:2345– 2352.
107. Kawashima, Y., Niwa, T., Takeuchi, H., Hino, T., Itoh, Y. (1991). Preparation of multiple unit hollow microspheres with acrylic resin containing tranilast and their drug release characteristics (in vitro) and floating behavior (in vivo), *J. Control. Release*, 16:279-290.

108. Kawashima, Y., Niwa, T., Takeuchi, H., Hino, T., Itoh, Y. (1992). Hollow microspheres for use as a floating controlled drug delivery system in the stomach, *J. Pharm. Sci.*, 81:135-140.
109. Kedzierewicz, F., Thouvenot, P., Lemut, J., Etienne, A., Hoffman, M., Maincent, P. (1999). Evaluation of peroral silicone dosage forms in humans by gamma-scintigraphy, *J. Control. Release*, 58:195-205.
110. Kelleway, I.W. (1989). In vitro test methods for the measurement of mucoadhesion, *International Association for Pharmaceutical Technology (APV)*, Course No. 470.
111. Khattar, D., Ahuja, A., Khar, R. K. (1990). Hydrodynamically balanced systems as sustained release dosage forms for propranolol hydrochloride, *Pharmazie*, 45:356-358.
112. Klausner E.A., Lavy E., Stepensky D., Friedman M., Hoffman A. (2002). Novel gastroretentive dosage forms: evaluation of gastroretentivity and its effect on riboflavin absorption in dogs, *Pharm. Res.*, 19:1516-1523.
113. Klausner, E. A., Eyal, S., Lavy, E., Friedman, M., Hoffman, A. (2003). Novel levodopa gastroretentive dosage form: in-vivo evaluation in dogs, *J. Control. Release*, 88:117-126.
114. Klausner, E. A., Lavy, E., Barta, M., Cserepes, E., Friedman, M., Hoffman, A. (2003). Novel gastroretentive dosage forms: Evaluation of gastroretentivity and its effect on levodopa absorption in humans, *Pharm. Res.*, 20:1466-1473.
115. Ko, J.A., Park, H.J., Park, Y.S., Hwang, S.J., Park, J.B. (2003). Chitosan microparticle preparation for controlled drug release by response surface methodology, *J. Microencapsul.*, 20:791– 797.

116. Krauland, A., Bernkop-Schnürch, A. (2004). Thiomers: development and in vitro evaluation of an oral microparticulate peptide delivery system, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 57:181–187.
117. Krauland, A., Leitner, V. M., Bernkop-Schnürch, A. (2003). Improvement in the in situ gelling properties of deacetylated gellan gum by the immobilization of thiol groups, *J. Pharm. Sci.*, 92:1234-1241.
118. Krauland, A.H., Guggi, D., Bernkop-Schnürch, A. (2006). Thiolated chitosan microparticles: A vehicle for nasal peptide drug delivery, *Int. J. Pharm.*, 307:270-277.
119. Kremer, M.J., Senel, S., Kas, S.H., Wertz, P.W., Hincal, A.A., Squier, C.A. (1999). Oral mucosal drug delivery: chitosan as vehicle and permeabilizer, *J. Dent. Res.*, 77: 718.
120. Krögel, I., Bodmeier, R. (1999). Development of a multifunctional matrix drug delivery system surrounded by an impermeable cylinder, *J. Control. Release*, 61:43-50.
121. Langoth, N., Bernkop-Schnürch, A., Kurka, P. (2005). In vitro evaluation of various buccal permeation enhancing systems for PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide), *Pharm. Res.*, 22:2045-2050.
122. Langoth, N., Guggi, D., Bernkop-Schnürch, A. Investigation on the cytotoxicity of (thiolated) polyacrylates, *Toxicol. In Vitro*, in press.
123. Langoth, N., Kalbe, J., Bernkop-Schnürch, A. (2003). Development of buccal drug delivery systems based on a thiolated polymer, *Int. J. Pharm.*, 252:141-148.
124. Lee, P.I., Peppas, N.A. (1987). Prediction of polymer dissolution in swellable controlled-release systems. *J. Control. Release*, 6:207–15.

125. Leitner, V. M., Guggi, D., Krauland, A., Bernkop-Schnürch, A. (2004). Nasal delivery of human growth hormone: In vitro and in vivo evaluation of a thiomers/glutathione microparticulate delivery system, *J. Control. Release*, 100:87-94.
126. Leitner, V. M., Marschütz, M., Bernkop-Schnürch, A. (2003). Mucoadhesive and cohesive properties of poly(acrylic acid)-cysteine conjugates with regard to their molecular mass. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 18:89-96.
127. Leitner, V.M., Guggi, D., Bernkop-Schnürch, A. (2004). Thiomers in Noninvasive polypeptide delivery: In vitro and in vivo characterization of a polycarbophil-cysteine/glutathione gel formulation for human growth hormone, *J. Pharm. Sci.*, 93:1682-1691.
128. Leitner, V.M., Walker, G.F., Bernkop-Schnürch, A. (2003). Thiolated polymers: evidence for the formation of disulphide bonds with mucus glycoproteins, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 56:207– 214.
129. Li, S., Lin, S., Daggy, B.P., Mirchandani, H.L., Chien, Y.W. (2003). Effect of HPMC and Carbopol on the release and floating properties of gastric floating drug delivery system using factorial design, *Int. J. Pharm.*, 253:13-22.
130. Loretz, B., Bernkop-Schnürch, A (2006). In vitro evaluation of chitosan-EDTA conjugate polyplexes as a nanoparticulate gene delivery system, *The AAPS Journal*, 8:756-764.
131. Luciano, L., Reale, E. (1992). The "limiting ridge" of the rat stomach., *Arch. Histol. Cytol.*, 55:131-138

132. Luessen, H.L., de Leeuw, B.J., Perand, D. (1996). Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery, I. Influence of mucoadhesive excipients on the proteolytic activity of intestinal enzymes, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 4:117-128.
133. Maculotti, K., Gente, I., Perugini, P., Imam, M., Bernkop-Schnürch, A., Pavanetto, F. (2005). Preparation and in vitro evaluation of thiolated chitosan microparticles, *J. Microencapsulation*, 22:459-470.
134. Mamajek, R.C., Moyer, E.S. (1980). Drug-dispensing device and method. U.S. patent 4207890.
135. Marschütz, M. K., Bernkop-Schnürch, A. (2002). Thiolated polymers: self-crosslinking properties of thiolated 450 kDa poly(acrylic acid) and their influence on mucoadhesion, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 15:387–394.
136. Marschütz, M.K., Zauner, W., Mattner, F., Otava, A., Buschle M., Bernkop-Schnürch, A. (2002). Improvement of the enzymatic stability of a cytotoxic T-lymphocyte-epitope model peptide for its oral administration, *Peptides*, 23:1727–1733.
137. Marvola, M., Vahervuo, K., Sothmann, A., Martilla, E., Rajaniemi, M. (1982). Development of a method for study of the tendency of drug products to adhere to the esophagus, *J. Pharm. Sci.*, 71:975-977.
138. Matharu, R.S., Sanghavi, N.M. (1992). Novel drug delivery system for captopril, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 18:1567-1574.
139. Menteş, N. K. (1982). Klinik Gastroenteroloji, Cilt 1, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Basımevi, 4. Baskı, İzmir, 51-.89.
140. Mikos, A.G., Peppas, N.A. (1990). Bioadhesive analysis of controlled-release systems. IV. An experimental method for testing the adhesion of microparticles with mucus, *J. Control. Release*, 12:31-37.

141. Miyazaki, S., Yamaguchi, H., Yokouchi, C., Takada, M., Hou, W.-M. (1988). Sustained-release and intragastric-floating granules of indomethacin using chitosan in rabbits, *Chem. Pharm. Bul.*, 36:4033-4038.
142. Miyazaki, Y., Ogihara, K., Yakou, S., Nagai, T., Takayama, K. (2003). In vitro and in vivo evaluation of mucoadhesive microspheres consisting of dextran derivatives and cellulose acetate butyrate, *Int. J. Pharm.*, 258:21-29.
143. Mohanraj, V.J., Chen, Y. (2006). Nanoparticles – A review. *Trop. J. Pharm. Res.*, 5:561:573.
144. Naisbett, B., Woodley, J. (1994). The potential use of tomato lectin for oral drug delivery. Lectin binding to rat small intestine in vitro, *Int. J. Pharm.* 107:223– 230.
145. Neves, J., Amaral, M.H., Bahia, M.F. (2008). Performance of an in vitro mucoadhesion testing method for vaginal semisolid: Influence of different testing conditions and instrumental parameters, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 69:622-632.
146. Nur, A.O., Zhang, J.S. (2000). Captopril floating and/or bioadhesive tablets: design and release kinetics, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 26: 965-969.
147. Oth, M., Franz, M., Timmermans, J., Moes, A.J. (1992). The bilayer floating capsule: a stomach-directed drug delivery system for misoprostol, *Pharm. Res.* 9:298-302.
148. Özdemir, N., Ordu, Ş., Özkan, Y. (2000). Studies of floating dosage forms of furosemide: in vitro and in vivo evaluations of bilayer tablet formulations, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 26:857-866.

149. Park, H., Robinson, J. R. (1985). Physico-chemical properties of water insoluble polymers important to mucin/epithelial adhesion, *J. Control. Release*, 2:47-57.
150. Peppas, N. A. (1991). The kinetics of adhesive bond development between polymers and mucus, *Proceedings of International Symposium of Controlled Release and Bioactive Materials*, 18:71.
151. Peppas, N. A., Mikos, A. G. (1989). Experimental methods for determination of bioadhesive bond strength of polymers with mucus, *STP Pharm. Sci.*, 5:187-191.
152. Peppas, N.A. (1989). Kinetics of mucus-polymer interactions. *International Association for Pharmaceutical Technology (APV)*, Course No. 470.
153. Ponchel, G., Touchard, F., Duchêne, D., Peppas, N. A. (1987). Bioadhesive analysis of controlled-release systems; Fracture and interpenetration analysis in poly(acrylic acid)-containing systems, *J. Control. Release*, 5:129-141.
154. Reinhart, C.T., Peppas, N.A. (1984). Solute diffusion in swollen membranes. II. Influence of crosslinking on diffusion properties, *Journal of Membrane Sciences*, 18:227.
155. Rinaudo M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.*, 31: 603–632.
156. Roldo, M., Hornof, M., Caliceti, P., Bernkop-Schnürch A. (2004). Mucoadhesive thiolated chitosans as platforms for oral controlled drug delivery: synthesis and in vivo evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 57:115-121.

157. Roth, H.J., Eger, K., Troschütz, R. (Eds.) (1990). Pharmazeutische Chemie II: Arzneistoffanalyse, 3rd Ed., Thieme Verlag Stuttgart, Germany, pp. 188–192.
158. Sahlin, J.J., Peppas, N.A. (1997). Enhanced hydrogel adhesion by polymer interdiffusion: use of linear poly(ethylene glycol) as an adhesion promoter, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 8:421–436.
159. Schlocker W, Gschließer S, Bernkop-Schnürch A. (2006). Evaluation of the potential of air jet milling of solid protein-poly(acrylate) complexes for microparticle preparation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 62, 260-266.
160. Schmittz, T., Bravo-Osuna, I., Vauthier, C., Ponchel, G., Loretz, B., Bernkop-Schnürch, A. (2007). Development and in vitro evaluation of a thiomers-based nanoparticulate gene delivery system, *Biomaterials*, 28:524-531.
161. Schmitz, T., Leitner, V., Bernkop-Schnürch, A., (2005). Oral heparin delivery: Design and in vivo evaluation of a stomach-targeted mucoadhesive delivery system, *J. Pharm. Sci.*, 94:966-973.
162. Sen, H., Dennis, A. B., Timmins, P., Browning, I. (1988). In-vitro investigation of potential mucoadhesive materials dispersed in a mineral oil/polyethylene gel carrier, *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 15:370-371.
163. Senel, S., Hincal, A. (2001). Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations, *J. Control. Release*, 72:133–144.
164. Sheth, P.R., Tossounian, J. (1984). The hydrodynamically balanced system (HBSTM): a novel drug delivery system for oral use, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 10:313-339.

165. Singh, B.N., Kim, K.H. (2000). Floating drug delivery systems: an approach to oral controlled drug delivery via gastric retention, *J. Control. Release*, 63:235-259
166. Smart, J.D. Kellaway, I.W. Worthington, H.E.C. (1984). An in-vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery, *J. Pharm. Pharmacol.*, 36:295– 299.
167. Sonobe T., Watanabe S., Katsuma M., Takamatsu N., Konno Y., Takag, H. (1991). Gastric retention device, Eur. Patent 0415671.
168. Stato, Y., Kawashima, Y., Takeuchi, H., Yamamoto, H. (2003). In vivo evaluation of riboflavin-containing microballoons for floating controlled drug delivery system in healthy human volunteers, *J. Control. Release*, 93:39-47.
169. Stato, Y., Kawashima, Y., Takeuchi, H., Yamamoto, H. (2004). In vitro and in vivo evaluation of riboflavin-containing microballoons for a floating controlled drug delivery system in healthy humans, *Int. J. Pharm.*, 275:97-107.
170. Stops, F., Fell, J.T., Collett, J.H., Martini, L.G. (2008). Floating dosage forms to prolong gastro-retention—The characterisation of calcium alginate beads, *Int. J. Pharm.*, 350:301-311.
171. Streubel, A., Siepmann, J., Bodmeier R. (2001). Floating microparticles based on polymer-coated foam powder, *Proceedings of Int. Symp. Control. Release Bioactive Materials*, 28:6058.
172. Swarbrick, J. (2007). Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Nanoparticles, Third Edition, Informa Healthcare Inc., USA, Volume 4, pp.2384-2397.
173. Thairs, S., Ruck, S., Jackson, S.J., Steele, R.J.C., Feely, L.C., Washington, C., Washington, N. (1998). Effect of dose size, food and surface coating on

- the gastric residence and distribution of an ion exchange resin, *Int. J. Pharm.*, 176:47-53.
174. The United States Pharmacopeia, The National Formulary, USP XXX, NF XV, Convention Inc., Rockville, 2007.
 175. Umamaheshwari, R.B., Jain, S., Jain, N.K. (2003). A new approach in gastroretentive drug delivery system using cholestyramine, *Drug Deliv.*, 10:151-160.
 176. Üstünes, L. (2010). Rx-Media Pharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı, İzmir.
 177. Valenta, C., Kast, E.C., Harich, I., Bernkop-Schnürch, A. (2001). Development and in vitro evaluation of a mucoadhesive vaginal delivery system for progesterone, *J. Control. Rel.*, 77:323-332.
 178. Valenta, C., Marschütz, M.K., Egyed, C. (2001). Evaluation of the inhibitory effect of thiolated poly(acrylates) on vaginal membrane bound aminopeptidase N, *J. Pharm. Pharmacol.*, 54:603-610.
 179. Validation of analytical procedures, (1996). Proceedings of International Conference on Harmonisation (ICH), Commission of the European Communities.
 180. Voyutskii, S.S. (1981). The healing process at polymer-polymer interfaces, *J. Chem. Phys.*, 75:5194.
 181. Yang, L., Eshranghi, J., Fassihi, R. (1999). A new intragastric delivery system for the treatment of *Helicobacter pylori* associated gastric ulcer: in vitro evaluation, *J. Control.Release*, 57:215-222.

ETİK KURUL KARARI



EGE ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU

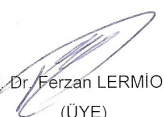
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

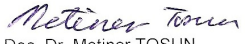
Toplantı No: 2007/11
Başvuru No: 2007/1
Karar No : 2007/11-1

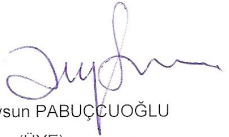
Kurulumuza yaptığınız başvurunuzdan, tarafınızdan yürütülen "Gastrik Mukoadezif Formülasyonların Hazırlanması ve İn-Vitro İn-Vivo Olarak Değerlendirilmesi" başlıklı araştırmanız Kurulumuz tarafından değerlendirilmiştir.

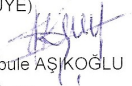
Değerlendirme sonucunda, midede kalış süresinin uzatılması amacıyla etkin maddenin, farklı biyoadezif polimerler kullanılarak, mikropartiküler sistemler ve tablet tipi kontrollü ilaç taşıyan formülasyonların hazırlanacağı, bunların etkinliklerinin ex vivo ve in vivo şartlarda değerlendirileceği bu çalışmada, Deney hayvanı olarak Sıçan (Rat) kullanma isteğinizin Etik Kurulumuz açısından bir sakıncası bulunmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.


Prof. Dr. Aslı ÖZER
(BAŞKAN)


Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU
(ÜYE)


Doç. Dr. Metiner TOSUN
(ÜYE)


Prof. Dr. Aysun PABUÇCUOĞLU
(ÜYE)


Doç. Dr. Makbule AŞIKOĞLU
(ÜYE)

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 35100 Bornova / İZMİR
Telefon: 0 232 388 22 41 Faks: 0 232 388 52 58

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Doğum yeri ve tarihi: İzmir, 20.04.1979

Medeni durumu: Evli, 1 çocuk annesi

İş adresi: Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
35100, Bornova, İzmir
Tel: 232 - 388 4000 / 3985

e-posta: zeynep.ay@ege.edu.tr

Yabancı dil: İngilizce

Eğitim durumu

İlkokul: Müdafaa-i Hukuk İlköğretim Okulu, İzmir

Ortaokul-Lise: Karşıyaka Anadolu Lisesi, İzmir

Lisans: Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (1998-2002)

Yüksek lisans: Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı (2004)

Yüksek lisans tezi: Çeşitli Polimerler Kullanılarak Kolona İlaç Taşıyan Sistemler

Üzerinde Çalışmalar

Çalıştığı yerler:

Kasım 2005- Bugüne dek: Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik
Teknoloji Anabilim Dalı

TEZ ÇALIŞMASINDAN HAZIRLANAN MAKALELER

Journal of Drug Targeting, 2010; 18(5): 362–372

informa
healthcare

RESEARCH ARTICLE

Gastroretentive particles formulated with thiomers: development and *in vitro* evaluation

Zeynep Ay Senyigit¹, Anja Vetter², Tamer Guneri¹, and Andreas Bernkop-Schnürch²

¹Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Ege University, Bornova, Izmir, Turkey, and

²Department of Pharmaceutical Technology, Institute of Pharmacy, University of Innsbruck, Innsbruck, Austria

Abstract

The objective of this study is to develop and evaluate gastroretentive particulate delivery systems using Riboflavin-5'-monophosphate sodium salt dihydrate (RF5'PNa) as model drug. Poly(acrylic acid)-cysteine and chitosan-4-thiobutylamide were evaluated and compared as anionic and cationic polymers for gastroretentive particles.

Permeation studies were performed with freshly excised stomach mucosa from rats. Polymers and combination with glutathione were evaluated for permeation enhancing properties. Furthermore, particles were prepared by air jet milling and characterized.

Permeation studies showed that the apparent permeability coefficients for RF5'PNa with thiomers and glutathione are 1.511-fold and 2.354-fold higher than control, respectively. It can be seen from the results glutathione in combination with thiomers has a significant influence for increasing permeation. Poly(acrylic acid)-cysteine and chitosan-4-thiobutylamide particles demonstrated a mean diameter of 336.5 ± 16.5 and 396.3 ± 17.0 nm and zeta potential of -19.98 ± 1.015 and 27.15 ± 0.500 mV, respectively. The drug loading of Poly(acrylic acid) particles was significantly higher than chitosan particles. The release rate of RF5'PNa from the thiolated particles was slower compared with unmodified particles. Moreover, thiolated particles showed higher mucoadhesive properties compared to unmodified particles.

Overall, thiolated particles of both anionic and cationic polymers had improved mucoadhesive and controlled release properties. Therefore, they could be promising for gastroretentive delivery systems.

Keywords: Thiomers; permeation; particulate delivery systems; gastroretentive drug delivery systems; riboflavin

Introduction

The GI-tract is still the most important route for the delivery of drugs to the systemic circulation. It is known that oral availability of certain drugs can be limited by the residence time of the dose in the upper GI tract. If such drugs reach lower regions before they are completely released, drug absorption is reduced. Gastroretentive drug delivery systems can be developed to achieve a more complete and longer lasting absorption for such drugs.

Several approaches have been tried to provide gastric retentivity including mucoadhesion to gastric mucosa, buoyancy over gastric content, high-density units, coadministration with pharmacological agents that

slow gastric motility and expansion to large dimension following oral administration (Moës, 1993; Deshpande et al., 1996).

Among the methods proposed, mucoadhesive drug carriers are promising to prolong the residence time in the GI tract because they can adhere to the mucus surface resulting in an effective localized drug concentration. They were also reported to improve the absorption and systemic bioavailability of the drugs that were normally poorly absorbed (Harris et al., 1990; Chun, Sah, & Choi, 2005).

To improve the residence time on mucosal membranes and especially provide mucoadhesion in the GI tract, more effective mucoadhesive delivery systems

Address for Correspondence: Zeynep Ay Senyigit, Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Ege University, Bornova, 35100, Izmir, Turkey. E-mail: zeynep.ay@ege.edu.tr

(Received 28 June 2009; revised 10 October 2009; accepted 11 November 2009)

ISSN 1061-186X print/ISSN 1029-2330 online © 2010 Informa UK Ltd
DOI: 10.3109/10611860903403370

<http://www.informahc.com/dri>
RIGHTS LINK
Copyright Clearance Center

RESEARCH ARTICLE

A comprehensive in vitro and in vivo evaluation of thiolated matrix tablets as a gastroretentive delivery system

Zeynep Ay Semyigit¹, Anja Vetter², Tamer Guner¹, and Andreas Bernkop-Schnürch²

¹Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Ege University, Bornova, 35100, Izmir, Turkey, and

²Department of Pharmaceutical Technology, Institute of Pharmacy, University of Innsbruck, A-6020, Innsbruck, Austria

Abstract

The aim of this study was to investigate the potential of thiolated matrix tablets for gastroretentive delivery systems. Poly(acrylic acid)-cysteine (PAA-Cys) and chitosan-4-thiobutylamidine (chitosan-TBA) were evaluated as anionic and cationic thiolated polymers and riboflavin was used as a model drug. Tablets were prepared by direct compression and each formulation was characterized in terms of disintegration, swelling, mucoadhesion, and drug release properties. Thereafter, the gastric residence times of tablets were determined with in vivo study in rats. The resulting PAA-Cys and chitosan-TBA conjugates displayed 172.80 ± 30.33 and 371.11 ± 72.74 μmol free thiol groups, respectively. Disintegration studies demonstrated the stability of thiolated tablets up to 24 h, whereas tablets prepared with unmodified PAA and chitosan disintegrated within a time period of 1 h. Mucoadhesion studies showed that mucoadhesion work of PAA-Cys and chitosan-TBA tablets were 1.341- and 2.139-times higher than unmodified ones. The mucoadhesion times of PAA, PAA-Cys, chitosan, and chitosan-TBA tablets were 1.5 ± 0.5 , 21 ± 1 , 1 ± 0.5 , 17 ± 1 h, respectively. These results confirm the theory that thiol groups react with mucin glycoproteins and form covalent bonds to the mucus layer. Release studies indicated that a controlled release was provided with thiolated tablets up to 24 h. These promising in vitro results of thiolated tablets were proved with in vivo studies. The thiolated tablets showed a gastroretention time up to 6 h, whereas unmodified tablets completely disintegrated within 1 h in rat stomach. Consequently, the study suggests that thiolated matrix tablets might be promising formulations for gastroretentive delivery systems.

Keywords: Gastroretentive drug delivery systems, mucoadhesion, PAA-Cys, chitosan-TBA, riboflavin

Introduction

Prolonged residence time of a delivery system on the gastric mucosa leads to an extended period of absorption and consequently to an improved bioavailability and a greater therapeutic benefit of the drug substance. For instance, drugs that are absorbed in the proximal part of the gastrointestinal tract and drugs that are less soluble or degraded in the alkaline pH may benefit from prolonged gastric retention. In addition, local and sustained drug delivery to the stomach may offer numerous advantages including improved bioavailability and therapeutic efficacy. Thus, dose reduction may become feasible (Talukder & Fassiht, 2004).

Various strategies have been pursued to develop efficient formulations for gastroretentive drug delivery such

as floating, swelling, and high/low density systems, and promising results were obtained (Bardonnnet et al., 2006). Unfortunately, up-to-date gastric mucoadhesive systems have not reached their full potential despite a few notable exceptions. Until now, first generation mucoadhesive polymers (i.e. polyacrylic acid, sodium carboxymethyl-cellulose, polycarbophil, chitosan) were utilized for such systems, but their success was limited due to insufficient adhesion to the GI tract. Therefore, second-generation mucoadhesive polymers, called thiomers, are now receiving increased attention for developing novel approaches. Thiomers mimic the natural mechanism of secreted mucus glycoproteins which are covalently anchored in the mucus layer by disulfide bonds (Bernkop-Schnürch et al., 1999; Leitner et al., 2003b). This leads to increased

Address for Correspondence: Zeynep Ay Semyigit, Ege University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, 35100, Bornova, Izmir, Turkey. Tel: +90 232 3884000/1368. Fax: +90 232 3885258. Email: zeynep.ay@ege.edu.tr

(Received 13 October 2010; revised 11 February 2011; accepted 08 March 2011)

TEZ ÇALIŞMASINDAN SUNULAN POSTER BİLDİRİLERİ

Senyigit Z., Vetter A., Güneri T., Bernkop-Schnürch A., In Vitro Evaluation of Thiolated Matrix Tablets for Stomach Targeted Drug Delivery Systems, 2nd PharmSciFair, Premier European Platform for Advancing Pharmaceutical Sciences, June 8-12, 2009, Nice, France.

Ay Senyigit Z., Vetter A., Güneri T., Bernkop-Schnürch A., Development of stomach targeted particles formulated with chitosan-TBA, 36th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, July, 18-22, 2009, Bella Center, Copenhag, Denmark.

Zeynep Ay Senyigit, Anja Vetter, Tamer Guneri, Andreas Bernkop-Schnürch, Comparison of different in vitro and in vivo methods for evaluating the mucoadhesion of Poly(acrylic acid)-Cysteine tablets to stomach, 37th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society (CRS-2010), July 10-14, 2010 Portland, Oregon, U.S.A.

Zeynep Ay Senyigit, Anja Vetter, Tamer Guneri, Andreas Bernkop-Schnürch, In Vitro Evaluation of Thiolated Chitosan-TBA Matrix Tablets as Gastroretentive Drug Delivery System, FIP Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC) 2010, 14-18 November 2010, New Orleans, Louisiana, USA.