



**DİYABET TEDAVİSİNDE ORAL YOLLA KULLANILMAK ÜZERE
ENTERİK KAPLI İNSÜLİN YÜKLÜ KİTOSAN-SÜLFOBUTİL ETER- β -
SİKLODEKSTRİN NANOPARTİKÜLLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Tuğçe TURAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Tuğçe TURAN

27/01/2023

DİYABET TEDAVİSİNDE ORAL YOLLA KULLANILMAK ÜZERE ENTERİK
KAPLI İNSÜLİN YÜKLÜ KİTOSAN-SÜLFOBUTİL ETER- β -SİKLODEKSTRİN
NANOPARTİKÜLLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR
(Yüksek Lisans Tezi)

Tuğçe TURAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ocak 2023

ÖZET

Diabetes Mellitus, yüksek kan glukoz seviyeleri ile karakterize kronik, metabolik bir hastalıktır. Tedavide insülin subkütan enjeksiyon ile uygulanmaktadır. Tekrarlı ve yaşam boyu enjeksiyon gereksinimi, enjeksiyon yerinde ağrı, enfeksiyon riski, lipodistrofi gibi dezavantajları hasta uyuncunun düşük olmasına yol açmaktadır. İnsülinin subkütan yola alternatif olarak, uygulaması kolay ve hasta uyuncunun yüksek olduğu oral yol ile vücuda verilmesi yoğun olarak araştırılan bir konudur. Oral insülin, pankreas tarafından salgılanan endojen insülinin fizyolojisini taklit eder. Peptit/proteinlerin oral yoldan verilmesi, peptit ve proteinlerin zayıf fiziksel ve kimyasal stabiliteyi yüzünden yetersiz terapötik etkinlik ile sonuçlandığından oldukça zordur. Çalışmamızda insülinin, kitosan (CS) nanopartiküllerine yüklenmesi ve enterik kaplama yapılarak oral yoldan verilebilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda CS ile sodyum tripolifosfat (TPP) veya sülfobutil-eter- β -siklodekstrin (SBE- β -SD) kullanılarak iyonik jelyasyon yöntemi ile insülin yüklü kitosan nanopartikülleri (CS:TPP, CS:SBE- β -SD) hazırlanmış ardından nanopartiküllerin Kollicoat® MAE 100 P ile kaplanmasıyla enterik kaplı nanopartiküller (K-CS:TPP, K-CS:SBE- β -SD) elde edilmiştir. Nanopartiküller hazırlanırken kitosan pH'sının 3, CS:TPP oranının 2:1, CS:SBE- β -SD oranının 1:1 ve CS: Kollicoat® MAE 100 P oranının 1:3 olmasına karar verilmiştir. Optimum CS:TPP, CS:SBE- β -SD K-CS:TPP ve K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin partikül büyüklükleri sırasıyla 289,17 $\pm$ 34,64, 334,25 $\pm$ 25,42, 581,32 $\pm$ 79,68 ve 555,32 $\pm$ 38,46 nm olarak bulunmuştur. İn vitro salım sonuçları incelendiğinde kaplı nanopartiküllerin insülini pH 1,2'de kaplı olmayan nanopartiküllere göre ve CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin CS:TPP nanopartiküllerine göre pH 1,2'de daha az insülin saldıgı görülmüştür. Altı aylık stabilite çalışmaları ise enterik kaplı nanopartiküllerin daha stabil olduğunu ayrıca SBE- β -SD ile oluşturulan nanopartiküllerin TPP ile hazırlanan nanopartiküllere göre daha stabil olduğu göstermiştir.

Bilim Kodu : 1020

Anahtar Kelimeler : İnsülin, nanopartikül, kitosan, diyabet, enterik kaplama, siklodekstrin

Sayfa Adedi : 184

Danışman : Doç. Dr. Necibe Başaran MUTLU AĞARDAN

STUDIES ON THE DEVELOPMENT OF ENTERIC-COATED INSULIN-LOADED
CHITOSAN-SULFOBUTYLATED BETA-CYCLODEXTRIN NANOPARTICLES FOR
ORAL TREATMENT OF DIABETES MELLITUS

(M. Sc. Thesis)

Tuğçe TURAN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2023

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a chronic, metabolic disease characterized by high blood glucose levels. Insulin is administered by subcutaneous injection in the treatment. Disadvantages such as the need for repeated and lifetime injections, pain at the injection site, risk of infection, and lipodystrophy cause low patient compliance. As an alternative to the subcutaneous route, orally administration of insulin, which is easy to administer and has high patient compliance, is a subject that has been extensively researched. Oral insulin mimics the physiology of endogenous insulin secreted by the pancreas. Oral administration of peptide/proteins is very challenging as it results in insufficient therapeutic efficacy due to their poor physical and chemical stability. In our study, it was aimed to load insulin into chitosan (CS) nanoparticles and to investigate its the oral administration by enteric coating. For this purpose, insulin-loaded chitosan nanoparticles (CS:TPP, CS:SBE- β -SD) were prepared by ionic gelation method of chitosan (CS) with sodium tripolyphosphate (TPP) or sulfobutyl-ether- β -cyclodextrin (SBE- β -SD) then enteric coated nanoparticles (K-CS:TPP, K-CS:SBE- β -SD) were prepared by coating the nanoparticles with Kollicoat® MAE 100 P. In order to prepare nanoparticles, it was decided that the pH of chitosan should be 3, the CS:TPP ratio of 2:1, the CS:SBE- β -SD ratio of 1:1 and the CS: Kollicoat® MAE 100 P ratio of 1:3. The particle sizes of optimum CS:TPP, CS:SBE- β -SD K-CS:TPP and K-CS:SBE- β -SD nanoparticles were measured as $289,17 \pm 34,64$, $334,25 \pm 25,42$, $581,32 \pm 79,68$ and $555,32 \pm 38,46$ nm, respectively. In vitro release results revealed that coated nanoparticles released less insulin at pH 1.2 than uncoated nanoparticles, and CS:SBE- β -SD nanoparticles released less insulin at pH 1.2 than CS:TPP nanoparticles. Six-month stability studies have shown that enteric coated nanoparticles are more stable than the uncoated ones and nanoparticles formed with SBE- β -SD are more stable than the nanoparticles prepared with TPP.

Science Code : 1020

Key Words : Insulin, nanoparticle, chitosan, diabetes, enteric coating, cyclodextrin

Page Number : 184

Supervisor : Assoc. Prof. Necibe Başaran Mutlu AĞARDAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez dönemimin ilk gününden itibaren bana her zaman açıklayıcı olan, tezimin yönetilmesi ve yönlendirilmesinde bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Necibe Başaran MUTLU AĞARDAN'a, eğitimimde büyük katkıları olan ve bana yeni bakış açıları kazandıran hocalarım Prof. Dr. Füsün ACARTÜRK başta olmak üzere Prof. Dr. Sevgi TAKKA'ya, Prof. Dr. Fahriye Figen TIRNAKSIZ'a, Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN'e, Doç. Dr. Tuba İNCEÇAYIR'a, Doç. Dr. Sibel İLBASMIŞ TAMER'e, Doç. Dr. Fatma Nur Tuğcu DEMİRÖZ'e ve Doç. Dr. Serdar TORT'a teşekkürlerimi borç bilirim.

İn vitro stotoksisite çalışmalarım sırasında katkı, desteklerinden ve emeklerinden dolayı Dr. Biol. Şükran YILMAZ ve Uzm. Biol. Hilal PARLAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Bana her zaman destek veren, yardımcı olan ve bilgilerini asla esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Tahir Emre YALÇIN'a, Arş. Gör. Dr. Duygu YILMAZ USTA'ya, Dr. Ecz. Yasin TURANLI'ya, Dr. Ecz. Mehmet BİRER'e, Ecz. Ayşegül YILMAZ'a, Arş. Gör. Sinem SAAR'a, Ecz. Aysel YILMAZ'a, Arş. Gör. Emre TUNÇEL'e, Arş. Gör. Ceren YETGİN'e, Arş. Gör. Burcu TİMUR'a, Ecz. Esra KODAN'a ve Arş. Gör. Özlem KRAL'a, Ecz. Seval OLĞAÇ'a, Ecz. Eylül Su ACARCA'ya, Ecz. Ezgi GÜLPINAR'a ve bölüm sekreterimiz Fatma ÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tez dönemimin en başından beri yanımda olan Öğr. Gör. Ecz. Nebahat DURMAZ'a, bana hep destek olan ve dostluklarını esirgemeyen Arş. Gör. Şeyma AYDOĞDUOĞLU'na, Arş. Gör. Zeliha Duygu ÖZDAL'a, Arş. Gör. Nihal Tuğçe ÖZAKSUN'a, bu dönemde maddi ve manevi yardımlarını hiç esirgemeyen, her zaman yanımda olan Müh. Ahmet ÖZDEMİR'e ve aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xv
RESİMLERİN LİSTESİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diabetes Mellitus	3
2.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus.....	4
2.1.2. Tip 2 Diabetes Mellitus.....	5
2.1.3. Gestasyonel Diyabet Mellitus	5
2.1.4. Diğer spesifik diyabet türleri.....	6
2.1.5. Diabetes Mellitus'ta tedavi	6
2.2. İnsülin.....	10
2.2.1. İnsülin analogları.....	11
2.2.2. Protein ve Peptit Yapılı İlaçların Oral Yoldan Verilmesi	14
2.2.3. İnsülinin oral yoldan verilmesi	15
2.2.4. İnsülinin oral yoldan verilmesi ile ilgili yaklaşımlar	17
2.2.5. İnsülinin oral yoldan verilmesinde ilaç taşıyıcı sistemler	19
2.2.6. İnsülinin oral yoldan verilmesinde nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler.	21
2.3. Çalışmada Kullanılan Etken Madde ve Polimer	24

	Sayfa
2.3.1. İnsan insülini (Humulin®-R Flakon)	24
2.3.2. Kitosan	26
2.3.3. Sodyum tripolifosfat.....	32
2.3.4. Sülfobütil-eter- β -siklodekstrin (Siklodekstrinler).....	32
2.3.5. Kollicoat® MAE 100 P	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Gereç	35
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	35
3.1.2. Kullanılan araç ve gereçler.....	35
3.1.3. Kullanılan yazılımlar.....	36
3.2. Yöntem	36
3.2.1. İn vitro çalışmalarda kullanılan çözeltiler.....	37
3.2.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FT-IR) analizi.....	37
3.2.3. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi	38
3.2.4. İnsülinin miktar tayini yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu.....	38
3.3. Çalışmalarda Kullanılan İnsülin Formülasyonları	42
3.3.1. Formülasyon çalışmalarında optimize edilen parametreler	43
3.4. Formülasyonların hazırlanması	44
3.4.1. Kitosan:sodyum tripolifosfat (CS:TPP) nanopartiküllerinin hazırlanışı..	44
3.4.2. Kitosan:sülfobütil eter- β -Siklodekstrin (CS:SBE- β -SD) nanopartiküllerinin hazırlanışı.....	45
3.5. Kollicoat® MAE 100 P kaplı nanopartiküllerin hazırlanışı.....	46
3.5.1. Enterik kaplı kitosan:tripolifosfat (K-CS:TPP) nanopartiküllerinin hazırlanışı	47
3.5.2. Enterik kaplı kitosan:sülfobütil eter- β -siklodekstrin (K-CS:SBE- β -SD) nanopartiküllerinin hazırlanışı.....	49
3.6. Liyofilizasyon	50

	Sayfa
3.7. İnsülin İçeren Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	51
3.7.1. Partikül büyüklüğü ve dağılımı	51
3.7.2. Zeta potansiyel ölçümleri	51
3.7.3. % Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi	52
3.7.4. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) analizi	52
3.8. In vitro salım çalışmaları	53
3.8.1. Nanopartikül formülsayonlarından in vitro insülin salım kinetiklerinin değerlendirilmesi	54
3.9. Nanopartiküllerin sitotoksitelerinin değerlendirilmesi	54
3.10. In vitro stabilite	56
3.11. Stabilite çalışmaları	56
4. BULGULAR	57
4.1. Etkin Maddenin Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	57
4.1.1. İnsülinin fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FT-IR) analizinden elde edilen bulguları	57
4.1.2. İnsülinin diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizinden elde edilen bulguları	58
4.1.3. İnsülinin UV-Vis spektrofotometredeki dalga boyu taraması bulguları ..	58
4.2. Etkin maddenin UV-Vis spektrofotometre ile miktar tayini yönteminin validasyon çalışmalarına ait bulgular	60
4.2.1. Doğrusallık	61
4.2.2. Kesinlik	63
4.2.3. Doğruluk ve geri elde	66
4.2.4. Özgünlük ve seçicilik	68
4.2.5. Saptama ve tayin sınırı	75
4.2.6. Stabilite	75
4.3. Nanopartikül Formülasyonlarının Optimizasyon Çalışmalarından Elde Edilen Bulgular	79

Sayfa

4.3.1. Kitosanin pH değerinin ve çapraz bağlayıcı miktarının belirlenmesinde elde edilen bulgular	79
4.3.2. Enterik kaplama için Kollicoat® MAE 100 P miktarının belirlenmesi	82
4.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FT-IR) Analizinden Elde Edilen Bulgular.....	101
4.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizlerinden Elde Edilen Bulgular	102
4.6. Liyofilizasyon İşleminin Optimizasyon Çalışmaları.....	103
4.7. In Vitro İnsülin Salım Çalışmaları	107
4.7.1. Optimum formülasyonların in vitro salım kinetiklerinin tayinine ait bulgular.....	110
4.8. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntüleme Çalışmalarına Ait Bulgular.....	115
4.9. MTT Sitotoksosite Testlerine Ait Bulguları	119
4.10. In Vitro Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular	119
4.11. Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular	123
5. TARTIŞMA	133
5.1. Etkin Madde ve Diğer Maddelerin Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi.....	133
5.1.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FT-IR) analizi bulgularının değerlendirilmesi	133
5.1.2. İnsülinin erime noktasının değerlendirilmesi.....	135
5.1.3. DSC bulgularının değerlendirilmesi	135
5.1.4. İnsülinin UV-Vis spektrofotometre ile analiz bulgularının değerlendirilmesi.....	137
5.1.5. İnsülinin miktar tayini yönteminin geliştirilmesi ve miktar tayini yönteminin validasyonundan elde edilen bulguların değerlendirilmesi...	138
5.2. Nanopartiküllerin Hazırlanmasının Optimize Edilmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi.....	140
5.3. Kollicoat® MAE 100 P Kaplı Nanopartiküllerin Hazırlanmasının Optimize Edilmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi.....	143

Sayfa

5.4. Geçirimli Elektron Mikroskobu Görüntüleme Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	145
5.5. Liyofilizasyon Bulgularının Değerlendirilmesi	146
5.6. İn Vitro Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi	147
5.6.1. Optimum formülasyonların in vitro salım kinetiklerinin tayinine ait bulguların değerlendirilmesi	151
5.7. MTT Sitotoksosite Testlerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	152
5.8. İn vitro Stabilite Bulgularının Değerlendirilmesi	153
5.9. Stabilite Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	157
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	161
6.1. Sonuçlar.....	161
6.2. Öneriler	162
KAYNAKLAR	165
ÖZGEÇMİŞ	183

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Kitosanın özellikleri ve ilaç taşıyıcı sisteminde sağladığı avantajlar	28
Çizelge 4.1. İnsülinin pH 1,2 çözeltisindeki deney içi kesinlik bulguları	64
Çizelge 4.2. İnsülinin pH 6,8 fosfat tamponundaki deney içi kesinlik bulguları.....	64
Çizelge 4.3. İnsülinin pH 7,4 fosfat tamponundaki deney içi kesinlik bulguları.....	65
Çizelge 4.4. İnsülinin pH 1,2 çözeltisindeki deneyler arası kesinlik bulguları.....	65
Çizelge 4.5. İnsülinin pH 6,8 fosfat tamponundaki deneyler arası kesinlik bulguları....	65
Çizelge 4.6. İnsülinin pH 7,4 fosfat tamponundaki deneyler arası kesinlik bulguları....	66
Çizelge 4.7. İnsülinin pH 1,2 çözeltisindeki doğruluk ve geri elde bulguları	66
Çizelge 4.8. İnsülinin pH 6,8 fosfat tamponundaki doğruluk ve geri elde bulguları.....	67
Çizelge 4.9. İnsülinin pH 7,4 fosfat tamponundaki doğruluk ve geri elde bulguları.....	67
Çizelge 4.10. İnsülinin pH 1,2 çözeltisi ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tamponundaki duyarlılık ve saptama sınırı bulguları.....	75
Çizelge 4.11. Kitosan pH'sı ve CS:TPP oranının değişmesiyle hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyel ve % enkapsülasyon etkinliği değerleri.....	80
Çizelge 4.12. Kitosan pH'sı ve CS:SBE-β-SD oranının değişmesiyle hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyel ve % enkapsülasyon etkinliği değerleri.....	81
Çizelge 4.13. Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki çözeltileri (1, 3 ve 5 mg/mL) kullanılarak enterik kaplama yapılmasının partikül büyüklüğü üzerine etkisi	83
Çizelge 4.14. Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki çözeltileri (1, 3 ve 5 mg/mL) kullanılarak enterik kaplama yapılmasının polidispersite indeksi üzerine etkisi	83
Çizelge 4.15. Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki çözeltileri (1, 3 ve 5 mg/mL) kullanılarak enterik kaplama yapılmasının zeta potansiyel üzerine etkisi	84
Çizelge 4.16. Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki çözeltileri (1, 3 ve 5 mg/mL) kullanılarak enterik kaplama yapılmasının % enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi	84

Çizelge 4.17. Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltilerinin (1, 3 ve 5 mg/mL) partikül büyüklüğü üzerine etkisi.....	85
Çizelge 4.18. Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltilerinin (1, 3 ve 5 mg/mL) polidispersite indeksi üzerine etkisi	86
Çizelge 4.19. Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltilerinin (1, 3 ve 5 mg/mL) zeta potansiyel değeri üzerine etkisi	86
Çizelge 4.20. Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltilerinin (1, 3 ve 5 mg/mL) % enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi	87
Çizelge 4.21. CS:Kollicoat® MAE 100 P (Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki çözeltisi) oranının partikül büyüklüğü üzerine etkisi	89
Çizelge 4.22. CS:Kollicoat® MAE 100 P (Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki çözeltisi) oranının polidispersite indeksi üzerine etkisi	90
Çizelge 4.23. CS:Kollicoat® MAE 100 P (Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki çözeltisi) oranının zeta potansiyel üzerine etkisi.....	91
Çizelge 4.24. CS:Kollicoat® MAE 100 P (Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki çözeltisi) oranının % enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi	92
Çizelge 4.25. CS:Kollicoat® MAE 100 P (Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltisi) oranının partikül büyüklüğü üzerine etkisi	93
Çizelge 4.26. CS:Kollicoat® MAE 100 P (Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltisi) oranının polidispersite indeksi üzerine etkisi ..	94
Çizelge 4.27. CS:Kollicoat® MAE 100 P (Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltisi) oranının zeta potansiyel üzerine etkisi.....	95
Çizelge 4.28. CS:Kollicoat® MAE 100 P (Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltisi) oranının % enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi	96
Çizelge 4.29. Mannitol oranının liyofilizasyon sonrası partikül büyüklüğü üzerine etkisi	103
Çizelge 4.30. Mannitol oranının liyofilizasyon sonrası polidispersite indeksi üzerine etkisi	104
Çizelge 4.31. Mannitol oranının liyofilizasyon sonrası zeta potansiyel üzerine etkisi .	105
Çizelge 4.32. CS:TPP. CS:SBE-β-SD, K-CS:TPP ve K-CS:SBE-β-SD nanopartikülleri için 24 saatlik in vitro % kümülatif insülin salım sonuçları	108
Çizelge 4.33. CS:TPP nanopartiküllerinin in vitro insülin salım sonuçlarının kinetik modellerle uyumunun değerlendirilmesi.....	111

Çizelge 4.34. CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin in vitro insülin salım sonuçlarının kinetik modellerle uyumunun değerlendirilmesi.....	112
Çizelge 4.35. K-CS:TPP nanopartiküllerinin in vitro insülin salım sonuçlarının kinetik modellerle uyumunun değerlendirilmesi.....	113
Çizelge 4.36. K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin in vitro insülin salım sonuçlarının kinetik modellerle uyumunun değerlendirilmesi.....	114
Çizelge 4.37. İn vitro stabilite çalışmalarında nanopartiküllerin partikül büyüklüğü değerleri.....	120
Çizelge 4.38. İn vitro stabilite çalışmalarında nanopartiküllerin polidispersite indeksi değerleri.....	121
Çizelge 4.39. İn vitro stabilite çalışmalarında nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri.....	122
Çizelge 4.40. 4°C sıcaklık $\pm$ ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında ve 25°C %60 $\pm$ 5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde bekletilen insülin çözeltisinin 90 günlük miktar tayini sonuçları (μ g/mL).....	123
Çizelge 4.41. 4°C sıcaklık $\pm$ ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında bekletilen nanopartiküllerin 6 aylık partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları	125
Çizelge 4.42. 25°C sıcaklık %60 $\pm$ 5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde bekletilen nanopartiküllerin 6 aylık partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları	125
Çizelge 4.43. 4°C sıcaklık $\pm$ ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında bekletilen nanopartiküllerin 6 aylık polidispersite indeksi ölçüm sonuçları.....	127
Çizelge 4.44. 25°C sıcaklık %60 $\pm$ 5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde bekletilen nanopartiküllerin 6 aylık polidispersite indeksi ölçüm sonuçları	127
Çizelge 4.45. 4°C sıcaklık $\pm$ ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında bekletilen nanopartiküllerin 6 aylık zeta potansiyeli ölçüm sonuçları.....	129
Çizelge 4.46. 25°C sıcaklık %60 $\pm$ 5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde bekletilen formülasyonların 6 aylık zeta potansiyeli ölçüm sonuçları	129
Çizelge 4.47. 4°C sıcaklık $\pm$ ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında bekletilen nanopartiküllerin 6 aylık % enkapsülasyon etkinliği değerleri.....	131
Çizelge 4.48. 25°C sıcaklık %60 $\pm$ 5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde bekletilen nanopartiküllerin 6 aylık % enkapsülasyon etkinliği sonuçları	131

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1.	İnsülinin A ve B zincirlerinin yapısı.....	11
Şekil 2.2.	a) kitinin kimyasal yapısı b) kitosanın kimyasal yapısı.....	27
Şekil 2.3.	Kitosan nanopartiküllerinin genel hazırlanış yöntemleri ve kullanım alanları	28
Şekil 2.4.	Kitosan ve tripolifosfat arasındaki molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlar ile nanopartiküllerin oluşumu	31
Şekil 2.5.	Sodyum tripolifosfatın yapısı	32
Şekil 2.6.	β -siklodekstrinlerin genel yapısı.....	33
Şekil 3.1.	Kitosan çözeltisinin hazırlanışı.....	43
Şekil 3.2.	CS:TPP nanopartiküllerinin hazırlanışı	45
Şekil 3.3.	CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin hazırlanışı.....	46
Şekil 3.4.	Kollicoat® MAE 100 P kaplı nanopartiküllerin hazırlanışı	47
Şekil 3.5.	K-CS:TPP nanopartiküllerinin hazırlanışı.....	48
Şekil 3.6.	K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin hazırlanışı.....	50
Şekil 4.1.	Humulin®-R'ye ait FT-IR spektrumu	57
Şekil 4.2.	Humulin®-R'ye ait DSC termogramı	58
Şekil 4.3.	İnsülinin distile su içerisinde 200-800 nm arası dalga boyu taramasına ait spektrum	59
Şekil 4.4.	Kullanılan analiz yönteminin insülin için a) pH 1,2 çözeltisinde b) pH 6,8 fosfat tamponundaki c) pH 7,4 fosfat tamponundaki dalga boyu taramasına ait spektrumlar	60
Şekil 4.5.	İnsülinin pH 1,2 çözeltisindeki kalibrasyon grafiği.....	62
Şekil 4.6.	İnsülinin pH 6,8 fosfat tamponundaki kalibrasyon grafiği.....	62
Şekil 4.7.	İnsülinin pH 7,4 fosfat tamponundaki kalibrasyon grafiği.....	63
Şekil 4.8.	Kullanılan analiz yönteminin kitosan için a) pH 1,2 çözeltisindeki b) pH 6,8 fosfat tamponundaki c) pH 7,4 fosfat tamponundaki özgülük ve seçiciliği.....	69

Şekil 4.9.	Kullanılan analiz yönteminin TPP için a) pH 1,2 çözeltisindeki b) pH 6,8 fosfat tamponundaki c) pH 7,4 fosfat tamponundaki özgünlük ve seçiciliği.....	70
Şekil 4.10.	Kullanılan analiz yönteminin SBE- β -SD için a) pH 1,2 çözeltisindeki b) pH 6,8 fosfat tamponundaki c) pH 7,4 fosfat tamponundaki özgünlük ve seçiciliği.....	71
Şekil 4.11.	Kullanılan analiz yönteminin Kollicoat® MAE 100 P için a) pH 1,2 çözeltisindeki b) pH 6,8 fosfat tamponundaki c) pH 7,4 fosfat tamponundaki özgünlük ve seçiciliği	72
Şekil 4.12.	Kullanılan analiz yönteminin mannitol için a) pH 1,2 çözeltisindeki b) pH 6,8 fosfat tamponundaki c) pH 7,4 fosfat tamponundaki özgünlük ve seçiciliği.....	73
Şekil 4.13.	Kullanılan analiz yönteminin a) kitosan, TPP ve Kollicoat® MAE 100 P karışımı için pH 1,2 çözeltisindeki b) kitosan, SBE- β -SD ve Kollicoat® MAE 100 P karışımı için pH 1,2 çözeltisindeki c) kitosan, TPP ve Kollicoat® MAE 100 P karışımı için pH 6,8 fosfat tamponundaki d) kitosan, SBE- β -SD ve Kollicoat® MAE 100 P karışımı için pH 6,8 fosfat tamponundaki e) kitosan, TPP ve Kollicoat® MAE 100 P karışımı için pH 7,4 fosfat tamponundaki d) kitosan, SBE- β -SD ve Kollicoat® MAE 100 P karışımı için pH 7,4 fosfat tamponundaki özgünlük ve seçiciliği...	74
Şekil 4.14.	a) İnsülinin pH 1,2 çözeltisindeki stabilite bulguları (4°C) b) İnsülinin pH 1,2 çözeltisindeki stabilite bulguları (25°C)	76
Şekil 4.15.	a) İnsülinin pH 6,8 fosfat tamponundaki stabilite bulguları (4°C) b) İnsülinin pH 6,8 fosfat tamponundaki stabilite bulguları (25°C)	77
Şekil 4.16.	a) İnsülinin pH 7,4 fosfat tamponundaki stabilite bulguları (4°C) b) İnsülinin pH 7,4 fosfat tamponundaki stabilite bulguları (25°C)	78
Şekil 4.17.	Formülasyonda kullanılan maddelere ve nanopartiküllere ait FT-IR spektrumları	101
Şekil 4.18.	Formülasyonda kullanılan maddelere ait DSC termogramları	102
Şekil 4.19.	İnsülin yüklü nanopartiküllere ait DSC spektrumları	102
Şekil 4.20.	a) CS:TPP nanopartiküllerinin 24 saatlik in vitro insülin salım profili b) CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin 24 saatlik in vitro insülin salım profili c) K-CS:TPP nanopartiküllerinin 24 saatlik in vitro insülin salım profili d) K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin 24 saatlik in vitro insülin salım profili	109
Şekil 4.21.	Nanopartiküllerin 24 saatlik in vitro insülin salım profilleri	110
Şekil 4.22.	Nanopartiküllerinin in vitro insülin salım profilinin Peppas-Sahlin salım kinetik modeliyle eşleştirilmesi	111

Şekil 4.23.	CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin in vitro insülin salım profilinin Weibull salım kinetik modeliyle eşleştirilmesi	112
Şekil 4.24.	K-CS:TPP nanopartiküllerinin in vitro insülin salım profilinin 1.derece salım kinetik modeliyle eşleştirilmesi	113
Şekil 4.25.	K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin in vitro insülin salım profilinin 1.derece salım kinetik modeliyle eşleştirilmesi	114
Şekil 4.26.	İnsülin derişimine göre hücre canlılığı değişim grafiğı.....	119
Şekil 4.27.	a) CS:TPP nanopartiküllerinin b) K-CS:TPP nanopartiküllerinin c) CS:SBE- β SD nanopartiküllerinin d) K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin in vitro stabilite çalışmalarından elde edilen partikül büyüklüğü değerlerinin değişimi	120
Şekil 4.28.	a) CS:TPP nanopartiküllerinin b) K-CS:TPP nanopartiküllerinin c) CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin d) K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin in vitro stabilite çalışmalarından elde edilen PDI değerlerinin değişimi	121
Şekil 4.29.	a) CS:TPP nanopartiküllerinin b) K-CS:TPP nanopartiküllerinin c) CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin d) K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin in vitro stabilite çalışmalarından elde edilen zeta potansiyel değerlerinin değişimi.....	122
Şekil 4.30.	İnsülin çözeltisinin 4°C $\pm$ ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında ve 25°C sıcaklık %60 $\pm$ 5 bağıl nem koşullarında miktar tayini sonuçlarının 90 günlük değişim grafiğı.....	124
Şekil 4.31.	a) CS:TPP nanopartiküllerinin b) CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin c) K-CS:TPP nanopartiküllerinin d) K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin 4°C $\pm$ ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında ve 25°C sıcaklık %60 $\pm$ 5 bağıl nem koşullarında partikül büyüklüğü değerlerinin 6 aylık değişim grafikleri.....	126
Şekil 4.32.	a) CS:TPP nanopartiküllerinin b) CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin c) K-CS:TPP nanopartiküllerinin d) K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin 4°C $\pm$ ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında ve 25°C sıcaklık %60 $\pm$ 5 bağıl nem koşullarında polidispersite indeksi değerlerinin 6 aylık değişim grafikleri.....	128
Şekil 4.33.	a) CS:TPP nanopartiküllerinin b) CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin c) K-CS:TPP nanopartiküllerinin d) K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin 4°C $\pm$ ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında ve 25°C sıcaklık %60 $\pm$ 5 bağıl nem koşullarında zeta potansiyel değerlerinin 6 aylık değişim grafikleri.....	130
Şekil 4.34.	a) CS:TPP nanopartiküllerinin b) CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin c) K-CS:TPP nanopartiküllerinin d) K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin 4°C $\pm$ ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında ve 25°C sıcaklık	

%60±5 bağıl nem koşullarında % enkapsülasyon etkinliği değerlerinin 6 aylık değişim grafikleri.....	132
---	-----

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Humulin®-R flakon ticari preparatı	25
Resim 3.1. In vitro salım çalışması deney düzeneği	54
Resim 4.1. Kollicoat® MAE 100 P'in etanoldeki 10 mg/mL derişimindeki çözeltisinin nanopartikül dispersiyonuna ilavesiyle oluşan agregatların görünüşü	88
Resim 4.2. a) CS:TPP nanopartikül dispersiyonuna ait görüntü b) CS:SBE- β -SD nanopartikül dispersiyonuna ait görüntü c) K-CS:TPP nanopartikül dispersiyonuna ait görüntü d) K- CS:SBE- β -SD nanopartikül dispersiyonuna ait görüntü.....	97
Resim 4.3. CS:TPP nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü dağılımı grafiğı	98
Resim 4.4. CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü dağılımı grafiğı...	98
Resim 4.5. K-CS:TPP nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü dağılımı grafiğı	98
Resim 4.6. K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü dağılımı grafiğı	99
Resim 4.7. CS:TPP nanopartiküllerin zeta potansiyel grafiğı	99
Resim 4.8. CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin zeta potansiyel grafiğı	99
Resim 4.9. K-CS:TPP nanopartiküllerinin zeta potansiyel grafiğı	100
Resim 4.10. K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin zeta potansiyel grafiğı.....	100
Resim 4.11. a) CS:TPP nanopartiküllerinin mannitol eklemeyen liyofilize edildiğindeki görüntüsü b) CS:TPP nanopartiküllerinin %5 mannitol varlığında liyofilize edildiğindeki görüntüsü c) CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin mannitol eklemeyen liyofilize edildiğindeki görüntüsü d) CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin %5 mannitol varlığında liyofilize edildiğindeki görüntüsü.....	106
Resim 4.12. a) K-CS:TPP nanopartiküllerinin mannitol eklemeyen liyofilize edildiğindeki görüntüsü b) K-CS:TPP nanopartiküllerinin %5 mannitol varlığında liyofilize edildiğindeki görüntüsü c) K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin mannitol eklemeyen liyofilize edildiğindeki görüntüsü d) K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin %5 mannitol varlığında liyofilize edildiğindeki görüntüsü	107
Resim 4.13. a) İnsülin yüklü olmayan CS:TPP nanopartiküllerinin b) İnsülin yüklü CS:TPP nanopartiküllerinin TEM görüntüleri	115

Resim	Sayfa
Resim 4.14. a) İnsülin yüklü olmayan CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin b) İnsülin yüklü CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin TEM görüntüleri	116
Resim 4.15. a) İnsülin yüklü olmayan K-CS:TPP nanopartiküllerinin b) İnsülin yüklü K-CS:TPP nanopartiküllerinin TEM görüntüleri	117
Resim 4.16. a) İnsülin yüklü olmayan K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin b) İnsülin yüklü K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin TEM görüntüleri.....	118

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
μg	Mikrogram
mL	Mililitre
nm	Nanometre
λ_{max}	Maksimum Dalga Boyu
R^2	Korelasyon Katsayısı
R^2_{adj}	Ayarlanmış Korelasyon Katsayısı
mV	Milivolt
rpm	Dakikada Devir Sayısı
kDa	kiloDalton
S	Kalibrasyon Doğrusunun Eğimi
N	Normal
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
σ	Kalibrasyon Aralığında Yer Alan En Küçük Değişimin Standart Sapması

Kısaltmalar	Açıklamalar
AIC	Akaike Bilgi Kriteri
ATCC	Amerikan tipi kültür koleksiyonu
BS	Bağıl Sapma
CS	Kitosan
DMEM	Dubelco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi
HCl	Hidroklorik Asit
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu
K₂HPO₄	Dipotasyum hidrojen fosfat
KH₂PO₄	Potasyum dihidrojen fosfat
LOD	Saptama Sınırı
LOQ	Tayin Sınırı
MSC	Model Seçim Kriteri
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromit
NaCl	Sodyum Klorür
Na₂HPO₄	Disodyum hidrojen fosfat
PB	Partikül büyüklüğü
NaOH	Sodyum hidroksit
PDI	Polidispersite indeksi
SBE-β-SD	Sülfobütil eter-β-siklodekstrin
SS	Standart Sapma
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TPP	Sodyum Tripolifosfat
UV-Vis	Ultraviyole-Visible (Ultraviyole ve görünür ışık)

1. GİRİŞ

Diabetes Mellitus, yüksek kan glukoz seviyeleri ile karakterize, böbrek yetmezliği, felç gibi komplikasyonlara yol açabilen hatta ölüm ile sonuçlanabilen kronik, metabolik bir hastalıktır (Meneguín ve diğerleri, 2021; Petersmann ve diğerleri, 2019). Diyabet Mellitus, pankreasın β hücrelerinin kaybından dolayı insülin üretilmemesi ya da ürettiği insülinin yeterli gelmemesi ve insüline yanıt veren dokularda insüline yeterli yanıt alınamaması ile oluşmaktadır ve bu nedenler Tip 1 ve Tip 2 Diyabetes Mellitus'un temelini oluşturmaktadır (Galicía-García ve diğerleri, 2020; Katsarou ve diğerleri, 2017). Tip 1 ve Tip 2 diyabetin yanı sıra gestasyonel ve diğer spesifik diyabet türleri de bulunmaktadır (Baynes, 2015; Johns, Denison, Norman ve Reynolds, 2018). Diyabet tedavisinde özellikle Tip 2 diyabetli hastalarda yaşam tarzı değişikliği önerilse de insülin ve/veya hipoglisemik ajanlar farmasötik tedaviyi oluşturmaktadır. Tip 1 diyabetli hastalar için subkütan enjeksiyon yoluyla insülin tedavisi şarttır (S. Tan ve diğerleri, 2019).

İnsülinin subkütan enjeksiyon yoluyla günde birkaç kez ve sürekli uygulanması, enjeksiyon yerinde ağrıya, lipodistrofiye, kilo artışına neden olarak hasta uyuncunu düşürmekte ve subkütan yol pankreastan salgılanan endojen insülini taklit edememektedir (Iyer, Dyawanapelly, Jain ve Dandekar, 2022). Bu olumsuzlukların önüne geçebilmek için insülinin başta oral yol olmak üzere alternatif yollar ile vücuda verilmesiyle ilgili çalışmalar yapılmaktadır (Zaric ve diğerleri, 2019). Oral yol hasta uyuncunun en yüksek olduğu yol olmasına rağmen, insülinin gastrointestinal sistemdeki zayıf stabilitesi, kimyasal ve enzimatik engeller, yüksek molekül ağırlığı, hidrofilik yapısı nedeniyle zayıf emilim göstermesi dolayısıyla zayıf biyoyararlanımı oral yoldan verilmesini zorlaştırmaktadır (Seyam, Nordin ve Alfatama, 2020; M. Wang ve diğerleri, 2022). İnsülinin oral yoldan verilebilmesi için nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılması, enterik kaplama yapılması, formülasyonlara enzim inhibitörlerinin ve absorpsiyon artırıcıların eklenmesi gibi stratejiler geliştirilmiştir (Alai, Lin ve Pingale, 2015). Biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerler ile hazırlanan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ilaç molekülünün bağırsak epiteli boyunca taşınmasını kolaylaştırmakta ve ilaç molekülünün gastrointestinal sistemde stabil kalmasını sağlamaktadır (Bahman, Greish ve Taurin, 2019; Ismail ve Csoka, 2017).

Tez çalışmamız kapsamında, subkütan yola alternatif olarak insülinin oral yoldan verilebilmesi için enterik kaplı insülin yüklü kitosan nanopartikül formülasyonlarının

geliştirilmesi amaçlanmıştır. Kitosan katyonik, biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen bir polimerdir (Bhattacharyya, Mukherjee, Mishra ve Kundu, 2017). Negatif yüklü bir çapraz bağlayıcı ve pozitif yüklü kitosanın elektrostatik etkileşimine bağlı olarak iyonik jelasyon yöntemi ile kitosan nanopartikülleri oluşmaktadır (Seyam ve diğerleri, 2020). İyonik jelasyon yöntemi ile kitosan nanopartikülleri oluştururken polianyon olarak sıklıkla tripolifosfat kullanılmaktadır (Di Santo, D'Antoni, Rubio, Alaimo ve Pérez, 2021). Tripolifosfatın kitosan ile istenmeyen inter/intra moleküler etkileşimleri, yüksek polidispersite indeksi ve agregasyon gibi istenmeyen özelliklere neden olmaktadır. Tripolifosfatın bu olumsuz sonuçları nedeniyle kitosan nanopartiküllerinin hazırlanmasında tripolifosfata alternatif olarak sülfobütil-eter- β -siklodekstrinin kullanılması planlanmıştır. Siklodekstrinlerin ilaç moleküllerini fizyolojik ortamdaki çeşitli etkileşimlere karşı koruyarak ve ilaç moleküllerinin permeabilitesini artırmak için biyolojik membranlar ile etkileşerek ilaç moleküllerinin oral biyoyararlanımı artırması sayesinde farmasötik formülasyonlarda yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir (Carrier, Miller ve Ahmed, 2007). İnsülin siklodekstrinler ile formüle edildiğinde veya inklüzyon kompleksleri hazırlandığında, siklodekstrinler insülini agregasyona ve termal denatürasyona karşı stabilize etmekte ve membran akışkanlığını bozarak insülinin bağırsak epitelleri boyunca emilimini artırabilmektedir (Abdel-Moneim ve Ramadan, 2022).

Tez çalışmamızda dört tip insülin yüklü kitosan nanopartikül formülasyonu geliştirilmiştir. Kitosan nanopartikülleri iyonik jelasyon yöntemi ile hazırlanmış ve çapraz bağlayıcı olarak tripolifosfat ve sülfobütil-eter- β -siklodekstrin kullanılmıştır. Hazırlanma koşulları optimize edilen kitosan nanopartiküllerinin, Kollicoat® MAE 100 P ile kaplanması sayesinde insülinin midede parçalanmasının engellenmesi planlanmıştır. Geliştirilen nanopartiküllerin karakterizasyonları gerçekleştirilmiş, insülin salım profilleri incelenmiş, sitotoksosite açısından değerlendirilmiş ve stabilize çalışmaları yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) insülin üretiminde, insülinin etkinliğinde veya her ikisinden kaynaklanan bir bozukluk nedeniyle oluşan hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır (Petersmann ve diğerleri, 2019). Yüksek kan glikoz seviyeleri ile karakterize olan bu hastalık böbrek yetmezliği, körlük, felç gibi birçok komplikasyona yol açabilmekte ve hatta ölüm ile sonuçlanabilmekle beraber günümüzde yaklaşık 463 milyon insanı etkilemektedir (Meneguın ve diğerleri, 2021). Diyabetli hastalarda görülen kronik hiperglisemi insülin üretiminde, insülin etkisinde veya her ikisinde de görülen eksiklikten kaynaklanabilmekte ve bu eksiklikler nedeniyle karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında da bozukluklar meydana gelebilmektedir (Sonia ve Sharma, 2012). İnsülin, karbonhidrat ve yağ metabolizmasını düzenleyen önemli bir anabolik hormondur. İnsülin etkisi ile karaciğer, yağ ve kas dokularında glikoz alımı olmaktadır. İnsülinin yokluğunda/eksikliğinde organ ve dokular tarafından glikoz alımı etkilenmekte ve kan glikoz seviyeleri artmaktadır. Hiperglisemi ve ilişkili diğer metabolik bozukluklar, sinirlerde ve kan damarlarında ciddi hasara neden olmakla beraber vücudun birçok işlevinde bozukluğa neden olmaktadır (Rekha ve Sharma, 2013). Gelişmiş ülkelerde diyabet, başlıca ölüm nedenlerinden biridir (C. Wong, Al-Salami ve Dass, 2018a). Diyabetin belirtileri arasında çok idrara çıkma, çok fazla su içme, sık sık yemek yeme isteği, açıklanamayan kilo kaybı, yorgunluk ve huzursuzluk yer almaktadır (Ramachandran, 2014).

2. yüzyılda Kapadokyalı Aretaeus diyabetin doğru tanımını ilk kez yapmış, 17. yüzyılda Thomas Willis idrarın aşırı tatlı tadını tanımlamak amacıyla diyabete Mellitus terimini eklemiştir. 1889 yılında ise Oskar Minkowski ve Joseph von Mering köpek pankreasını çıkarıp yaptıkları deneylerde pankreasın glikoz homeostazının sürdürülmesinde önemli bir organ olduğunu göstermişler ve 1921 yılında Frederick Banting ve Charles Best pankreas adacıklarından insülin izole ederek hastaların iyileşmesini sağlamışlardır (Karamanou, Protogerou, Tsoucalas, Androutsos ve Poulakou-Rebelakou, 2016).

Diyabet türleri genellikle Tip 1, Tip 2, gestasyonel ve diğer spesifik diyabet türleri olarak sınıflandırılmaktadır (Kharroubi ve Darwish, 2015).

2.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus

Tip 1 DM pankreasın β hücrelerinin kaybından dolayı ortaya çıkan vücudun insülin üretememesine bağlı olarak vücutta oluşan hiperglisemi ile karakterize kronik bir otoimmün hastalıktır ve çocukluk çağında ortaya çıkan en yaygın endokrin rahatsızlıklardan biridir (Katsarou ve diğerleri, 2017). Daha çok çocuklarda ve genç erişkinlerde görülmesi ile beraber her yaşta ortaya çıkabilmektedir ve artan insidans ile birlikte tanı daha küçük yaşlara kaymıştır (Ilonen, Lempainen ve Veijola, 2019). Hastaların %70-90'ında (Tip 1a DM) β hücrelerin kaybı, Tip 1 DM ile ilişkili otoimmünitenin sonucudur. Geri kalan hastalarda (idiyopatik Tip 1 DM, Tip 1b DM) ise immün yanıt veya otoantikor saptanmaz ve β hücre yıkımının nedeni tam olarak bilinmemektedir (Katsarou ve diğerleri, 2017).

Dünyada tip 1 DM yaygınlığında genel olarak yaklaşık %2-3 oranında artış olduğu bilinmektedir (DiMeglio, Evans-Molina ve Oram, 2018). 1990 ile 2019 yılları arasında 193 makaleden alınan verilere göre tip 1 DM insidansının 100 000 kişide 15 olduğu ve dünyada tip 1 DM yaygınlığının ise %9.5 olduğu bildirilmiştir (Mobasseri ve diğerleri, 2020).

Tip 1 DM'de genellikle aile öyküsü risk faktörü sayılmamakta, hastaların sadece %10-15'inin hasta olan birincil ya da ikincil dereceden akrabası bulunmaktadır. Genetik çalışmalar ve meta analizlerde 50'den fazla Tip 1 DM genetik risk lokusu tanımlanmıştır. Tip 1 DM'ye yatkın olan ana genler genellikle insan lökosit antijeni (HLA) ve kromozom 6'da bulunan ana histo-uyumluluk kompleksi (MHC) bölgesi içerisindedir. HLA kompleksi polimerik aleller, Tip 1 DM gelişimindeki genetik riskin %40-50'sinden sorumludur. Kromozom 11'deki insülin geni (İnsülin-VNTR, IDDM 2) polimorfizmleri ve kromozom 2'deki sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen-4 geni (CTLA-4) ise genetik yatkınlığın %15'inden sorumludur. Ayrıca birçok genetik lokusun tek başına veya diğer otoimmün hastalıklarla beraber Tip 1 DM için genetik duyarlılığa daha az katkıda bulunduğu bilinmektedir (Paschou, Papadopoulou-Marketou, Chrousos ve Kanaka-Gantenbein, 2018).

Enfeksiyon, diyet, aşılar, hava kirliliği, ikamet yeri, aile ortamı ve stres gibi faktörler tip 1 DM oluşumundaki çevresel faktörleri oluşturmaktadır. Hastalığın daha erken yaşlarda görülmesi, tüm yaş gruplarında artan insidans ve insidans oranındaki en büyük artışın önceden düşük insidanslı ülkelerde görülmesi çevresel faktörlerin etkisini destekler nitelikte görülmektedir (Butalia, Kaplan, Khokhar ve Rabi, 2016).

2.1.2. Tip 2 Diabetes Mellitus

Tip 2 DM, insülinin pankreasın β hücreleri tarafından yetersiz salgılanması, dokularda insülin direnci gelişmesi ve insüline yanıt veren dokularda insüline yeterli yanıt verilememesi ile ilişki olmakla beraber diyabetli kişilerin yaklaşık %90'dan fazlasını oluşturmaktadır. Gelişen veriler ise bağırsak mikrobiyotasındaki anormalliklerin ve inflamasyonun, immün yetersizlik ve adipokin düzensizliğinin Tip 2 DM gelişmesindeki önemli patofizyolojik faktörler arasında yer aldığını göstermektedir (Galicía-García ve diğerleri., 2020).

Tip 2 DM genellikle genetik yatkınlığı olan kişilerde gelişmekte ve çeşitli çevresel nedenlerle ilişkili olabilmektedir. Ana risk faktörlerinden biri yağ/karbonhidrat ağırlıklı beslenme ve fiziksel aktivitenin yeterli olmaması ile ilişkilendirilen obezite olmakla beraber düşük HDL seviyesi, polikistik over sendromu, bazı virüsler ve hareketsiz yaşam tarzı da risk faktörlerini oluşturmaktadır. Etnik köken, kalıtım ve yaş ise değiştirilemez risk faktörleri arasında yer almaktadır (Blair, 2016). Tüm bu risk faktörleri kan glukoz seviyelerinin korunmasını engelleyerek, mikro ve makrovasküler komplikasyonların gelişmesine yol açmaktadır (DeFronzo ve diğerleri, 2015). Bu komplikasyonlar arasında kardiyovasküler hastalıklar, retinopati, nefropati, dislipidemi ve endotel disfonksiyonu yer almaktadır ve bu komplikasyonlara bağlı olarak Tip 2 DM ile ilgili morbidite ve mortalite oranlarında artış gözlenmektedir (Pivari, Mingione, Brasacchio ve Soldati, 2019).

Tip 2 DM'ye sahip kişilerde klasik hiperglisemi ile alakalı olan ve tip 1 DM'ye sahip kişilerde daha sık görülen sık idrara çıkma, çok susama ve aşırı yemek yeme gibi belirtiler gözlenebiliyorken genel olarak belirtiler daha belirsizdir. Tip 2 DM'ye sahip kişilerde daha çok yorgunluk, enfeksiyonların sıklıkla oluşması, yaraların geç iyileşmesi ve tekrarlayan vajinal mantar enfeksiyonları gibi durumlar gözlenmektedir (Blair, 2016).

2.1.3. Gestasyonel Diyabet Mellitus

Amerikan Diyabet Derneği gestasyonel diyabeti “gebeliğin ikinci veya üçüncü trimesterinde teşhis edilen ve önceden bilinen tip 1 veya tip 2 diyabet öyküsü olmayan diyabet” olarak tanımlamaktadır (Plows, Stanley, Baker, Reynolds ve Vickers, 2018). Bu diyabet türünde tanı gebelik öncesinde konmamıştır ve gebelik sırasında diyabet gelişmektedir. Gestasyonel

diyabette β hücreleri gebelikte artan insülin ihtiyacını yeterince karşılayamamaktadır (Johns ve diğerleri, 2018).

Gestasyonel diyabet oluşumunda ileri anne yaşı, ailede tip 2 DM varlığı, etnik köken gibi risk faktörleri yer almaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada, 40 yaşından büyük kadınlarda 30 yaşından küçük kadınlara göre gestasyonel diyabet riskinin iki kattan fazla arttığı gözlenmiştir. Ayrıca erkek bebek taşıyan kadınlarda ve ikiz bebek taşıyan annelerde de bu riskin arttığı raporlanmıştır. Etnik kökene göre riskin değişmesi ise yaşam tarzı, genetik yatkınlık ve vücut yağlanmasında farklılıklar gibi etkenlere bağlanmaktadır. Gebelik öncesi aşırı kilolu veya obez olmak, gebelikte sigara tüketimi ve beslenme de önemli risk faktörleri arasındadır. Gebelikte D vitamini ve C vitamini seviyelerinin düşüklüğü, diyetle yağ alımının artması, yüksek şeker içeren içecekler ve kızarmış yiyecekler gibi ürünlerin tüketimi gebelikte diyabet oluşunu artırmaktadır (McIntyre ve diğerleri, 2019).

2.1.4. Diğer spesifik diyabet türleri

Spesifik diyabet türlerinde pankreasın β hücre fonksiyonlarında genetik kusurlar veya insülin etkinliğinde bozukluk mevcuttur. Bu kişilerde genellikle pankreatit veya kistik fibrozis gibi pankreas hastalıkları, endokrinopatilerle ilişkili işlev bozukluğuna ya da ilaçlar, kimyasallar veya enfeksiyonların neden olduğu pankreas disfonksiyonu görülmektedir (Baynes, 2015).

2.1.5. Diabetes Mellitus'ta tedavi

Tip 2 DM'ye asıl olarak aşırı gıda alımı ve hareketsiz yaşam tarzı neden olduğundan farmakolojik olmayan müdahaleler ile yaşam tarzı değişikliği yapılması oluşabilecek semptomları önlemek için umut verici görülmektedir. Yaşam tarzı beslenme düzeninin değiştirilmesi, diyabetin her tipinde hayatidir. İnsülin enjeksiyonu Tip 1 DM için ana tedavi olmakla birlikte, Tip 2 DM için tek başına veya oral hipoglisemik ajanlarla beraber de kullanılabilir. Oral hipoglisemik ajanlar arasında; biguanidler, sülfonilüreler, tiyazolidindionlar, dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) inhibitörleri ve glukagon benzeri peptit 1 (GLP-1) analogları gibi ajanlar bulunmaktadır (S. Tan ve diğerleri, 2019).

Diabetes Mellitus'ta insülin tedavisi

Subkütan insülin uygulaması, insülin eksikliğinin belirgin olduğu Tip 1 DM hastalarında ana tedaviyi oluşturmaktadır. Tip 2 DM hastalarında ise oral antidiyabetik ajanların, glikoz ve HbA1c düzeylerini düzenlemede yetersiz kaldığı durumlarda, insülin tek başına veya oral antidiyabetik ajanlarla birlikte kullanılabilir. Subkütan insülin uygulaması her ne kadar başarılı bir tedavi yöntemi olsa da tedavide hasta uyuncu zayıftır ve bu yüzden kan glikoz seviyelerinin kontrolü yetersiz olmaktadır (S. Tan ve diğerleri, 2019).

Gebelerde ise 1-2 hafta içinde eğer glisemik hedefler gerçekleşmezse birincil ilaç tedavisi insülin tedavisi olmaktadır. Çünkü insülin plasentayı geçemediği için güvenli görülmektedir. En sık kullanılan insülin analogu insülin glarjin olsa da insülin detemir, insülin aspart gibi çeşitli insülin analogları da gebelikte kullanılmaktadır (McIntyre ve diğerleri, 2019)

Diabetes Mellitus tedavisinde mevcut subkütan insülin tedavisinde karşılaşılan zorluklardan, zayıf hasta uyuncudan dolayı insülinin özellikle oral yol başta olmak üzere bukkal, oküler, nazal, rektal ve pulmoner yollarla verilmesiyle ilgili çalışmalar yapılmaktadır (Zaric ve diğerleri, 2019)

Bukkal yol

İnsülin ağız boşluğuna verilmekte, absorpsiyon ağzın iç yüzeylerinde gerçekleşmekte ve insülin buradan sistemik dolaşıma geçmektedir. Bu uygulama yolunda proteolitik enzim aktivitesinin düşük olması, ağız içi dokuların yüksek vaskülerizasyonu, uygulamanın kolay olması ve emilim için geniş bir yüzey olması gibi üstünlükler mevcutken ağız mukozasında farklı alanlarda farklı doku geçirgenlikleri olması insülinin bukkal yoldan verilmesini sınırlandırmaktadır (Roy ve Bhattacharjee, 2020). Bir çalışmada Aleo vera ve insülinin bukkal kullanımı için film formülasyonu oluşturulmuş ve formülasyonun kan glikoz seviyelerini düşürmede başarılı olduğu bildirilmiştir (Zulfakar ve Chin, 2020).

Oküler yol

Oküler yol subkütan yola alternatif olarak düşünülse de oküler yoldan emilebilecek insülin miktarının az olması bu yolun kullanımını sınırlamaktadır, bu yüzden formülasyonlara emilim artırıcıların ilave edilmesi gerektiği düşünülmektedir (Olorunsola, Udoh, Ekott,

Alozie ve Davies, 2022). Kitosan ve tripolifosfatın kullanıldığı bir çalışmada nanopartiküller hazırlanmış ve oküler yoldan uygulanması araştırılmıştır. Ex vivo çalışmalarda nanopartiküler sistem içerisine hapsedilen insülinin normal insülin çözeltisine göre oküler geçirgenliğinin fazla olduğu ve oküler dokular için toksik olmadığı bildirilmiştir (Rathore, Mahor, Jain, Haque ve Kesharwani, 2020).

Nazal yol

Nazal yol, nazal mukozanın vasküleritesinin fazla olması ve insülinin ilk geçiş metabolizmasına uğramadan sistemik dolaşıma geçmesi sayesinde oldukça avantajlı olmasına rağmen burun içerisinde mukus tabakası ve epitel hücreleri gibi emilimi engelleyen birçok engel insülinin nazal yoldan verilmesini sınırlandırmaktadır (Srikanth, Nair ve Siddharth, 2020). İnsülinin nazal yoldan etkinliğini değerlendirmek için hücreye nüfuz eden peptitlerle (CPP) işlevlendirilmiş lipozom formülasyonu hazırlanan bir çalışmada gözlenen antihiperglisemik etki insülinin nazal yolla uygulanabileceğini göstermiştir (Von Zuben ve diğerleri, 2022).

Rektal yol

İnsülini rektal yol ile uygulamanın diyet, mide boşalma süresi, bağırsak motilitesi gibi faktörlerden etkilenmemesi avantaj oluştursa da insülinin rektal yolla biyoyararlanımı subkütan uygulamaya göre düşük olduğu ve bu yolun hasta uyuncunun zayıf olduğu ifade edilmektedir (El Maalouf, Capoccia ve Priefer, 2022). Tip 1 diyabet tedavisi için insülin yüklü hidrojel supozituarları hazırlanmış ve supozituarların rektal yoldan hayvanlara uygulanmasının belirgin bir hipoglisemik etki oluşturduğu bildirilmiştir (Xue ve diğerleri, 2018). Yapılan başka bir çalışmada ise insülinin vajinal ve rektal yoldan verilmesi için jel formülasyonlarının hazırlanması amaçlanmıştır. Taşıyıcı olarak kitosan ve penetrasyon artırıcı olarak da dimetil- β -siklodekstrin ve sodyum taurokolatın kullanıldığı bu çalışmada siklodekstrin türevi olan dimetil- β -siklodekstrinin insülinin rektal ve vajinal membranlardan penetrasyonunu artırmak için yararlı olabileceği bildirilmiştir (Değim ve diğerleri, 2005).

Pulmoner yol

İnsülinin inhaleler olarak vücuda verilmesiyle gözlenen öksürük gibi yan etkilerin subkütan yolla oluşan yan etkiler ile karşılaştırılabilir zorlukta olması nedeniyle kullanımı düşünülse de subkütan yolla elde edilen terapötik yanıtı elde etmek için daha yüksek dozda inhaleler insüline ihtiyaç duyulması insülinin bu yolla uygulanmasını sınırlandırmaktadır (Mohanty ve Das, 2017). Bir çalışmada insülin yüklü katı-lipit nanopartiküller vücuda inhalasyon yoluyla verilmiş ve nanopartiküller sürekli ve kontrollü salım göstermiştir. Böylece araştırmacılar insülinin pulmoner yoldan verilmesinin uygun olabileceğini bildirmişlerdir (Yadav ve Yadav, 2022).

İnsülinin oral yol ile verilmesiyle ilgili bilgiler daha sonra ayrıntılı olarak anlatılacaktır.

Oral antidiyabetikler ile tedavi

İnsülin salgılatıcı ilaçlar (Sülfonilüreler ve benzoik asit türevleri)

En eski oral antidiyabetik ilaç grubu olan sülfonilüreler, pankreas β hücrelerinde potasyum kanallarına bağlanarak, potasyum kanallarını inhibe eder. Oluşan membran polimerizasyonu kalsiyum kanallarının açılmasını dolayısıyla kalsiyum akışının artmasını sağlamaktadır. Hücre içine giren kalsiyum, depolanmış β hücrelerde depolanmış insülinin sekresyonunu sağlar. Tip 2 diyabetli hastalarda tek başına veya diğer oral antidiyabetiklerle beraber veya insülin ile beraber kullanılmaktadır (Costello, Nicolas ve Shivkumar, 2022).

Benzoik asit türevleri insülin sekresyonunu artırmakta ve hipoglisemi riski taşıyan hastalara önerilmektedir (Manu, Rogozea ve Cernea, 2021).

İnsülin direncini azaltmaya yönelik ilaçlar (Biguanidler ve tiazolidindion türevleri)

Biguanidler, kas ve yağ hücrelerini insüline duyarlı hale getirerek ve hepatik glikoz çıkışını inhibe ederek etki göstermektedirler (He ve diğerleri, 2015). Biguanid grubunda bulunan metformin, Tip 2 diyabetli hastalarda yaygın olarak reçete edilmekte ve tek başına veya kombine kullanımında güvenli ve etkili bulunmaktadır (R. Song, 2016).

Tiazolidindion türevleri (Pioglitazon) ise serbest yağ asidi birikimini azaltarak, enflamatuvar sitokinlerin azalmasını ve β hücre bütünlüğünün korunmasını sağlayarak insülin direncinin ve β hücre kaybının azalmasını sağlamaktadır (S. Patel ve diğerleri, 2021).

İnkretin mimetik ilaçlar (Glukagon Benzeri Peptid-1 reseptör agonistleri ve Dipeptidil peptidaz-4 inhibitörleri)

GLP-1 agonistleri glikoza bağımlı olarak glukagon sekresyonunu baskılayarak ve pankreasta insülin sekresyonunu artırarak kan glikoz seviyelerini düşürmektedir. Bu gruptaki ilaçların gastrointestinal yan etkileri mevcut olsa da bunlar metforminin etkili olmadığı ya da yetersiz geldiği hastalarda sık sık kullanılmaktadır (Kadrić, Ćesić ve Dujić, 2021).

DPP-4 inhibitörleri, glikoza bağımlı insülin sekresyonunu uyaran, glukagonu inhibe eden ve gastrik boşalmayı yavaşlatan GLP-1 hormonunun inaktivasyonunu önlemektedir. Tip 2 diyabetli kişilerde tek başına kullanılabilen DPP-4 inhibitörleri kişiler tarafından çok az hipoglisemi riskine neden olması sayesinde iyi bir şekilde tolere edilebilmektedir (Yaribeygi, Atkin ve Sahebkar, 2019).

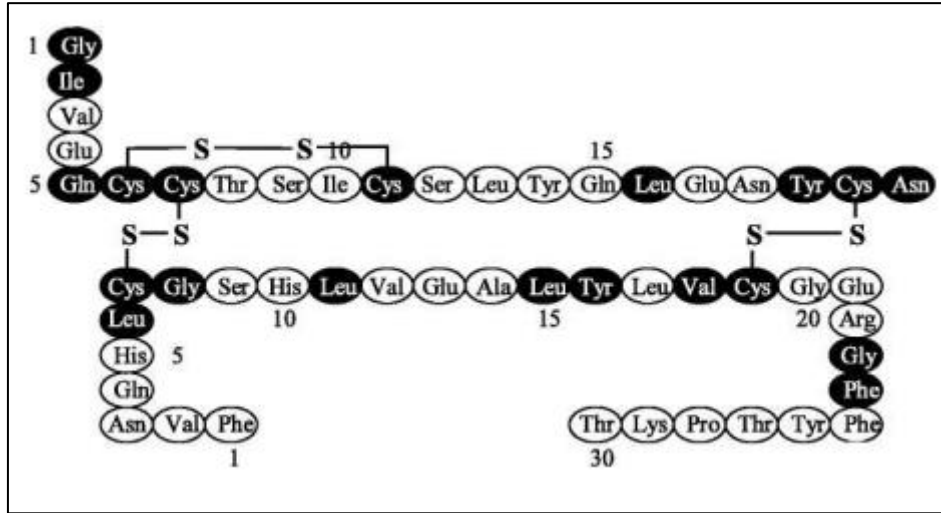
Glikoz emilimini yavaşlatan ilaçlar (α -glikozidaz inhibitörleri)

α -glikozidaz inhibitörleri hem tek başına hem de diğer ilaçlar ile kombine olarak kullanıldığında glikoz emilimini geciktirerek öğün sonrası kandaki glikoz miktarını azaltmaktadırlar. Bu gruptaki ilaçlar tip 2 diyabetli kişilerde diyabetin ilerleme riskini azaltırken hipertansiyonda ve kardiyovasküler vakalarda da azalma sağlamaktadır (Leroux-Stewart, Rabasa-Lhoret ve Chiasson, 2015).

2.2. İnsülin

İnsülin özellikle Diabetes Mellitus tedavisinde en etkili tedavi olarak kullanılan, kandaki glikoz seviyelerini düzenleyen başlıca hormondur. Pankreasın β hücrelerinde sentezlenen insülin hekzamer formundan biyolojik olarak aktif monomer formuna geçiş sırasında birçok konformasyonel varyasyon göstermektedir (Gorai ve Vashisth, 2022). İnsan metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir rolü olan bu hormon pankreasın Langerhans adacıklarındaki β hücrelerinde 51 aminoasitten oluşan anabolik bir protein olarak

salgılanmakta ve birbirine disülfid bağları ile bağlanan A ve B zincirlerinden oluşmaktadır. İnsülin, proinsülin olarak adlandırılan tek zincirli bir öncünün translokasyon ürünüdür (Weiss, Steiner ve Philipson, 2015). İnsülinin yapısı Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. İnsülinin A ve B zincirlerinin yapısı (Yılmaz ve Kadioglu, 2012)

İsmi Latince “ada” anlamına gelen insula kelimesinden türetilen insülin, Banting ve Best tarafından 1921-1922 yıllarında Toronto Üniversitesi’nde keşfedilmiştir. İnsülin temel olarak kandaki glikoz derişimini korumaktadır. İnsülin kandaki glikoz derişimi arttıkça kas, karaciğer ve yağ dokusundaki hücreler tarafından glikoz alımını arttırarak kandaki derişimi düşürmektedir. Fazla glikoz bu dokularda glikojene dönüştürülerek depolanır. Kandaki glikoz derişimi azaldığında ise bu dokularda oluşturulan glikojen glikoza dönüştürülmekte ve kana salınır. İnsülin ayrıca lipidlerin yağ hücreleri tarafından kandan alınmasını sağlayarak yağ asidi sentezini kolaylaştırmakta, DNA’nın kopyalanmasını ve protein sentezini artırarak aminoasit alımının düzenlenmesini sağlamakta ve lipoliz ve glukoneogenezi azaltmaktadır (K. Ahmad, 2014).

2.2.1. İnsülin analogları

İnsülinin sıklıkla hipoglisemiye neden olmasına sebep olan sınırlayıcı farmakokinetik özellikleri nedeniyle hipoglisemi oluşturma riski daha az olan, daha güvenli ve endojen insülin salgılanmasını daha iyi taklit eden insülin analogları geliştirilmiştir (Hirsch, 2005). İnsülin ilk kez 1921 yılında izole edildikten sonra 1940’ların sonuna doğru yavaş etkili bir preparat olan nötr protamin (NPH) geliştirilmiş ve 1977’de daha büyük miktarlarda insülin

üretimine olanak veren rekombinant DNA teknolojisi sayesinde insan insülini üretilmiştir. 1990’larda hızlı etkili insülin analogları ve 2000’li yılların başında ise uzun etkili insülin analogları piyasaya sürülmüştür (Tibaldi, 2014).

Hızlı etkili insülin analogları

Daha hızlı monomerik hale geçen yani daha az kararlı insülin hekzamerleri tasarlanarak insülinin subkütan uygulanmasından sonra daha hızlı etki göstermesi sağlanmıştır. Böylece öğünden kaynaklanan kanda glikoz artışı daha kısa sürede engellenebilmektedir. Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri’nde insülin lispro, insülin aspart ve insülin glulisin olmak üzere üç hızlı etkili insülin analogu kabul görmektedir (Mathieu, Gillard ve Benhalima, 2017).

İnsülin lispro

İnsülinin B zincirinde 28. ve 29. pozisyonlarda bulunan prolin ve lizinin yer değiştirilmesiyle oluşmaktadır. Bu değişiklik ile insülinin hekzamer yapısı kararsız hale gelerek dimer ve monomer yapısına ayrışması kolay hale gelmektedir. Böylece kandaki etkinliğini konvansiyonel insüline göre daha hızlı göstermektedir. Ayrıca daha az hipoglisemi riski yaratmakta ve glikoz hedeflerine daha iyi ulaşarak hastaların yaşam kalitesini artırmaktadır (Mathieu ve diğerleri, 2017). Yapılan bir çalışmada insülin lispronun gebelerde insan insülinine alternatif olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Edson, Bracco, Vambergue ve Koivisto, 2010). Enjeksiyon öncesi saklama koşullarının değerlendirildiği bir çalışmada ise insülin lispro 2-8 ve 21 °C’de 24 saat bekletilmiş ve salım profilleri karşılaştırılmıştır. Salım profillerinde anlamlı bir fark gözlenmemiş, bu durum da insülin lispronun sıcaklık değişimine karşı stabilitesini koruduğu hakkında bilgi vermiştir (Kerr, Wizemann, Senstius, Zacho ve Ampudia-Blasco, 2013).

İnsülin aspart

İnsülinin B zincirinde 28. pozisyonundaki prolinin yerine aspartik asitin yerleştirilmesi ile oluşturulmaktadır. Tip 1 diyabetli çocuk ve ergenlerden yapılan bir çalışmada insülin aspartın, yemekten önce veya sonra uygulanmasının etkinliğinde değişiklik yaratmadığı gözlenmiştir. Böylece insülin aspartın yemeklerden sonra uygulanmasının, insülin dozunun

tüketilen karbonhidrat miktarına uygun olacak şekilde ayarlanmasına avantaj sağladığı bildirilmiştir (Oiknine, Bernbaum ve Mooradian, 2005).

İnsülin glulisin

İnsülinin B zincirinin 3. pozisyonundaki asparajin yerine lizin, 29. pozisyonundaki lizin yerine glutamik asit yerleştirilmesiyle oluşturulmaktadır. İn vitro ve in vivo çalışmaların bir çoğu, insülin glulisinin insülin reseptörüne ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörüne regüler insan insüline benzer şekilde bağlandığını ama etkinliğini daha hızlı gösterdiğini kanıtlamıştır (Garnock-Jones ve Plosker, 2009).

Uzun etkili insülin analogları

Uzun etkili insülin analogları, fizyolojik koşullar altında çözünebilen çökelti veya çözünür oligomerler oluşturulması esasına dayanmaktadır. Analoglar, oluşan bu çökelti veya oligomerlerin aktif insülin monomerlerine yavaş yavaş dönüşmesi ve insülin etkisini yavaş yavaş ve uzun süre göstermesi için tasarlanmaktadır (Arai ve diğerleri, 2017). İnsülin glarjin ve insülin detemir klinik uygulamada kullanılmakta olup ve önemli ölçüde kan glikoz seviyelerini kontrol etme potansiyeline sahiptir (Pickup ve Renard, 2008)

İnsülin glarjin

İnsülin glarjin, Escherichia coli kullanılarak rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen ilk uzun etkili insülin analogudur. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından 2000 yılı nisan ayında, Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından ise aynı yıl Haziran ayında onay almıştır. Tip 1 ve Tip 2 diyabetli kişilerde yatmadan önce bir kez olmak üzere günde bir defa kullanımı uygun görülmektedir (F. Wang, Carabino ve Vergara, 2003).

İnsülin detemir

İnsülin detemir Saccharomyces cerevisiae kullanılarak rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen nötr, çözünür ve uzun etkili bir insülin analogudur. İnsülin detemiri insan insülininden ayıran özellik, B zincirinin 30. pozisyonundaki treoninin çıkarılmış olması ve B zincirinin 29. pozisyonundaki lizinin bir yağ asidi olan miristik asit ile açillendirilmiş olmasıdır (Keating, 2012). İnsülin detemirin insülin glarjine göre daha sık uygulanması ve

genelde daha yüksek dozda uygulanması gerekliliği insülin detemirin dezavantajını oluşturmaktadır (T. Zhang ve diğerleri, 2016).

Hazır karışım insülin analogları

Hazır karışım insülin analogu oluşturulmasındaki temel amaç tek bir formülasyonda hem hızlı etkiyi hem de orta etkiyi sağlayıp günlük gereken enjeksiyon sayısını azaltarak hasta uyuncunun artırılmasıdır. Bunun için de hazır karışım insülin analogları hızlı etkili insülin analogunun bir kısmı ve hızlı etkili insülin analogunun bir kısmının protamine edilip karıştırılması ile hazırlanmaktadır (Tibaldi, 2014).

2.2.2. Protein ve Peptit Yapılı İlaçların Oral Yoldan Verilmesi

Peptitler, aminoasitlerin amit bağlarıyla bağlanmasıyla proteinler ise peptitlerin üç boyutlu olarak katlanması ile oluşmaktadır. Peptitler ve proteinler, geleneksel ilaçlara kıyasla yüksek aktivite, düşük toksisite ve spesifik olmayan ilaç-ilaç etkileşimleri gibi avantajlar sağlamaktadır. Biyoteknoloji alanındaki gelişmeler proteinlerin, peptitlerin, hormonların ve aşılarda büyük ölçekli ve ekonomik bir şekilde üretilmesini sağlamıştır (Renukuntla, Vadlapudi, Patel, Boddu ve Mitra, 2013). Proteinlerin sekonder, tersiyer ve kuaterner yapıları arasındaki kovalent olmayan zayıf etkileşimler, proteinlerin stabilitesinin zayıf olmasına neden olmaktadır. Protein ve peptit yapılı ilaçlar uygulama bölgesinde ya da farmakolojik etki bölgesine gidene kadar enzimler ve proteazlar tarafından parçalanırlar. Böylece terapötik etkinlikleri azalır ve bu durum zayıf biyoyararlanıma ile sonuçlanır. Bu yüzden in vivo terapötik etki sağlamak için protein ve peptit yapısındaki terepötiklerin yüksek dozda ve sık uygulanması gerekebilir fakat yüksek doz ve sık uygulama da istenmeyen yan etkilere neden olabilmektedir. Ayrıca protein ve peptitler, hazırlanmaları sırasında çevresel faktörlerden (pH, iyonik kuvvet, yüksek basınç, sıcaklık, metaller) ve üretim proseslerinden (sterilizasyon, liyofilizasyon) etkilenebilmekte ve biyolojik aktiviteleri azalabilmektedir (M. Tan, Choong ve Dass, 2010).

Protein ve peptitlerin vücutta terapötik etkilerini gösterebilmesi için vücuda paranteral yol ile verilmeleri gereklidir. Fakat tekrarlı ve uzun süreli intramüsküler, intravenöz ve subkütan ilaç uygulanması zayıf hasta uyuncuna sebep olmaktadır. Bu yüzden protein ve peptitlerin paranteral uygulamaya alternatif veriliş yolları geniş bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Bu

alternatif yollar arasında oral, nazal, bukkal, vajinal, rektal, transdermal ve pulmoner uygulama yer almaktadır (Choonara ve diğerleri, 2014). Bunların içerisinde oral yol hasta uyuncunun yüksek olması ve hastanın ilacı kendi kendine alabilmesi nedeniyle oldukça avantajlı görülmektedir. Protein ve peptit yapılı terapötikler oral yoldan verildiğinde enzimatik bozunma ve zayıf bağırsak penetrasyonu nedeniyle oral biyoyararlanımları oldukça düşüktür. Bu tür terapötiklerin oral biyoyararlanımını artırmak için moleküllerin fizikokimyasal özelliklerini değiştirmek ve özel ilaç taşıyıcı sistemler geliştirmekten formülasyonlara ekşiyanların (absorpsiyon artırıcılar, enzim inhibitörleri, stabilite artırıcılar) eklenmesine kadar birçok yaklaşım mevcuttur (Bruno, Miller ve Lim, 2013; Hamman, Enslin ve Kotzé, 2005).

2.2.3. İnsülinin oral yoldan verilmesi

Diyabetli kişilerde insülininin yanı sıra yemeklerden sonra ve gece boyunca kan glikoz seviyelerini kontrol etmek amacıyla insülin analogları ve daha birçok kısa ve uzun etkili insülin formülasyonları insülinin oral yoldan verilmesi için tasarlanmıştır (Muntoni ve diğerleri, 2019). Subkütan yoldan insülin iletimi insülinin en yaygın olarak kullanıldığı yol olmasına rağmen tekrarlayan enjeksiyonlar, enjeksiyon yerinde ağrı ve deri altı yağ dokusunda kayıp oluşturması nedeniyle hasta uyuncunu olumsuz olarak etkilemekte ve esasen pankreastan salgılanan insülini taklit edememektedir. Oral insülin iletimi, özellikle pankreastan salgılanan insülini taklit edebildiği için oldukça önemlidir ve bu yüzden alternatif veriliş yolları arasında oral yol oldukça önemli bir yere sahiptir (Iyer ve diğerleri, 2022).

Oral yol sürekli ve kontrol edilebilir uygulama imkanı sunması, uygulanmasının kolay olması ve dolayısıyla iyi hasta uyuncu sağlaması sayesinde en çok dikkat çeken ilaç uygulama yolları arasındadır. Ayrıca oral yolun 300 m²'yi aşan, viskoz bir mukozal tabaka ile çevrili geniş bir yüzey alanına sahip olması ve ince bağırsakta özellikle mikrokat hücreleri olmak üzere çeşitli enterositlerin fazla olması sayesinde emilimin yüksek olması oral yolun diğer üstünlüklerindendir. Fakat oral yoldan emilim diğer yollara göre daha karmaşıktır. Oral yoldan uygulanan ilaçlar; transselüler, paraselüler, taşıyıcı aracılı transselüler ve kolaylaştırılmış taşıma gibi mekanizmalarla emilebilmektedir (Homayun, Lin ve Choi, 2019).

İnsülinin oral yoldan verilmesi, hasta açısından en kabul edilebilir, en güvenli ve en uygun yol olması, subkütan yol ile uygulandığında uygulama yerinde komplikasyona neden olmaması ve hipoglisemiye önlemesi gibi noktalarda avantajlı olmaktadır. Fakat insülin oral yoldan verildiğinde biyoyararlanımının insülinin yüksek molekül ağırlığı, hidrofilik yapısı, gastrointestinal sistemde zayıf stabilitesi ve proteazlar tarafından hidrolize karşı dayanıksız olması nedeniyle %2'den az olarak bildirilmektedir (M. Wang ve diğerleri, 2022). Ayrıca insülin oral yoldan verildiğinde gastrointestinal sistemde kimyasal, enzimatik ve fiziksel bariyerlerle karşılaşmaktadır (Hu ve Luo, 2018).

Oral yoldan verildiğinde insülinin karşılaşabileceği engeller

İnsülin oral yoldan verildiğinde insülinin karşılaştığı kimyasal, enzimatik ve fiziksel engeller insülinin biyoyararlanımını sınırlandırmakta ve oral yoldan verilmesini engellemektedir (Seyam ve diğerleri, 2020).

Kimyasal engeller

İnsülin gibi birçok protein yapılı ilaç gastrointestinal kanaldaki pH değişimlerine duyarlıdır. Mide pH'sı kuvvetli asidik, bağırsak pH'sı ise hafif baziktir, insülin gibi protein yapılı ilaçlar bu pH değişikliklerine bağlı olarak oksidasyon, deamidasyon ve hidrolize uğrayabilmekte ve etkinliklerinde kayıp oluşabilmektedir (M.Chen, Sonaje, Chen ve Sung, 2011).

Enzimatik engeller

Gastrointestinal sistem insülin gibi protein ve peptit yapılı terapötikleri parçalayabilen ve onları inaktive edebilen pepsin, tripsin, kimotripsin, elastaz ve karboksipeptidaz gibi enzimler bakımından oldukça zengindir. İnsülin ağırlıklı olarak mukus tabakasında ve bağırsak lümeninde tripsin ve karboksipeptidazlar tarafından parçalanmaktadır (Pang, Huang, Xu, Chen ve Han, 2022). Yumurta akından elde edilen Ovomukoid adı verilen enzim inhibitörünün in vitro çalışmalarla insülini tripsin ve kimotripsine karşı yüksek oranda koruduğu bildirilmiştir (C. Wong, Martinez ve Dass, 2016).

Fiziksel engeller

Gastrointestinal sistemde sürekli salgılanan mukus, negatif yükünden dolayı pozitif yüklü ilaç etkin maddeleri ve proteinlerle elektrostatik etkileşime girmektedir. Bağırsak epiteli ise molekül ağırlığı 700 daltondan az lipofilik etkin maddelerin pasif difüzyonla geçişine izin vermekte ve bu yüzden insülinin transselüler pasif difüzyonla geçişini sınırlandırmaktadır (Gedawy, Martinez, Al-Salami ve Dass, 2018). Safra tuzları, trisodyum sitrat gibi emilim artırıcılar ve bağırsak epitelindeki sıkı bağlantıların açılmasına yardımcı olan kitosan vb. polimerler kullanılarak emilimin artırılması sağlanmaktadır (Alai ve diğerleri, 2015).

2.2.4. İnsülinin oral yoldan verilmesi ile ilgili yaklaşımlar

İnsülin zayıf bağırsak geçirgenliği, yüksek molekül ağırlığı ve hidrofilik yapısı nedeniyle gastrointestinal sistemde birçok engelden etkilenmektedir, insülinin bu engellerin üstesinden gelmesi ve oral yoldan uygulanan insülinin biyoyararlanımını iyileştirilmesi için birçok yaklaşım bulunmaktadır. Formülasyona enzim inhibitörleri ve absorpsiyon artırıcıların eklenmesi, enterik kaplama yapılması ve mikropartiküler, nanopartiküler veya veziküler ilaç taşıma sistemleri geliştirilmesi gibi yaklaşımlar mevcuttur (Mutlu-Agardan ve Han, 2021).

Formülasyonlara enzim inhibitörleri eklenmesi

Gastrointestinal sistemde insülini hedef alan enzimleri inhibe etmek amacıyla kamostat mesilat, kromostatin, basitrasin ve sodyum glikolat gibi enzim inhibitörleri kullanılmaktadır. Enzim inhibitörlerin ince bağırsakta enzim aktivitesinin çok daha fazla olmasından dolayı kalın bağırsakta daha etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca enzim inhibitörlerinin uzun süreler kullanılması bu inhibitörlerin hedef dışı enzimleri de inhibe edebileceği için bir dezavantaj oluşturduğu bildirilmiştir (El Maalouf ve diğerleri, 2022).

Formülasyonlara absorpsiyon artırıcılar eklenmesi

Absorpsiyon artırıcılar, lipit çift tabakası yapısında değişikliğe neden olabilen ve transselüler ve paraselüler absorpsiyonu iyileştirebilen maddelerdir. Absorpsiyon artırıcıların işlevlerini geri dönüşümlü olarak gerçekleştirmesi, toksik olmaması, farmakolojik etkinliğinin bulunmaması, alerjik olmaması ve emilim bölgesinde bulunduğu hızlı bir şekilde artırması istenmektedir (Macedo ve diğerleri, 2020). Yapılan bir çalışmada

insülininin absorpsiyon artırıcı olan L-arjinin ile formülasyonu geliştirilmiş ve oral yoldan verildikten sonra emilimi değerlendirilmiştir. Sonuçlar L-arjininin bağırsaklarda emilimi artırdığı ve bunu yaparken hücre zarı bütünlüğünde ve paraselüler sıkı bağlantı noktaları üzerinde herhangi bir istenmeyen etki oluşturmadığı bildirilmiştir (Kamei, Khafagy, Hirose ve Takeda-Morishita, 2017). Başka bir çalışmada ise absorpsiyon artırıcı sodyum taurokolat kullanılarak insülinin lipozom formülasyonu hazırlanmış, bu formülasyonların Caco-2 hücre tek tabakalarında penetrasyon özellikleri incelenmiştir. Çalışmada absorpsiyon artırıcı kullanılmasının insülin benzeri proteinlerin geçirgenliğini, hücre sıkı bağlantılarını hücreye hasar vermeden açarak artıracağı bildirilmiştir (Degim, Ünal, Eşsiz ve Abbasoglu, 2004).

Enterik kaplama yapılması

Midenin aşırı asidik koşulları enkapsüle olan protein yapılı ilaç moleküllerini parçalayabilmekte ve oral dozlamadan sonra istenen terapötik etkiyi gösterememesine neden olabilmektedir. Buna çözüm oluşturmak için metakrilik asit-metarilat türevleri gibi enterik kaplama polimerleri kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin ve mikrokürelerin enterik kaplanması için sprey kurutma, nanopresipitasyon veya emülsiyon-çözücü buharlaştırma teknikleri kullanılmaktadır. Son zamanlarda bu geleneksel yöntemlere alternatif olarak flaş nanokompleksasyon oluşumu ile enterik kaplama popülerleşmiştir. Bu yaklaşımda partikül kaplanması iki veya daha fazla zıt elektriksel yüklü polielektrolitin sulu çözeltilerinin türbülanslı olarak karıştırılmasıyla gerçekleşmektedir. Bu yöntemle oluşturulan enterik kaplı partiküller daha tekdüze partikül büyüklüğüne ve daha yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip olmaktadır ve bu işlem daha güvenilir olarak görülmektedir (Sun ve diğerleri, 2018) Yapılan bir çalışmada kendi kendine nanoemülsifiye olan ilaç taşıyıcı sistem hazırlanarak, Eudragit® L100 ile kaplı kapsüllere koyularak insülinin oral yoldan verilmesi için kullanılmış ve bu kombinasyonun insülinin oral absorpsiyonunu artırdığı bildirilmiştir (P. Li, Tan, Prestidge, Nielsen ve Müllertz, 2014). Başka bir çalışmada ise aljinat nanopartikülleri sert jelatin kapsüllere konulmuş ve kapsüller Eudragit L 100-55 ile enterik kaplanmıştır. Araştırmacılar tarafından, hazırlanan formülasyonun oral insülin çözeltisine göre 8.saatte sıçanların kan glikoz seviyesini önemli derecede azalttığı bildirilmiştir (Arpaç ve diğerleri, 2022).

2.2.5. İnsülinin oral yoldan verilmesinde ilaç taşıyıcı sistemler

İnsülinin gastrointestinal sistemdeki engelleri aşabilmesini hedefleyen yaklaşımlardan sonra araştırmalar insülinin stabilitesini korumak ve biyoyararlanımını artırmak amacıyla insülinin nanopartiküller, mikropartiküller ve hidrojeller gibi uygun bir ilaç taşıyıcı sisteme enkapsüle edilmesi üzerinde yoğunlaşmaktadır. İlaç taşıyıcı sistemin insülini agregasyondan ve enzimatik parçalanmadan koruması, Emilimi artırmak için insülinin bağırsakta tutulma süresini artırması ve insülinin epitel hücrelerden taşınmasını kolaylaştırması beklenmektedir (T. Wong, 2010). Protein ve peptit yapılı terapötiklerin oral yoldan başarılı bir şekilde verilebilmesi için ilaç taşıyıcı sistemin partikül boyutu, zeta potansiyel, enkapsülasyon etkinliği ve salım kinetiği gibi birçok faktör göz önüne alınmalıdır (C. Wong ve diğerleri, 2018a).

Mikropartiküller

Uygun polimerler ile formüle edildiklerinde mikropartiküller, protein ve peptitlerin stabilitesini sağlamak, kontrollü salım sağlamak ve gastrointestinal absorpsiyonu için artmış yüzey/hacim oranı sağlamak için uygun ilaç taşıyıcı sistemler olarak görülmektedir (Singh, Hemant, Ram ve Shivakumar, 2010). İdeal bir mikropartiküler taşıyıcı sisteminin insülin enkapsülasyonunun yüksek olması, biyoyumlu olması ve enkapsüle insülinin kontrollü salımına izin vermesi beklenmektedir. Ayrıca mikropartiküller, enterik polimerler ile formüle edildiklerinde yüklenen etkin maddeyi korumakta ve gastrointestinal sistemdeki stabilitesini artırarak biyoyararlanımı iyileştirmektedirler (D'Souza, Bhowmik, Uddin, Oettinger ve D'Souza, 2015).

Yapılan bir çalışmada müsin ve sodyum aljinat kullanılarak insülin yüklü mikropartiküller hazırlanmış ve mikropartiküller sert jelatin kapsüllere konulmuştur. Araştırmacılar insülinin polimerler ile kovalent olmayan kompleksler oluşturabileceğini ve kompleks oluşumunun insülinin mikropartiküller içerisindeki stabilitesine katkıda bulunacağını bildirmişlerdir. Ayrıca insülin yüklü mikropartiküllerin oral uygulanmasından 5 saat sonraki kan glikoz seviyelerindeki düşüşün insülin çözeltisinin subkütan verildikten sonraki kan glikoz seviyelerindeki düşüşe eşdeğer olduğu bildirilmiş ve diğer tüm çalışmalarla birlikte mikropartiküllerin insülinin oral yoldan verilebilmesi için iyi adaylar olacağı düşünülmüştür (Builders ve diğerleri, 2008).

İnsülinin polisakkarit jellerde mikroküreler şeklinde enkapsüle edilmesi oral ilaç taşıyıcı sistem olarak araştırılmıştır. İnsülinin mikroenkapsülasyonunun insülini midede bozulmaya karşı koruma ve salımın hedeflendirilmesi gibi birçok avantajı bulunmaktadır (Martínez-López ve diğerleri, 2019).

Bir çalışmada fitik asit ile iyonik çapraz bağlanma yoluyla kitosan bazlı insülin yüklü mikroküreler geliştirilmiş ve mikro kürelerin yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğu, mide sıvısında ani bir salım oluşturmadığı, bağırsak ortamında sürekli salım gösterdiği, biyouyumlu olduğu ve Caco-2 hücrelerinde insülinin bağırsak geçirgenliğini artırdığı bildirilmiştir (J. Kim ve diğerleri, 2020).

Hidrojeller

Hidrojeller, terapötik ajanlar ve proteinler için taşıyıcı sistem olarak kullanılabilen üç boyutlu polimerik ağlardır. Hidrojeller, biyolojik sıvıları veya fazlaca miktar suyu absorbe edebilme kabiliyetine sahip olmaları ve biyouyumlu olmaları sayesinde kontrollü salım sistemlerin tasarımı için kullanılabilir (Cikrikci, Mert ve Oztop, 2018). İnsülini midenin asidik ortamında enzimatik bozunmadan koruyan ve bağırsakta etkili bir şekilde salan polimerik hidrojeller insülinin oral yoldan verilebilmesi için araştırılan sistemlerden biridir. Bu sistemin en büyük avantajlarından biri vücudun değişen pH koşulları altında hidrojinin şişme mekanizmasıyla insülinin salımını kontrol edebilmesidir (Chaturvedi, Ganguly, Nadagouda ve Aminabhavi, 2013).

Yapılan bir çalışmada pH duyarlı şişme yetenekleri olan, tekdüze gözenek dağılımına sahip insülin yüklü hidrojeller geliştirilmiş ve hidrojeller farklı pH ve iyonik kuvvete duyarlı şişme davranışları sergilemişlerdir. İn vitro salım çalışmaları hidrojellerden insülin salımının asidik koşullarda oldukça az olduğunu ve salımın nötr ortamlarda önemli ölçüde arttığını göstererek sistemin pH duyarlılığını kanıtlamıştır (S. Li, Qin, Chen, Wang ve Zeng, 2021).

Lipozomlar

Lipozomlar, bir veya daha fazla fosfolipit çift tabakadan oluşan küresel veziküllerdir. Lipozomlar, ilaç moleküllerini ya hidrofilik çekirdek de ya da hidrofobik fosfolipit çift tabakada enkapsüle edebilmekte ayrıca ilaç moleküllerini vezikülün yüzeyine

bağlayabilmektedir (C. Wong, Al-Salami ve Dass, 2018b). Lipozomların biyouyumlu olma, biyomembranlara benzerlik gösterme ve çözünürlüğü az olan etkin maddelerin çözünürlüğü artırmak için safra tuzları ile misel yapıları oluşturabilme gibi pek çok avantajı bulunmaktadır. Lipozomlar ile ilgili temel problem gastrointestinal koşullardaki stabiliteleridir. Lipozomların gastrointestinal sistemdeki stabilitelerini artırmak için uygun lipit bileşenlerinin seçilmesi, polimer kaplama yapılması, lipozomal yapılara stabilize edicilerin eklenmesi, çift lipozomların ve prolipozomların hazırlanması gibi pek çok yaklaşım bulunmaktadır (Daeihamed, Dadashzadeh, Haeri ve Faghieh Akhlaghi, 2017).

Yapılan bir çalışmada insülinin oral yoldan verilebilmesi için yüksek geçiş sıcaklığına sahip fosfolipitlerin kullanıldığı folik asit ile hedeflendirilen lipozom formülasyonu tasarlanmıştır. Sonuçlara göre stabilitenin iyileştirildiği ve lipozomların folik asit ile hedeflendirilmesinin bağırsak epiteli boyunca absorpsiyona katkı sağladığı ve sonuç olarak oral biyoyararlanımı artırdığı bildirilmiştir (Yazdi ve diğerleri, 2020).

Tüm bu ilaç taşıyıcı sistemlerin yanı sıra pek çok ilaç taşıyıcı sistem insülinin oral yoldan verilmesi amacıyla araştırılmıştır. Örneğin, yapılan bir çalışmada insülinin oral yoldan verilebilmesi için mikroemülsiyon formülasyonu geliştirilmiştir. Çalışmada sıçanlara mikroemülsiyonların oral yoldan uygulanmasından sonra gözlenen plazma glikoz ve insülin seviyelerinin insülin çözeltisine göre önemli ölçüde farklı olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar mikroemülsiyon formülasyonunun insülini gastrointestinal sistemde enzimatik bozunmadan koruyacağını ve formülasyonun insülinin oral yoldan verilmesi için uygun bir taşıyıcı sistem olduğunu bildirmişlerdir (Cilek, Celebi, Tırnaksız ve Tay, 2005). Başka bir çalışmada ise karbon kuantum noktalarının insülinin oral yoldan verilmesi için kullanılıp kullanılamayacağı araştırılmak istenmiştir. İn vitro çalışmalarda hazırlanan karbon kuantum noktalarının membranlara hızlı bir şekilde nüfuz ettiği ve in vivo çalışmalarda ise düşük kan glikoz seviyeleri gözlenmiştir (Camlik ve diğerleri, 2022)

2.2.6. İnsülinin oral yoldan verilmesinde nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler

Biyouyumlu, stabil ve toksik olmayan polimerler ile hazırlanan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler bağırsak epiteli boyunca ilaç molekülü taşınmasını kolaylaştırmakta ve peptit/protein yapısındaki molekülleri gastrointestinal sistemde hidrolizden ve enzimatik bozunmadan koruyabilmektedir. Bu nedenle nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler

makromoleküllerin oral yoldan verilebilmesi için umut verici olarak görülmektedir (Ismail ve Csoka, 2017).

İnsülinin oral yoldan verilmesinde nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin,

- Asidik mide ve bağırsak pH'sına karşı dirençli olması,
- İnsülini gastrointestinal sistemde enzimatik parçalanmaya karşı koruması,
- İnsülinin bağırsakta kalma süresini uzatması,
- Endojen insülini taklit edebilmesi,
- Epitel hücrelerden absorpsiyonundan sonra kan dolaşımına yapısal olarak bozulmamış biyolojik olarak aktif insülin verebilmesi,
- Sıkı bağlantıları geri dönüşümlü olarak gevşeterek ya da transselüler emilim için spesifik gastrointestinal reseptörleri hedefleyerek gastrointestinal sistemde geçirgenliği ve insülin emilimini artırması,
- İnsülin yükleme kapasitesinin fazla olması,
- Güvenli olması,
- Biyouyumlu olması ve
- Uygun maliyetli olması istenmektedir (C. Wong, Al-Salami ve Dass, 2017).

Nanopartiküller doğal ya da sentetik polimerler ile çeşitli yöntemlerle hazırlanabilmektedir. İnsülinin oral yoldan verilmesi için en çok kullanılan doğal polimerlerin başında kitosan, dekstran, aljinat ve kazein gelmektedir. Bunlar hidrofilik yapıda, toksik olmayan, biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerdir. Biyouyumlu olmaları ve biyoparçalanabilir olmaları nedeniyle oral insülin taşınmasında kullanılan sentetik polimerlerin bazıları ise poli ϵ -kaprolakton (PCL), poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve poli (laktik asi) (PLA)'dır (Bahman ve diğerleri, 2019). Polimerik nanopartiküller, sıcaklık ve pH gibi çevresel uyaranlara bağlı olarak yapılarında enkapsüle ettikleri ilaç moleküllerini salmak üzere formüle edilebilmektedir. Ayrıca nanopartiküller bölgeye özgü ilaç taşınması için hedefleyici ligand ile de tasarlanabilmektedir (Seyam ve diğerleri, 2020). Yapılan bir çalışmada pH bağımlı insülin salımı sağlamak için poliüretan-aljinat nanopartikülleri, sodyum aljinatın kalsiyum klorür ile çapraz bağlanmasıyla hazırlanmıştır. pH 1,2'deki salım çalışmalarında nanopartiküllerin insülini enzimatik bozunmaya karşı koruduğu ve fosfat tamponundaki salım çalışmalarında ise nanopartiküllerin insülinin 8 saate kadar kontrollü salımını sağladığı bildirilmiştir (Bhattacharyya, Mukherjee, Mishra ve Kundu, 2016). Başka

bir çalışmada ise folik asit ile modifiye edilmiş pektin nanopartikülleri geliştirilmiştir ve hedeflendirme ligandı olan folik asidin insülinin transepitelyal taşınmasına katkı sağladığı bildirilmiştir (F. Zhang ve diğerleri, 2022)

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin bağırsak mukozası boyunca insülinin paraselüler ve transselüler taşınmasını teşvik etmesi istenmektedir (M. Song ve diğerleri, 2018). Yapılan bir çalışmada deoksikolik asit ve hyaluronik asit ile modifiye edilmiş insülin yüklü katmanlı hidroksit nanopartiküller geliştirilmiştir. Nanopartiküllerin hücre sıkı bağlantılarının açılmasını indükleyerek insülinin paraselüler yol ile taşındığı ve emiliminin iyileştirildiği bildirilmiştir (Huang ve diğerleri, 2021).

İnsülinin oral yoldan verilmesinde nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem tasarımı

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarımının temel amacı partikül büyüklüğünü, yüzey alanını ve yüzey özelliklerini kontrol etmektir. Bu özellikler kontrol edildiğinde belli bir miktarda ilaç molekülü taşıyan nanopartiküller yüklenen ilaç molekülünü kontrollü olarak salarak hedeflenen farmakolojik aktiviteyi sağlamaktadır (Hong ve diğerleri, 2020).

Partikül büyüklüğü

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemin partikül büyüklüğünün 100-1000 nm arasında olması gerekmektedir. Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü fiziksel engelleri aşma ve hedef bölgeye ulaşma yeteneklerini etkilemektedir (Mansoor, Kondiah, Choonara ve Pillay, 2019). Küçük partikül büyüklüğüne sahip nanopartiküller, ince bağırsak ve kolonda hücresel alımı ve bağırsak epiteli boyunca permeabilityyi sağlamak için uygun görülmektedir (C. Wong, Luna, Martinez, Al-Salami ve Dass, 2019).

Partikül büyüklüğü ayrıca nanopartiküllerin insülin yükleme kapasitesini, insülinin salım performansını ve in vivo etkinliğini de etkilemektedir. Nanopartiküllerin, mikropartiküllerden daha yüksek hücresel alım sağladığı bilinmektedir (Alai ve diğerleri, 2015).

Polidispersite indeksi

Polidispersite indeksi partikül büyüklüğü dağılımını temsil etmektedir ve 0 ile 1 arasında bir değere sahiptir. Sıfıra yakın değerler homojen bir dağılımı gösterirken, 0,5'den büyük polidispersite indeksleri ise heterojenliği göstermektedir (M.R. Avadi ve diğerleri, 2010). Kitosan ve türevleri kullanılarak insülin yüklü nanopartiküller hazırlanan bir çalışmada kitosan çözeltisi pH'sının ve kitosan tipinin değişmesiyle polidispersite indeksinin değiştiği bildirilmiştir (Mahjub, Dorkoosh, Amini, Khoshayand ve Rafiee-Tehrani, 2011).

Yüzey Özellikleri

Nanopartiküllerin yüzey özellikleri, mukus ve epitel hücrelere penetrasyon yeteneklerini belirlemektedir. Örneğin nötr veya negatif yüzey yüküne sahip hidrofilik nanopartiküller negatif yüklü mukusa yapışmazlar. Polietilen glikol ile kaplanmış nanopartiküllerin bağırsak epitel hücrelerine düşük afinite gösterdiği ve bu durumun zayıf epitel alımla sonuçlandığı bildirilmiştir (J. Li ve diğerleri., 2022). Kitosan gibi pozitif yüklü nanopartiküller, negatif yüklü epitel hücrelere yüksek afinite göstermektedir (Asal, Shoueir, El-Hagrasy ve Toson, 2022).

Nanopartiküllerin taşınmasını iyileştirmek için nanopartikül yüzeyi fonksiyonlanabilmektedir. Fonksiyonlama işlemi kitosan-metal (demir veya çinko) arasındaki organometalik etkileşimler ile gerçekleşebilmektedir (De Marchi ve diğerleri, 2022).

2.3. Çalışmada Kullanılan Etken Madde ve Polimer

2.3.1. İnsan insülini (Humulin®-R Flakon)

Çalışmada insülin kaynağı olarak Lily firmasına ait Humulin®-R flakon ticari preparatı kullanıldı (Resim 2.1). Flakon her 1 mL'de 100 ünite (IU) insan insülini içermektedir. Humulin®-R, 1000 IU insan insülinine eşdeğer 10 mL çözelti içermektedir. 1 IU ise 34,70 µg'a eşdeğerdir. Buna göre hesaplama yapılırsa bir flakonda 34700 µg yani 34,7 mg insan insülini bulunmaktadır.



Resim 2.1. Humulin®-R flakon ticari preparatı

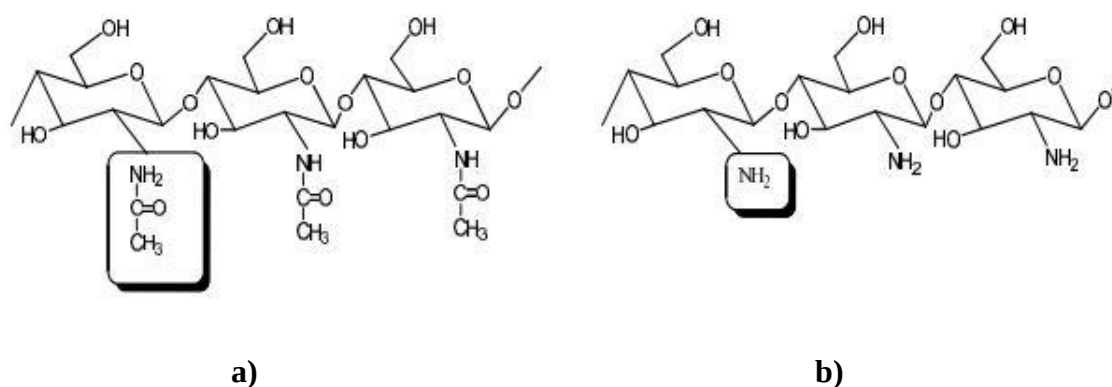
Humulin®-R normal glikoz seviyesinin korunması için insüline gereksinim duyan Diabetes Mellitus hastalarının tedavisinde endikedir. Preparat yardımcı madde olarak metakrezol (25 mg), gliserol, enjeksiyonluk su, hidroklorik asit (HCl) ve/veya sodyum hidroksit (NaOH) (pH ayarlanması için) içermektedir. Raf ömrü 36 ay olan Humulin®-R kullanılmadan önce 2-8 °C arasında buzdolabında saklanabilirken flakon açıldıktan sonra 30°C altında 28 gün etkisini devam ettirebilmektedir. Ayrıca Humulin®-R dondurulmamalı, aşırı sıcak ve direkt güneş ışığı altında bırakılmamalıdır.

İnsülin, izoelektrik noktası 5.3 ve molekül ağırlığı 5.8 kDa olan hidrofilik bir proteindir (Panigrahy ve Kumar, 2022). İnsülinin stabilitesi pH, derişim ve iyonların varlığından etkilenebilmektedir. Çözeltide insülin monomerleri, dimerleri ve heksamerleri bir arada bulunmaktadır. Örneğin yüksek insülin derişimlerinde (>5 mg/mL), insülin, insülin monomerlerinin hidrofobik etkileşimi yoluyla dimer ya da heksamer yapıları oluşturarak pH 7,4'de stabilitesini korurken, düşük insülin derişimlerinde (<100 µg/mL) insülin monomer yapısında bulunur. Düşük insülin derişimlerinde insülin monomerleri kısmi açılmaya uğrar ve bu monomerler stabiliteyi olumsuz yönde etkileyecek fibriller oluşturmaktadır. Çinko varlığında ve pH 4-8 aralığında ise dimerler birleşerek heksamerleri oluşturur böylece

insülin stabilitesi artırılır (C. Wong ve diğerleri, 2016). Rekombinant DNA teknikleri veya domuz insülininin enzimatik modifikasyonu ile insan insülini üretilebilmektedir. Domuz insülininin ve insan insülininin subkütan yolla uygulanmasını takiben hipoglisemik aktivitesinde absorpsiyon farklılıklarına dayandırılan klinik öneme sahip olmayan hafif farklar bulunmaktadır (Brogden ve Heel, 1987).

2.3.2. Kitosan

Kitin, ilk olarak 1811 yılında Henri Braconnot tarafından mantarlar üzerine araştırma yapılırken keşfedilmiştir. 1859 yılında Prof. C. Rouget kitinin alkalizasyonundan sonra kitinden farklı olarak asitlerde çözünen bir maddeyi keşfetmiş ve Hoppe Seiler deasetillenmiş kitine “kitosan” adını vermiştir (Divya ve Jisha, 2018). Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı Şekil 2.2’de gösterilmiştir (Çankaya ve Sökmen, 2016). Kitosan, kabuklu canlıların dış iskeletinde bulunan kitin adı verilen polisakkaritin deasetilasyonu ile elde edilen bir aminopolisakkarittir. N-asetil-D-glukozamin ve D-glukozaminlerin β -(1-4)-glikozidik bağıyla bağlanmasıyla oluşmaktadır. Polimer zincirleri arasındaki moleküller arası güçlü H bağları nedeniyle suda çözünmeyen bu polimer pH’nın 6,5’den küçük olduğu asitleştirilmiş sulu çözeltilerde çözünmektedir (Meneguın ve diğerleri, 2021) (Herdiana, Wathoni, Shamsuddin ve Muchtaridi, 2021). Kitosanının çözünürlüğü deasetilasyon derecesine de bağlı olarak değişmektedir, kitosanın deasetilasyon derecesi $\leq$ %40 olduğunda kitosan pH 9’a kadar sulu çözeltilerde çözünürken deasetilasyon derecesi $\geq$ %80 olduğunda pH 6,5’den küçük olan asidik çözeltilerde çözünebilmektedir (Choi, Nam ve Nah, 2016). Kitosanın bu dezavantajı kitosanın karboksimetilasyon ile kimyasal modifikasyonu ile aşılabilmektedir. Bu modifikasyon işlemi kitosanın sulu ve alkali ortamdaki çözünürlüğünün yanı sıra aktivitesini de iyileştirmektedir (El-Dakroury, Zewail ve Amin, 2022).



Şekil 2.2. a) kitinin kimyasal yapısı b) kitosanın kimyasal yapısı (Çankaya ve Sökmen, 2016)

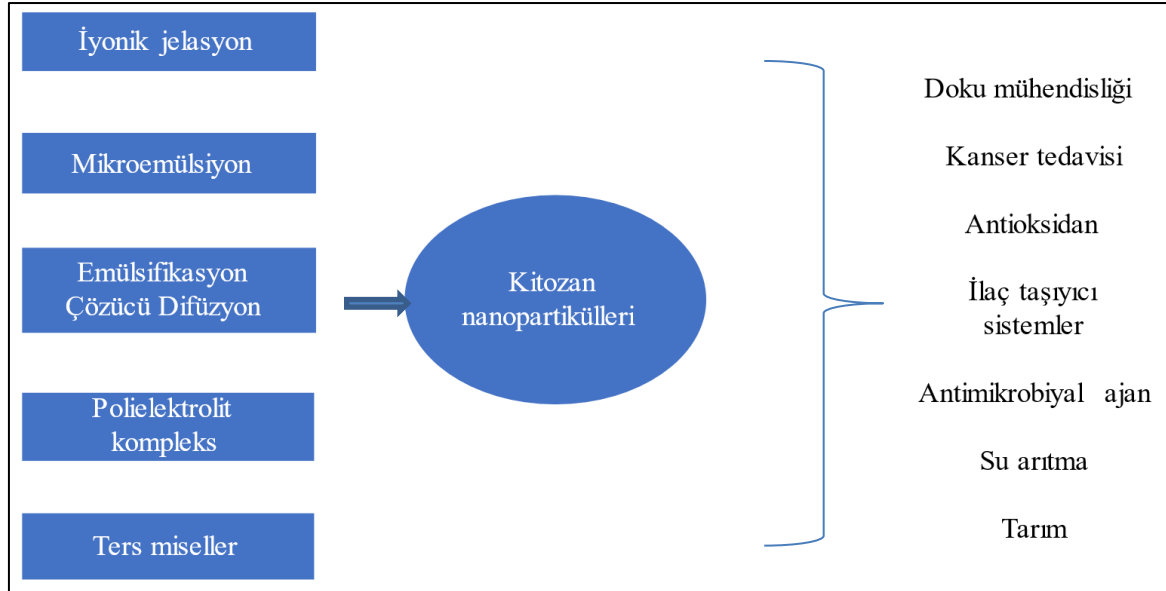
Kitosan biyoyumlu, biyoparçalanabilir, mukoadezif, toksik ve immünojenik olmayan aynı zamanda antimikrobiyal özellikte doğal bir polimerdir (Bhattacharyya ve diğerleri, 2017). Kitosanın toksisitesi deasetilasyonu derecesine, yüzey yüküne ve çözünürlüğüne bağlı olarak değişmektedir (Di Santo ve diğerleri, 2021). Pozitif yüklü bir yüzeye sahip olan kitosan doku mühendisliği, yara iyileştirme, gen tedavisi, ilaç taşıyıcı sistem yapımı ve birçok farmasötik/ tıbbi uygulamada kullanılmaktadır (Pang ve diğerleri, 2022). İyi bir mukoadezif ajan olan kitosan, hidrofilik ilaçların emilimini artırmak için paraselüler geçirgenliği artırıcı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Sonaje ve diğerleri, 2009). Kitosan alerjik reaksiyonlara neden olmadığından canlı dokularla biyoyumludur ve organizmadan kolayca uzaklaştırılabilmektedir (Agnihotri, Mallikarjuna ve Aminabhavi, 2004).

Kitosan nanopartikülleri, biyouyumlu ve biyobozunur özellikleri, katyonik yapıları nedeniyle ilaç taşıyıcı sistem hazırlanarak protein ve peptitlerin, gen ilaçlarının ve antikanser ilaçların oral, nazal, oküler ve intranazal gibi çeşitli yollar ile vücuda verilmesinde oldukça ilgi görmektedir (J. Wang ve diğerleri, 2011). Kitosanın özellikleri ve bu özelliklerin ilaç taşıyıcı sistemlerde sağladığı avantajlar Çizelge 2.1’de gösterilmiştir (Mukhopadhyay, Mishra, Rana ve Kundu, 2012).

Çizelge 2.1. Kitosanın özellikleri ve ilaç taşıyıcı sisteminde sağladığı avantajlar

Kitosanın özelliği	İlaç taşıyıcı sisteminde sağladığı avantaj
Doğal polimerdir.	Maliyetin uygun olmasını sağlar.
D-glukozamin yapısına sahiptir.	Kararlı ve nanoyapıda formülasyonlar oluşturulmasını imkan verir.
Yapısında pek çok reaktif grup bulunur.	Kitosanın dezavantajlarını önleyen kitosan türevleri oluşturulmasını sağlar.
Suda ve organik çözücülerde çözünmez, seyreltik asidik çözeltilerde çözünür.	İlaç taşıyıcı sistemler hazırlanırken toksik organik çözücülerin kullanılmasını gerektirmez.
Katyonik bir polimerdir.	Negatif yüklü maddeler ile etkileşime girerek nanopartiküllerin oluşumunu sağlar.
Biyoadeziv bir maddedir.	Yapısındaki pozitif yükler ile negatif yüklü mukoza ile kolayca etkileşir.

Kitosan nanopartiküllerinin genel hazırlanış yöntemleri ve kullanım alanları Şekil 2.3'te gösterilmiştir (Divya ve Jisha, 2018).



Şekil 2.3. Kitosan nanopartiküllerinin genel hazırlanış yöntemleri ve kullanım alanları

Oral insülin verilmesinde kitosan nanopartikülleri

İnsülinin oral yoldan verilmesi için en yaygın kullanılan doğal polimer kitosandır. Kitosanın tripolifosfat varlığında hatta sadece insülin ile polielektrolit kompleksi oluşturarak,

nanopartiküllerinin hazırlanması en sık kullanılan yöntemdir. Kitosan ve polianyonların etkileşimi, sulu bir ortamda nanopartiküllerin kendiliğinden oluşumunu sağlamaktadır. Nanopartiküllerin hazırlanışı sırasında organik çözücüye ve ısıya ihtiyaç duyulmaması, sitotoksikite ve insülin stabilitesi ile ilişkili sakıncalardan kaçınılmasını sağlamaktadır (Fonte ve diğerleri., 2015).

Kitosan iyi çapraz bağlanma yeteneği ve şişme kontrolü sayesinde ilaç taşıyıcı sistemin ilaç molekülünü salım hızını yönetebilmektedir. (Safdar ve Thanabalan, 2022). Biyolojik sıvılarda nanopartiküllerden kontrollü etkin madde salımı, etkin maddenin absorpsiyonunu, plazma seviyelerini ve dolayısıyla terapötik etkinliğini etkileyen en önemli özelliklerdendir. Kitosan nanopartiküllerinden etkin madde salımı polimer erozyonu/bozunması, difüzyon ve polimer şişmesi gibi mekanizmalar ile gerçekleşmektedir. Polimer erozyonu/bozunması mekanizmasında polimerin tamamen bozunmasıyla veya polimerin dış yüzeyinden içe doğru erozyonununla etkin madde salımı gerçekleşir. Difüzyon ile salımda ise etkin madde derişim farkına bağlı olarak polimerik matristen ortama Fick'in difüzyon yasasına göre salınmaktadır. Nanopartiküllerin şişmesi ile etkin madde salımında ise polimer zincirleri açılana kadar polimere su girer ve polimer zincirlerinin çözünmesiyle etkin maddenin polimer matristen salınımı gerçekleşir (Jhaveri, Raichura, Khan, Momin ve Omri, 2021).

Kitosan, insülinin oral yoldan verilebilmesi için en yaygın kullanılan polimerlerden biri olmasına rağmen kitosanın düşük pH'lardaki yüksek çözünürlüğü midede parçalanmasına ve protein peptitlerin bağırsağa kadar taşınmasına engel olabilmektedir. Bu sorunun önüne geçmek için sadece protein peptit yapılı moleküllerinin gastrointestinal sistemde parçalanmasını önlemek ile kalmayan aynı zamanda sürekli salım sağlayabilen kitosan türevleri geliştirilmiştir. Kitosanın modifikasyona imkan sağlayan serbest amino ve hidroksil gruplarına sahip olması çeşitli kitosan türevlerinin sentezini mümkün kılmıştır (Chaudhury ve Das, 2011). Kitosan türevleri arasında N-alkil veya kuaterner kitosan türevleri (N-trimetil kitosan, N-(2-hidroksil) propil-3-trimetil amonyum kitosan klorür), tiyolatlı kitosan türevleri, hidrofobik kitosanlar ve mono-N-karboksimetil kitosan yer almaktadır (Ahmed ve Aljaeid, 2016).

Yapılan bir çalışmada iyonik çapraz bağlanma yolu ile pH duyarlı bir polimer olan hidroksipropil metilselüloz ftalat ile kitosan nanopartikülleri insülinin oral yoldan verilmesi için hazırlanmış ve yapılan in vitro çalışmalar nanopartiküllerin asidik ve pepsin içeren

ortamda nanopartiküllerin stabil kaldığını göstermiştir (Makhlof, Tozuka ve Takeuchi, 2011). Yapılan başka bir çalışmada ise kitosan nanopartiküllerinin Caco-2 hücre tek tabakalarındaki sıkı bağlantıları geçici ve geri dönüşümlü olarak açabildiğini ve Caco-2 hücre tek tabakalarının paraselüler geçirgenliğini artırdığı bildirilmiştir (Lin ve diğerleri, 2007).

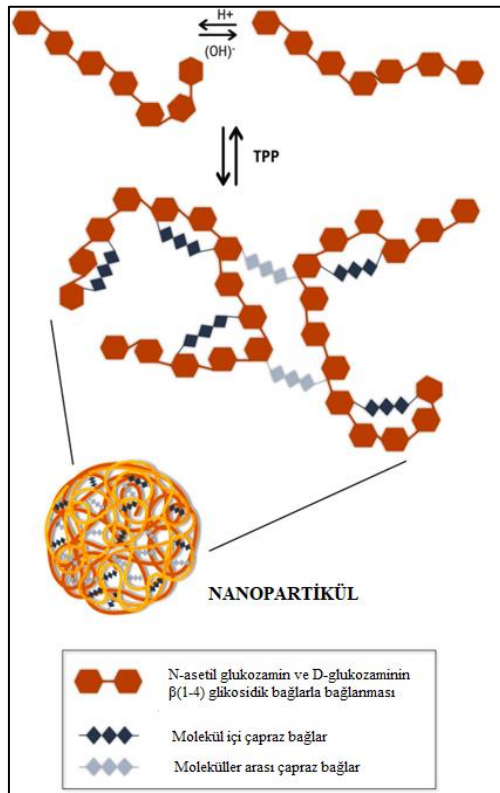
Kitosan nanopartiküllerin hazırlanmasında iyonik jelasyon yöntemi

Kitosan seyreltik asetik asitte çözünürken, tripolifosfat gibi bir anyonik çapraz bağlayıcı distile suda çözülerek hazırlanır ve daha sonra oda sıcaklığında mekanik karıştırma altında katyonik kitosan çözeltisine anyonik çapraz bağlayıcı çözeltisi damla damla eklenir ve böylece iyonik jelleşme gerçekleşmektedir. Negatif yüklü bir polianyon ve pozitif yüklü kitosanın amin grubunun elektrostatik kuvvetler sayesinde kompleksleştirilmesi sonucunda nanopartiküller oluşturulmaktadır. Bu tekniğin kolay olması, organik çözücüye ihtiyaç duyulmaması ve oda sıcaklığı koşullarında hazırlanması en büyük avantajlarını oluşturmaktadır. Fakat hazırlanan nanopartiküllerde görülen en büyük problem polidispersite indekslerinin nispeten yüksek olmasıdır (Seyam ve diğerleri, 2020). İyonik jelasyon yöntemi ile kitosan nanopartikülleri hazırlanırken yüksek molekül ağırlıklı kitosan kullanılması hem nanopartiküllerin partikül büyüklüğünü hem de polidispersite indeksini artırmaktadır, bu durum kitosanın viskozitesinin artması ile ilişkilendirilmektedir (Yien, Zin, Sarwar ve Katas, 2012). Ayrıca düşük molekül ağırlıklı kitosanın, yüksek molekül ağırlıklı kitosana göre çözünürlüğünün ve biyoaktivitesinin daha iyi olması, daha az toksisite göstermesi nedeniyle düşük molekül ağırlıklı kitosan nanopartikülleri ilaç taşıyıcı sistemlerde büyük potansiyel oluşturmaktadır (Fan, Yan, Xu ve Ni, 2012).

İyonik jelasyon yöntemi genellikle doğal polimerler ile hazırlanan nanopartiküller için kullanılsa da sentetik polimer ile hazırlanan nanopartiküllerin ve ligand ile modifiye edilmiş nanopartiküllerin hazırlanmasında da kullanımına dair çalışmalar mevcuttur (C. Wong, Al-Salami ve Dass, 2021).

Kitosan nanopartiküllerini oluşturmak için iyonik jelasyon yönteminde sıklıkla kullanılan tripolifosfat, düşük toksisiteye ve düşük maliyete sahip bir polianyondur. Tripolifosfat uzun polimer moleküllerinin amino grupları ile etkileşime girer ve kitosan özelliklerine ve derişimine bağlı olarak nanopartiküllerin veya homojen olmayan sistemlerin oluşumuna yol

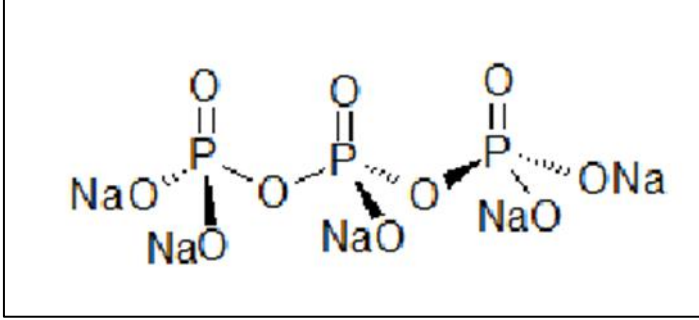
açan iyonik çapraz bağlı üç boyutlu bir ağ oluşturur. Kitosan çözeltisine tripolifosfat çözeltisi eklendikten sonra nanopartiküller, tripolifosfatın fosfat grupları ile kitosanın amino grupları arasında molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlar ile kendiliğinden oluşturulur, nanopartiküllerin oluşumu Şekil 2.4'te gösterilmiştir. Nanopartiküllerin özellikleri kitosanın deasetilasyonu derecesine, molekül ağırlığına ve yüzey yüküne bağlı olarak değişmektedir. Tripolifosfatın çapraz bağlanma kuvveti ise kitosan amin gruplarının sayısına, pH'ya ve iyonik şiddete bağlıdır. Bu nedenle kitosan/tripolifosfat oranı, kitosan derişimi ve pH gibi etkenlerin değişmesi ile nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyelleri kontrol edilebilmektedir (Di Santo ve diğerleri, 2021).



Şekil 2.4. Kitosan ve tripolifosfat arasındaki molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlar ile nanopartiküllerin oluşumu (Di Santo ve diğerleri, 2021)

2.3.3. Sodyum tripolifosfat

Tripolifosfatın nanopartiküllerin hazırlanmasında çok büyük rolü olduğu yukarıda anlatılmıştır. Sodyum tripolifosfatın yapısı ise Şekil 2.5'te gösterilmiştir.

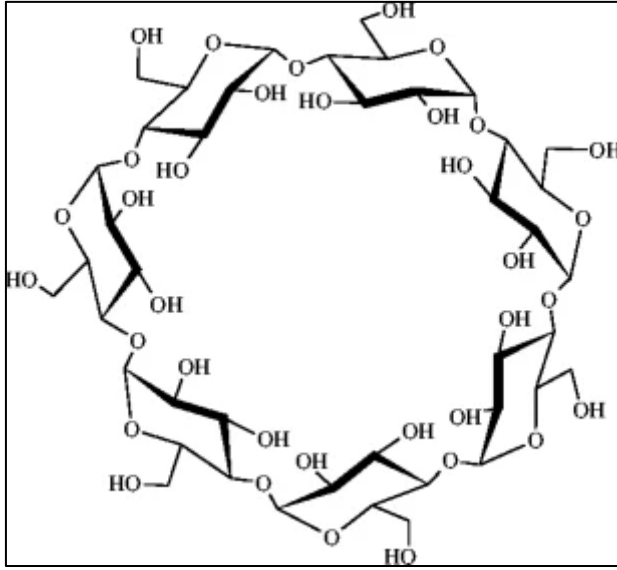


Şekil 2.5. Sodyum tripolifosfatın yapısı (Morocco, 2013)

Nanopartiküllerin oluşmasında kullanılan polianyonlar arasında tripolifosfat toksik olmaması ve hızla jelleşebilme özelliği sayesinde nanopartiküler sistemlerde en sık kullanılan polianyondur (Gan, Wang, Cochrane ve McCarron, 2005). FDA tarafından güvenilirliği onaylanan tripolifosfat elektrostatik etkileşimler ile biyoyumlu nanopartiküllerin oluşumunu sağlayabilmekte ve ilaç taşıyıcı sistemlerde verimli bir şekilde kullanılabilir (Wu, Wang, Yang, Liu ve Lu, 2017)

2.3.4. Sülfobütil-eter-β-siklodekstrin (Siklodekstrinler)

Siklodekstrinler ilk kez 1891 yılında Villiers tarafından tanımlanmıştır. Villiers, 1903-1911 yılları arasında hem α hem de β siklodekstrinleri tanımlayarak siklodekstrin kimyasının temellerini atmıştır (Loftsson ve Duchêne, 2007). Siklodekstrinler, α-1,4-bağları ile bağlı altı veya daha fazla glukopiranoz biriminden oluşan siklik oligosakkaritlerdir (Ogoshi ve Harada, 2008). En yaygın olarak kullanılan siklodekstrinler sırasıyla 6, 7 ve 8 D-glukopiranoz biriminden oluşan α, β ve γ siklodekstrinlerdir. Siklodekstrinler hidrofilik bir dış yüzeye ve lipofilik merkezi bir boşluğa sahip olan halkalı moleküllerdir (Jansook, Ogawa ve Loftsson, 2018). Kimyasal olarak modifiye edilmiş siklodekstrinlerden sülfobütil-eter-β-siklodekstrin suda yüksek çözünürlüğü ve minimum toksisitesi nedeniyle geniş çapta araştırılmaktadır (Nagase ve diğerleri, 2001). β-siklodekstrinlerin genel yapısı Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. β -siklodekstrinlerin genel yapısı (Szente ve Fenyvesi, 2017)

Siklodekstrinler ilaç moleküllerini fizyolojik ortamdaki çeşitli etkileşimlere karşı koruyabilmekte, ilaç moleküllerinin permeabilitesini artırmak için biyolojik membranlarla etkileşime girebilmekte, ilaç salımını iyileştirmekte ve genel olarak güvenilir görülmektedir (Adeoye ve Cabral-Marques, 2017). Farklı moleküler yapı ve fizikokimyasal özellikleri sayesinde siklodekstrinler, nanopartiküllerin ve mikropartiküllerin hazırlanmasında kompleksasyon ajanı olarak da son zamanlarda oldukça ilgi çekmektedir (Jacob ve Nair, 2018).

İnsülin siklodekstrinler ile formüle edildiğinde veya inklüzyon kompleksleri hazırlandığında, siklodekstrinler insülini agregasyona ve termal denatürasyona karşı stabilize etmekte ve membran akışkanlığını bozarak insülinin bağırsak epitelleri boyunca emilimini artırabilmektedir (Abdel-Moneim ve Ramadan, 2022).

2.3.5. Kollicoat® MAE 100 P

Kollicoat® MAE 100 P, 1:1 oranında metakrilik asit ve etil akrilat içermektedir. Kopolimeri nötralize etmek için sodyum hidroksit ile muamele edilmiştir. Bir polimetakrilat ürünü olan Kollicoat® MAE 100 P, ilaç moleküllerini midenin asidik ortamından koruduğu ve pH 5,5'in üzerinde çözünürlüğe sahip olduğu için enterik kaplama ajanı olarak kullanılmaktadır (Nguyen, Tran ve Tran, 2019). Suda ve pH 1 ile 5 arasında çözünmeyen Kollicoat® MAE 100 P pH 5,5'in üzerinde şişmeye ve çözünmeye başlar (Amado ve diğerleri, 2017).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

• Asetik asit	Sigma, Almanya
• Dipotasyum hidrojen fosfat	Merck, Almanya
• Disodyum hidrojen fosfat	Merck, Almanya
• Etanol	Sigma, Almanya
• Hidroklorik asit	Sigma, Almanya
• İnsülin (Humulin®)	Lilly, ABD
• Kitosan (Düşük molekül ağırlıklı, LMW)	Sigma, Almanya
• Kollicoat® MAE 100 P	BASF, Almanya
• Mannitol	Merck, Almanya
• MTT	Sigma, Almanya
(3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromit)	
• Potasyum dihidrojen fosfat	Merck, Almanya
• Sodyum tripolifosfat (penta basic %90-95)	Sigma, Almanya
• Sülfobutil-eter-β-Siklodekstrin	Cylolab, Macaristan
• Sodyum hidroksit	Sigma, Çek Cumhuriyeti
• Sodyum klorür	Merck, Almanya

3.1.2. Kullanılan araç ve gereçler

• Bidistile su ünitesi	Mes mp Minipure®, Türkiye
• Diferansiyel taramalı kalorimetri cihazı	DSC 60, Shimadzu, Japonya
• Diyaliz membran (MWCO:12.000 Da)	Serva, Almanya
• 96 gözlü plakalar	Thermo Scientific, Danimarka
• -80°C derin dondurucu	Thermo Scientific, ABD
• Enjektör	Ayset, Türkiye
• Eppendorf tüp	Isolab, Almanya
• Flasklar (25 cm ² ve 75 cm ²)	SPL Life Sciences, Kore

• Fourier transform kızılötesi spektrofotometri cihazı-(FT-IR)	Spectrum 400, Perkin Elmer, ABD
• Hassas terazi	Ohaus®, Çin
• Hücre kültürü sarf malzemeleri	Granier GmbH, Almanya
• İnsülin enjektörü	Beybi, Çin
• Klips	Bevara, Hindistan
• Laminar hava akım kabini	Clean Air, Almanya
• Manyetik karıştırıcı	Thermo Scientific, Almanya
• Otomatik pipetler (10-100 µl, 100-1000 µl, 1000-5000 µl)	Eppendorf, Almanya
• Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçüm cihazı	Malvern Zetasizer Nano, İngiltere
• pH-metre	(Sartorius, Almanya
• Santrifüj cihazı	Allegra X-30R, Almanya
• Santrifüj tüpleri (15 ve 50 mL'lik)	Isolab, Almanya
• Stabilite test kabinleri (4°C ve 25°C)	TK252, Sanyo, Hindistan; Nüve; Türkiye
• Steril pipetler	Costar, AB
• Su banyosu	Nüve, Türkiye
• Ultrasonik banyo	Brainsonic 221, Almanya
• UV-Vis spektrofotometrik analiz cihazı	Shimadzu UV 1700, Japonya
• Vorteks	Nüve-NM 110, Türkiye

3.1.3. Kullanılan yazılımlar

- İstatistiksel analiz yazılımı Graphpad® Prism 8
- İstatistiksel analiz yazılımı DDSolver®

3.2. Yöntem

Bu bölümde insülinin karakterizasyon çalışmaları, miktar tayini yöntem validasyonu, tripolifosfat (TPP) ve sülfobütil eter- β -siklodekstrin (SBE- β -SD) ile kitosanın iyonik jelasyon yöntemi sayesinde insülin yüklü formülasyon geliştirilmesine dair çalışmalar, insülin yüklü nanopartiküllerin enterik kaplanmasına dair çalışmalar, insülin yüklü

nanopartiküllerin karakterizasyonuna dair çalışmalar, in vitro salım çalışmaları, sitotoksosite çalışmaları, in vitro stabilite çalışmaları ve altı aylık stabilite çalışmaları ayrıntılı bir şekilde sunulacak ve bu çalışmalara ait bulgular verilecektir.

3.2.1. İn vitro çalışmalarda kullanılan çözeltiler

pH 7,4 fosfat tamponu (Avrupa Farmakopesi Ek 6.4)

KH ₂ PO ₄	0,6 g
Na ₂ HPO ₄	6,4 g
NaCl	5,85 g
Distile su	ym 1L

pH 6,8 fosfat tamponu (Avrupa Farmakopesi Ek 6.4)

KH ₂ PO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
NaCl	8,5 g
Distile su	ym 1L

pH 1,2 HCl çözeltisi

0.1 N HCl çözeltisinin pH'sı 1,2'ye ayarlanarak hazırlandı.

Etkin maddenin ve diğer maddelerin karakterizasyon çalışmaları

Tez çalışmamızda kullanılan etkin madde, yardımcı maddeler ve hazırlanan formülasyonların FTIR (Fourier dönüşümlü spektrometre) ve DSC (Diferansiyel taramalı kalorimetre) analizleri yapıldı.

3.2.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FT-IR) analizi

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FT-IR) maddelerin yapısında bulunan fonksiyonel grupların temel titreşimlerine karşılık gelen karakteristik kızılötesi absorpsiyon

bantlarıyla ilişkilendirilmesine dayalı olarak maddelerin kimyasal yapısının aydınlatılmasında kullanılmaktadır (Berthomieu ve Hienerwadel, 2009).

İnsülin ve yardımcı maddelerin yapısındaki fonksiyonel grupları belirlemek ve formülasyon oluşumlarını aydınlatabilmek amacıyla Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FT-IR) kullanıldı. Çalışmada analizler $650-400\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında yapıldı.

3.2.3. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi

Çalışmada insülinin, yardımcı maddelerin ve liyofilize formülasyonların Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) termogramları alındı. Bunun için analizi yapılacak her madde 2 mg olarak tartıldı ve alüminyum örnek kaplarına konuldu. Örnek kaplarının üzerine alüminyum kapaklar konuldu ve kap-kapak sistemi içerisinde toz sıkıştırıldı. Daha sonra kap-kapak sistemi DSC cihazının numune bölgesine yerleştirildi ve azot gazı altında 10°C/dk ısıtma hızında 350°C 'ye kadar ısıtılıp 24°C 'ye kadar soğuması bekletilerek termogramlar alındı. Alınan pikler incelenerek maddeler arasında etkileşim olmadığı, karakteristik pikleri değerlendirilerek kontrol edildi.

3.2.4. İnsülinin miktar tayini yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu

Yöntem validasyonu, analiz yönteminin beklenen sonuçları gösterip göstermediğini ve kabul edilebilir bir ölçüm için uygun olup olmadığını kontrol etmeyi amaçlayan çeşitli değerlendirmeleri içeren bir çalışmalar bütünüdür. (Chikanbanjar, Semwal ve Jyakhwa, 2020). Yöntemin valide edilmesi, o yöntem ile elde edilen sonuçların doğruluğunu, özgünlüğünü, kesinliğini ve güvenilirliği göstermektedir.

Çalışmamızda insülinin miktar tayini için UV-Vis spektrofotometresi kullanıldı. Dalga boyu taraması ve diğer tüm validasyon çalışmaları için 1 cm ışık yoluna sahip kuvars küvet kullanıldı.

Yöntem validasyonunda ICH Q2(R1) kılavuzu esas alınarak; doğrusallık, kesinlik (deney içi-deneyler arası), doğruluk ve geri elde, özgünlük ve seçicilik, saptama ve tayin sınırı ve stabilize parametreleri incelendi ve yorumlandı.

Validasyon çalışmalarına başlamadan önce insülinin distile su içerisinde 100 µg/mL derişimindeki çözeltisi hazırlandı ve UV-Vis spektrofotometrede 200-800 nm dalga boyu aralığında dalga boyu taraması yapılarak insülinin en fazla absorbens verdiği dalga boyu ($\lambda_{\max}$) kaydedildi.

Validasyon çalışmaları pH 1,2 çözeltisi ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tamponu için ayrı ayrı yapıldı ve parametreler incelendi. Her pH için çalışmalara başlamadan önce o pH'daki dalga boyu taraması insülinin o pH'daki 100 µg/mL'lik çözeltisinin köre karşı dalga boyu taraması yapılarak $\lambda_{\max}$ değeri bulundu. Validasyon çalışmaları kapsamında aşağıdaki parametreler incelendi.

Çalışmamızda insülin kaynağı olarak Humulin-R çözeltisi kullanıldı.

Doğrusallık (Linearity)

Doğrusallık, hazırlanan bir seri örneğin derişimi ile bu örneklerin verdiği yanıtın (absorbansın) arasındaki doğru orantıyı göstermektedir. Derişim ve absorbanslar kalibrasyon grafiğine geçirildiğinde elde edilen kalibrasyon doğrusu ve kalibrasyon doğrusuna ait korelasyon katsayısı (R^2) doğrusallık hakkında bilgi vermektedir.

Doğrusallık için, insülinin pH 1,2 çözeltisinde ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tamponunda ayrı ayrı 200 µg/mL'lik stok çözeltileri hazırlandı ve bu stok çözeltilerinden hareketle 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 ve 5 µg/mL'lik standart çözeltiler hazırlandı. Daha sonra bu standart çözeltilerin absorbans değerleri UV-Vis spektrofotometrede 272 nm'de kör çözeltilere karşı ölçüldü ve değerler ile derişim-absorbans kalibrasyon grafikleri en küçük kareler yöntemi ile oluşturuldu. Doğrunun denklemi ve R^2 değeri hesaplandı.

Kesinlik (Precision)

Deney sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin bir kanıtı olan bu parametre, aynı koşullar altında çalışıldığında aynı derişimdeki çözeltilerin absorbans sonuçlarının birbirine yakınlığını göstermektedir.

Deney içi kesinlik (Intraday precision) (Repeatability)

Belirli bir derişimdeki etken madde çözeltisinin absorbandsının aynı gün içerisinde art arda ölölerek miktar tayininin hesaplanmasıyla miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirliğı ile ilgili bilgi veren bir parametredir.

Çalışmada insülinin pH 1,2 çözeltisinde ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tamponunda 20 µg/mL derişimindeki çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan özeltilerin absorbandsları UV-Vis spektrofotometrede art arda 10 kez ölölerek kaydedildi. Daha sonra bu absorbandslardan yola çıkarak hesaplanan derişimlerin ortalama (X_{ort}), standart sapma (SS) ve yüzde bağıl sapma değıerleri (%BS) hesaplanarak tekrarlanabilirlik değıerlendirildi.

Deneyler arası kesinlik (Interday precision)

Belirli bir derişimde etken madde içeren çözeltinin farklı günlerde yapılan miktar tayini analizlerinden elde edilen sonuçların tekrarlanabilir olup olmadığını gösteren bir parametredir.

Çalışmada insülinin pH 1,2 çözeltisinde ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tamponunda hazırlanan 10, 30 ve 60 µg/mL derişimindeki çözeltilerinin absorbands değıerleri UV-Vis spektrofotometrede art arda 3 gün boyunca her defasında 3 kez ölölerek kaydedildi ve bu absorbands değıerlerinden yola çıkılarak hesaplanan derişimlerin X_{ort} , SS ve %BS değıerleri hesaplandı. Böylece yöntemin tekrarlabılır olup olmadığı hakkında bilgi elde edildi.

Doğruluk (Accuracy) ve Geri elde (Recovery)

Doğruluk ölüm sonuçlarının gerçek değıerlere yakın olup olmadığını gösteren bir parametredir. Doğruluğı sayısal olarak gösterebilmek için ise % geri elde verileri kullanılır. Elde edilen verilerin %95-105 geri eldeye sahip olması istenir böylelikle yöntem doğruluğunu kanıtlamış olacaktır.

Çalışmada insülinin pH 1,2 çözeltisi ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tamponundaki 70, 80 ve 90 µg/mL derişimindeki çözeltileri hazırlandı ve UV-Vis spektrofotometrede absorbands değıerleri ölüldü. Absorbands değıerlerinden hareketle hesaplanan derişimin bilinen derişime

oranlanması ile de % geri elde değeri hesaplandı. Daha sonra bu geri elde değerlerinin X_{ort} , SS ve %BS değerleri de hesaplanarak yöntemin doğruluğu hakkında bilgi sahibi olundu.

Özgünlük ve seçicilik (Spesificity, Selectivity)

Kullanılan analiz yönteminin sadece analizi yapılacak maddeyi saptayıp saptamadığını gösteren bir parametredir. Bu amaç doğrultusunda çalışılan dalga boyunda diğer maddelerin absorbans verip vermediğine bakılır.

Çalışmada kitosan, TPP, SBE- β -SD, Kollicoat® MAE 100 P, mannitol, kitosan-TPP-Kollicoat® MAE 100 P karışımı ve kitosan-SBE- β -SD-Kollicoat® MAE 100 P karışımının pH 1,2 çözeltisi ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tamponunda dalga boyu taramaları yapıldı ve bu maddeler ve karışımların insülinin maksimum absorbans verdiği dalga boyunda pik verip vermediği araştırıldı.

Saptama ve tayin sınırı (Limit of Detection and Limit of Quantification)

Saptama sınırı (LOD-Limit of Detection), bir numunedeki saptanabilen ancak ölçülemeyen en düşük madde miktarını gösterir ve aşağıdaki denklem ile hesaplanır.

$$\text{Saptama sınırı (LOD)} = (3,3 \times \sigma) / S$$

Tayin sınırı (LOQ-Limit of Quantification), bir numunedeki kesin ve doğru olarak ölçülen en küçük madde miktarını gösterir ve aşağıdaki denklem ile hesaplanır.

$$\text{Tayin sınırı (LOQ)} = (10 \times \sigma) / S$$

σ : kalibrasyon aralığında yer alan en küçük derişimin standart sapması

S: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Stabilite (Stability)

Numunelerin analize edilinceye kadar, belli saklama koşullarında, madde miktarının değişip değişmediğini gösteren bir parametredir.

Çalışmada insülinin pH 1,2 çözeltisi ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tamponunda hazırlanan 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µg/mL derişimindeki çözeltileri hazırlandı ve hem oda sıcaklığında hem de 4°C buzdolabında 24 saat boyunca bekletildi. Çözeltilerin absorbans değerleri 0. ve 24. Saatlerde ölçülerek stabiliteleri değerlendirildi.

3.3. Çalışmalarda Kullanılan İnsülin Formülasyonları

Diyabet tedavisinde kullanılan insülinin subkütan uygulanmasından dolayı birçok yan etki gözlenmekte ve bu uygulama ile hasta uyuncu oldukça düşük olmaktadır. Çalışmada insülinin oral yoldan verilmesine odaklanıldı ve hasta uyuncunun bu sayede de hasta yaşam kalitesinin artırılması hedeflenerek formülasyonlar tasarlandı. İnsülin oral yoldan verildiğinde birçok engelle karşılaşp, engelleri aşamadığından dolayı düşük terapötik etkinlik ile karşılaşlmakta, çalışmada insülinin bu engelleri aşabilmesini sağlamak ve terapötik etkinliğini artırmak için nanopartiküler sistem ve enterik kaplama stratejileri denendi. Çalışmada esas olarak dört farklı insülin yüklü nanopartikül formülasyonu geliştirilerek optimize edildi.

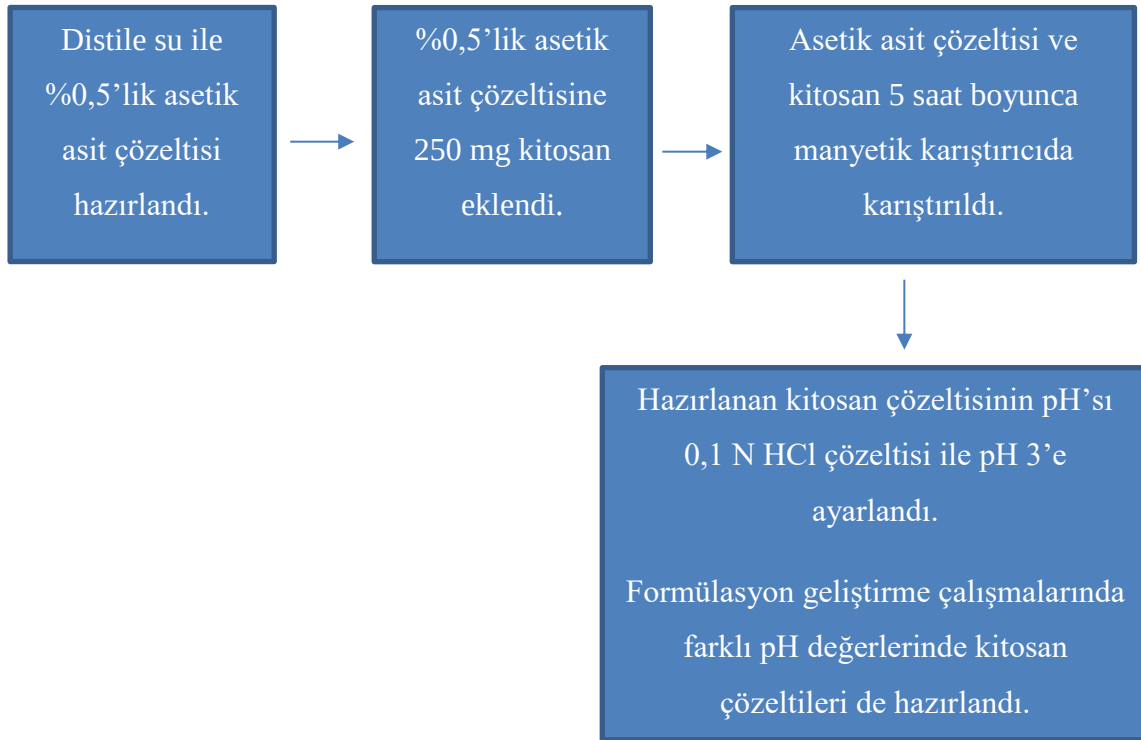
1. İnsülin yüklü kitosan:tripolifosfat (CS:TPP) nanopartikülleri iyonik jelasyon yöntemi ile hazırlandı (CS:TPP NP) (Calvo, Remuñan-López, Vila-Jato ve Alonso, 1997).
2. İnsülin yüklü kitosan:sülfobutil eter-β-siklodekstrin (CS:SBE-β-SD) nanopartikülleri CS:TPP nanopartikülleri gibi iyonik jelasyon yöntemi ile hazırlandı (CS:SBE-β-SD NP) (Calvo ve diğerleri, 1997).
3. İnsülin yüklü CS:TPP nanopartikülleri Kollicoat® MAE 100 P ile enterik kaplanarak enterik kaplı CS:TPP (K-CS:TPP) nanopartikülleri hazırlandı (K-CS:TPP NP) (Xu ve diğerleri, 2018).
4. İnsülin yüklü CS:SBE-β-SD nanopartikülleri Kollicoat® MAE 100 P ile enterik kaplanarak enterik kaplı CS:SBE-β-SD (K-CS:SBE-β-SD) nanopartikülleri hazırlandı (K-CS:SBE-β-SD NP) (Xu ve diğerleri, 2018).

3.3.1. Formülasyon çalışmalarında optimize edilen parametreler

- Kitosan çözeltisinin pH'sı
- CS:TPP oranı
- CS:SBE- β -SD oranı
- CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı

Kitosan çözeltisinin hazırlanışı

100 mL'lik mezüre bir miktar distile su konuldu, üzerine çeker ocakta 500 μ L glasiyal asetik asit ilave edildikten sonra mezür distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak %0,5'lik asetik asit çözeltisi hazırlandı. Daha sonra 250 mg kitosan tartıldı ve %0,5'lik asetik asit çözeltisi ile bir kapaklı kavanoza alındı. Kitosan ve asetik asit çözeltisi oda sıcaklığında 5 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra kitosan çözeltisinin pH'sı 0,1 N HCl çözeltisi ile 3'e ayarlandı ve yarım saat daha karıştırıldı. Böylece deneylerde kullanılmak üzere pH'sı 3'e ayarlanan %0,25'lik kitosan çözeltisi hazır hale geldi. Kitosan çözeltisinin hazırlanışı Şekil 3.1'de gösterildi.



Şekil 3.1. Kitosan çözeltisinin hazırlanışı

Sodyum tripolifosfat (TPP) çözeltisinin hazırlanışı

15 mg/mL’lik TPP çözeltisi hazırlamak amacıyla 150 mg TPP bir miktar distile suda çözüldü ve mezürde distile su ile 10 mL’ye tamamlandı.

Sulfobütil eter-β-Siklodekstrin (SBE-β-SD) Çözeltisinin Hazırlanışı

15 mg/mL’lik SBE-β-SD çözeltisi hazırlamak amacıyla 150 mg SBE-β-SD bir miktar distile suda çözüldü ve mezürde distile su ile 10 mL’ye tamamlandı.

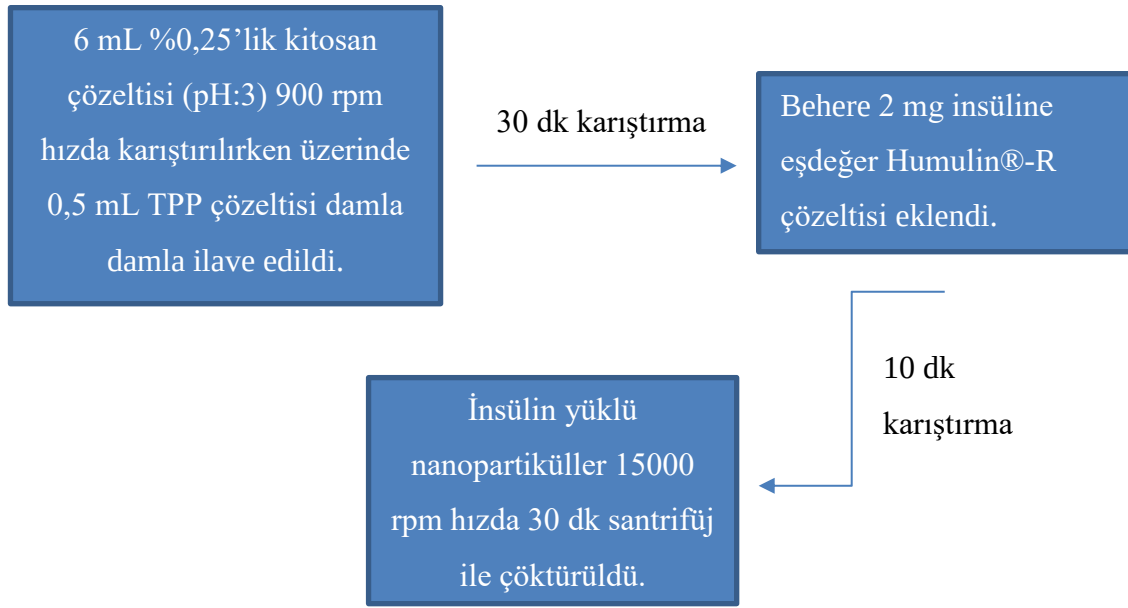
3.4. Formülasyonların hazırlanması

3.4.1. Kitosan:sodyum tripolifosfat (CS:TPP) nanopartiküllerinin hazırlanışı

CS:TPP nanopartiküllerinin hazırlanması için kitosan pH’sı 3, 4,6, 5,2 ve 6 olarak ve CS:TPP oranı 2:1, 1:1 ve 0,5:1 olmak üzere formülasyonlar hazırlandı ve deneyler sonucunda kitosan pH’sının 3 ve CS:TPP oranının 2:1 olmasına karar verildi.

CS:TPP nanopartiküllerini hazırlamak için kitosan çözeltisinin pH’sı 3’e 0.1 N HCl çözeltisi ile ayarlandı. 6 mL %0,25’lik yani 15 mg kitosan içeren kitosan çözeltisi bir behere alınıp 900 rpm hızındaki manyetik karıştırıcıya konuldu. Manyetik karıştırıcı üzerindeki kitosan çözeltisine CS:TPP oranı 2:1 olacak şekilde 0,5 mL TPP çözeltisi (7,5 mg TPP içermektedir.) damla damla ilave edildi. 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı, ardından üzerine 2 mg insüline eşdeğer miktarda insülin içeren çözeltisi eklenerek 10 dakika daha karıştırıldı. Daha sonra 15000 rpm hızda 30 dakika santrifüj edilerek nanopartiküller çöktürüldü ve süpernatant ayrıldı. Süpernatanttan UV spektrofotometre ile insülin miktarı tayin edildi, indirekt yöntem ile % enkapsülasyon etkinliği eşitliğe göre hesaplandı. Eş. 3.1’de T_{insulin} , başlangıçta eklenen toplam insülin miktarını (mg), S_{insulin} ise santrifüj sonrası süpernatantta tayin edilen insülin miktarını ifade etmektedir.

$$\% \text{ Enkapsülasyon Etkinliği} = \frac{T_{\text{insulin}} - S_{\text{insulin}}}{T_{\text{insulin}}} \times 100 \quad (3.1)$$

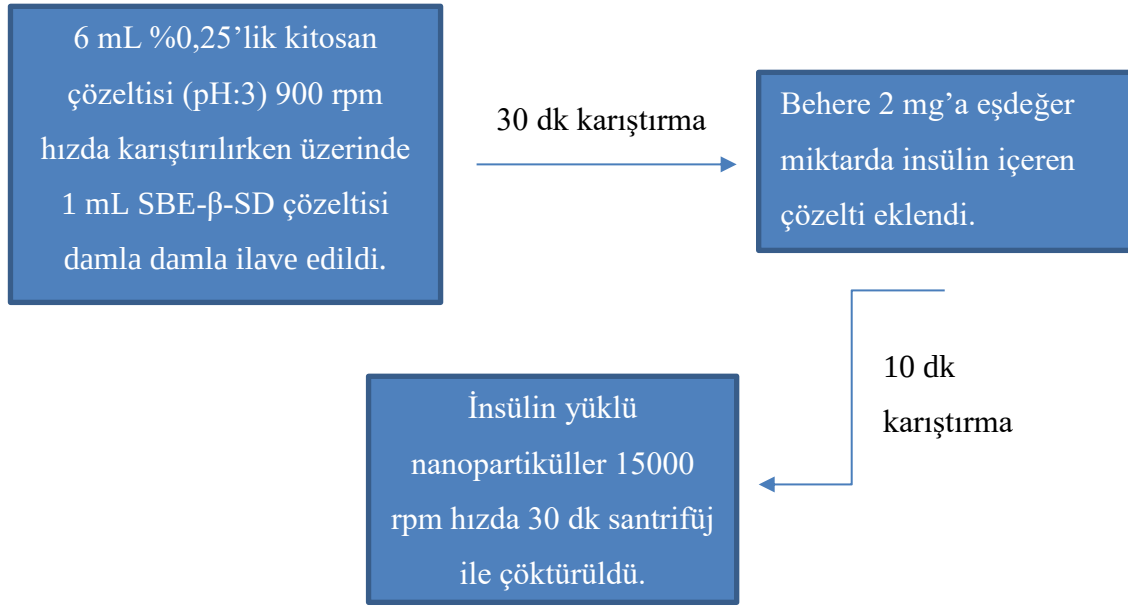


Şekil 3.2. CS:TPP nanopartiküllerinin hazırlanışı

3.4.2. Kitosan:sulfobütil eter- β -Siklodekstrin (CS:SBE- β -SD) nanopartiküllerinin hazırlanışı

CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin hazırlanması için kitosan pH'sı 3, 4,6, 5,2 ve 6 olarak ve CS:SBE- β -SD oranı 2:1, 1:1 ve 0,5:1 olmak üzere formülasyonlar hazırlandı ve deneyler sonucunda kitosan pH'sının 3 ve CS:SBE- β -SD oranının 1:1 olmasına karar verildi.

CS:SBE- β -SD nanopartiküllerini hazırlamak için kitosan çözeltisinin pH'sı 0.1 N HCl çözeltisi ile 3'e ayarlandı. 6 mL %0,25'lik yani 15 mg kitosan içeren kitosan çözeltisi bir behere alınıp 900 rpm hızındaki manyetik karıştırıcıya konuldu. Manyetik karıştırıcı üzerindeki kitosan çözeltisine CS: SBE- β -SD oranı 1:1 olacak şekilde 1 mL SBE- β -SD çözeltisi (15 mg SBE- β -SD içermektedir.) damla damla ilave edildi. 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı, ardından üzerine 2 mg insüline eşdeğer Humulin®-R çözeltisi eklenerek 10 dakika daha karıştırıldı. Daha sonra 15000 rpm hızda 30 dakika santrifüj edilerek nanopartiküller çöktürüldü ve süpernatant ayrıldı. Süpernatanttan UV spektrofotometre ile insülin miktarı tayin edildi, enkapsülasyon etkinliği indirekt yöntem ile eşitliğe göre hesaplandı.



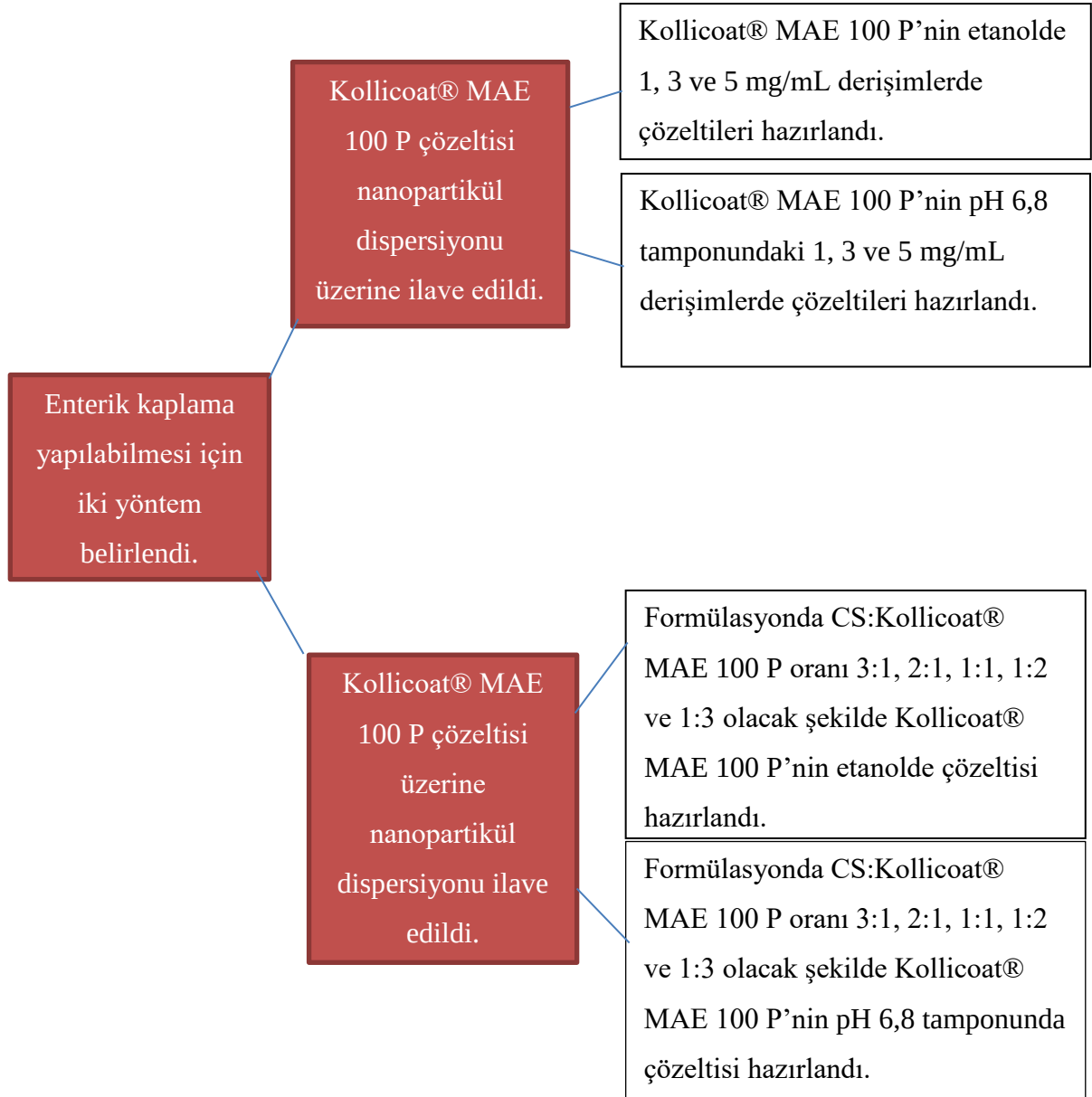
Şekil 3.3. CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin hazırlanışı

3.5. Kollicoat® MAE 100 P kaplı nanopartiküllerin hazırlanışı

Nanopartiküllerin enterik kaplanması için,

- Kollicoat® MAE 100 P'nin hem etanolde hem de pH 6,8 fosfat tamponunda 1, 3 ve 5 mg/mL derişimindeki çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilerden 1 mL nanopartikül dispersiyonunun üzerine damla damla ilave edildi.
- Formülasyona eklenecek CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 ve 1:3 olacak şekilde Kollicoat® MAE 100 P'nin hem etanolde hem de pH 6,8 fosfat tamponundaki 4 mL'lik çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltiler üzerine nanopartikül dispersiyonu damla damla ilave edildi.

Kollicoat® MAE 100 P kaplamada kullanılan çözeltilerin ve nanopartiküllerin hazırlanışı Şekil 3.4'te gösterildi.



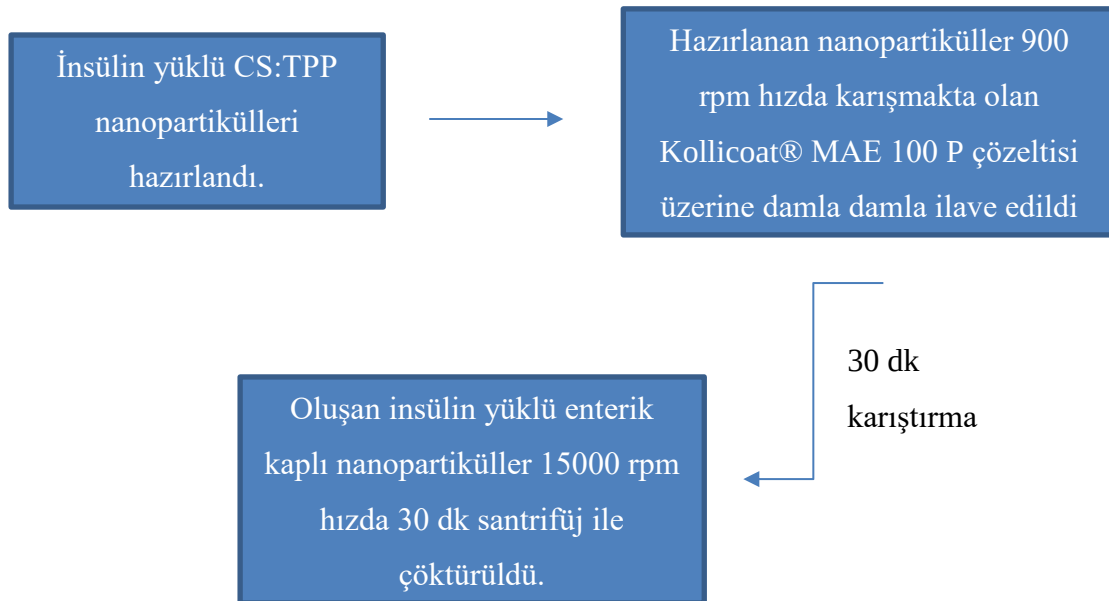
Şekil 3.4. Kollicoat® MAE 100 P kaplı nanopartiküllerin hazırlanışı

3.5.1. Enterik kaplı kitosan:tripolifosfat (K-CS:TPP) nanopartiküllerinin hazırlanışı

CS:TPP nanopartiküllerinin enterik kaplamak için hazırlanan nanopartikül dispersiyonu üzerine farklı derişimlerde hazırlanan Kollicoat® MAE 100 P çözeltisi (etanol içerisinde) farklı derişimlerde damla damla ilave edildi, aynı çalışmalar Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponunda çözülmesi ile de yapılarak enterik kaplamanın başarılı olup olmadığı incelendi. Ardından farklı derişimlerde hazırlanan Kollicoat® MAE 100 P çözeltisi (etanol veya pH 6,8 fosfat tamponu içerisinde) üzerine hazırlanan CS:TPP nanopartikül

dispersiyonu damla damla ilave edilerek de enterik kaplamanın başarılı olup olmadığı incelendi. Enterik kaplamanın başarılı olup olmadığına partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri değerlendirilerek karar verildi. Çalışmalar sonunda, CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı 1:3 olacak şekilde (15 mg:45 mg) Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki 4 mL çözeltisine CS:TPP nanopartikül dispersiyonunun damla damla ilave edilmesine karar verildi.

K-CS:TPP nanopartiküllerini hazırlamak için kitosan çözeltisinin pH'sı 3'e 0.1 N HCl çözeltisi ile ayarlandı. 6 mL %0,25'lik yani 15 mg kitosan içeren kitosan çözeltisi bir behere alınıp beher 900 rpm hızındaki manyetik karıştırıcıya konuldu. Manyetik karıştırıcı üzerindeki kitosan çözeltisine CS:TPP oranı 2:1 olacak şekilde 0,5 mL TPP çözeltisi (7,5 mg TPP içermektedir.) damla damla ilave edildi. 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı, ardından üzerine 2 mg insüline eşdeğer Humulin®-R çözeltisi eklenerek 10 dakika daha karıştırıldı. Hazırlanan nanopartikül dispersiyonuna aynı rpm hızda karıştırılan 45 mg Kollicoat® MAE 100 P içeren 4 mL Kollicoat® MAE 100 P çözeltisi (pH 6,8 fosfat tamponu içerisinde) damla damla ilave edildi ve 30 dakika daha karıştırıldı. Daha sonra 15000 rpm hızda 30 dakika santrifüj edilerek enterik kaplı nanopartiküller çöktürüldü ve süpernatant ayrıldı. Süpernatanttan UV spektrofotometre ile insülin miktarı tayin edildi, enkapsülasyon etkinliği indirekt yöntem ile eşitliğe göre hesaplandı.

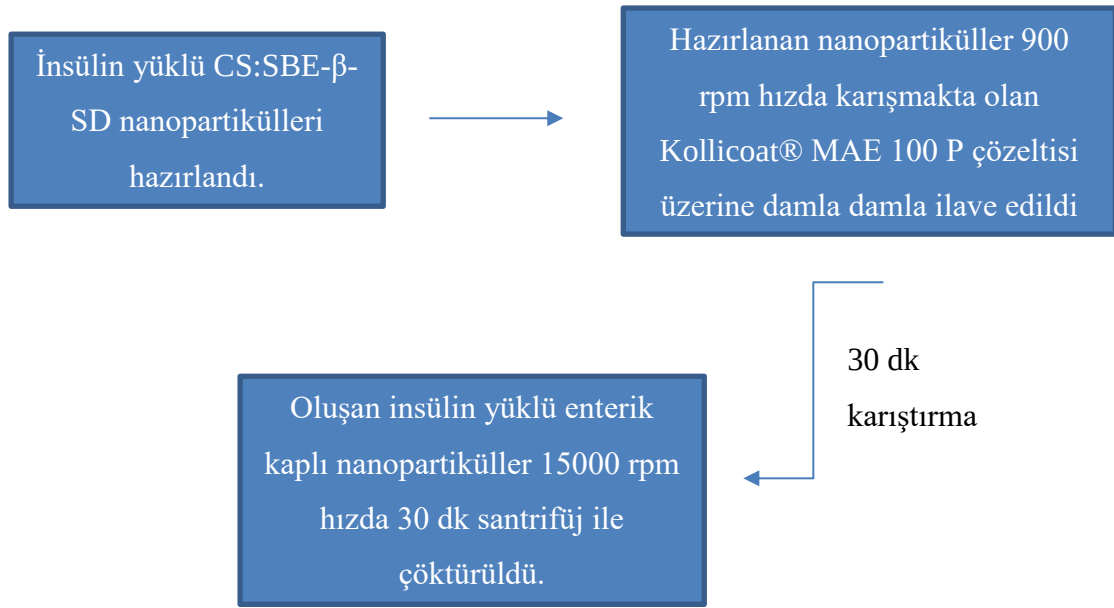


Şekil 3.5. K-CS:TPP nanopartiküllerinin hazırlanışı

3.5.2. Enterik kaplı kitosan:sülfobutil eter- β -sikolodekstrin (K-CS:SBE- β -SD) nanopartiküllerinin hazırlanışı

CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin enterik kaplamak için hazırlanan nanopartikül dispersiyonu üzerine farklı derişimlerde hazırlanan Kollicoat® MAE 100 P çözeltisi (etanol içerisinde) farklı derişimlerde damla damla ilave edildi, aynı deneyler Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltisi ile de yapılarak enterik kaplamanın olup olmadığı incelendi. Ardından farklı derişimlerde hazırlanan Kollicoat® MAE 100 P çözeltisi (etanol/pH 6,8 fosfat tamponu içerisinde) üzerine hazırlanan CS:SBE- β -SD nanopartiküller dispersiyonları damla damla ilave edilerek de enterik kaplamanın olup olmadığı incelendi. Deneyler sonunda CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı 1:3 olacak şekilde (15 mg:45 mg) Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki 4 mL'lik çözeltisine CS: SBE- β -SD nanopartikül dispersiyonunun damla damla ilave edilmesine karar verildi.

K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerini hazırlamak için kitosan çözeltisinin pH'sı 3'e 0.1 N HCl çözeltisi ile ayarlandı. 6 mL %0,25'lik yani 15 mg kitosan içeren kitosan çözeltisi bir behere alınıp 900 rpm hızındaki manyetik karıştırıcıya konuldu. Manyetik karıştırıcı üzerindeki kitosan çözeltisine CS: SBE- β -SD oranı 1:1 olacak şekilde 1 mL SBE- β -SD çözeltisi (15 mg SBE- β -SD içermektedir.) damla damla ilave edildi. 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı, ardından üzerine 2 mg insüline eşdeğer Humulin®-R çözeltisi eklenerek 10 dakika daha karıştırıldı. Hazırlanan nanopartikül dispersiyonu aynı rpm hızda karıştırılan 45 mg Kollicoat® MAE 100 P içeren 4 mL Kollicoat® MAE 100 P çözeltisi (pH 6,8 fosfat tamponu içerisinde) üzerine damla damla ilave edildi ve 30 dakika daha karıştırıldı. Daha sonra 15000 rpm hızda 30 dakika santrifüj edilerek enterik kaplı nanopartiküller çöktürüldü ve süpernatant ayrıldı. Süpernatanttan UV spektrofotometre ile insülin miktarı tayin edildi, enkapsülasyon etkinliği indirekt yöntem ile eşitliğe göre hesaplandı.



Şekil 3.6. K-CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin hazırlanışı

3.6. Liyofilizasyon

Liyofilizasyon yani dondurarak kurutma işlemi, numunelerin fiziksel ve kimyasal stabilitesini iyileştirmek için stabiliteyi olumsuz yönde etkileyen suyu ilk önce dondurup daha sonra süblimleştirme ile numuneden uzaklaştırarak, numunenin stabil kalmasını sağlamak için kullanılan bir işlemdir (Gaidhani, Harwalkar, Bhambere ve Nirgude, 2015). Liyofilizasyon işlemi donma ve kurutma adımlarında nanopartiküllerde stres oluşabilmektedir. Bu stresi önlemek amacıyla nanopartiküller dondurulmadan önce nanopartikül dispersiyonuna kriyoprotektanlar eklenmelidir, bu kriyoprotektanlar arasında en sık kullanılan şekerler; theraloz, sükroz, glikoz ve mannitoldür (Abdelwahed, Degobert, Stainmesse ve Fessi, 2006).

İyonik jelasyon yöntemi ile benzydamin yüklü kitosan nanopartikülleri hazırlanan bir çalışmada ise %10'luk mannitol çözeltisi kriyoprotektan olarak kullanılarak liyofilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Tuğcu-Demiröz ve diğerleri, 2021).

Hazırlanan nanopartikül dispersiyonları, 15000 rpm hızda 30 dk santrifüj edildi, ardından çökelti alını. Çökelti üzerine 2 mL distile su ve 2 mL distile suda hazırlanan %1, 2, 3, 5 ve 7'lik mannitol çözeltileri ilave edildi. Çökelti farklı oranlarda mannitol içeren çözeltilerde vorteks ile 5 dk karıştırılarak iyice süspande edildi. Daha sonra hazırlanan

süspansiyonlar tüplere konuldu ve üzeri parafilmle kapandı. Daha sonra parafilm üzerinden iğne ile delikler açılarak, -80°C 'ye ayarlı dondurucuda dondurmak için 30 dk bekletildi. Daha sonra donan süspansiyonlar liyofilizatöre konuldu ve 2 gün bekletildi. Oluşturulan tozlar için uygun mannitol oranının belirlenmesi için tozlar distile suda dağıtılarak partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel açısından değerlendirildi.

3.7. İnsülin İçeren Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve dağılımı, polidispersite indeksleri ve zeta potansiyelleri Malvern Zeta Sizer cihazı ile ölçüldü. Ölçümlerde partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksleri için plastik küvet, zeta potansiyeli için ise kılcal küvet kullanıldı. Ölçümler için nanopartikül dispersiyonları distile su ile seyreltilerek kullanıldı.

3.7.1. Partikül büyüklüğü ve dağılımı

Dinamik ışık saçılımı (Dynamic Light Scattering-DLS) teknolojisi kullanılarak partikül büyüklüğü ölçümü yapan Malvern Zeta Sizer cihazında partikül büyüklüğü ölçüm aralığı 0,6-6000 nm aralığındadır. Bu teknolojiye temel prensip bir lazer ışınının Brownian hareketi yapan partiküller içeren sıvı süspansiyondan geçirilmesi ve ışık saçılması nedeniyle yoğunlukta dalgalanmalar yaşanmasına göre partikül büyüklüğünün ölçülmesine dayanmaktadır (Shekunov, Chattopadhyay, Tong ve Chow, 2007)

Polidispersite indeksi (PDI) belli bir örnek içerisindeki partiküllerin dağılımını ifade etmektedir. 0 ile 1 arasında değişebilen bu değerde 0'a yaklaşıırken partikül dağılımı tekdüzeliğe yaklaşıırken; değer 1'e yaklaştıkça da partikül dağılımı tekdüzelikten uzaklaşmaktadır. Polimer bazlı nanopartiküler sistemler için 0,2'nin altındaki değerler en yaygın olarak kabul edilmektedir (Danaei ve diğerleri, 2018).

3.7.2. Zeta potansiyel ölçümleri

Zeta potansiyeli bir çözelti içerisindeki bir nanopartikülü çevreleyen elektriksel çift tabakadaki elektrostatik potansiyelin sayısal değeri olarak tanımlanmaktadır. Zeta potansiyeli +10 mV ve -10 mV arası olan nanopartiküller yaklaşık olarak nötr kabul edilirken; zeta potansiyeli +30 mV'dan yüksek nanopartiküller kuvvetli katyonik, -30

mV'dan küçük nanopartiküller ise kuvvetli katyonik olarak kabul edilmektedir (Clogston ve Patri, 2011).

Partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ölçümü yapılırken nanopartiküller distile su ile yaklaşık 40 kat seyreltildi. Bu ölçümler karakterizasyonda kullanılırken ayrıca stabilitenin değerlendirilmesi için de kullanıldı.

3.7.3. % Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi

Enkapsülasyon etkinliği % olarak ifade edilir ve hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının insülini hangi oranda hapsettiğini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır.

Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi için insülin yüklü nanopartikül formülasyonları hazırlandı ve daha önce anlatıldığı gibi santrifüj edildi. Süpernatanttan 0,1 mL alınarak seyretme faktörü 40 olacak şekilde pH 7,4 fosfat tamponu ile 4 mL'ye seyreltildi. Hazırlanan örnekler UV-Vis spektrofotometresinde pH 7,4 fosfat tamponu körüne karşı 272 nm dalga boyunda analiz edilerek absorbans değerleri okundu. Aynı zamanda süpernatant hacmi ise mikropipet yardımıyla belirlenip kaydedildi.

Okunan absorbans değerleri pH 7,4 fosfat tamponunda belirlenen kalibrasyon denkleminde yerine konularak $\mu\text{g/mL}$ cinsinden derişim hesaplandı. Bulunan derişim, süpernatant hacmi ile çarpıldıktan sonra seyretme faktörü ile de çarpıldı ve böylece enkapsüle olmayan insülin miktarı belirlenmiş oldu. Başta formülasyona eklenen insülin miktarı ile bulunan miktar arasındaki bulunan fark nanopartiküllere enkapsüle olan insülin miktarını verdi. Sonuç yüzdeye çevrilerek % enkapsülasyon etkinliği belirlendi.

3.7.4. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) analizi

Çalışmada taze hazırlanan CS:TPP, CS:SBE- β -SD, K-CS:TPP, K-CS:SBE- β -SD nanopartikülleri ve bu nanopartiküllerin insülin yüklü olmayanları TEM analizi* ile değerlendirildi. TEM cihazı için örnekler taze hazırlanan formülasyonlardan 50 μL alınarak 1 mL'ye distile su ile seyreltilerek hazırlandı.

* Nanopartiküllerin TEM mikroskobu ile görüntülenmesi Ortadoğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda yapıldı.

3.8. In vitro salım çalışmaları

İn vitro salım çalışmaları diyaliz torba metodu kullanılarak, 24 saat süresince, 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda sabit hızda karıştırılma ile sürdürüldü. Çalışmalar CS:TPP nanopartikülleri, CS: SBE- β -SD nanopartikülleri, K-CS:TPP nanopartikülleri ve K-CS:SBE- β -SD nanopartikülleri ile gerçekleştirildi. Salım çalışmalarından bir gün önce diyaliz membran pH 1,2 çözeltisinde ıslatıldı. Santrifüj edilen nanopartiküller 2 mL distile suda dağıtıldı. Salım ortamı olarak bir behere ilk önce 50 mL pH 1,2 çözeltisi konuldu. Daha sonra bir gün önceden ıslatılan diyaliz membran uygun boyutlarda kesildi, bir ucu klips yardımı ile kısıtılarak içerisine nanopartikül dispersiyonu konuldu ve üst kısmı da klips yardımıyla kısıtıldı. Hazırlanan diyaliz torbası pH 1,2 çözeltisi içeren beher içerisine konuldu ve 37°C'ye ayarlanmış olan su banyosunda sabit hızda karıştırıldı. 30. dakikada salım ortamından 3 mL örnek alındı ve alınan örnek yerine 3 mL pH 1,2 çözeltisi ilave edildi. Aynı işlem 1. ve 2. saatlerde de yapıldı. 2. saatin sonunda diyaliz torbası aynı su banyosunda bulunan 50 mL pH 6,8 fosfat tamponu içerisine konuldu ve 4., 6. ve 8. saatlerde de bu ortamdan örnek alınarak alınan örnek hacmi kadar pH 6,8 fosfat tamponu eklendi. 8. saatin sonunda ortam aynı su banyosunda bulunan 50 mL pH 7,4 fosfat tamponu ile değiştirildi ve aynı şekilde 10., 12. ve 24. saatlerde örnek alınarak, salım ortamı pH 7,4 fosfat tamponu ile tamamlandı. Alınan örnekler UV spektrofotometre ile analiz edildi, her ortam için hazırlanan kalibrasyon denklemleri kullanılarak örneklerdeki insülin miktarları hesaplandı, in vitro salım profilleri oluşturuldu. İn vitro salım çalışmaları esnasında çekilen fotoğraf Resim 3.1'de görülmektedir.



Resim 3.1. İn vitro salım çalışması deney düzeneği

3.8.1. Nanopartikül formülsayonlarından in vitro insülin salım kinetiklerinin değerlendirilmesi

Hazırlanan formülasyonlardan insülin salımını matematiksel olarak modellemek amacıyla DDSolver® programı kullanıldı. CS:TPP, CS:SBE- β -SD, K-CS:TPP ve K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin hangi kinetiğe uyarak insülin salımı gerçekleştirdiği en yüksek korelasyonun tespit edilmesiyle belirlendi.

3.9. Nanopartiküllerin sitotoksitelerinin değerlendirilmesi

Hazırlanan optimum CS:TPP, CS:SBE- β -SD, K-CS:TPP ve K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin sitotoksitite potansiyelleri MTT testleri ile değerlendirildi.*

Sitotoksitite incelenmesinde MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi, toksik maddelere belirenen sürelerde maruziyetin ardından hücre canlılığının saptanmasında en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Yöntemin esası, mitokondri

* MTT testleri, Dr. Biol. Şükran YILMAZ rehberliğinde, Uzm. Biol. Hilal PARLAK tarafından T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı ŞAP Enstitüsü Hücre Bankası Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

içindeki süksinat dehidrogenaz tarafından tetrazolyum halkasının parçalanmasıyla sarı renkteki MTT'nin çözünmeyen mor renkli formazana dönüşmesi ve oluşan formazanın çözünür hale getirilmesinden sonra mor rengin şiddetinin spektrofotometrik olarak tayin edilmesidir. (Fotakis ve Timbrell, 2006).

L929 fare fibroblast hücreleri kullanılan MTT testinde, optimum nanopartiküller 50, 100 ve 200 µg insülin içerecek şekilde serumlu DMEM içinde vorteks ve ultrasonik banyo yardımı ile dağıtıldı ardından 0,45 µm'lik selüloz asetat membran filtreden süzüldü. 20 mg insülin 100 µl DMSO'da çözüldü ve 100 mL'ye serumlu DMEM ile seyreltildi. Hazırlanan stok çözelti 0,45 µm'lik selüloz asetat membran filtreden süzüldü ve 200µg/mL'lik stok çözeltisi kullanılarak 100 ve 50 µg/mL derişimindeki çözeltiler serumlu DMEM ile hazırlandı. Seyreltme işlemlerinin tümü steril malzemeler ve steril DMEM kullanılarak laminar hava akım kabinde yapıldı. L929 hücreleri, ATCC tarafından belirlenen protokole göre kültür ile çoğaltıldı ve hücreler 5x10³ hücre/kuyucuk yoğunlukta 96 kuyucuklu plakalara ekildi. K 100'er µl DMEM eklenen kuyucuklar 37°C'de CO₂'li etüvde 24 saat bekletildi. Sadece DMEM içeren ve %0,1 oranında DMSO içeren DMEM kontrol grupları belirlendi. Plakaların 24 saat sonunda boşaltılmasının ardından kuyucuklara farklı derişimlerde test maddelerinin DMEM içerisindeki çözeltileri (100 mL) eklendi ve kuyucuklar 24 saat 37°C'de CO₂'li etüvde bekletildi. Kaplardaki içeriklerin 24 saatin sonunda boşaltılmasından sonra 100 µl taze DMEM ile 13 µl MTT çözeltisi tüm kuyucuklara eklendi. Hemen alüminyum folyoyla sıkıca sarılan plakalar ve 37°C'de CO₂'li etüvde 3 saat boyunca bekletildi. Kaplar 3 saatin sonunda çıkarılarak boşaltıldı ve 100'er µl izopropanol kuyucuklara ilave edildi. Oluşan mor renk spektrofotometrik olarak 570 nm'de tayin edildi. Maddelerin farklı derişimleri için farklı absorbans değerleri gözlemlendi ve bu absorbans değerlerin ortalamaları ile % canlılık hesapları yapıldı (Präbst, Engelhardt, Ringgeler ve Hübner, 2017). % canlılık hesabı Eş. 3.2'de gösterilmiştir.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Örnek kuyucuk absorbansı}}{\text{Kontrol kuyucuk absorbansı}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.10. In vitro stabilite

İn vitro stabilite deneyi için hazırlanan nanopartikül süspansiyonları beherde pH 1,2 çözeltisinde ve pH 6,8 fosfat tampon çözeltisinde dağıtıldı. Beherler 37°C'ye ayarlanan su banyosunda sabit hızda karıştırıldı. Beherlerde 0. ve 30. dakikalarda ve 1., 2. ve 4. saatlerde örnek alınarak, örnekler uygun tampon ile 10 mL'ye seyreltildi. Seyreltilen örnekler Malvern Zeta Sizer cihazında partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerlerinde anlamlı bir değişiklik olup olmadığı açısından değerlendirildi.

3.11. Stabilite çalışmaları

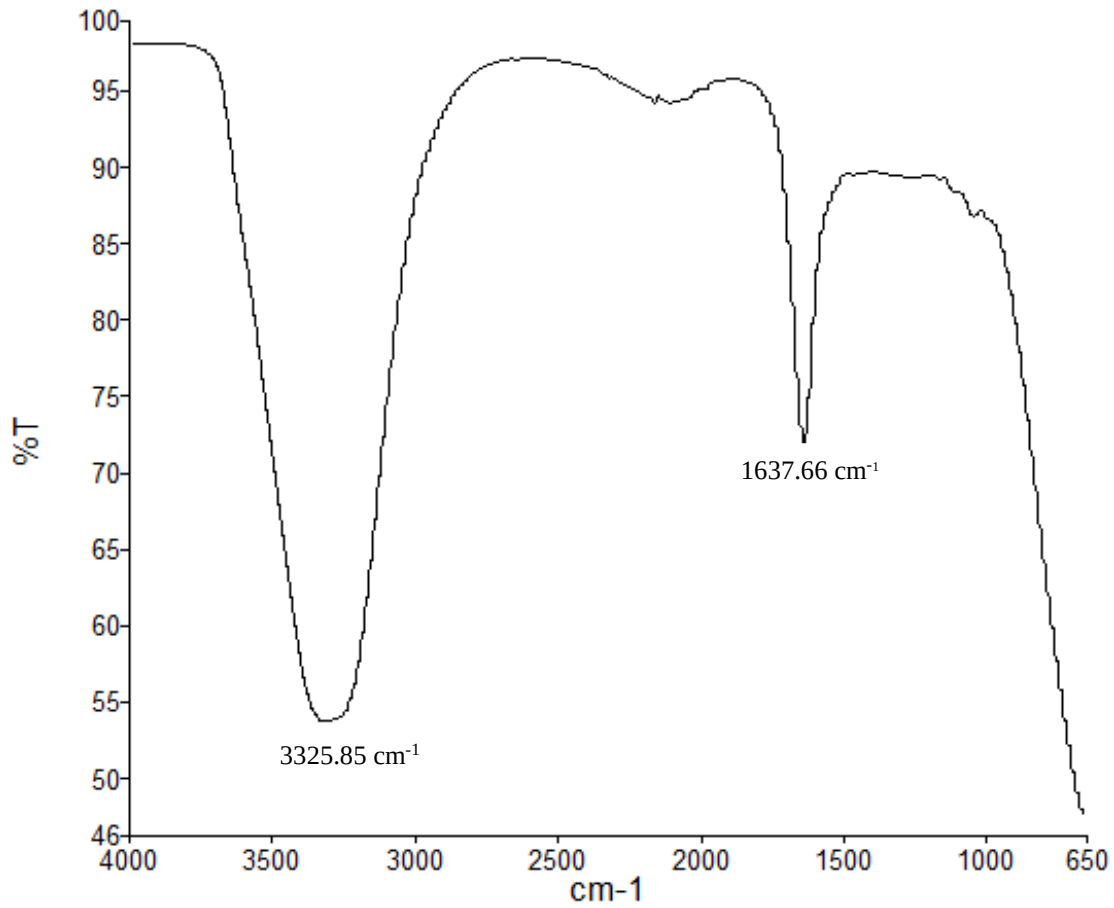
Hazırlanan optimum nanopartikül formülasyonları ve insülin çözeltisi (çözelti derişimi 100 µg/mL olacak şekilde insülinin distile sudaki çözeltisi) ayrı tüplere konularak 25°C sıcaklık ve %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde ve 4°C sıcaklık ve ± ortam nemi koşullarında buzdolabında insülin çözeltisi 90 gün, nanopartikül formülasyonları 180 gün bekletildi. 0., 15., 30., 60., 90., 120., 150. ve 180. günlerde örnekler alınarak Malvern Zeta Sizer cihazında partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel açısından incelendi, insülin miktar tayini yapıldı ve bu değerlerde anlamlı bir değişiklik olup olmadığı değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Etkin Maddenin Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

4.1.1. İnsülinin fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FT-IR) analizinden elde edilen bulguları

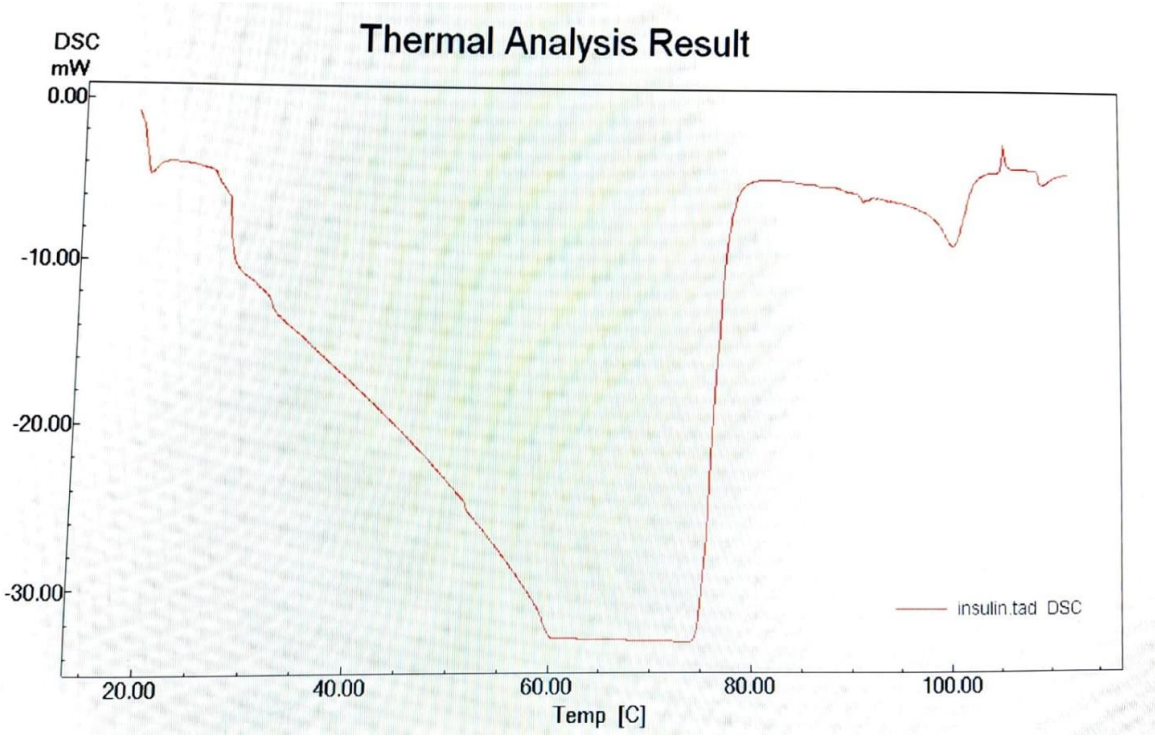
FT-IR analizleri Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı gibi yapıldı. Humulin®-R’ye ait FT-IR spektrumu Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Humulin®-R’ye ait FT-IR spektrumu

4.1.2. İnsülinin diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizinden elde edilen bulguları

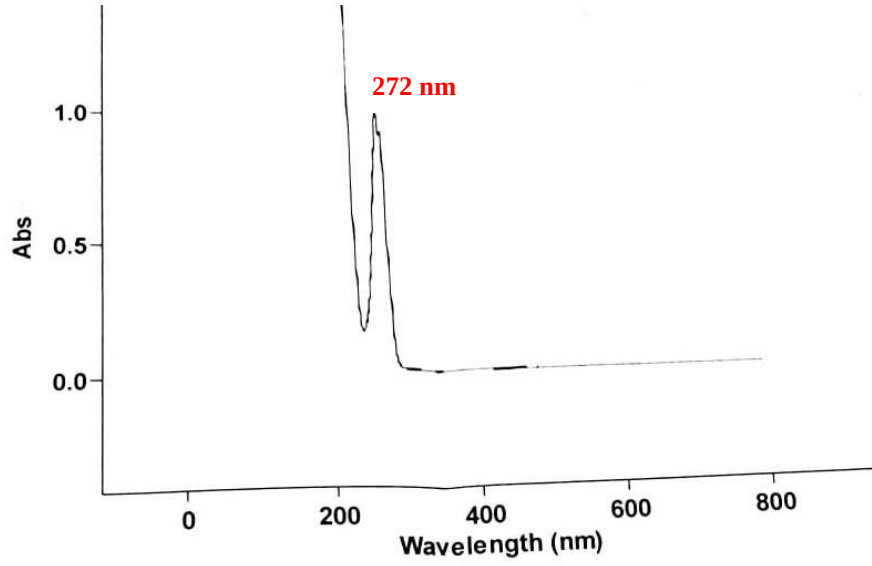
DSC analizleri Bölüm 3.2.3'te belirtildiği gibi yapıldı. Humulin®-R' ye ait analiz sonuçları ise Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Humulin®-R'ye ait DSC termogramı

4.1.3. İnsülinin UV-Vis spektrofotometredeki dalga boyu taraması bulguları

Humulin®-R'den hareketle distile su ile hazırlanan 200 µg/mL derişimindeki stok çözeltisinden hareketle 100 µg/mL derişiminde insülin çözeltisi hazırlanarak UV-Vis spektrofotometresinde distile suya karşı dalga boyu taraması Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. İnsülin çözeltisinin maksimum absorbans verdiği dalga boyu (λ_{max}) 272 nm olarak belirlendi. İnsülin çözeltisine ait spektrum Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Scan Analysis Report

Report Time : Tue 20 Oct 03:13:36 PM 2020
 Method C:\Users\GAZI\Desktop\TUGCE\ins 100.DSW
 Batch: 5.0.0.999
 Software version:
 Operator:

Instrument Parameters

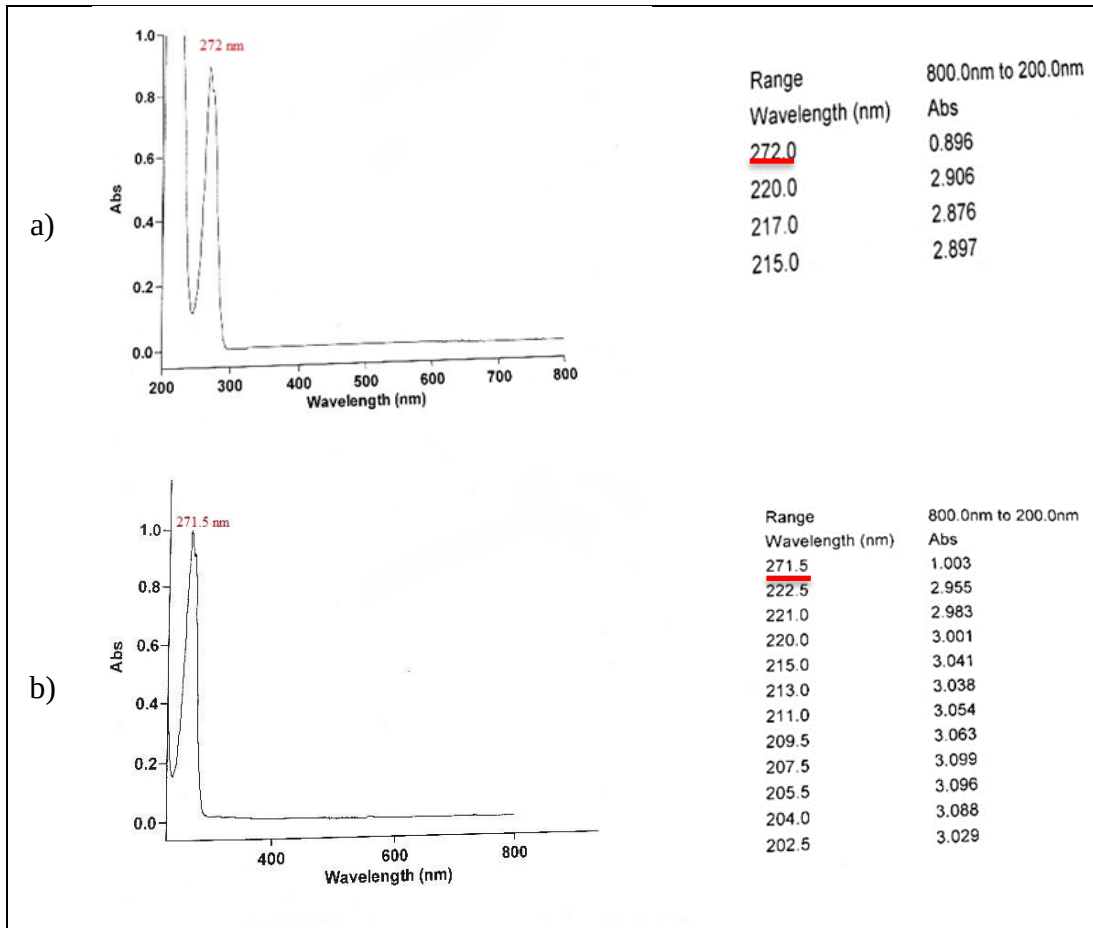
Instrument Cary 60
 Instrument Version 2.00
 Start (nm) 800.0
 Stop (nm) 200.0
 X Mode Nanometers
 Y Mode Abs
 UV-Vis Scan Rate (nm/min) 300.00
 UV-Vis Data Interval (nm) 0.50
 UV-Vis Ave. Time (sec) 0.1000
 Beam Mode Dual Beam
 Baseline Correction On
 Baseline Type Baseline correction
 Baseline File Name
 Baseline Std Ref File Name
 Cycle Mode Off
 Comments

Şekil 4.3. İnsülinin distile su içerisinde 200-800 nm arası dalga boyu taramasına ait spektrum

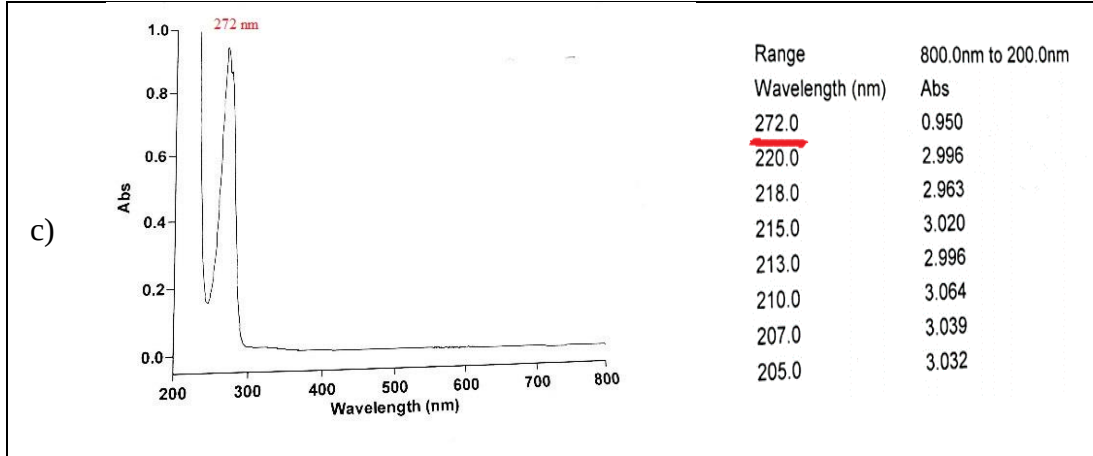
4.2. Etkin maddenin UV-Vis spektrofotometre ile miktar tayini yönteminin validasyon çalışmalarına ait bulgular

İnsülinin miktar tayini yönteminin validasyon çalışmaları pH 1,2 çözeltisinde ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tamponunda Bölüm 3.2.4’te anlatıldığı gibi yapıldı. Miktar tayini yönteminin validasyon çalışmaları için doğrusallık, kesinlik (deney içi ve deneyler arası), doğruluk ve geri elde, stabilite, özgünlük ve seçicilik parametreleri incelenirken duyarlılık ve saptama sınırları da hesaplandı.

Validasyon çalışmalarına başlamadan önce pH 1,2 çözeltisi ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tamponunda hazırlanan insülin çözeltilerinin her bir ortamdaki dalga boyu taraması yapıldı. Spektrumlar Şekil 4.4’te gösterilmiştir.



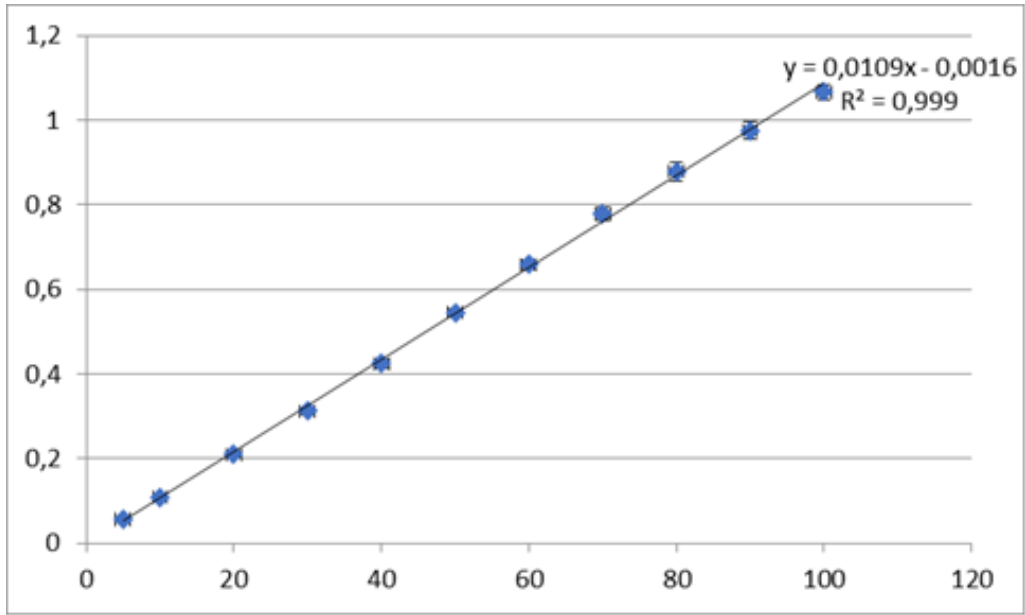
Şekil 4.4. Kullanılan analiz yönteminin insülin için a) pH 1,2 çözeltisinde b) pH 6,8 fosfat tamponundaki c) pH 7,4 fosfat tamponundaki dalga boyu taramasına ait spektrumlar



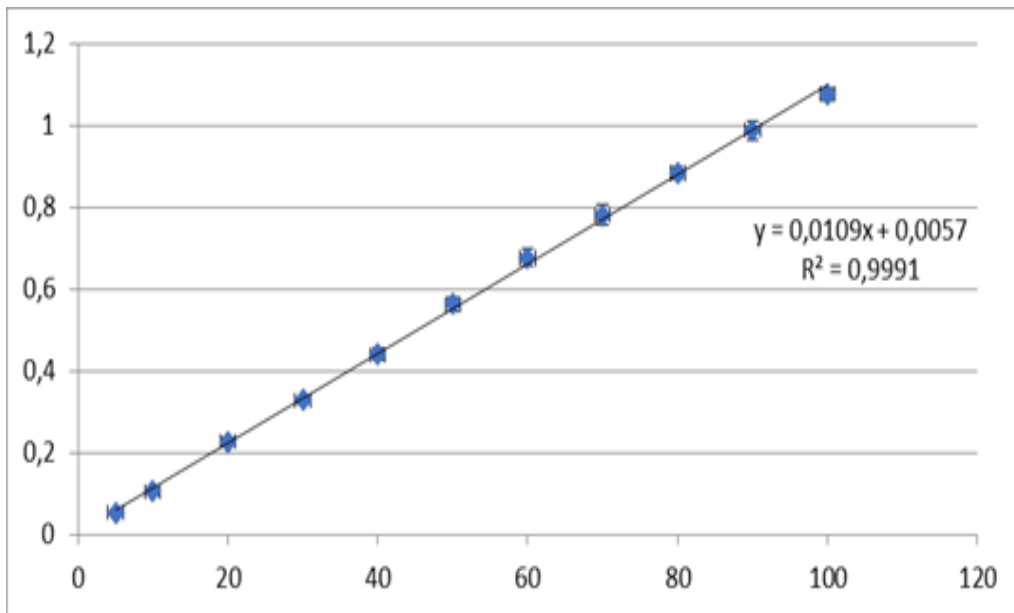
Şekil 4.4. (devam) Kullanılan analiz yönteminin insülin için a) pH 1,2 çözeltisinde b) pH 6,8 fosfat tamponundaki c) pH 7,4 fosfat tamponundaki dalga boyu taramasına ait spektrumlar

4.2.1. Doğrusallık

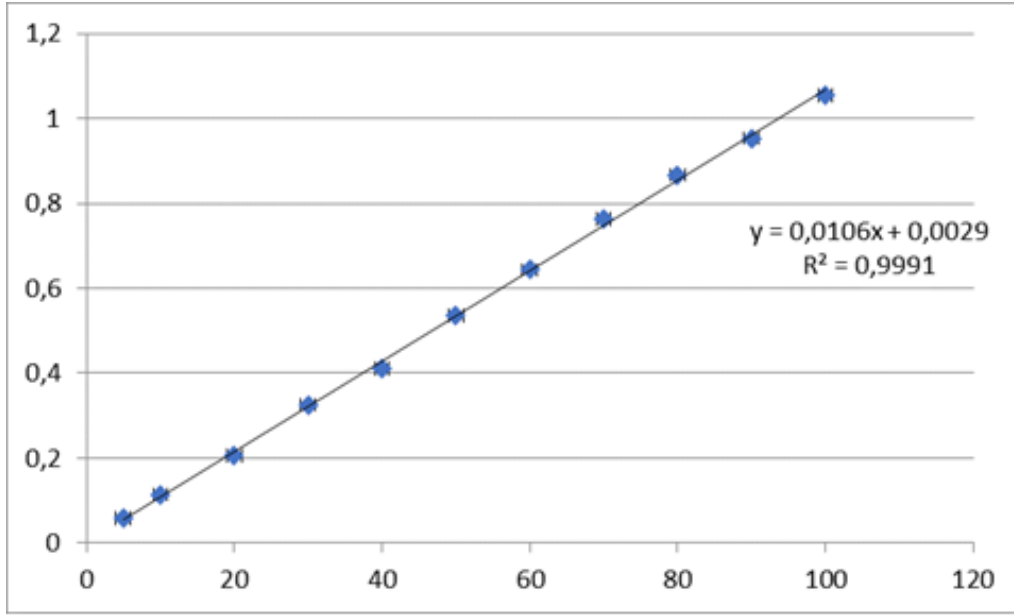
Doğrusallık çalışmaları Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. 200 µg/mL derişimindeki insülin stok çözeltisinden hareketle 100 µg/mL insülin ara stok çözeltisi hazırlandı. Ara stok çözeltisinden hareketle de 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 ve 5 µg/mL derişimlerinde standart insülin çözeltileri pH 1,2 çözeltisi ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tamponunda ayrı ayrı hazırlandı. Hazırlanan ara stok ve standart çözeltilerinin UV-Vis spektrofotometresinde absorbans değerleri 272 nm'de okundu. Derişimlere karşılık gelen absorbans değerleri ile derişimler grafiğe geçirildi ve en küçük kareler yöntemine göre değerlendirilip denklem elde edilerek doğrusallık kanıtlandı. Derişime karşı absorbans değerleri grafikleri her pH için ayrı ayrı çizildi. Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de sırasıyla pH 1,2 çözeltisi ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tampon çözeltisi ortamlarındaki kalibrasyon grafikleri, kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları gösterilmiştir.



Şekil 4.5. İnsülinin pH 1,2 çözeltisindeki kalibrasyon grafiği



Şekil 4.6. İnsülinin pH 6,8 fosfat tamponundaki kalibrasyon grafiği



Şekil 4.7. İnsülinin pH 7,4 fosfat tamponundaki kalibrasyon grafiği

4.2.2. Kesinlik

Kesinlik çalışmaları deney içi kesinlik ve deneyler arası kesinlik olmak üzere iki başlık altında değerlendirilerek Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi yapıldı.

Deney içi kesinlik

İnsülinin Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3'te sırasıyla pH 1,2 çözeltisi ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tamponu ortamındaki deney içi kesinlik sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.1. İnsülinin pH 1,2 çözeltisindeki deney içi kesinlik bulguları

Örnek No	İnsülinçözeltilisinin derişimi (µg/mL)	Ölçülen insülin derişimi (µg/mL)
1	20	19,65
2	20	19,62
3	20	19,72
4	20	19,74
5	20	19,69
6	20	19,76
7	20	19,69
8	20	19,79
9	20	19,82
10	20	19,81
Ortalama		19,73
SS		0,19
% BS		0,960

Çizelge 4.2. İnsülinin pH 6,8 fosfat tamponundaki deney içi kesinlik bulguları

Örnek No	İnsülin çözeltisinin derişimi (µg/mL)	Ölçülen insülin derişimi (µg/mL)
1	20	19,85
2	20	19,72
3	20	19,78
4	20	19,84
5	20	19,82
6	20	19,69
7	20	19,81
8	20	19,77
9	20	19,76
10	20	19,71
Ortalama		19,78
SS		0,16
% BS		0,790

Çizelge 4.3. İnsülinin pH 7,4 fosfat tamponundaki deney içi kesinlik bulguları

Örnek No	İnsülin çözeltisinin derişimi (µg/mL)	Ölçülen insülin derişimi (µg/mL)
1	20	20,32
2	20	20,21
3	20	20,14
4	20	20,41
5	20	20,22
6	20	20,25
7	20	20,12
8	20	19,98
9	20	19,85
10	20	20,31
Ortalama		20,18
SS		0,13
% BS		0,640

Deneyler arası kesinlik

İnsülinin Çizelge 4.4, 4.5 ve 4.6’da sırasıyla pH 1,2 çözeltisi ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tamponundaki deneyler arası kesinlik sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.4. İnsülinin pH 1,2 çözeltisindeki deneyler arası kesinlik bulguları

Derişim (µg/mL)	1.gün	2. gün	3. gün	ORT	SS	% BS
10	9,75	9,76	9,82	9,78	0,16	1,601
30	29,26	29,65	29,45	29,45	0,39	1,312
60	58,21	58,71	58,65	58,52	1,05	1,751

Çizelge 4.5. İnsülinin pH 6,8 fosfat tamponundaki deneyler arası kesinlik bulguları

Derişim (µg/mL)	1.gün	2. gün	3. gün	ORT	SS	% BS
10	10,15	10,23	10,26	10,21	0,15	1,513
30	29,16	29,22	29,28	29,22	0,55	1,832
60	59,15	59,36	59,31	59,27	0,51	0,854

Çizelge 4.6. İnsülinin pH 7,4 fosfat tamponundaki deneyler arası kesinlik bulguları

Derişim (µg/mL)	1.gün	2. gün	3. gün	ORT	SS	% BS
10	9,84	9,75	9,81	9,8	0,14	1,425
30	30,53	30,43	30,17	30,38	0,27	0,905
60	59,15	59,08	59,04	59,09	0,64	1,071

4.2.3. Doğruluk ve geri elde

Doğruluk ve geri elde çalışmaları Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. İnsülinin Çizelge 4.7, 4.8 ve 4.9'da sırasıyla pH 1,2 çözeltisi ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tamponundaki doğruluk ve geri elde sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.7. İnsülinin pH 1,2 çözeltisindeki doğruluk ve geri elde bulguları

İnsülin derişimi (µg/mL)	Hesapla bulunan insülin derişimi (µg/mL)	Geri elde (%)	ORT	SS	% BS
70	69,13	98,75	99,39	0,43	0,612
70	69,74	99,64			
70	69,85	99,79			
80	81,21	101,51	101,08	0,76	0,953
80	80,74	100,93			
80	80,63	100,79			
90	89,65	99,61	100,36	0,26	0,298
90	90,21	100,73			
90	90,13	100,74			

Çizelge 4.8. İnsülinin pH 6,8 fosfat tamponundaki doğruluk ve geri elde bulguları

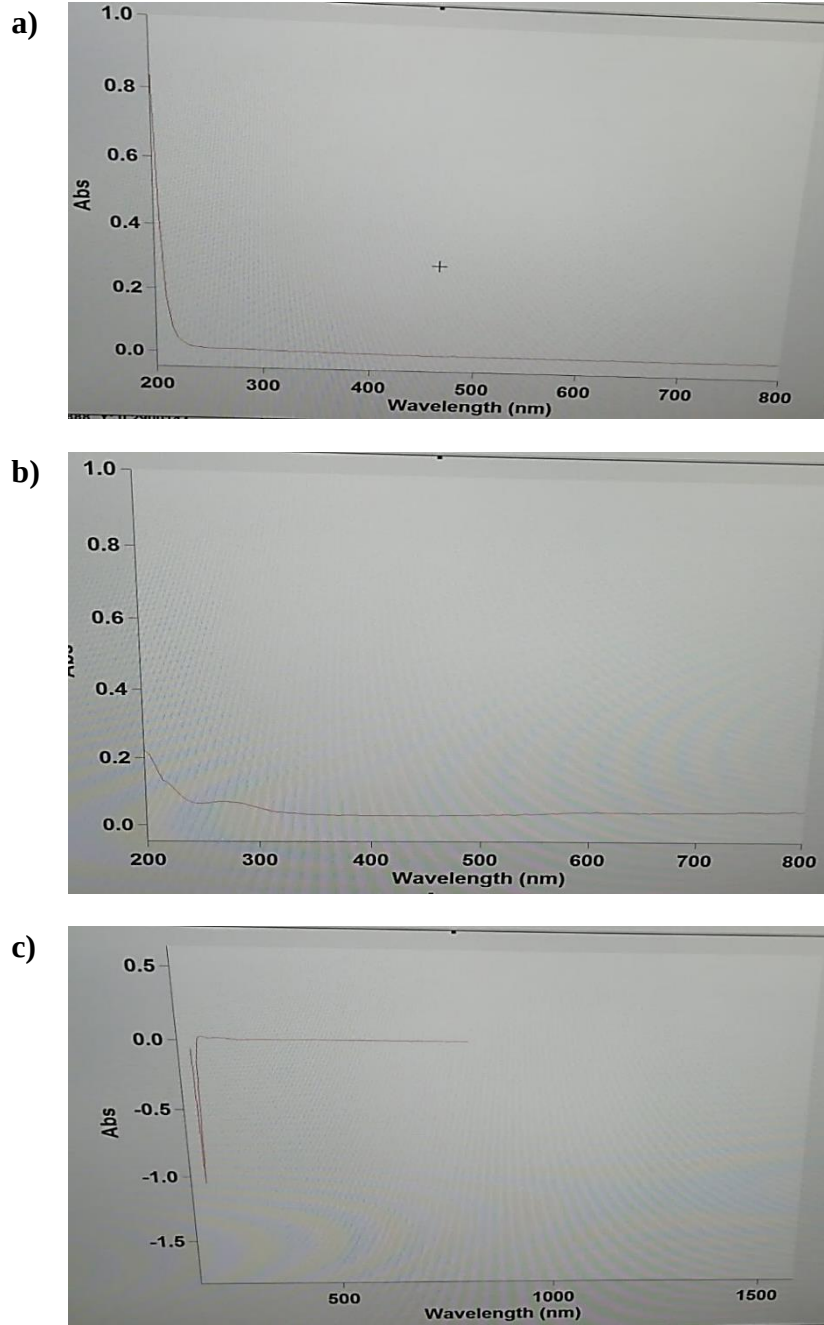
İnsülin derişimi (µg/mL)	Hesapla bulunan insülin derişimi (µg/mL)	Geri elde (%)	ORT	SS	% BS
70	69,91	99,87	99,88	0,09	0,130
70	69,92	99,89			
70	69,92	99,89			
80	80,52	100,65	100,36	0,26	0,332
80	80,19	100,24			
80	80,16	100,20			
90	89,91	99,90	99,48	0,37	0,411
90	89,72	99,69			
90	88,96	98,84			

Çizelge 4.9. İnsülinin pH 7,4 fosfat tamponundaki doğruluk ve geri elde bulguları

İnsülin derişimi (µg/mL)	Hesapla bulunan insülin derişimi (µg/mL)	Geri elde (%)	ORT	SS	% BS
70	69,16	98,80	99,12	0,62	0,891
70	69,54	99,34			
70	69,46	99,23			
80	79,09	98,86	98,73	0,90	1,133
80	78,97	98,71			
80	78,90	98,63			
90	88,36	98,18	98,17	1,29	1,432
90	88,35	98,17			
90	88,34	98,16			

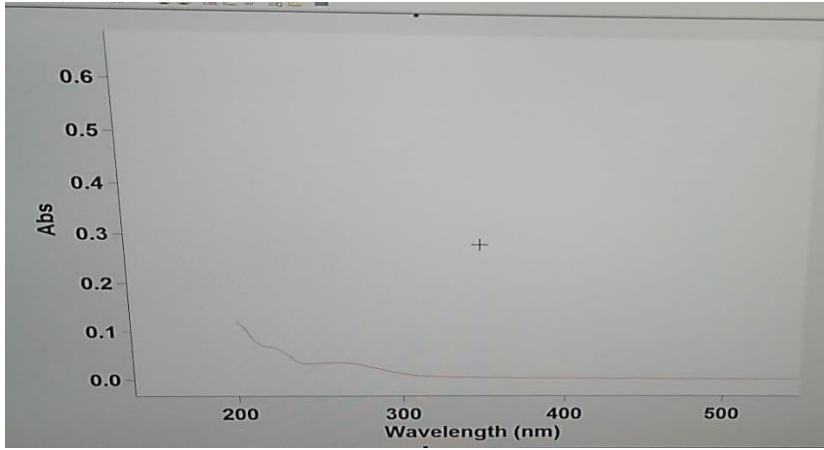
4.2.4. Özgünlük ve seçicilik

Özgünlük ve seçicilik çalışmaları Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Kullanılan analiz yönteminin kitosana ait özgünlük ve seçicilik sonuçları Şekil 4.8'de, TPP'a ait özgünlük ve seçicilik sonuçları Şekil 4.9'da, SBE- β -SD'e ait özgünlük ve seçicilik sonuçları Şekil 4.10'da, Kollicoat® MAE 100 P'a ait özgünlük ve seçicilik çalışmaları Şekil 4.11'de, mannitole ait özgünlük ve seçicilik çalışmaları Şekil 4.14'de ve kitosan-TPP- Kollicoat® MAE 100 P ve kitosan-SBE- β -SD-Kollicoat® MAE 100 P karışımlarının özgünlük ve seçicilik çalışmaları Şekil 4.13'te gösterilmiştir.

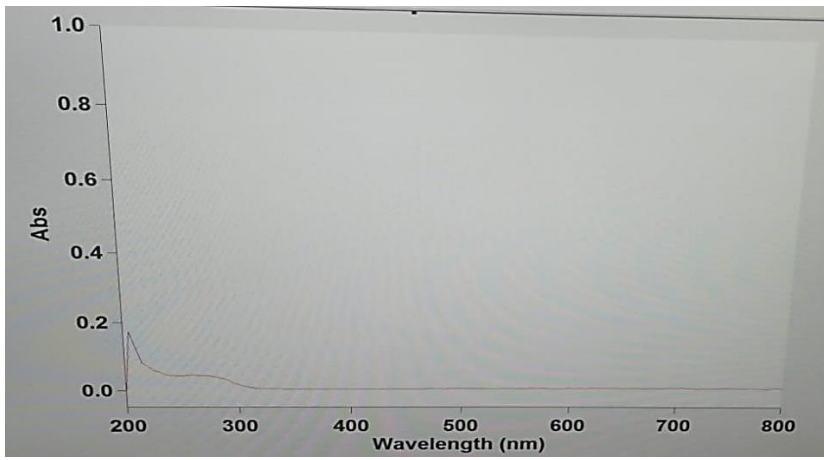


Şekil 4.8. Kullanılan analiz yönteminin kitosan için a) pH 1,2 çözeltisindeki b) pH 6,8 fosfat tamponundaki c) pH 7,4 fosfat tamponundaki özgünlük ve seçiciliği

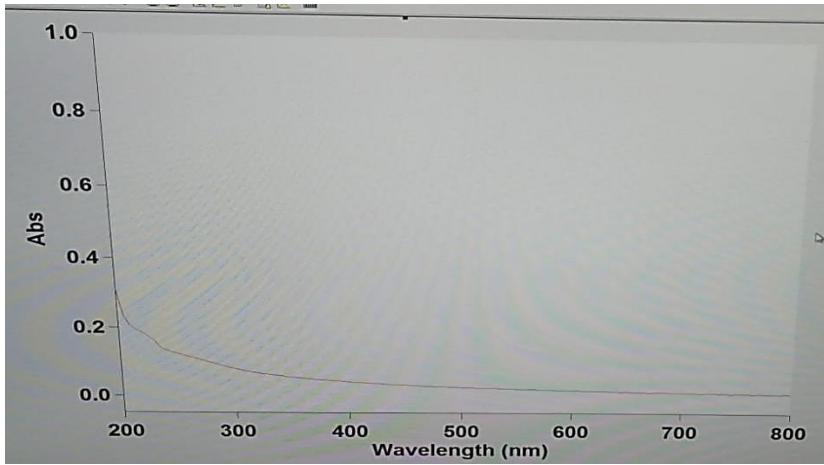
a)



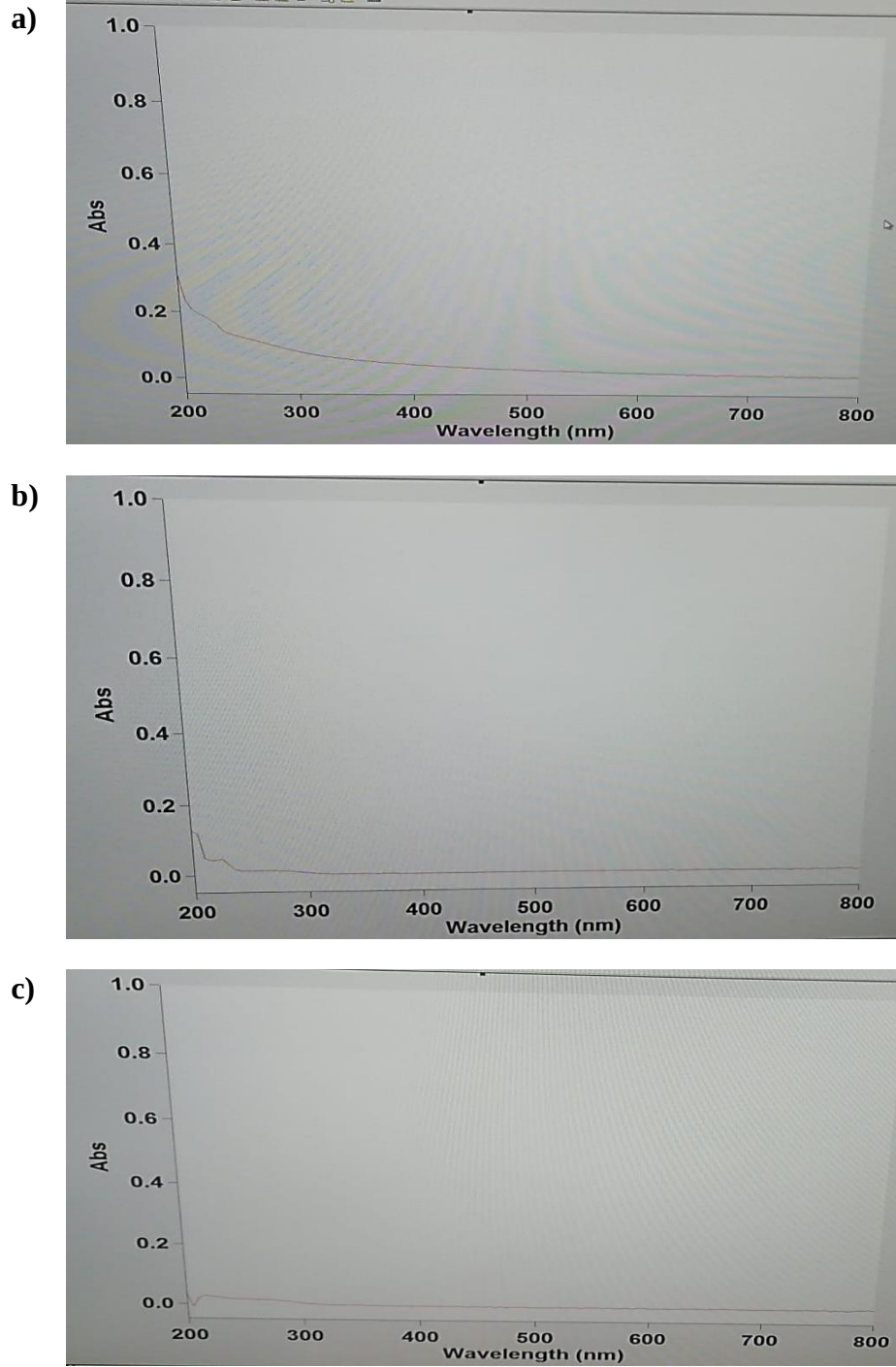
b)



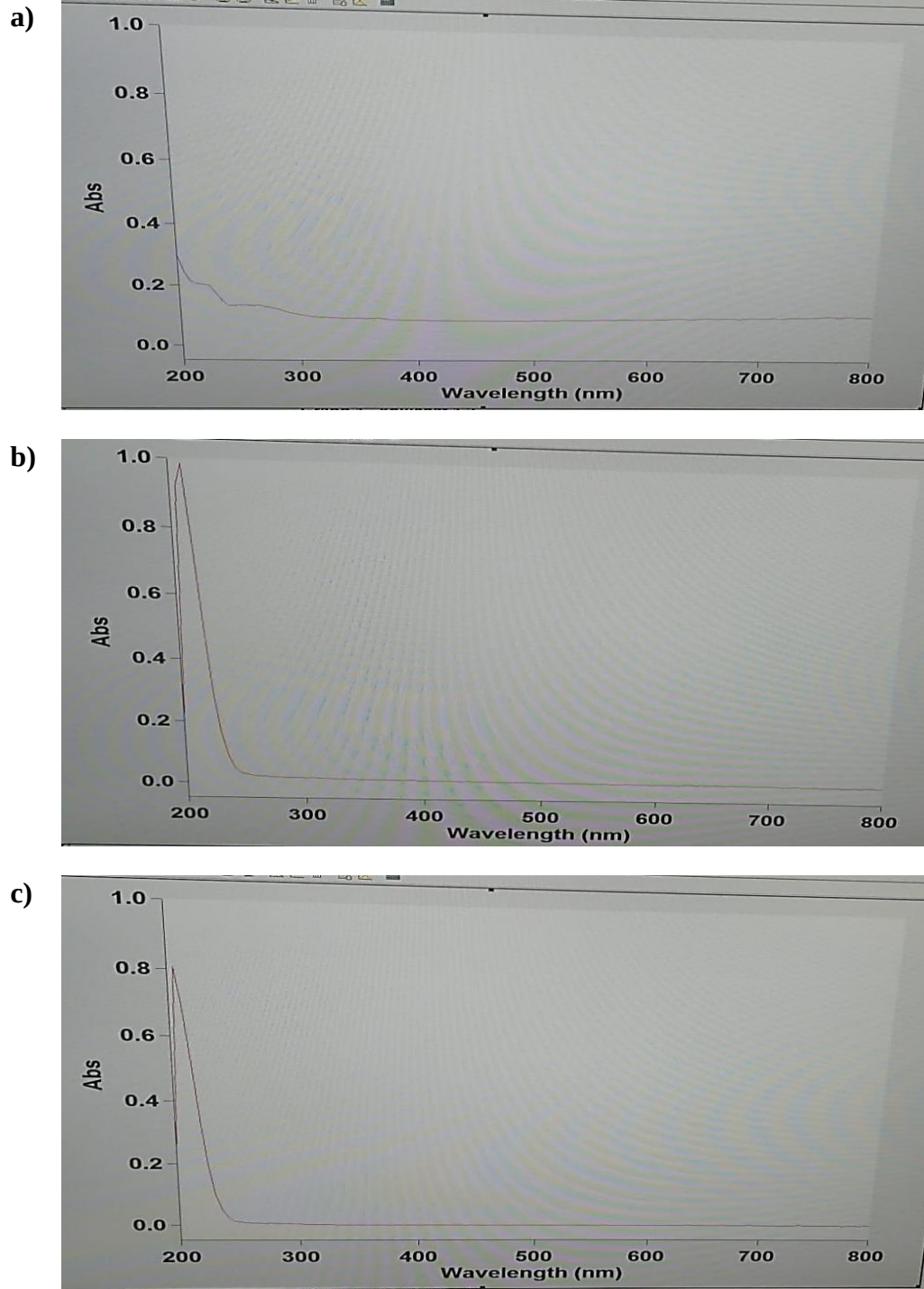
c)



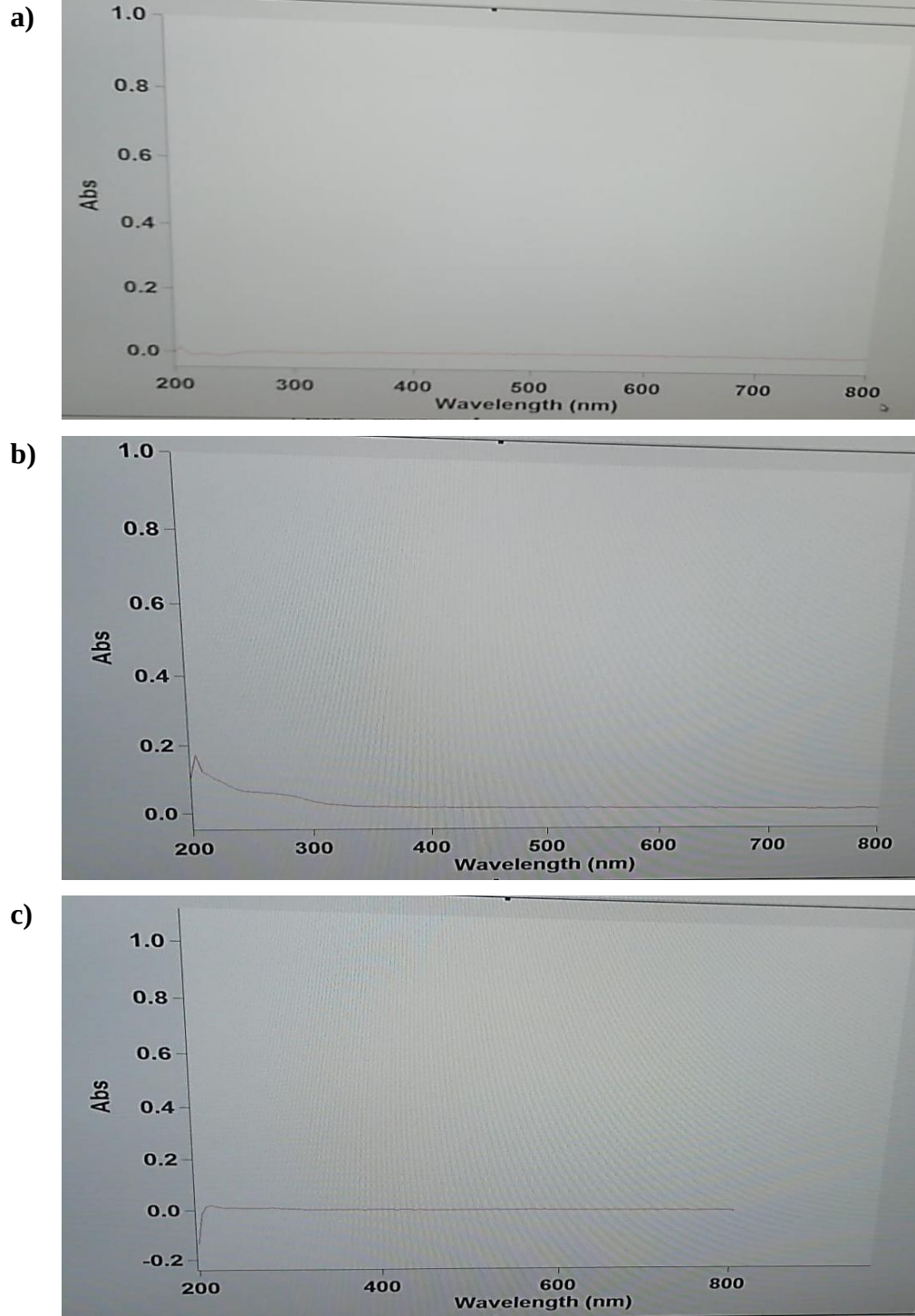
Şekil 4.9. Kullanılan analiz yönteminin TPP için a) pH 1,2 çözeltisindeki b) pH 6,8 fosfat tamponundaki c) pH 7,4 fosfat tamponundaki özgünlük ve seçiciliği



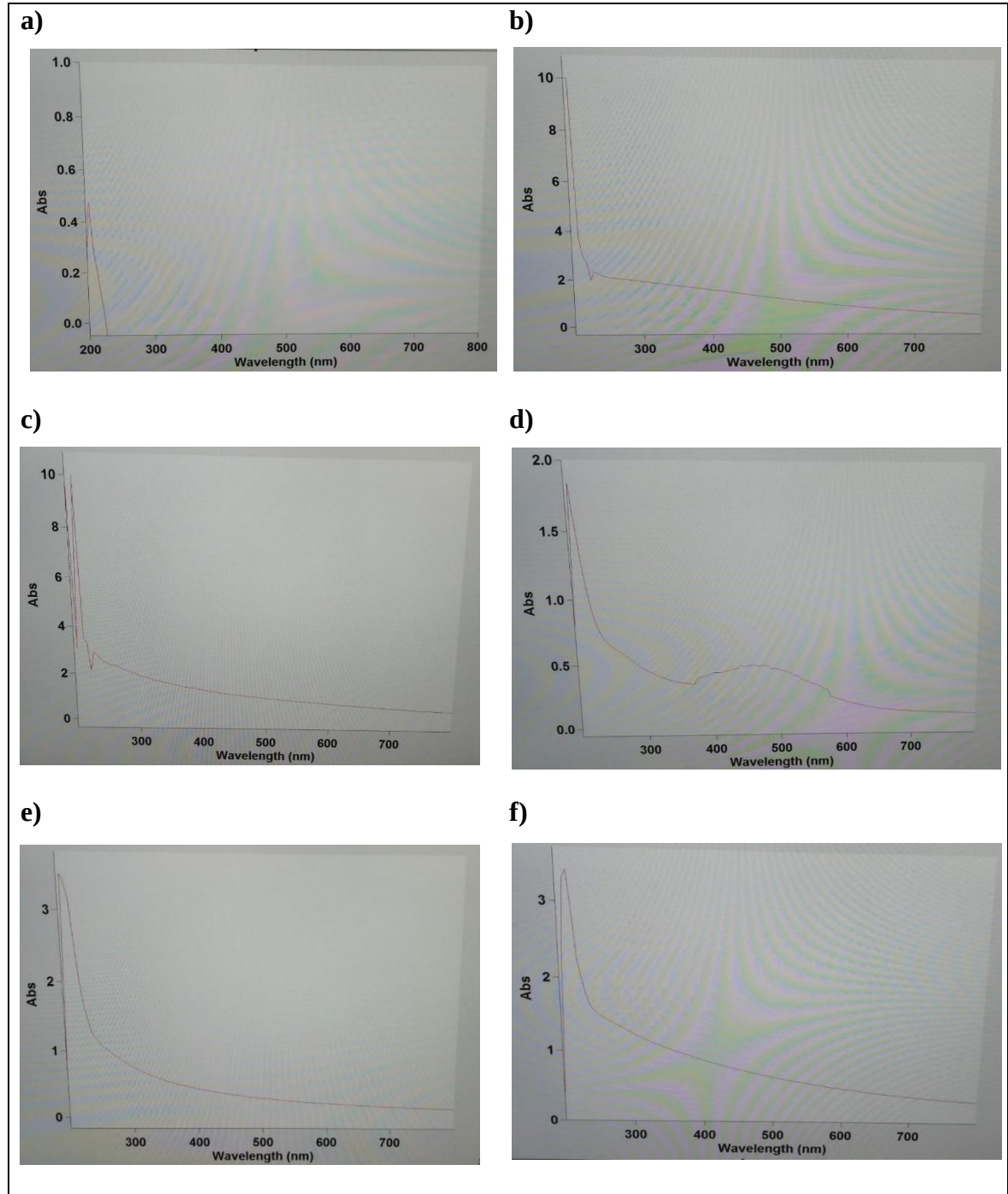
Şekil 4.10. Kullanılan analiz yönteminin SBE- β -SD için a) pH 1,2 çözeltisindeki b) pH 6,8 fosfat tamponundaki c) pH 7,4 fosfat tamponundaki özgülük ve seçiciliği



Şekil 4.11. Kullanılan analiz yönteminin Kollicoat® MAE 100 P için a) pH 1,2 çözeltisindeki b) pH 6,8 fosfat tamponundaki c) pH 7,4 fosfat tamponundaki özgünlük ve seçiciliği



Şekil 4.12. Kullanılan analiz yönteminin mannitol için a) pH 1,2 çözeltisindeki b) pH 6,8 fosfat tamponundaki c) pH 7,4 fosfat tamponundaki özgünlük ve seçiciliği



Şekil 4.13. Kullanılan analiz yönteminin a) kitosan, TPP ve Kollicoat® MAE 100 P karışımı için pH 1,2 çözeltisindeki b) kitosan, SBE- β -SD ve Kollicoat® MAE 100 P karışımı için pH 1,2 çözeltisindeki c) kitosan, TPP ve Kollicoat® MAE 100 P karışımı için pH 6,8 fosfat tamponundaki d) kitosan, SBE- β -SD ve Kollicoat® MAE 100 P karışımı için pH 6,8 fosfat tamponundaki e) kitosan, TPP ve Kollicoat® MAE 100 P karışımı için pH 7,4 fosfat tamponundaki d) kitosan, SBE- β -SD ve Kollicoat® MAE 100 P karışımı için pH 7,4 fosfat tamponundaki özgünlük ve seçiciliği

4.2.5. Saptama ve tayin sınırı

Saptama (LOD) ve tayin (LOQ) sınırı validasyon çalışmaları Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Kullanılan yöntemin saptama ve tayin sınırı sonuçları pH 1,2 çözeltisi ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tamponu için Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

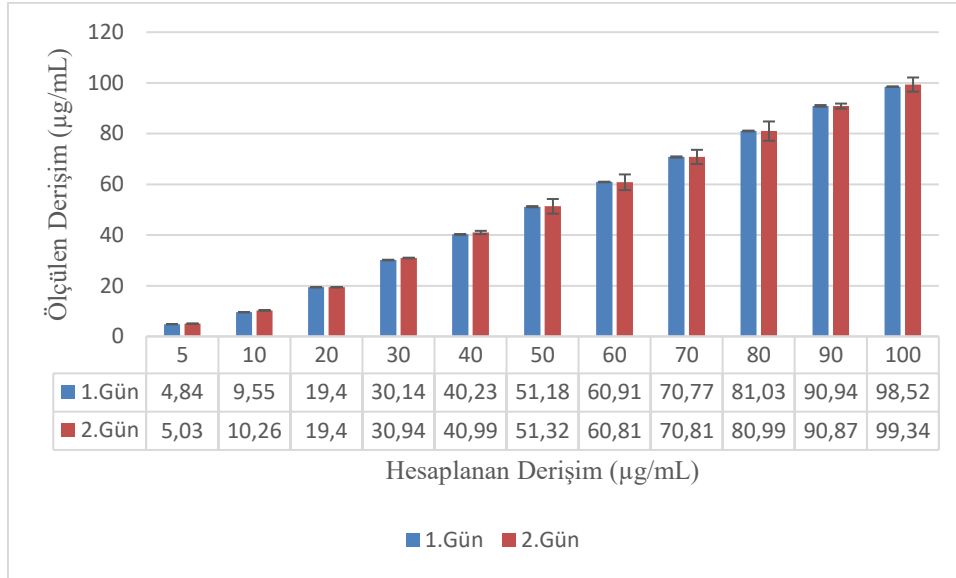
Çizelge 4.10. İnsülinin pH 1,2 çözeltisi ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tamponundaki duyarlılık ve saptama sınırı bulguları

	Saptama sınırı (µg/mL)	Tayin sınırı (µg/mL)
pH 1,2	0,873	2,645
pH 6,8	0,109	0,331
pH 7,4	1,040	3,153

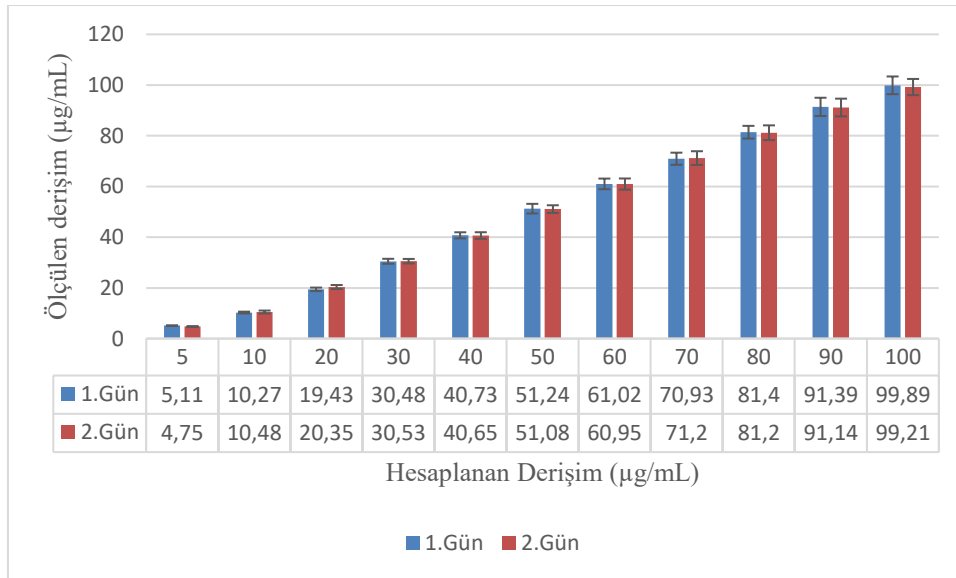
4.2.6. Stabilite

Yöntem validasyonu doğrultusunda stabilite çalışmaları Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. İnsülinin pH 1,2 çözeltisi ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tamponunda iki günlük stabilite verileri sırasıyla Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da verilmiştir.

a)

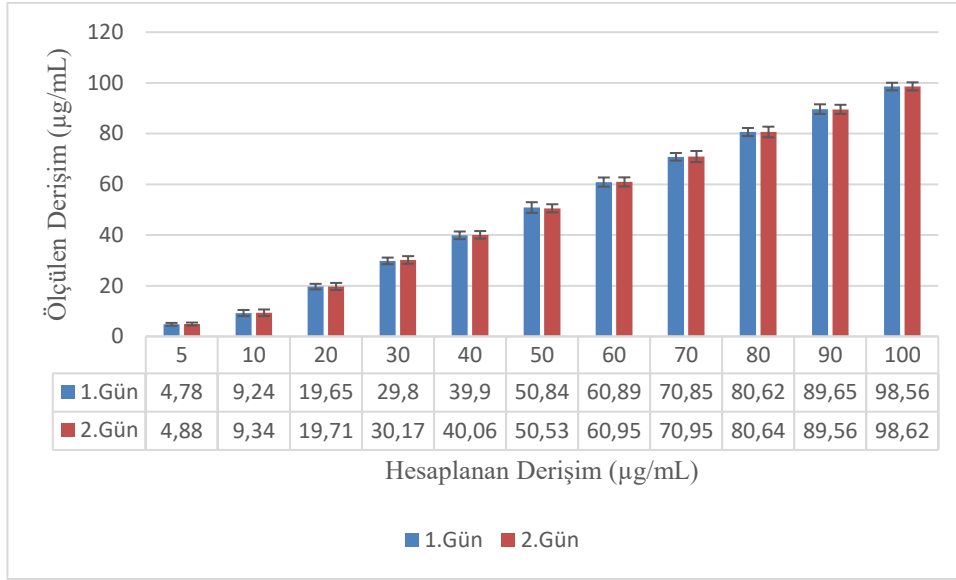


b)

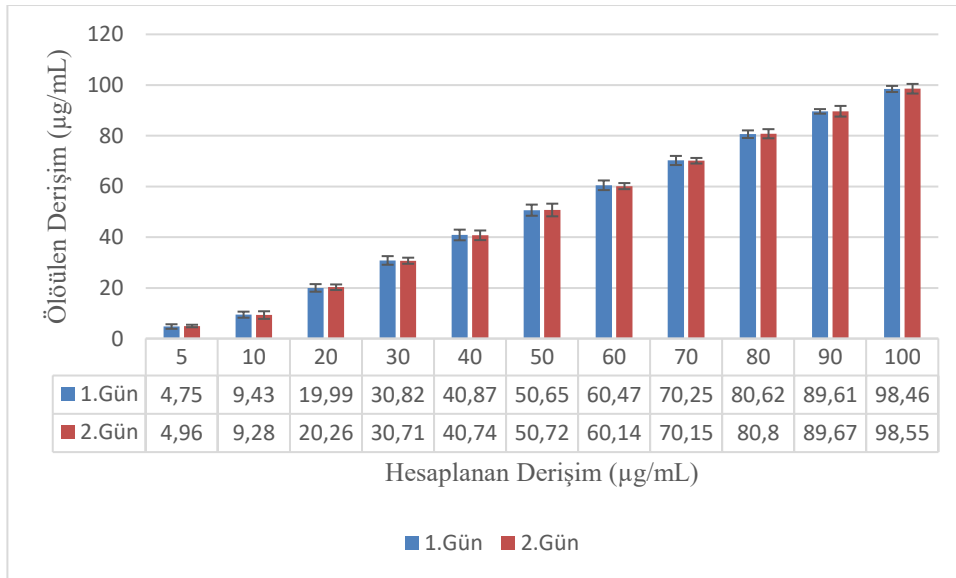


Şekil 4.14. a) İnsülinin pH 1,2 çözeltisindeki stabilite bulguları (4°C) b) İnsülinin pH 1,2 çözeltisindeki stabilite bulguları (25°C)

a)

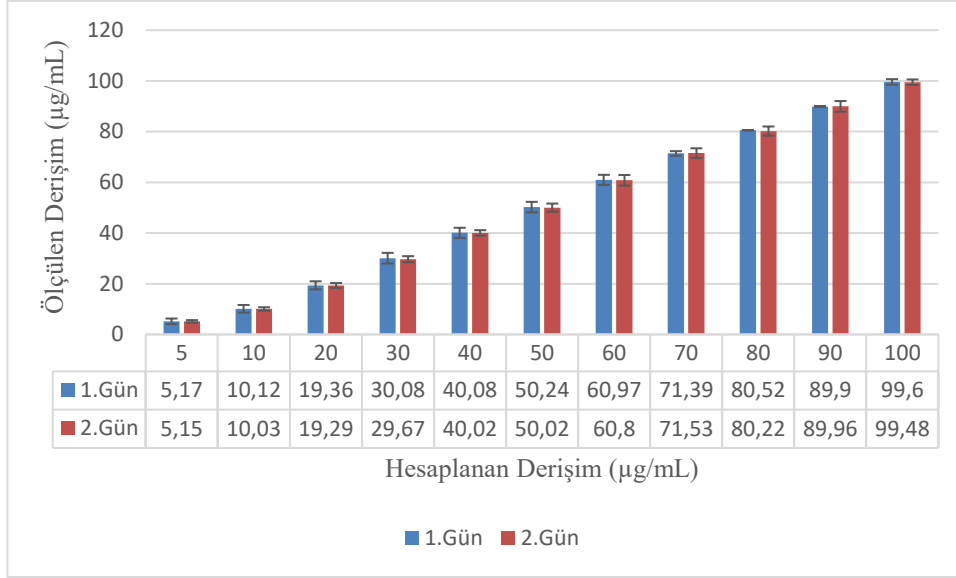


b)

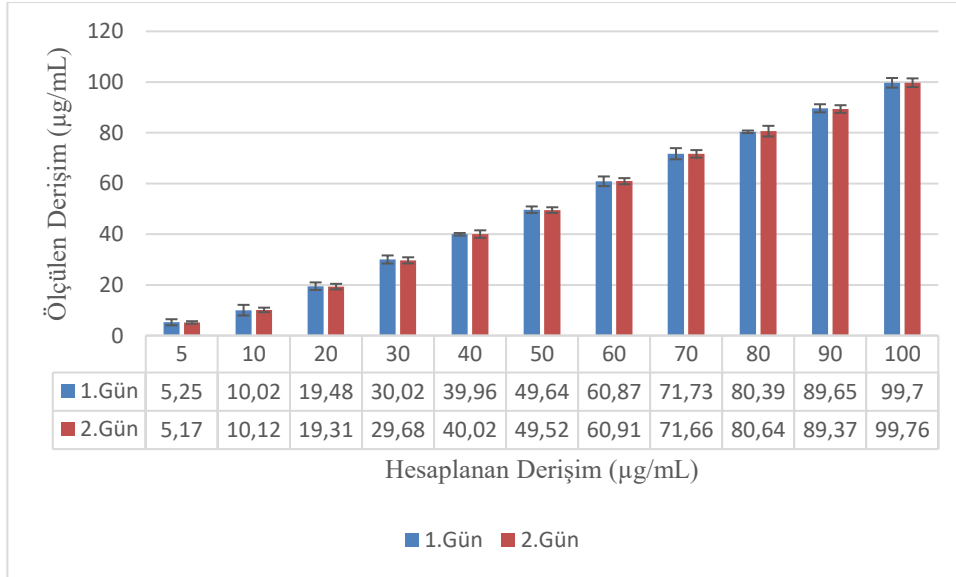


Şekil 4.15. a) İnsülinin pH 6,8 fosfat tamponundaki stabilite bulguları (4°C) b) İnsülinin pH 6,8 fosfat tamponundaki stabilite bulguları (25°C)

a)



b)



Şekil 4.16. a) İnsülinin pH 7,4 fosfat tamponundaki stabilite bulguları (4°C) b) İnsülinin pH 7,4 fosfat tamponundaki stabilite bulguları (25°C)

4.3. Nanopartikül Formülasyonlarının Optimizasyon Çalışmalarından Elde Edilen Bulgular

4.3.1. Kitosanın pH değerinin ve çapraz bağlayıcı miktarının belirlenmesinde elde edilen bulgular

Kitosan pH'sı 0,1 N HCl ve 0,1 N NaOH kullanılarak pH 3, 4,6, 5,2 ve 6'ya ayarlandı. CS:TPP ve CS:SBE- β -SD oranı 2:1, 1:1 ve 0,5:1 olacak şekilde nanopartikül formülasyonları hazırlandı. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri ölçülerek karşılaştırıldı. Nanopartikül dispersiyonları 15000 rpm hızda 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatantlar Bölüm 3.4'te anlatıldığı gibi aynı bölümdeki Eş.3.1 kullanılarak enkapsülasyon etkinliğini hesaplamak için kullanıldı. Kitosan pH değerinin ve CS:TPP ve CS:SBE- β -SD oranlarının değiştirilmesiyle elde edilen nanopartiküllerin partikül büyüklüğü (PB), polidispersite indeksi (PDI), zeta potansiyeli (ζ P) ve enkapsülasyon etkinliği (% EE) değerlerine ait bulgular Çizelge 4.11 ve 4.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Kitosan pH'sı ve CS:TPP oranının değişmesiyle hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyel ve % enkapsülasyon etkinliği değerleri

CS:TPP oranı	pH	PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ζ P (mV) $\pm$ SS	% EE $\pm$ SS
2	3	289,17$\pm$34,64	0,398$\pm$0,090	28,2$\pm$2,8	30,2$\pm$2,3
	4,6	370,03 $\pm$ 25,06	0,735 $\pm$ 0,070	18,9 $\pm$ 0,2	28,5 $\pm$ 4,2
	5,2	499,65 $\pm$ 17,62	0,513 $\pm$ 0,085	19,6 $\pm$ 1,4	28,5 $\pm$ 2,3
	6	945,23 $\pm$ 51,90	0,364 $\pm$ 0,048	4,2 $\pm$ 0,4	39,1 $\pm$ 6,2
1	3	4494 $\pm$ 640,61	0,512 $\pm$ 0,142	10,4 $\pm$ 0,2	29,3 $\pm$ 1,6
	4,6	1793 $\pm$ 183,85	0,932 $\pm$ 0,124	6,9 $\pm$ 0,3	32,2 $\pm$ 3,8
	5,2	7047 $\pm$ 43,84	0,890 $\pm$ 0,193	-6,6 $\pm$ 0,4	31,2 $\pm$ 1,4
	6	1305 $\pm$ 42,43	0,918 $\pm$ 0,182	-7,4 $\pm$ 1,2	34,1 $\pm$ 2,3
0,5	3	1462 $\pm$ 320,85	0,669 $\pm$ 0,121	2,5 $\pm$ 1,1	28,2 $\pm$ 3,5
	4,6	2248 $\pm$ 236,98	0,488 $\pm$ 0,253	1,5 $\pm$ 0,8	35,2 $\pm$ 4,5
	5,2	2685 $\pm$ 198,23	0,884 $\pm$ 0,242	-3,8 $\pm$ 2,3	38,2 $\pm$ 2,4
	6	1662 $\pm$ 265,43	0,880 $\pm$ 0,191	-5,2 $\pm$ 5,5	30,2 $\pm$ 2,9

Çizelge 4.12. Kitosan pH'sı ve CS:SBE- β -SD oranının değişmesiyle hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyel ve % enkapsülasyon etkinliği değerleri

CS:SBE- β -SD oranı	pH	PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ζ P (mV) $\pm$ SS	% EE $\pm$ SS
2	3	712,05 $\pm$ 17,62	0,375 $\pm$ 0,232	21,7 $\pm$ 3,2	28,9 $\pm$ 1,9
	4,6	380,13 $\pm$ 4,71	0,378 $\pm$ 0,043	25,6 $\pm$ 3,8	31,2 $\pm$ 3,5
	5,2	421,57 $\pm$ 25,46	0,277 $\pm$ 0,026	24,1 $\pm$ 0,9	29,6 $\pm$ 2,3
	6	524,57 $\pm$ 11,20	0,155 $\pm$ 0,063	25,4 $\pm$ 3,3	30,5 $\pm$ 2,2
1	3	334,25$\pm$25,42	0,215$\pm$0,091	32,5$\pm$3,5	31,2$\pm$2,3
	4,6	323,37 $\pm$ 8,12	0,240 $\pm$ 0,031	24,4 $\pm$ 0,4	29,6 $\pm$ 2,5
	5,2	412,54 $\pm$ 25,63	0,255 $\pm$ 0,026	14,5 $\pm$ 2,6	28,6 $\pm$ 1,2
	6	471,21 $\pm$ 0,74	0,167 $\pm$ 0,084	8,4 $\pm$ 0,6	33,2 $\pm$ 2,3
0,5	3	218,81 $\pm$ 28,27	0,432 $\pm$ 0,063	12,9 $\pm$ 0,9	33,6 $\pm$ 4,5
	4,6	396,25 $\pm$ 39,46	0,423 $\pm$ 0,091	8,5 $\pm$ 2,1	32,5 $\pm$ 4,4
	5,2	401,41 $\pm$ 7,67	0,330 $\pm$ 0,012	4,6 $\pm$ 0,4	34,5 $\pm$ 2,3
	6	425,25 $\pm$ 6,36	0,356 $\pm$ 0,031	3,6 $\pm$ 2,1	32,1 $\pm$ 4,5

Optimum formülasyonlar partikül büyüklüğünün ve polidispersite indeksinin küçük, zeta potansiyel ve enkapsülasyon etkinliğinin büyük olmasına göre seçilmiştir. Optimum CS:TPP nanopartikülleri için CS:TPP oranı 2:1 ve CS pH'sı 3 olarak belirlendi ve

nanopartiküllerin $289,17 \pm 34,64$ nm partikül büyüklüğüne, $0,398 \pm 0,090$ polidispersite indeksine, $28,2 \pm 2,8$ mV zeta potansiyeline ve $\%30,2 \pm 2,3$ enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğu bulundu. Optimum CS:SBE- β -SD nanopartikülleri için CS:SBE- β -SD oranı 1:1 ve CS pH'sı 3 olarak belirlendi ve nanopartiküllerin $334,25 \pm 25,42$ nm partikül büyüklüğüne, $0,215 \pm 0,091$ polidispersite indeksine, $32,5 \pm 3,5$ mV zeta potansiyeline ve $\%31,2 \pm 2,3$ enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğu bulundu.

4.3.2. Enterik kaplama için Kollicoat® MAE 100 P miktarının belirlenmesi

CS:TPP ve CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin enterik kaplanması Bölüm 3.5'te anlatıldığı gibi yapıldı.

İlk önce 1, 3 ve 5 mg/mL olacak şekilde Kollicoat® MAE 100 P'yi etanolde çözerek etanol içerisinde Kollicoat® MAE 100 P çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerden 1 mL nanopartikül dispersiyonları üzerine damla damla ilave edildi (S.Chen ve diğerleri, 2017). Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki çözeltileri (1, 3 ve 5 mg/mL) kullanılarak enterik kaplama yapılmasının partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli ve % enkapsülasyon etkinliği üzerine etkileri sırasıyla Çizelge 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki çözeltileri (1, 3 ve 5 mg/mL) kullanılarak enterik kaplama yapılmasının partikül büyüklüğü üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	Kollicoat® MAE 100 P (mg/mL)	Kaplama öncesi PB (nm) ± SS	Kaplama sonrası PB (nm) ± SS
CS:TPP NP	1	258,93±12,75	2048±100
	3		1572±97
	5		1063±10
CS:SBE-β-SD NP	1	320,51±15,05	340,43±28,25
	3		518,43±12,50
	5		650,41±59,48

Çizelge 4.14. Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki çözeltileri (1, 3 ve 5 mg/mL) kullanılarak enterik kaplama yapılmasının polidispersite indeksi üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	Kollicoat® MAE 100 P derişimi (mg/mL)	Kaplama öncesi PDI ± SS	Kaplama sonrası PDI ± SS
CS:TPP NP	1	0,338±0,028	0,632±0,016
	3		0,572±0,054
	5		0,513±0,036
CS:SBE-β-SD NP	1	0,208±0,089	0,435±0,036
	3		0,388±0,034
	5		0,352±0,063

Çizelge 4.15. Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki çözeltileri (1, 3 ve 5 mg/mL) kullanılarak enterik kaplama yapılmasının zeta potansiyel üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	Kollicoat® MAE 100 P derişimi (mg/mL)	Kaplama öncesi ζP (mV) $\pm$ SS	Kaplama sonrası ζP (mV) $\pm$ SS
CS:TPP NP	1	28,1 $\pm$ 3,5	27,4 $\pm$ 2,1
	3		26,5 $\pm$ 1,1
	5		27,4 $\pm$ 2,2
CS:SBE- β -SD NP	1	32,4 $\pm$ 4,6	31,5 $\pm$ 2,3
	3		27,4 $\pm$ 3,1
	5		25,2 $\pm$ 3,2

Çizelge 4.16. Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki çözeltileri (1, 3 ve 5 mg/mL) kullanılarak enterik kaplama yapılmasının % enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	Kollicoat® MAE 100 P derişimi (mg/mL)	Kaplama öncesi % EE $\pm$ SS	Kaplama sonrası % EE $\pm$ SS
CS:TPP NP	1	29,4 $\pm$ 3,5	29,5 $\pm$ 1,2
	3		30,1 $\pm$ 2,5
	5		30,5 $\pm$ 2,3
CS:SBE- β -SD NP	1	31,5 $\pm$ 2,1	31,2 $\pm$ 1,2
	3		35,4 $\pm$ 3,6
	5		38,1 $\pm$ 2,4

Daha sonra 1, 3 ve 5 mg/mL olacak şekilde Kollicoat® MAE 100 P'yi pH 6,8 fosfat tamponunda çözerek pH 6,8 fosfat tamponu içerisinde Kollicoat® MAE 100 P çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerden 1 mL nanopartikül dispersiyonları üzerine damla damla ilave edildi. Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltileri (1, 3 ve 5 mg/mL) kullanılarak enterik kaplama yapılmasının partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli ve % enkapsülasyon etkinliği üzerine etkileri sırasıyla Çizelge 4.17, 4.18, 4.19 ve 4.20'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.17. Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltilerinin (1, 3 ve 5 mg/mL) partikül büyüklüğü üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	Kollicoat® MAE 100 P derişimi (mg/mL)	Kaplama öncesi PB (nm) ± SS	Kaplama sonrası PB (nm) ± SS
CS:TPP NP	1	296,12±21,61	320,15±25,63
	3		340,25±19,23
	5		380,12±24,35
CS:SBE-β-SD NP	1	320,51±13,21	341,25±18,23
	3		382,21±13,36
	5		425,25±19,23

Çizelge 4.18. Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltilerinin (1, 3 ve 5 mg/mL) polidispersite indeksi üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	Kollicoat® MAE 100 P derişimi (mg/mL)	Kaplama öncesi PDI $\pm$ SS	Kaplama sonrası PDI $\pm$ SS
CS:TPP NP	1	0,356 $\pm$ 0,025	0,554 $\pm$ 0,032
	3		0,498 $\pm$ 0,046
	5		0,488 $\pm$ 0,056
CS:SBE- β -SD NP	1	0,201 $\pm$ 0,015	0,410 $\pm$ 0,012
	3		0,386 $\pm$ 0,025
	5		0,348 $\pm$ 0,024

Çizelge 4.19. Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltilerinin (1, 3 ve 5 mg/mL) zeta potansiyel değeri üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	Kollicoat® MAE 100 P derişimi (mg/mL)	Kaplama öncesi ζ P (mV) $\pm$ SS	Kaplama sonrası ζ P (mV) $\pm$ SS
CS:TPP NP	1	29,2 $\pm$ 1,2	27,2 $\pm$ 1,2
	3		23,5 $\pm$ 2,3
	5		20,5 $\pm$ 1,3
CS:SBE- β -SD NP	1	32,6 $\pm$ 1,3	25,4 $\pm$ 1,6
	3		20,5 $\pm$ 2,6
	5		17,5 $\pm$ 1,8

Çizelge 4.20. Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltilerinin (1, 3 ve 5 mg/mL) % enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	Kollicoat® MAE 100 P derişimi (mg/mL)	Kaplama öncesi % EE $\pm$ SS	Kaplama sonrası % EE $\pm$ SS
CS:TPP NP	1	28,5 $\pm$ 1,5	31,8 $\pm$ 0,8
	3		33,5 $\pm$ 1,6
	5		36,5 $\pm$ 2,4
CS:SBE- β -SD NP	1	31,4 $\pm$ 2,3	35,6 $\pm$ 1,3
	3		38,5 $\pm$ 1,4
	5		40,1 $\pm$ 2,1

Bu nanopartiküllerin istenen partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerlerini sağlayamamasından dolayı Kollicoat® MAE 100 P miktarı artırılmak istendi ve Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki 10 mg/mL derişimindeki çözeltileri nanopartikül dispersiyonu üzerine damla damla ilave edildi. Fakat agregat oluşumu gözlemlendiği için ölçüm yapılamadı. Agregat oluşumu Resim 4.1'de gösterilmiştir.



Resim 4.1. Kollicoat® MAE 100 P'in etanoldeki 10 mg/mL derişimindeki çözeltilisinin nanopartikül dispersiyonuna ilavesiyle oluşan agregatların görünüşü

Nanopartiküllerin üzerine Kollicoat® MAE çözeltisi eklenmesinin istenen formülasyonların eldesini sağlayamadığı için, nanopartikül dispersiyonunun Kollicoat® MAE çözeltisine eklenmesinin denenmesine karar verildi (Xu ve diğerleri, 2018). CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 ve 1:3 olacak şekilde Kollicoat® MAE 100 P 4 mL etanol içerisinde çözüldü ve Kollicoat® MAE 100 P çözeltisi üzerine nanopartikül dispersiyonu damla damla ilave edildi. Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki çözeltisi kullanılarak CS:Kollicoat® MAE 100 P oranının değiştirilmesiyle enterik kaplama yapılmasının partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli ve % enkapsülasyon etkinliği üzerine etkileri Çizelge 4.21, 4.22, 4.23 ve 4.24'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.21. CS:Kollicoat® MAE 100 P (Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki çözeltisi) oranının partikül büyüklüğü üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı	Kaplama öncesi PB (nm) ± SS	Kaplama sonrası PB (nm) ± SS
CS:TPP NP	3:1	295,62±19,25	Ölçülemedi.
	2:1		Ölçülemedi.
	1:1		2045±110
	1:2		1586±69
	1:3		1325±52
CS:SBE-β-SD NP	3:1	320,24±19,12	Ölçülemedi.
	2:1		1889±55
	1:1		1542±42
	1:2		1186±32
	1:3		1092±54

Çizelge 4.22. CS:Kollicoat® MAE 100 P (Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki çözeltisi) oranının polidispersite indeksi üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı	Kaplama öncesi PDI ± SS	Kaplama sonrası PDI ± SS
CS:TPP NP	3:1	0,365±0,039	Ölçülemedi.
	2:1		Ölçülemedi.
	1:1		0,798±0,111
	1:2		0,569±0,089
	1:3		0,535±0,096
CS:SBE-β-SD NP	3:1	0,201±0,012	Ölçülemedi.
	2:1		0,528±0,039
	1:1		0,501±0,045
	1:2		0,447±0,036
	1:3		0,401±0,023

Çizelge 4.23. CS:Kollicoat® MAE 100 P (Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki çözeltisi) oranının zeta potansiyel üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı	Kaplama öncesi ζP (mV) $\pm$ SS	Kaplama sonrası ζP (mV) $\pm$ SS
CS:TPP NP	3:1	28,1 $\pm$ 2,4	Ölçülemedi.
	2:1		Ölçülemedi.
	1:1		26,5 $\pm$ 4,1
	1:2		24,3 $\pm$ 4,1
	1:3		21,2 $\pm$ 5,3
CS:SBE- β -SD NP	3:1	31,1 $\pm$ 1,9	Ölçülemedi.
	2:1		26,4 $\pm$ 1,9
	1:1		23,2 $\pm$ 2,4
	1:2		20,1 $\pm$ 3,2
	1:3		17,9 $\pm$ 3,1

Çizelge 4.24. CS:Kollicoat® MAE 100 P (Kollicoat® MAE 100 P'nin etanoldeki çözeltisi) oranının % enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı	Kaplama öncesi % EE ± SS	Kaplama sonrası % EE ± SS
CS:TPP NP	3:1	29,1±2,1	Ölçülemedi.
	2:1		Ölçülemedi.
	1:1		31,1±1,3
	1:2		33,5±2,4
	1:3		35,1±1,9
CS:SBE-β-SD NP	3:1	31,2±1,4	Ölçülemedi.
	2:1		33,5±2,1
	1:1		36,5±1,2
	1:2		37,5±2,4
	1:3		41,1±2,3

Kollicoat® MAE 100 P'nin etanolde çözöldüğü için nano boyuttaki partikül büyüklüğü, düşük polidispersite indeksi ve düşük zeta potansiyeli değerlerini sağlayamaması düşünölerek Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponunda çözölerek hazırlanmasına karar verildi. CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 ve 1:3 olacak şekilde Kollicoat® MAE 100 P pH 6,8 fosfat tamponu içerisinde çözöldü. Kollicoat® MAE 100 P çözeltisi üzerine nanopartikül dispersiyonu damla damla ilave edildi. Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltisi kullanılarak CS:Kollicoat® MAE 100 P oranının değışitirilmesiyle enterik kaplama yapılmasının partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli ve % enkapsülasyon etkinliği üzerine etkileri Çizelge 4.25, 4.26, 4.27 ve 4.28'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.25. CS:Kollicoat® MAE 100 P (Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltisi) oranının partikül büyüklüğü üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı	Kaplama öncesi PB (nm) ± SS	Kaplama sonrası PB (nm) ± SS
CS:TPP NP	3:1	276,53±56,32	3559±493
	2:1		3024±296
	1:1		856,62±125,16
	1:2		635,52±73,62
	1:3		581,32±79,68
CS:SBE-β-SD NP	3:1	356,62±25,89	1472±245
	2:1		1000±34
	1:1		712,62±38,61
	1:2		581,03±56,36
	1:3		555,32±38,46

Çizelge 4.26. CS:Kollicoat® MAE 100 P (Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltisi) oranının polidispersite indeksi üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı	Kaplama öncesi PDI ± SS	Kaplama sonrası PDI ± SS
CS:TPP NP	3:1	0,385±0,062	0,811±0,221
	2:1		0,761±0,112
	1:1		0,595±0,103
	1:2		0,590±0,091
	1:3		0,517±0,055
CS:SBE-β-SD NP	3:1	0,208±0,046	0,602±0,13
	2:1		0,489±0,043
	1:1		0,481±0,057
	1:2		0,415±0,022
	1:3		0,375±0,081

Çizelge 4.27. CS:Kollicoat® MAE 100 P (Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltisi) oranının zeta potansiyel üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı	Kaplama öncesi ζP (mV) $\pm$ SS	Kaplama sonrası ζP (mV) $\pm$ SS
CS:TPP NP	3:1	27,3 $\pm$ 3,4	4,9 $\pm$ 1,8
	2:1		4,3 $\pm$ 0,8
	1:1		-14,4 $\pm$ 2,6
	1:2		-22,1 $\pm$ 0,7
	1:3		-22,9$\pm$0,3
CS:SBE- β -SD NP	3:1	32,4 $\pm$ 3,2	5,7 $\pm$ 0,6
	2:1		5,5 $\pm$ 0,3
	1:1		-10,6 $\pm$ 2,3
	1:2		-21,1 $\pm$ 0,6
	1:3		-21,6$\pm$0,2

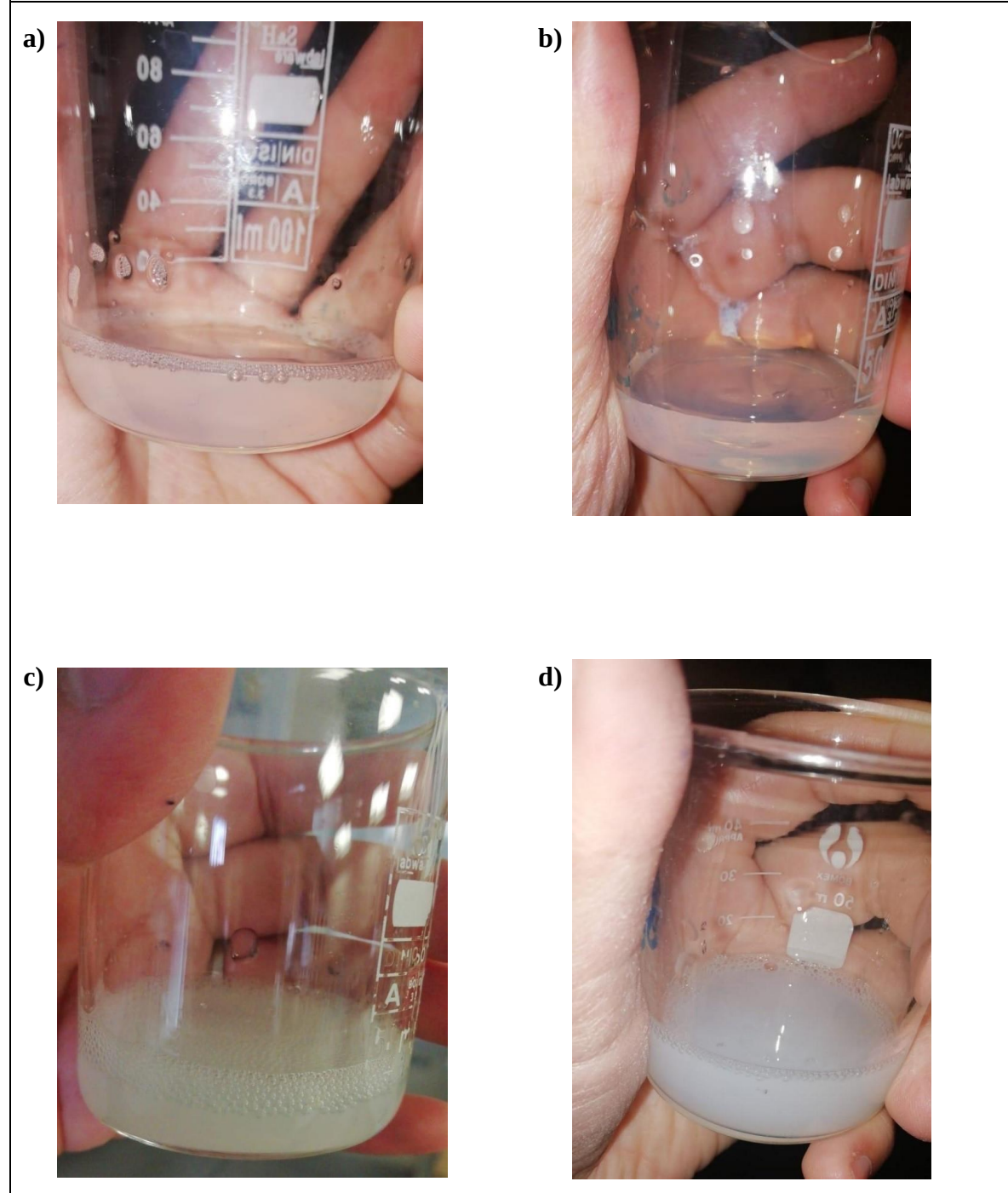
Çizelge 4.28. CS:Kollicoat® MAE 100 P (Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltisi) oranının % enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı	Kaplama öncesi % EE ± SS	Kaplama sonrası % EE ± SS
CS:TPP NP	3:1	28,1±2,3	32,1±1,2
	2:1		34,5±2,3
	1:1		42,93±,1
	1:2		46,9±2,3
	1:3		49,8±3,5
CS:SBE-β-SD NP	3:1	31,5±3,1	39,9±1,2
	2:1		40,5±0,5
	1:1		43,2±1,3
	1:2		47,5±2,3
	1:3		52,1±2,5

Optimum Kollicoat® MAE 100 P kaplı nanopartiküllerin, kaplı olmayan nanopartiküllere göre partikül büyüklüğünün artması ve zeta potansiyellerinin azalması beklenmiştir. Buna göre, optimum K-CS:TPP ve K-CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı 1:3 olacak şekilde Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponundaki çözeltisi kullanılarak, Kollicoat® MAE 100 P çözeltisi üzerine nanopartiküllerin damla damla ilave edilmesiyle hazırlanmasına karar verildi. Hazırlanan optimum K-CS:TPP nanopartiküllerinin 581,32±79,68 nm partikül büyüklüğüne, 0,517±0,055 polidispersite indeksine, -22,9±0,3 mV zeta potansiyeline ve %49,8±3,5 enkapsülasyon etkinliğine, optimum K-CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin ise 555,32±38,46 nm partikül büyüklüğüne,

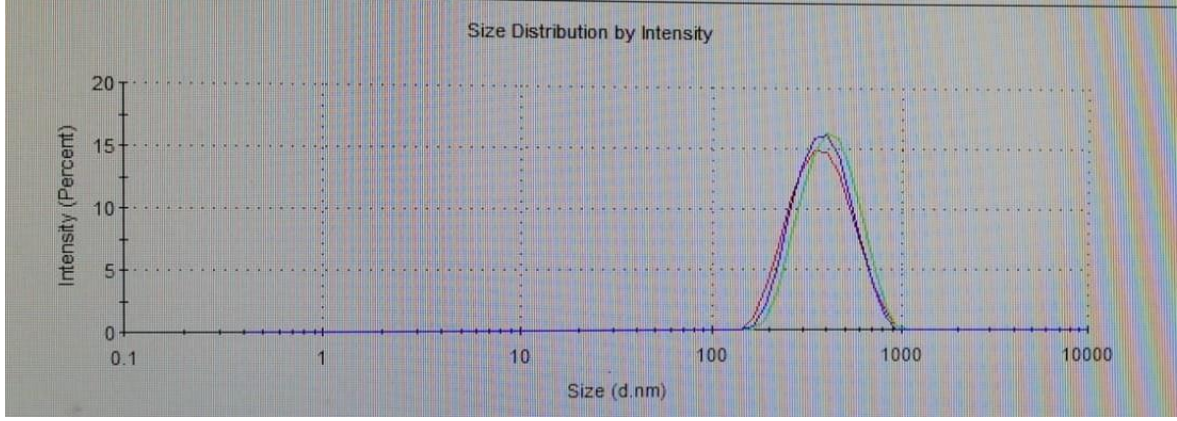
0,375±0,081 polidispersite indeksine, -21,6±0,2 mV zeta potansiyeline ve %52,1±2,5 enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğu bulundu.

Hazırlanan optimum nanopartikül dispersiyonlarının görüntüleri Resim 4.2’de gösterilmiştir.

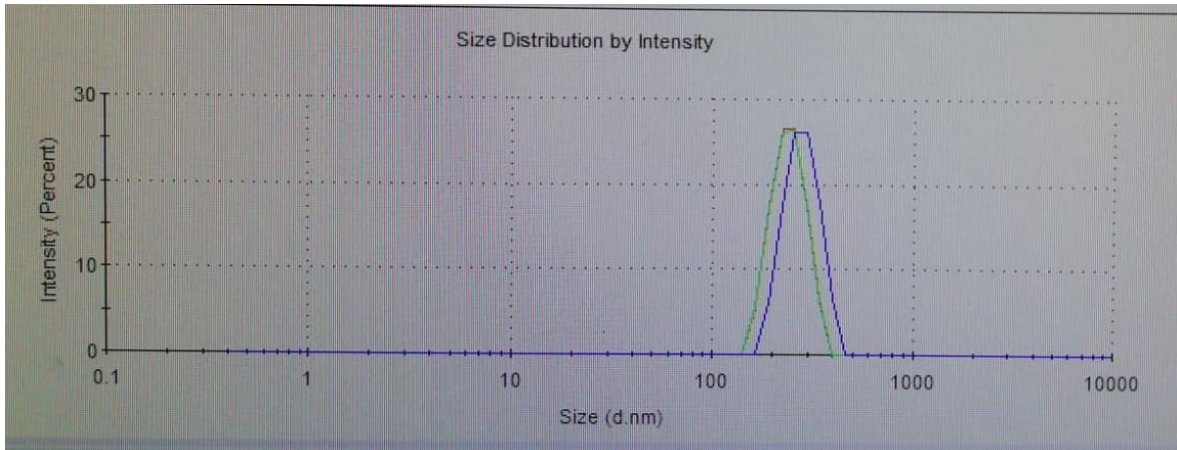


Resim 4.2. a) CS:TPP nanopartikül dispersiyonuna ait görüntü b) CS:SBE-β-SD nanopartikül dispersiyonuna ait görüntü c) K-CS:TPP nanopartikül dispersiyonuna ait görüntü d) K-CS:SBE-β-SD nanopartikül dispersiyonuna ait görüntü

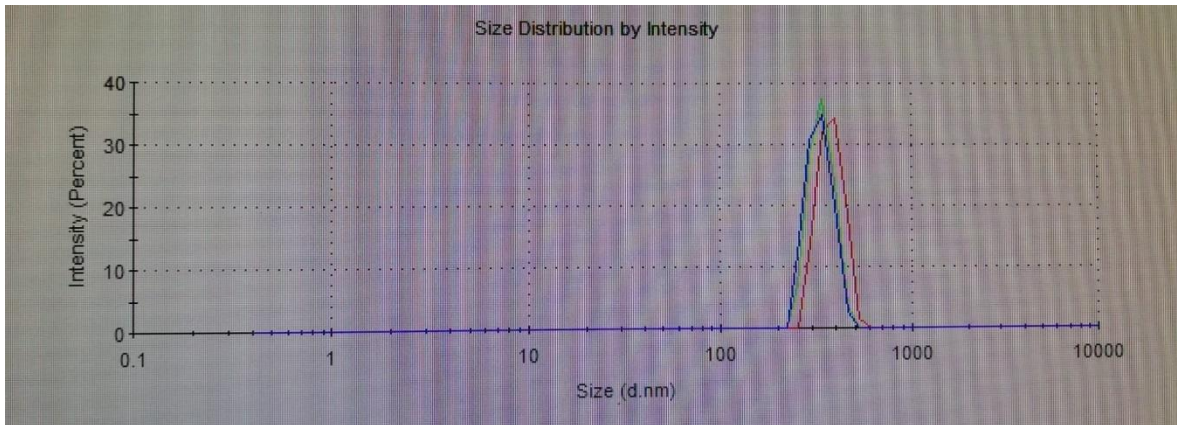
Resim 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6’da sırasıyla optimum CS:TPP, CS:SBE- β -SD, K-CS:TPP ve K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerine ait partikül büyüklüğü ölçümleri Malvern Zeta Sizer’den alınan grafiklerle gösterilmiştir.



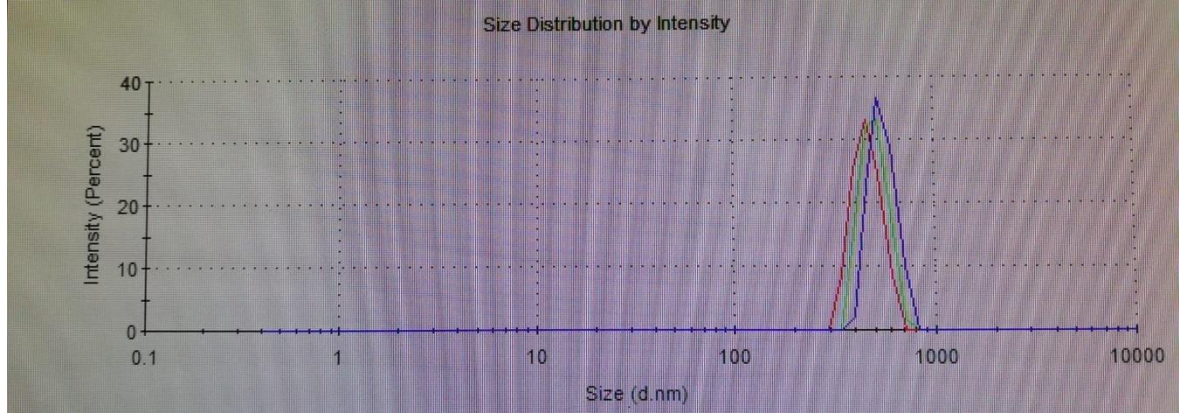
Resim 4.3. CS:TPP nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü dağılımı grafiği



Resim 4.4. CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü dağılımı grafiği

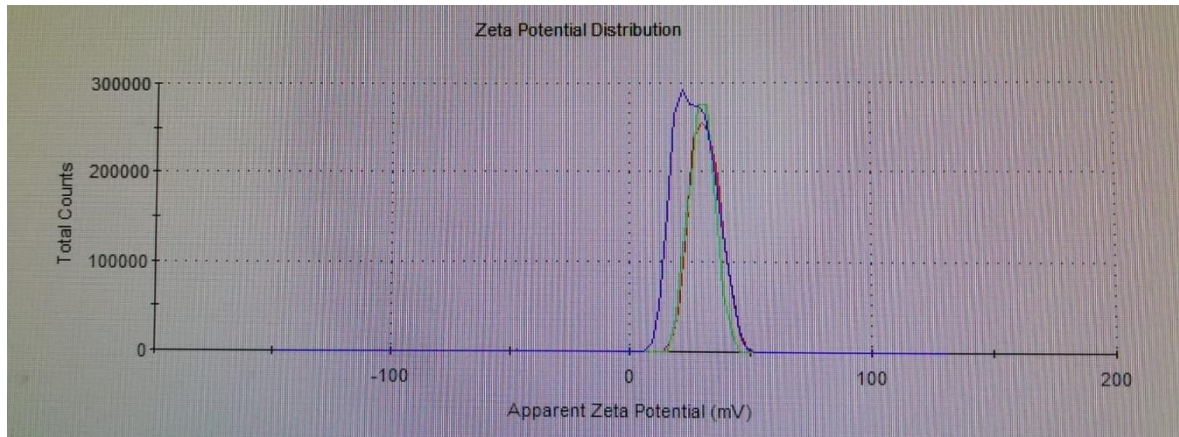


Resim 4.5. K-CS:TPP nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü dağılımı grafiği

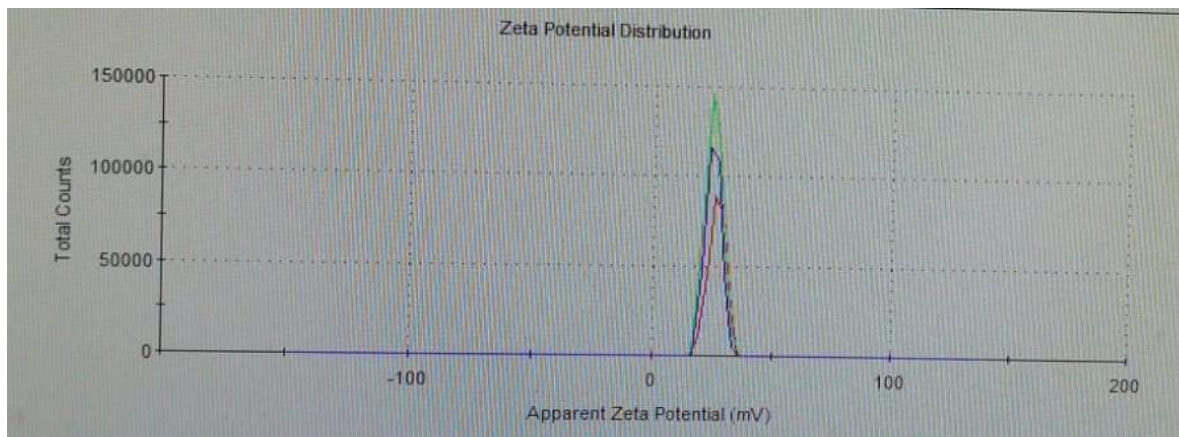


Resim 4.6. K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü dağılımı grafiği

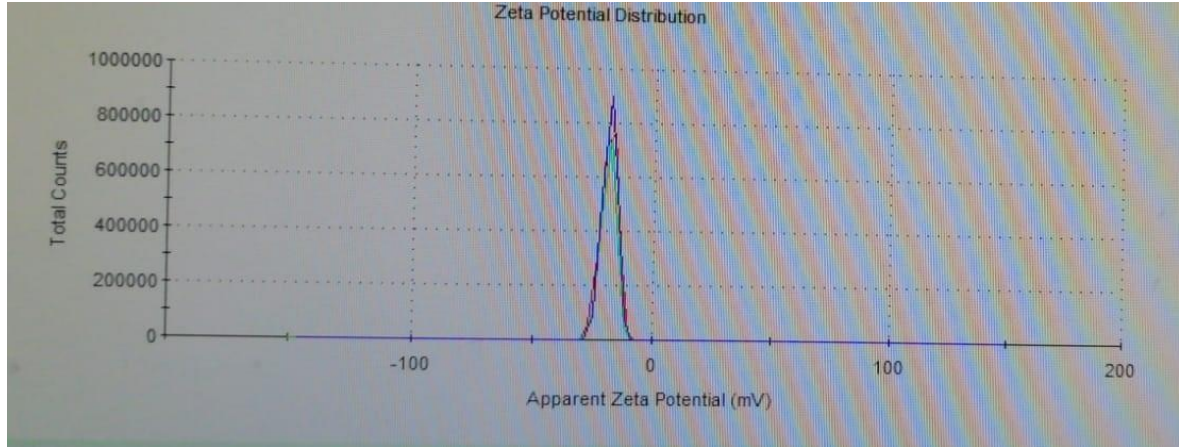
Resim 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10’da sırasıyla optimum CS:TPP, CS:SBE- β -SD, K-CS:TPP ve K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerine ait zeta potansiyel ölçümleri Malvern Zeta Sizer’den alınan grafiklerle gösterilmiştir.



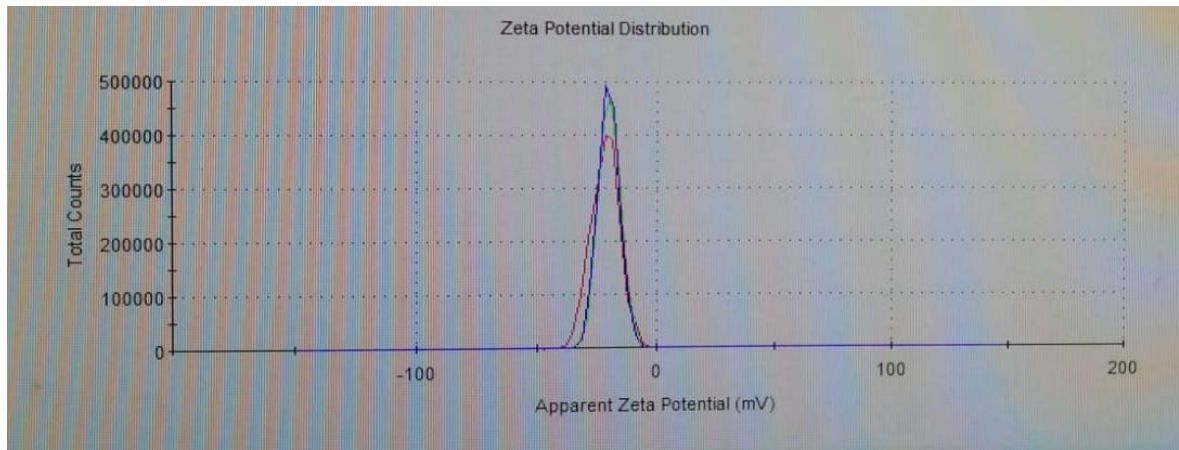
Resim 4.7. CS:TPP nanopartiküllerin zeta potansiyel grafiği



Resim 4.8. CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin zeta potansiyel grafiği



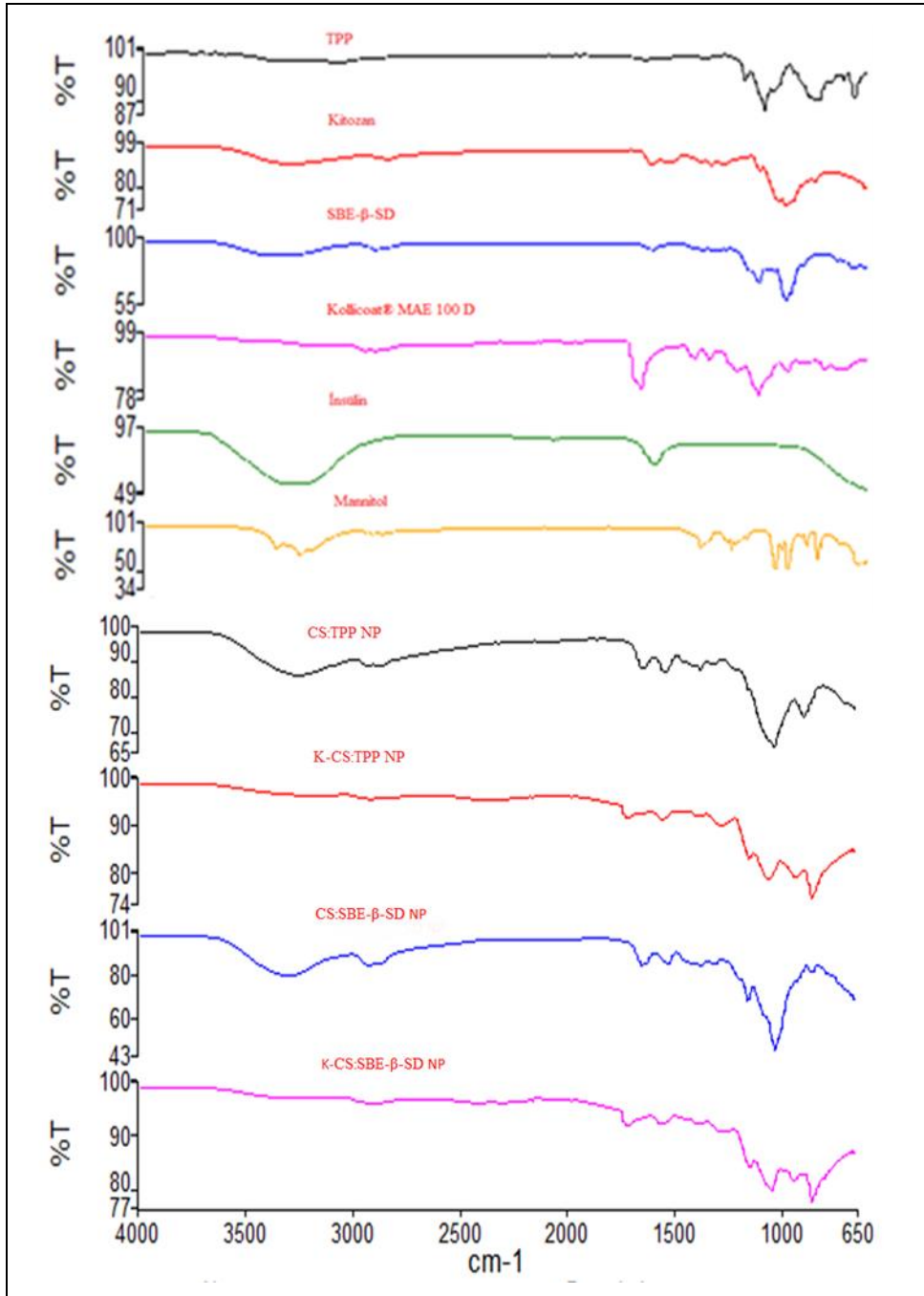
Resim 4.9. K-CS:TPP nanopartiküllerinin zeta potansiyel grafiği



Resim 4.10. K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin zeta potansiyel grafiği

4.4. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektrometresi (FT-IR) Analizinden Elde Edilen Bulgular

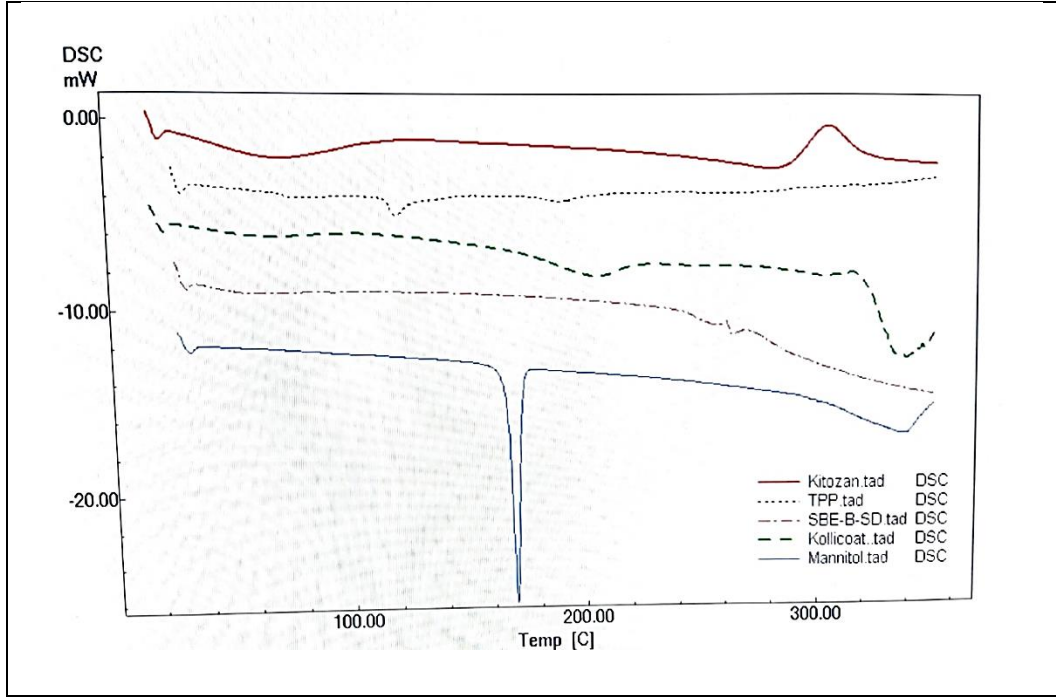
Formülasyon hazırlamada kullanılan maddelerin ve formülasyonların FT-IR analizleri Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı gibi yapıldı. Formülasyonda kullanılan maddelere ve insülin yüklü nanopartiküllere ait FT-IR spektrumları Şekil 4.17’te gösterilmiştir.



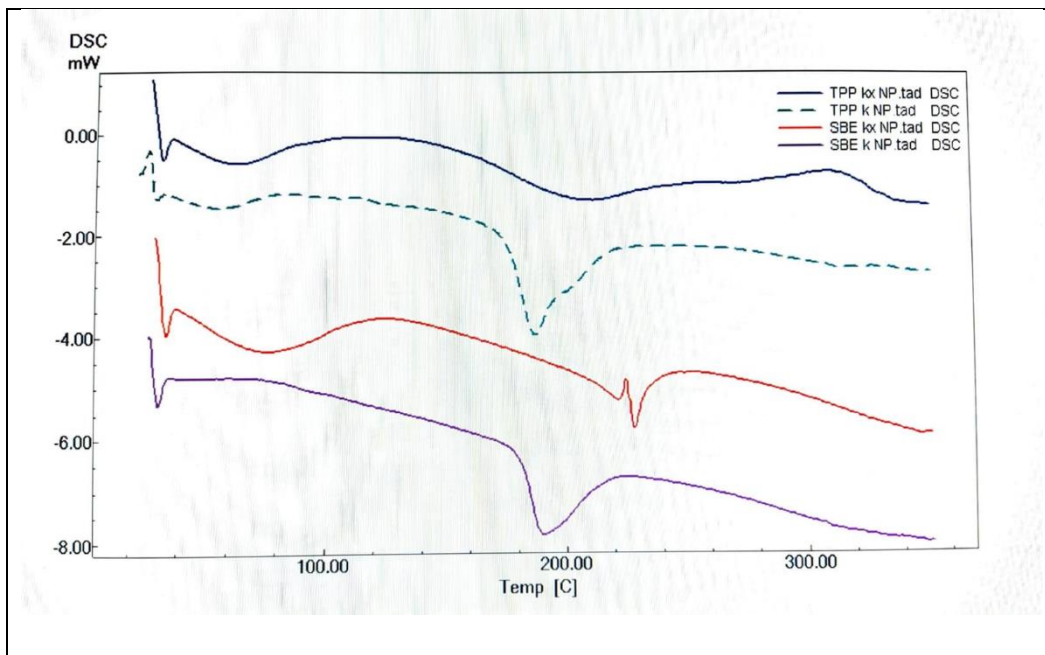
Şekil 4.17. Formülasyonda kullanılan maddelere ve nanopartiküllere ait FT-IR spektrumları

4.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizlerinden Elde Edilen Bulgular

Formülasyonda kullanılan maddelere ve insülin yüklü nanopartiküllerin DSC analizleri Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi yapıldı. Formülasyonda kullanılan maddeler ve insülin yüklü nanopartiküllere ait DSC termogramları Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Formülasyonda kullanılan maddelere ait DSC termogramları



Şekil 4.19. İnsülin yüklü nanopartiküllere ait DSC spektrumları

4.6. Liyofilizasyon İşleminin Optimizasyon Çalışmaları

Liyofilizasyon işlemi Bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.29, 4.30 ve 4.31’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.29. Mannitol oranının liyofilizasyon sonrası partikül büyüklüğü üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	Mannitol oranı (%)	Liyofilizasyon öncesi PB (nm) $\pm$ SS	Liyofilizasyon sonrası PB (nm) $\pm$ SS
CS:TPP NP	Mannitol yok	276,53 $\pm$ 26,3	5740 $\pm$ 1352
	1		1941 $\pm$ 314
	3		1454 $\pm$ 54
	5		1259 $\pm$ 129
	7		1465 $\pm$ 285
CS:SBE- β -SD NP	Mannitol yok	365,23 $\pm$ 26,51	Ölçülemedi.
	1		Ölçülemedi.
	3		719,81 $\pm$ 116,91
	5		1026 $\pm$ 106
	7		2562 $\pm$ 459
K-CS:TPP NP	Mannitol yok	583,23 $\pm$ 90,51	1121 $\pm$ 18
	1		1034 $\pm$ 194
	3		1318 $\pm$ 289
	5		1182 $\pm$ 107
	7		735,32 $\pm$ 85,62
K-CS:SBE- β -SD NP	Mannitol yok	542,12 $\pm$ 24,35	2862 $\pm$ 129
	1		Ölçülemedi.
	3		1038 $\pm$ 17
	5		1346 $\pm$ 106
	7		1656 $\pm$ 389

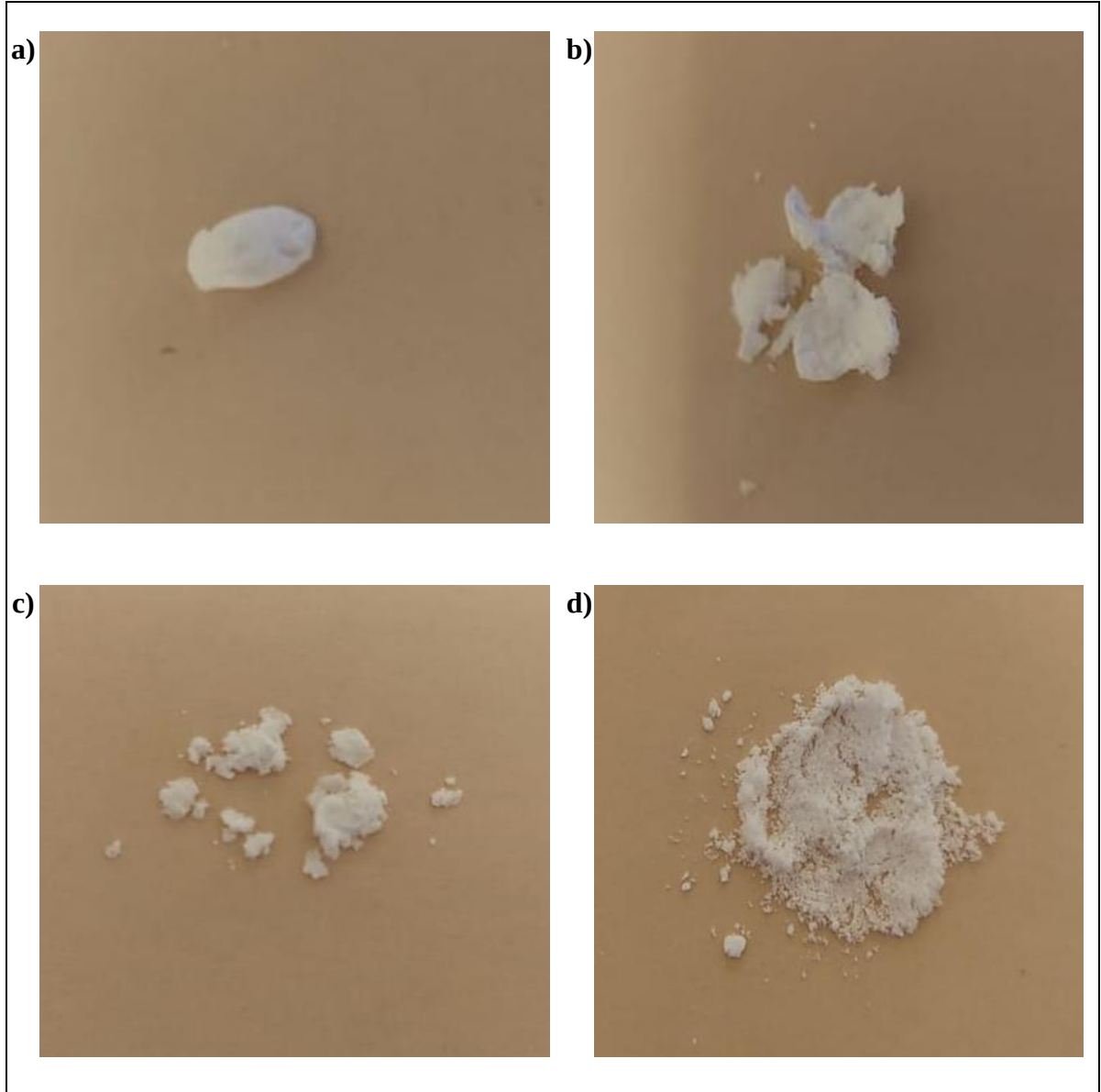
Çizelge 4.30. Mannitol oranının liyofilizasyon sonrası polidispersite indeksi üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	Mannitol oranı (%)	Liyofilizasyon öncesi PDI $\pm$ SS	Liyofilizasyon sonrası PDI $\pm$ SS
CS:TPP NP	Mannitol yok	0,382 $\pm$ 0,121	0,964 $\pm$ 0,051
	1		0,892 $\pm$ 0,152
	3		1
	5		0,8550 $\pm$,231
	7		0,899 $\pm$ 0,101
CS:SBE- β -SD NP	Mannitol yok	0,208 $\pm$ 0,891	Ölçülemedi.
	1		Ölçülemedi.
	3		0,664 $\pm$ 0,098
	5		0,658 $\pm$ 0,258
	7		0,589 $\pm$ 0,251
K-CS:TPP NP	Mannitol yok	0,541 $\pm$ 0,029	0,698 $\pm$ 0,085
	1		0,751 $\pm$ 0,156
	3		0,779 $\pm$ 0,121
	5		0,956 $\pm$ 0,212
	7		0,698 $\pm$ 0,121
K-CS:SBE- β -SD NP	Mannitol yok	0,375 $\pm$ 0,081	0,956 $\pm$ 0,061
	1		Ölçülemedi.
	3		0,692 $\pm$ 0,103
	5		0,616 $\pm$ 0,211
	7		0,657 $\pm$ 0,181

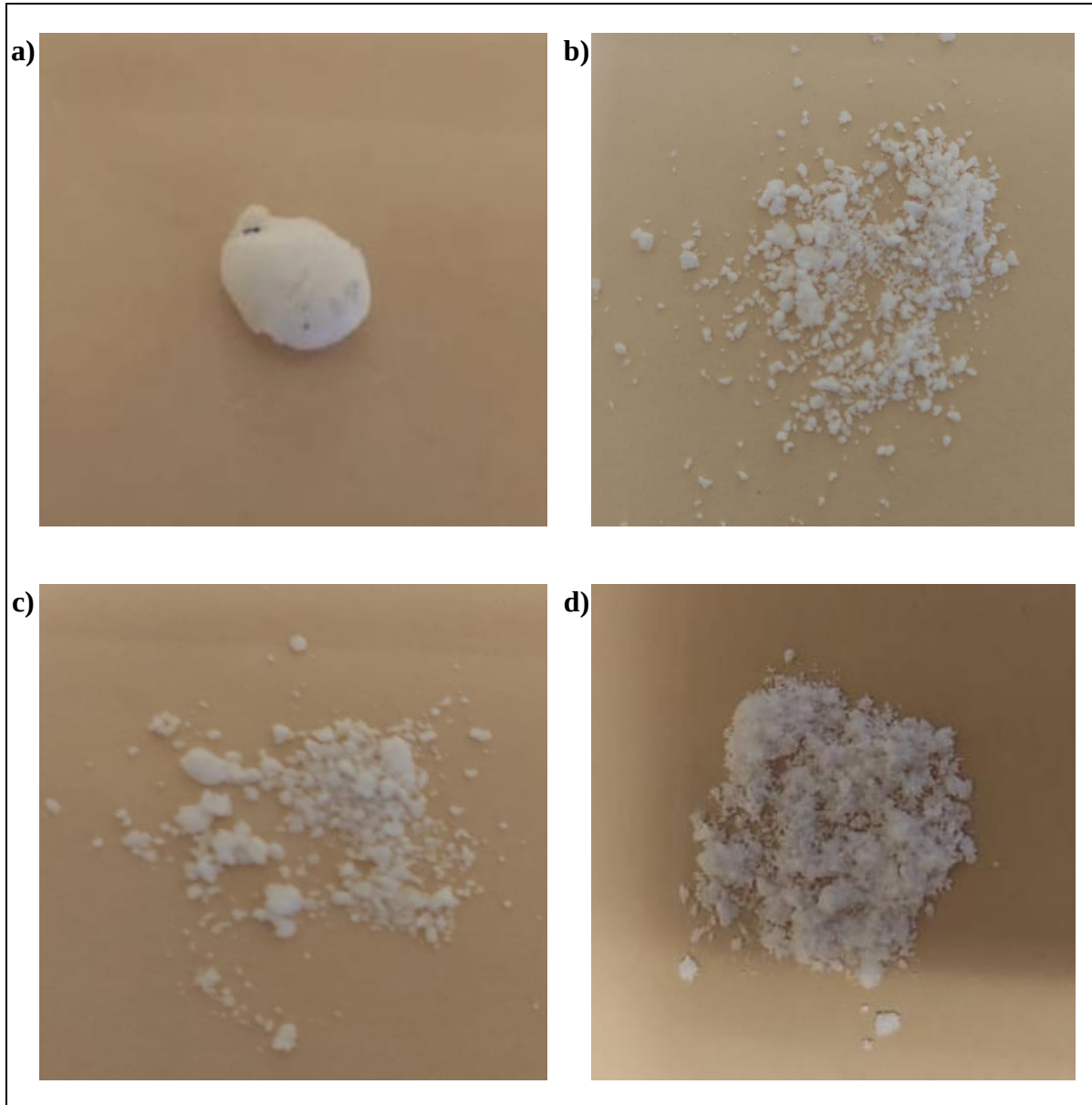
Çizelge 4.31. Mannitol oranının liyofilizasyon sonrası zeta potansiyel üzerine etkisi

Nanopartikül tipi	Mannitol oranı (%)	Liyofilizasyon öncesi ζP (mV) $\pm$ SS	Liyofilizasyon sonrası ζP (mV) $\pm$ SS
CS:TPP NP	Mannitol yok	27,3 $\pm$ 3,4	2,3 $\pm$ 1,6
	1		1,2 $\pm$ 0,6
	3		-2,0 $\pm$ 1,3
	5		21,6 $\pm$ 2,6
	7		27,8 $\pm$ 3,5
CS:SBE- β -SD NP	Mannitol yok	32,4 $\pm$ 4,6	Ölçülemedi.
	1		Ölçülemedi.
	3		13,8 $\pm$ 1,0
	5		10,62 $\pm$ 2,3
	7		15,62 $\pm$,3
K-CS:TPP NP	Mannitol yok	-21,6 $\pm$ 0,2	-36,32 $\pm$,1
	1		-30,7 $\pm$ 0,3
	3		-34,2 $\pm$ 2,1
	5		-13,6 $\pm$ 2,1
	7		-25,6 $\pm$ 3,8
K-CS:SBE- β -SD NP	Mannitol yok	-22,5 $\pm$ 0,3	-20,6 $\pm$ 0,3
	1		Ölçülemedi.
	3		-26,2 $\pm$ 2,5
	5		-21,2 $\pm$ 5,6
	7		-10,9 $\pm$ 2,3

Kaplı olmayan ve kaplı nanopartiküllerin mannitol yokken ve %5 mannitol varlığında liyofilize edildikten sonraki görüntüleri sırasıyla Resim 4.11 ve Resim 4.12’de gösterilmiştir.



Resim 4.11. a) CS:TPP nanopartiküllerinin mannitol ekmeden liyofilize edildiğindeki görüntüsü b) CS:TPP nanopartiküllerinin %5 mannitol varlığında liyofilize edildiğindeki görüntüsü c) CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin mannitol ekmeden liyofilize edildiğindeki görüntüsü d) CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin %5 mannitol varlığında liyofilize edildiğindeki görüntüsü



Resim 4.12. a) K-CS:TPP nanopartiküllerinin mannitol eklemeyen liyofilize edildiğindeki görüntüsü b) K-CS:TPP nanopartiküllerinin %5 mannitol varlığında liyofilize edildiğindeki görüntüsü c) K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin mannitol eklemeyen liyofilize edildiğindeki görüntüsü d) K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin %5 mannitol varlığında liyofilize edildiğindeki görüntüsü

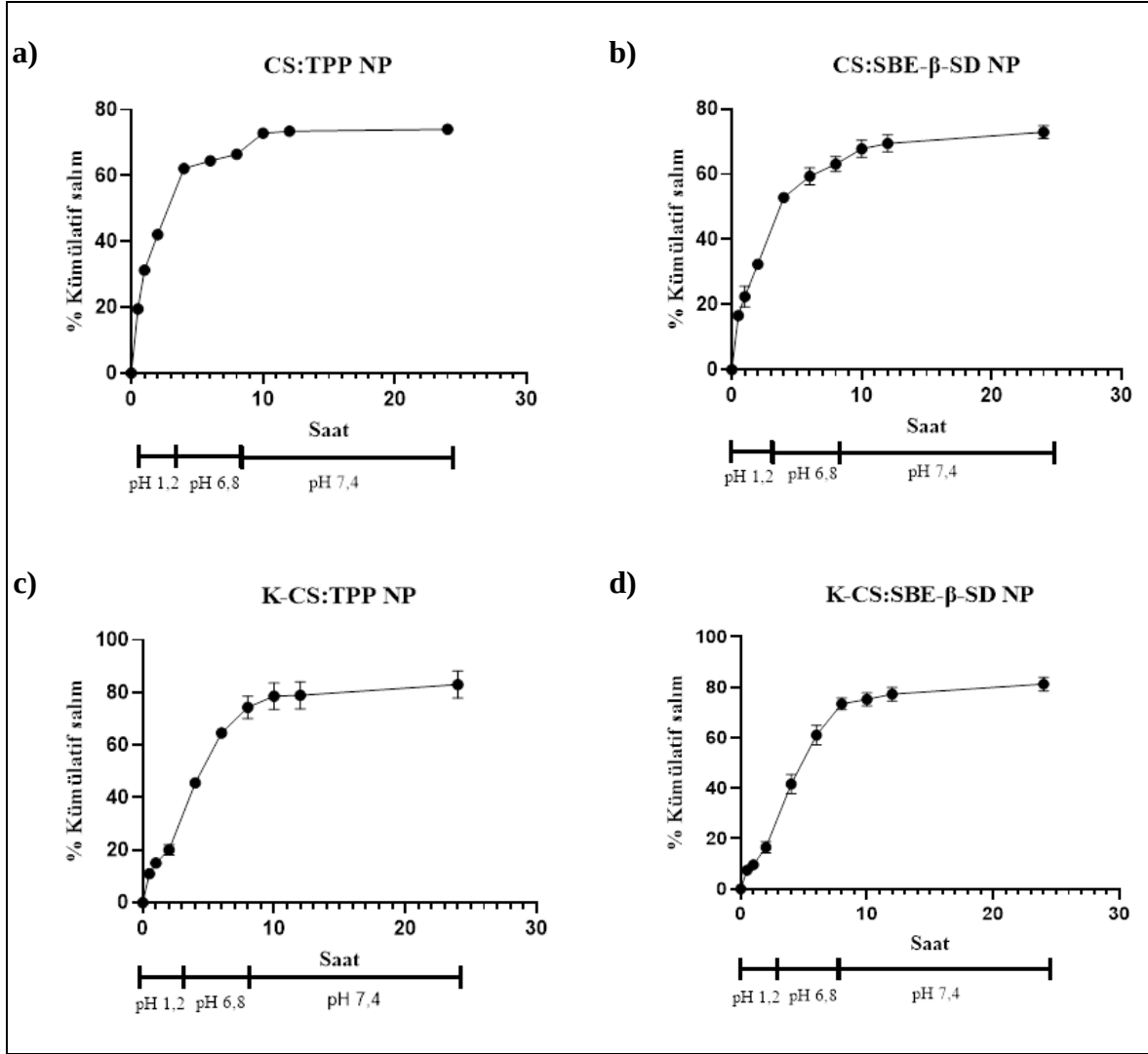
4.7. In Vitro İnsülin Salım Çalışmaları

İn vitro salım çalışmaları Bölüm 3.8’de anlatıldığı gibi diyaliz torba yöntemiyle ilk 2 saat nanopartiküllerin oral alımını taklit etmek için pH 1,2’de, sonra 6 saat bağırsak ortamını taklit etmek amacıyla pH 6,8 fosfat tamponunda ve daha sonra 16 saat ise kan ortamını taklit etmek amacıyla pH 7,4 fosfat tamponunda devam ettirilmiştir. CS:TPP, CS:SBE- β -SD, K-CS:TPP ve K-CS:SBE- β -SD nanopartikülleri için 24 saatlik in vitro % kümülatif insülin

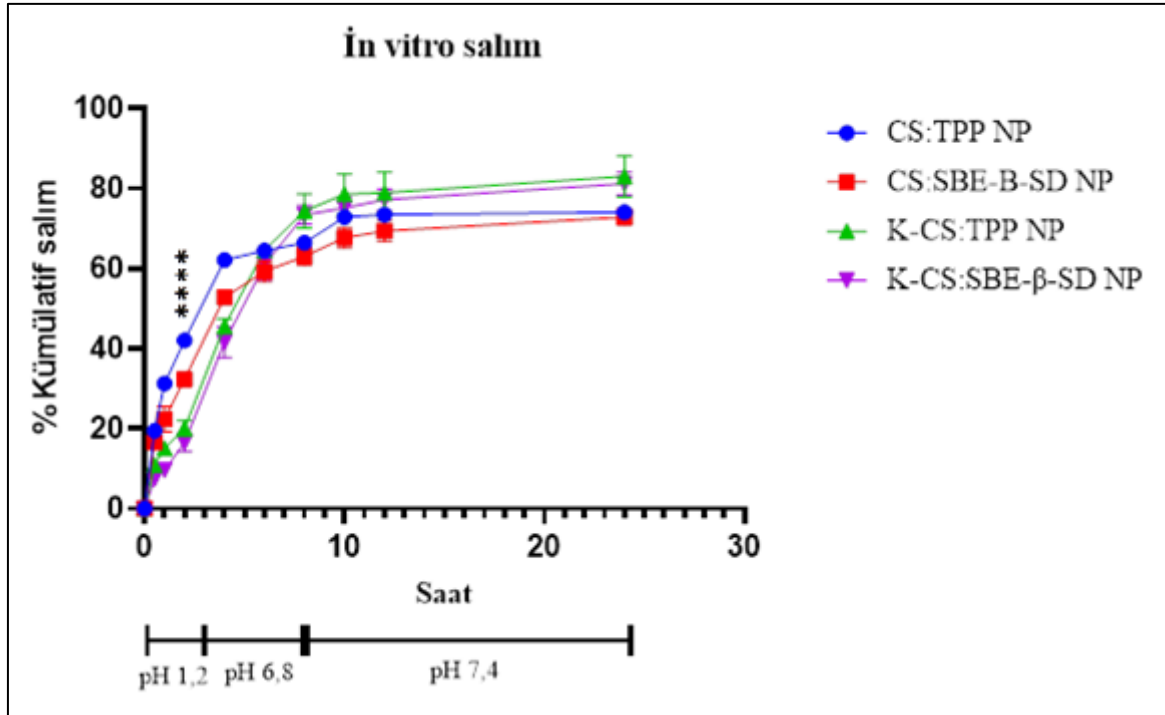
salım sonuçları Çizelge 4.32’de verilmiş, in vitro insülin salım profilleri ise Şekil 4.20’de gösterilmiştir. Şekil 4.21’de, 24 saatlik in vitro insülin salım profilleri toplu olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.32. CS:TPP, CS:SBE- β -SD, K-CS:TPP ve K-CS:SBE- β -SD nanopartikülleri için 24 saatlik in vitro % kümülatif insülin salım sonuçları

NP Tipi Saat	CS:TPP	CS:SBE- β -SD	K-CS:TPP	K-CS:SBE- β -SD
0,5	%19,50	%16,65	%11,02	%7,48
1	%31,30	%22,42	%15,09	%9,63
2	%42,07	%32,37	%20,09	%16,57
4	%62,15	%52,83	%45,66	%41,66
6	%64,52	%59,35	%64,66	%61,04
8	%66,50	%63,09	%74,41	%73,44
10	%72,90	%67,77	%78,60	%75,17
12	%73,50	%69,44	%78,95	%77,25
24	%74,12	%72,90	%83,04	%81,26



Şekil 4.20. a) CS:TPP nanopartiküllerinin 24 saatlik in vitro insülin salım profili b) CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin 24 saatlik in vitro insülin salım profili c) K-CS:TPP nanopartiküllerinin 24 saatlik in vitro insülin salım profili d) K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin 24 saatlik in vitro insülin salım profili



Şekil 4.21. Nanopartiküllerin 24 saatlik in vitro insülin salım profilleri

4.7.1. Optimum formülasyonların in vitro salım kinetiklerinin tayinine ait bulgular

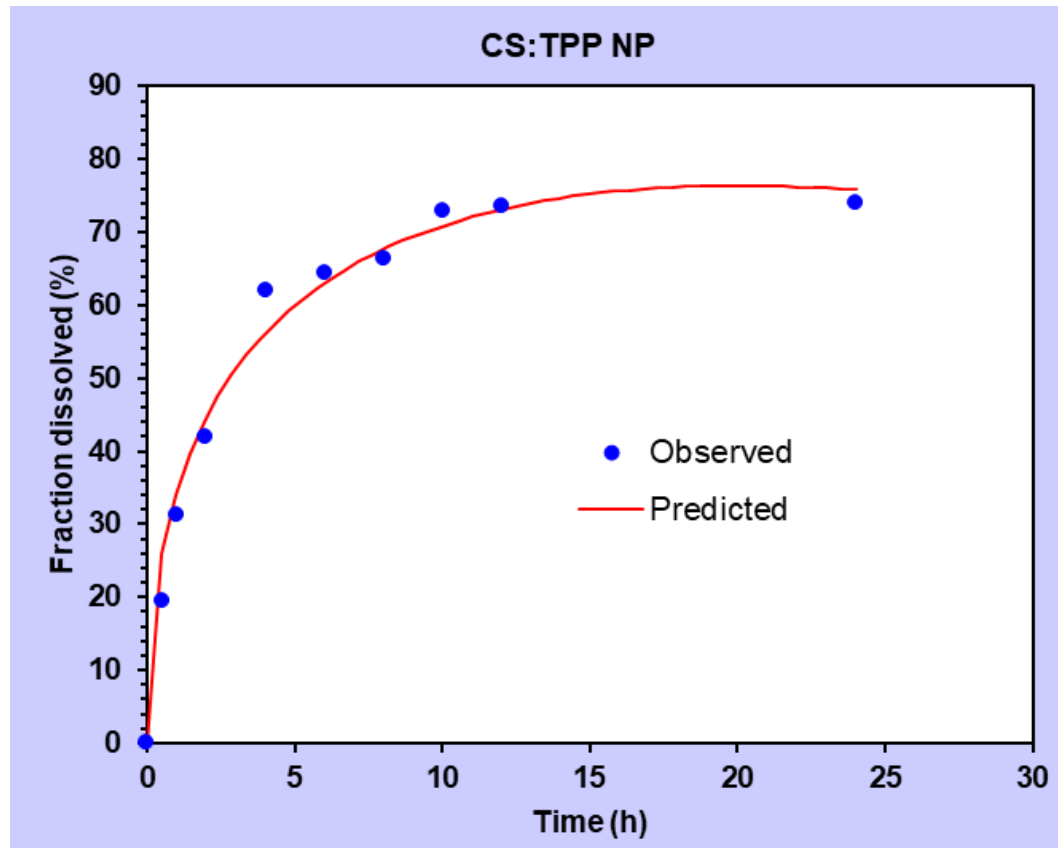
Optimum formülasyonların salım profillerinin farklı salım kinetik modelleri ile uyumları Bölüm 3.8.1’de anlatıldığı gibi DDSolver programı kullanılarak değerlendirildi. Kinetik modellemeler için % kümülatif insülin salım verilerinden yararlanılmıştır. Elde edilen bulgular incelendi ve R^2_{adj} değerinin 1’e en yakın, MSC değerinin 2’den büyük ve AIC değerinin daha küçük olması kriterlerine bağlı olarak en uygun kinetik model tespit edilmiştir.

Matematiksel modelleme için gerekli olan parametrelere ait bulgular CS:TPP nanopartikülleri için Çizelge 4.33’te ve bu bulgulardan hareketle uygun görülen matematiksel model olan Peppas-Sahlin ile in vitro insülin salım sonuçlarının eşleşmesi Şekil 4.22’de verilmiştir. Çizelge 4.34’te CS:SBE-β-SD nanopartikülleri için matematiksel modelleme için gerekli bulgular verilirken Şekil 4.23’te in vitro insülin salım sonuçları ile en uygun matematiksel model olarak görülen Weibull’ın eşleşmesi gösterilmiştir. K-CS:TPP nanopartikülleri için ise matematiksel modelleme için gerekli olan parametrelere ait bulgular Çizelge 4.35’de bu bulgulardan yola çıkılarak bulunan matematiksel model 1. derece ve in vitro insülin salım sonuçlarının etkileşimi Şekil 4.24’te gösterilmiştir.

K-CS:SBE- β -SD nanopartikülleri için ise matematiksel modelleme için gerekli olan parametrelere ait bulgular Çizelge 4.36’da ve bu bulgulardan yola çıkılarak bulunan model 1. derece ve in vitro insülin salım sonuçlarının etkileşimi Şekil 4.25’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.33. CS:TPP nanopartiküllerinin in vitro insülin salım sonuçlarının kinetik modellerle uyumunun değerlendirilmesi

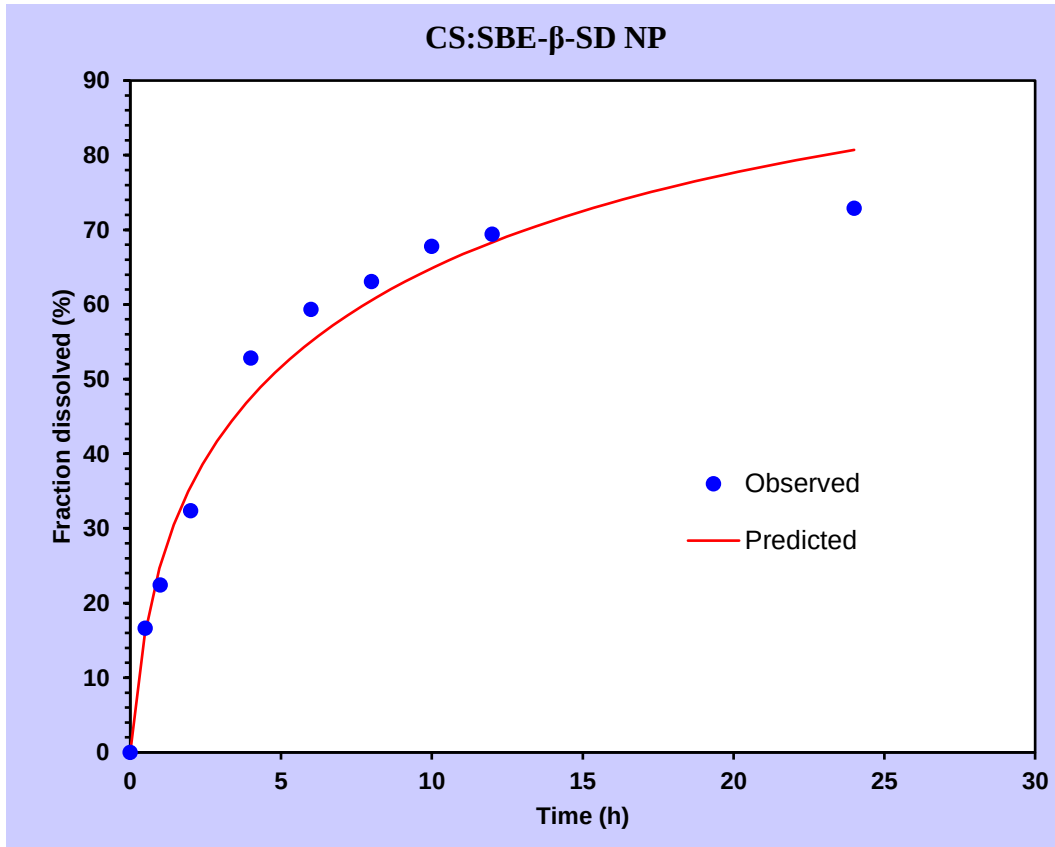
Matematiksel model	R^2_{adj}	AIC	MSC
0.derece	0,386	92,47	1,07
1.derece	0,679	77,84	0,39
Higuchi	0,71	76,83	0,5
Korsmeyer-Peppas	0,877	69,1	1,27
Hixson-Crowell	0,563	80,91	0,09
Peppas-Sahlin	0,977	53,01	2,88
Weibull	0,962	57,83	2,4



Şekil 4.22. Nanopartiküllerinin in vitro insülin salım profilinin Peppas-Sahlin salım kinetik modeliyle eşleştirilmesi

Çizelge 4.34. CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin in vitro insülin salım sonuçlarının kinetik modellerle uyumunun değerlendirilmesi

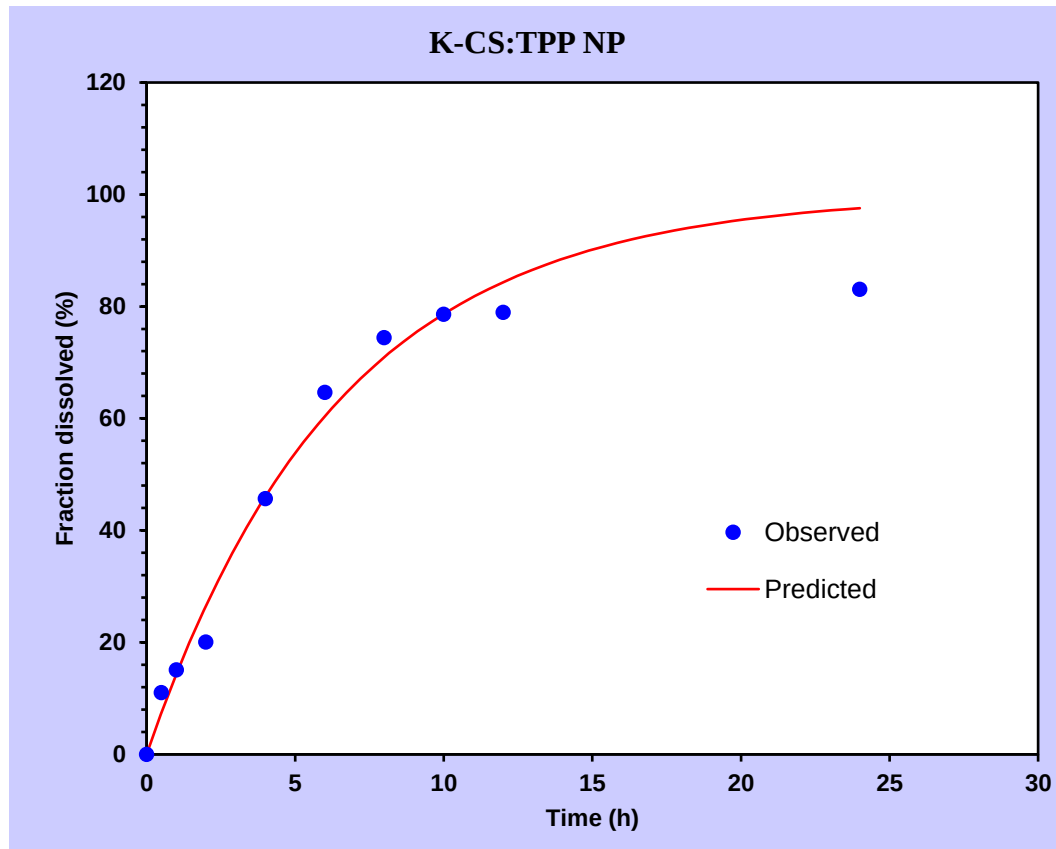
Matematiksel model	R^2_{adj}	AIC	MSC
0.derece	0,006	89,03	0,64
1.derece	0,804	72,66	1
Higuchi	0,836	70,88	1,18
Korsmeyer-Peppas	0,888	67,91	1,48
Hixson-Crowell	0,711	76,55	0,61
Peppas-Sahlin	0,964	57,11	2,56
Weibull	0,970	55,57	2,71



Şekil 4.23. CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin in vitro insülin salım profilinin Weibull salım kinetik modeliyle eşleştirilmesi

Çizelge 4.35. K-CS:TPP nanopartiküllerinin in vitro insülin salım sonuçlarının kinetik modellerle uyumunun değerlendirilmesi

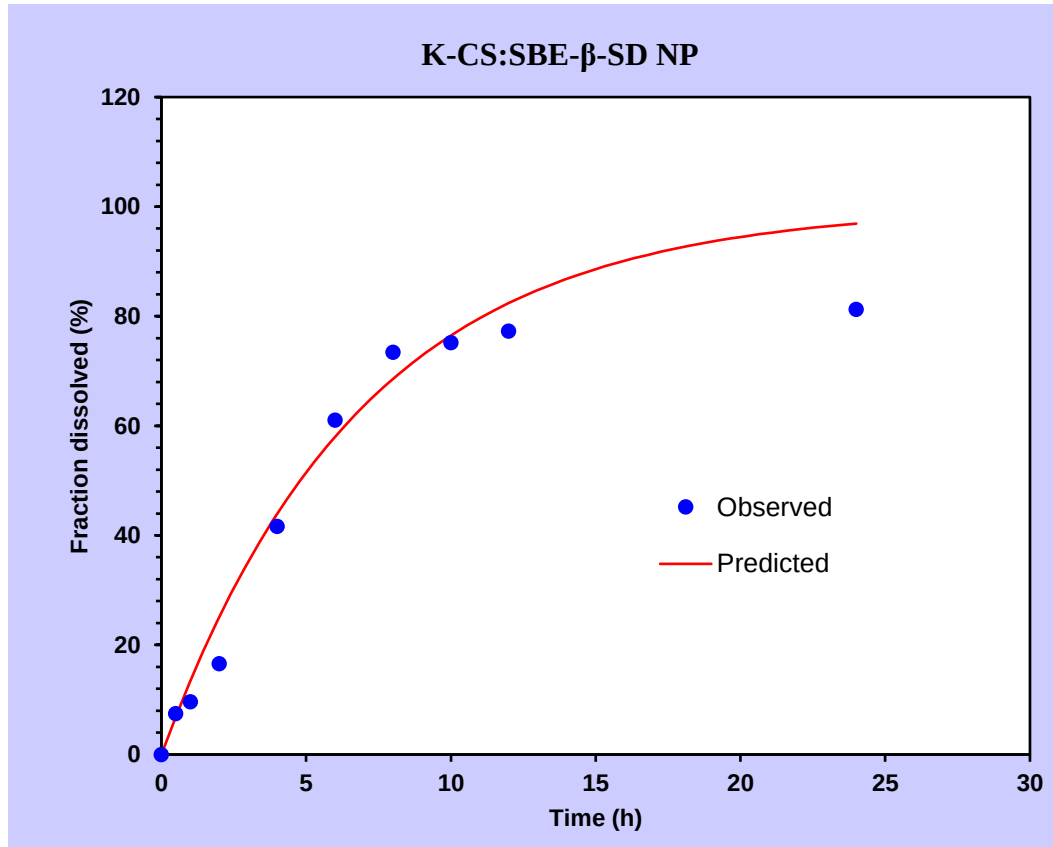
Matematiksel model	R^2_{adj}	AIC	MSC
0.derece	0,400	88,65	0,05
1.derece	0,966	59,85	2,93
Higuchi	0,882	72,29	1,68
Korsmeyer-Peppas	0,779	79,46	0,96
Hixson-Crowell	0,948	64,27	2,48
Peppas-Sahlin	0,877	74,27	1,48
Weibull	0,951	65,09	2,4



Şekil 4.24. K-CS:TPP nanopartiküllerinin in vitro insülin salım profilinin 1.derece salım kinetik modeliyle eşleştirilmesi

Çizelge 4.36. K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin in vitro insülin salım sonuçlarının kinetik modellerle uyumunun değerlendirilmesi

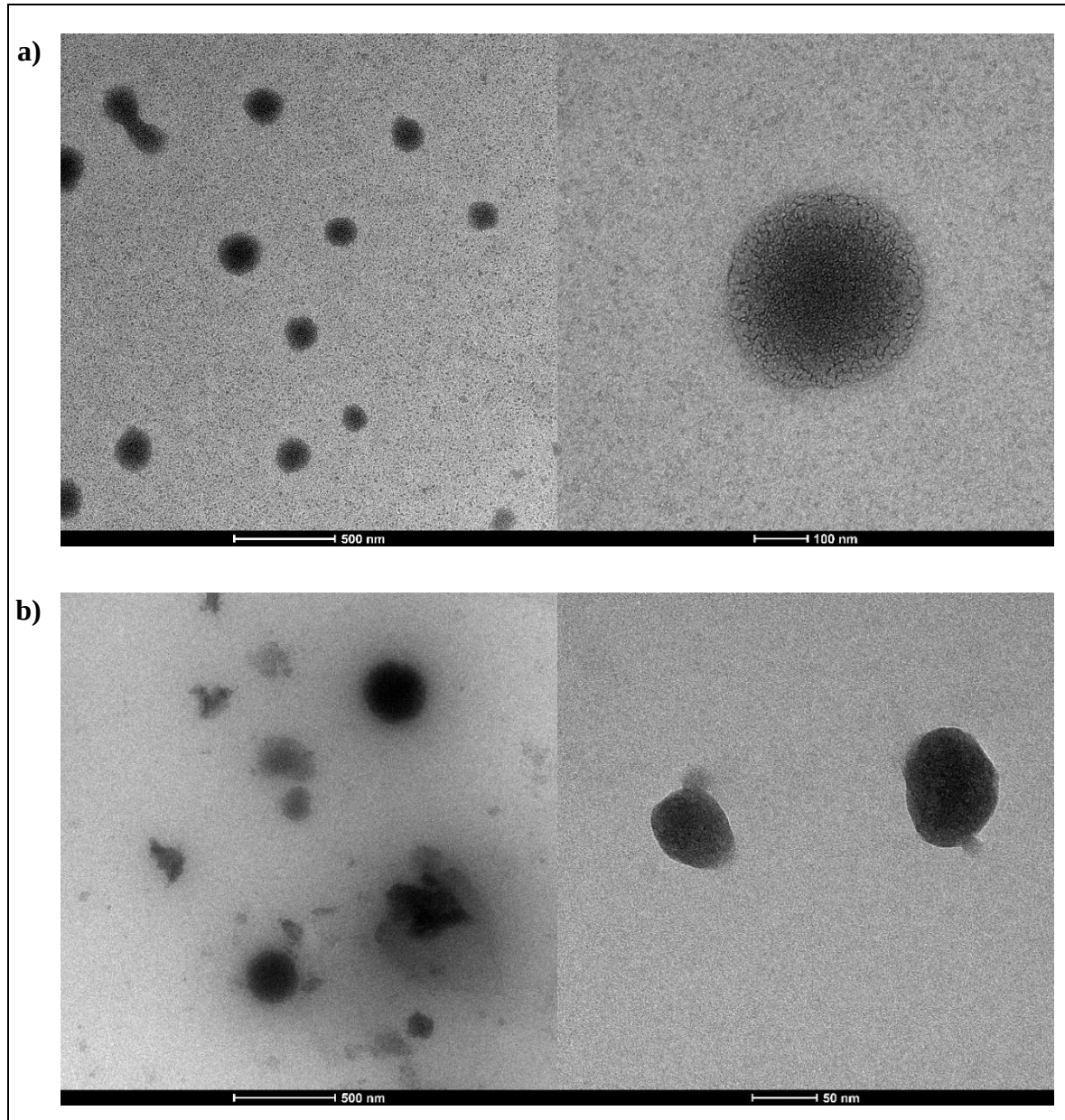
Matematiksel model	R^2_{adj}	AIC	MSC
0.derece	0,485	87,3	0,24
1.derece	0,959	61,89	2,78
Higuchi	0,879	72,83	1,69
Korsmeyer-Peppas	0,673	83,57	0,61
Hixson-Crowell	0,946	64,65	2,51
Peppas-Sahlin	0,849	76,47	1,32
Weibull	0,943	66,8	2,29



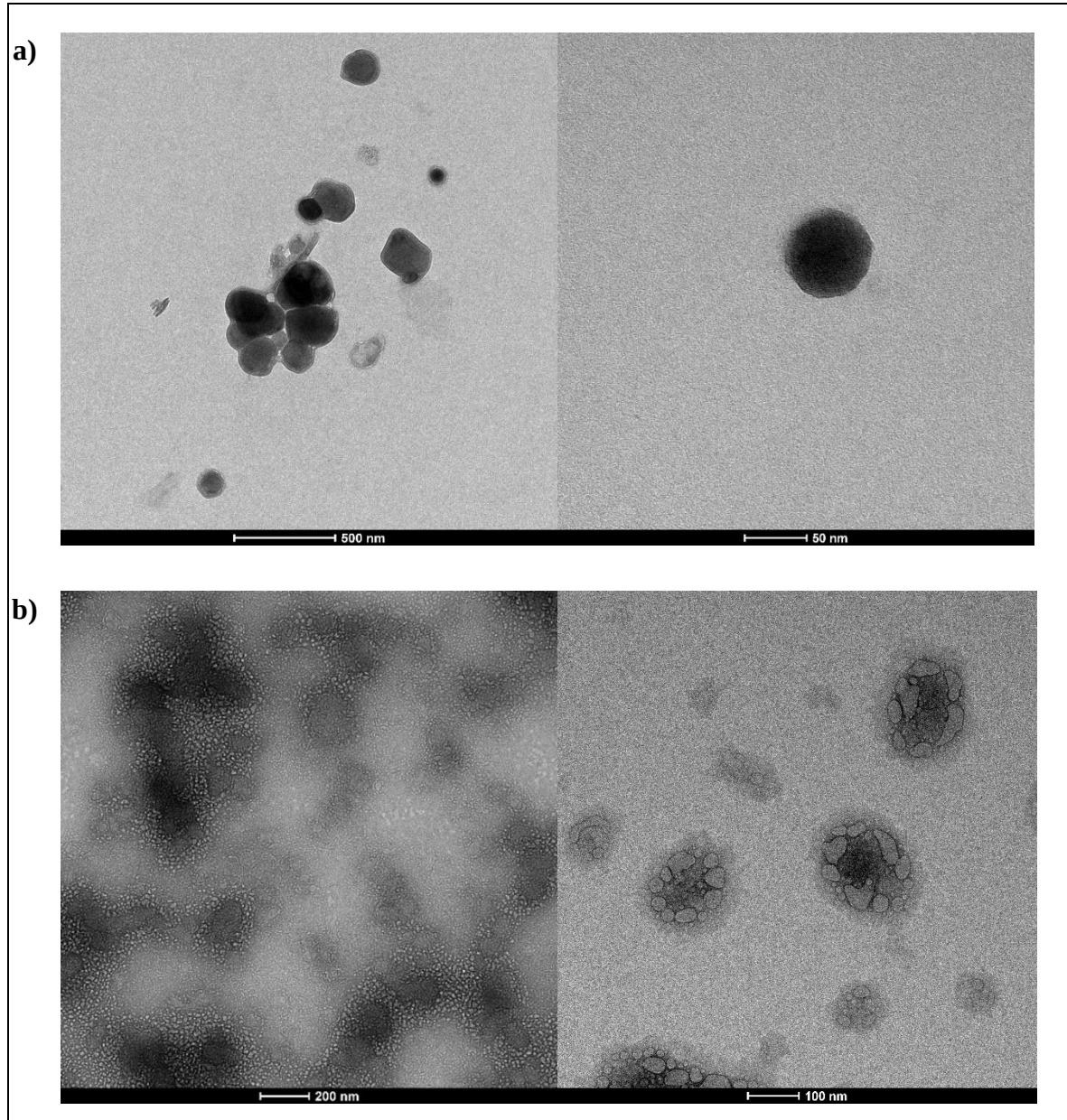
Şekil 4.25. K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin in vitro insülin salım profilinin 1.derece salım kinetik modeliyle eşleştirilmesi

4.8. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntüleme Çalışmalarına Ait Bulgular

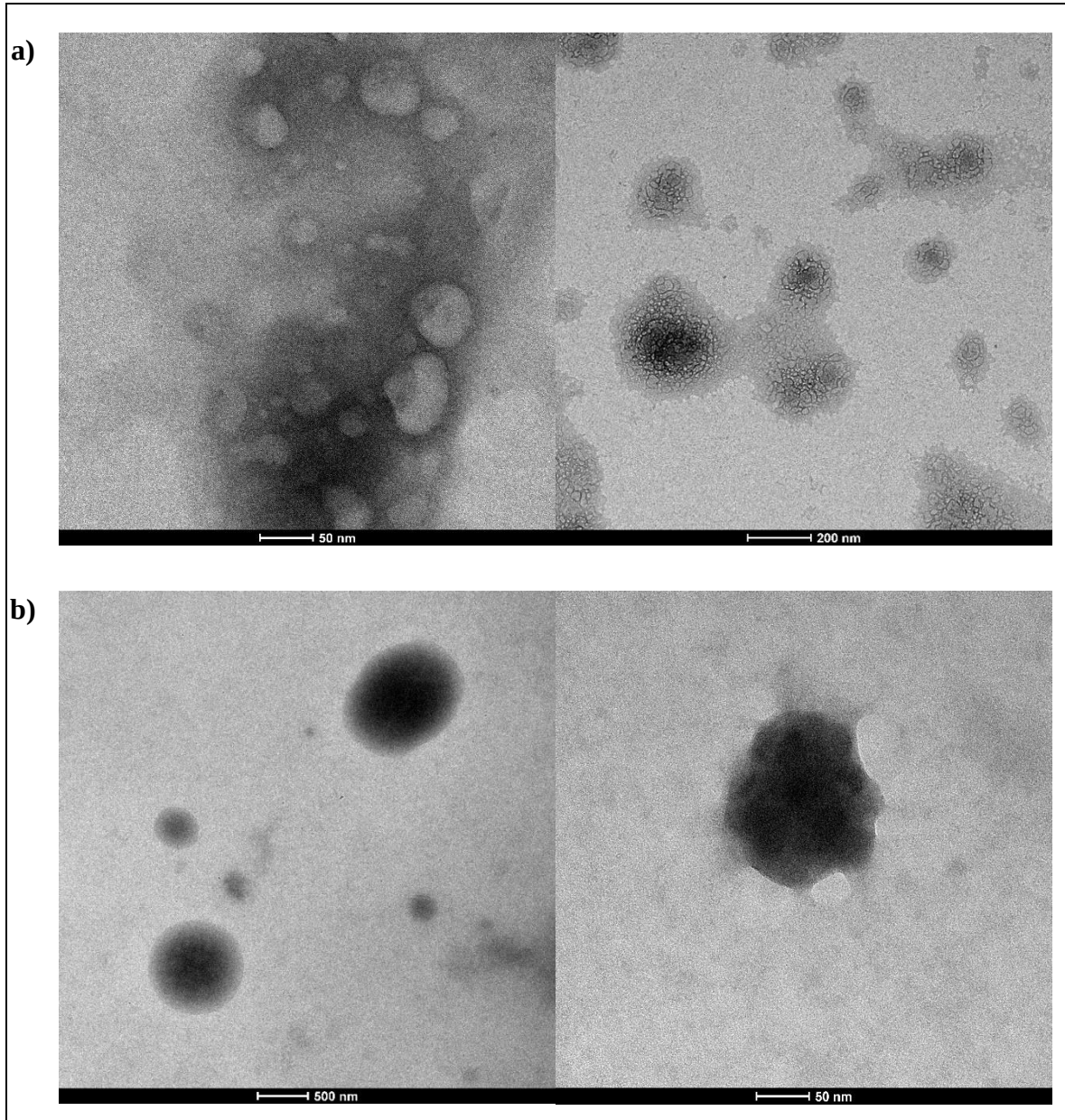
İnsülin yüklü ve insülin yüklü olmayan CS:TPP, CS:SBE- β -SD, K-CS:TPP ve K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin TEM görüntüleri sırasıyla Resim 4.13, Resim 4.14, Resim 4.15 ve Resim 4.16'da gösterilmiştir.



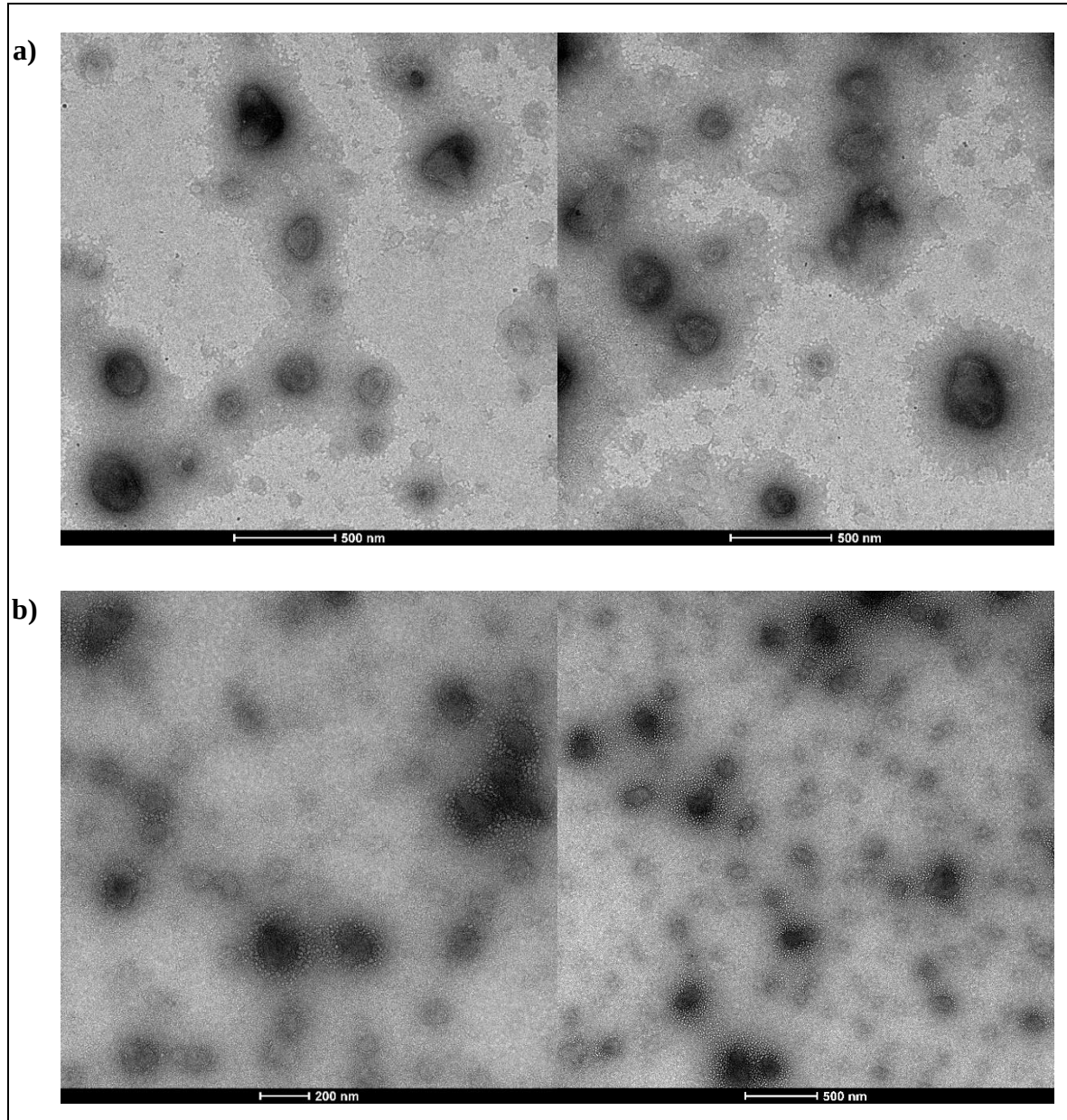
Resim 4.13. a) İnsülin yüklü olmayan CS:TPP nanopartiküllerinin b) İnsülin yüklü CS:TPP nanopartiküllerinin TEM görüntüleri



Resim 4.14. a) İnsülin yüklü olmayan CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin b) İnsülin yüklü CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin TEM görüntüleri



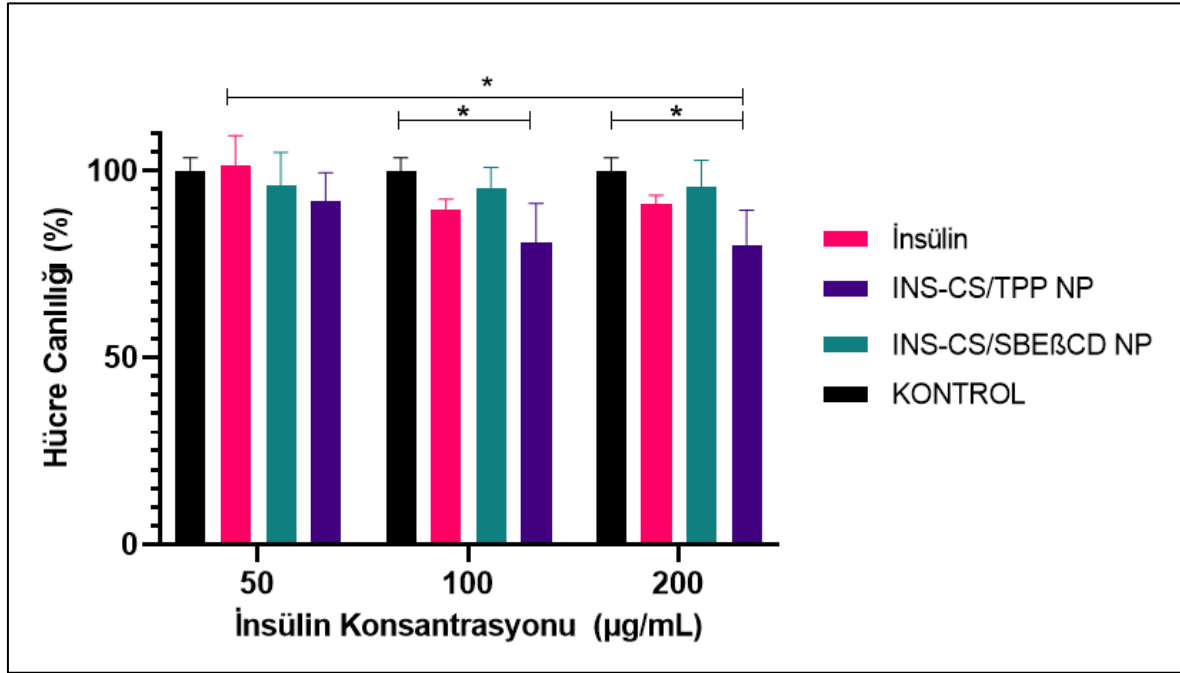
Resim 4.15. a) İnsülin yüklü olmayan K-CS:TPP nanopartiküllerinin b) İnsülin yüklü K-CS:TPP nanopartiküllerinin TEM görüntüleri



Resim 4.16. a) İnsülin yüklü olmayan K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin b) İnsülin yüklü K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin TEM görüntüleri

4.9. MTT Sitotoksosite Testlerine Ait Bulguları

MTT sitotoksosite testleri Bölüm 3.9’da anlatıldığı gibi yapılmıştır. Şekil 4.26’da CS:TPP ve CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinde artan insülin derişimlerine göre hücre canlılığı değışim grafiğı verilmiştir.



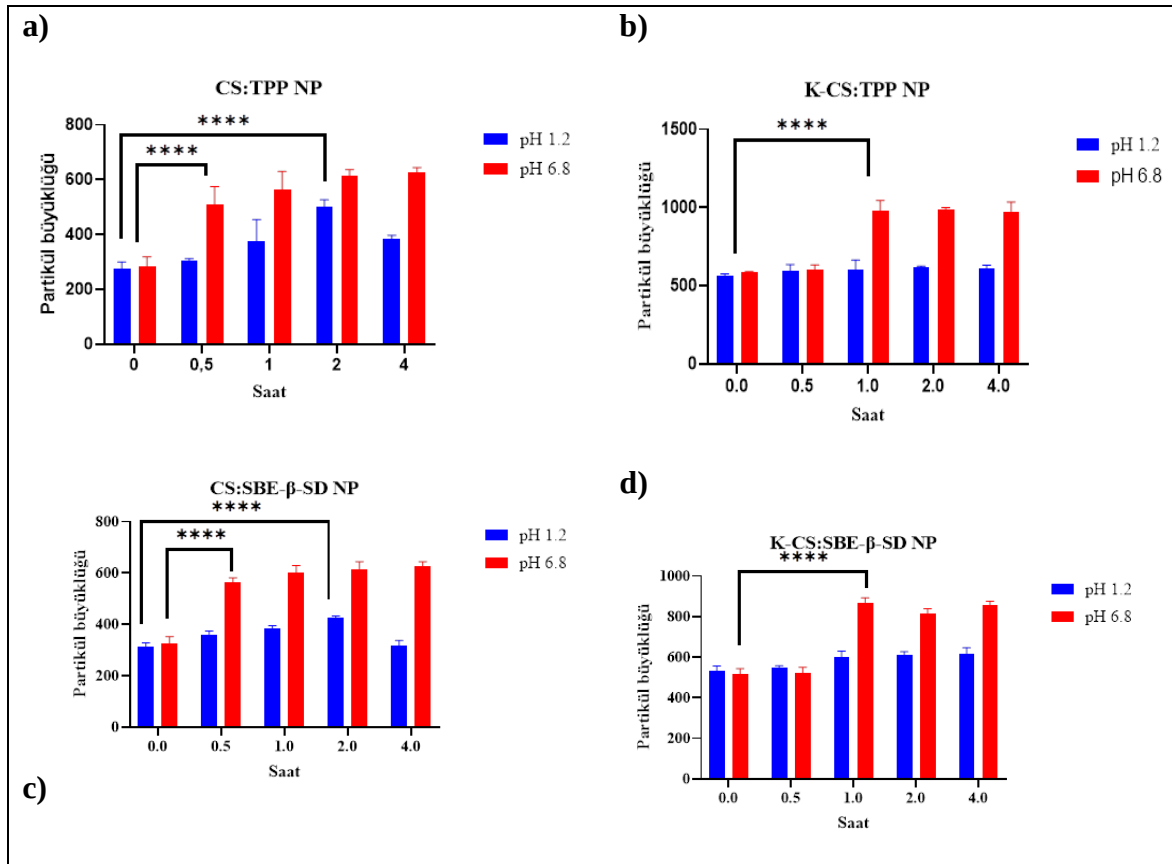
Şekil 4.26. İnsülin derişimine göre hücre canlılığı değışim grafiğı

4.10. In Vitro Stabilitte Çalışmalarına Ait Bulgular

İn vitro stabilite çalışmaları Bölüm 3.10’da anlatıldığı gibi yapıldı. Hazırlanan nanopartiküller 4’er saat boyunca pH 1,2 çözeltisi ve pH 6,8 fosfat tamponunda partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel açısından değerlendirilerek nanopartiküllerin oral yoldan verilmesinden sonra karşılaşacağı pH’lardaki davranışını incelendi. Optimum formülasyonlar için partikül büyüklüğü değışimi Çizelge 4.37’de polidispersite indeksi değışimi Çizelge 4.38’de ve zeta potansiyel değışimi Çizelge 4.39’da gösterilmiştir. Partikül büyüklüğü değışimi Şekil 4.27’de polidispersite indeksi değışim Şekil 4.28’de ve zeta potansiyel değışimi ise Şekil 4.29’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.37. İn vitro stabilite çalışmalarında nanopartiküllerin partikül büyüklüğü değerleri

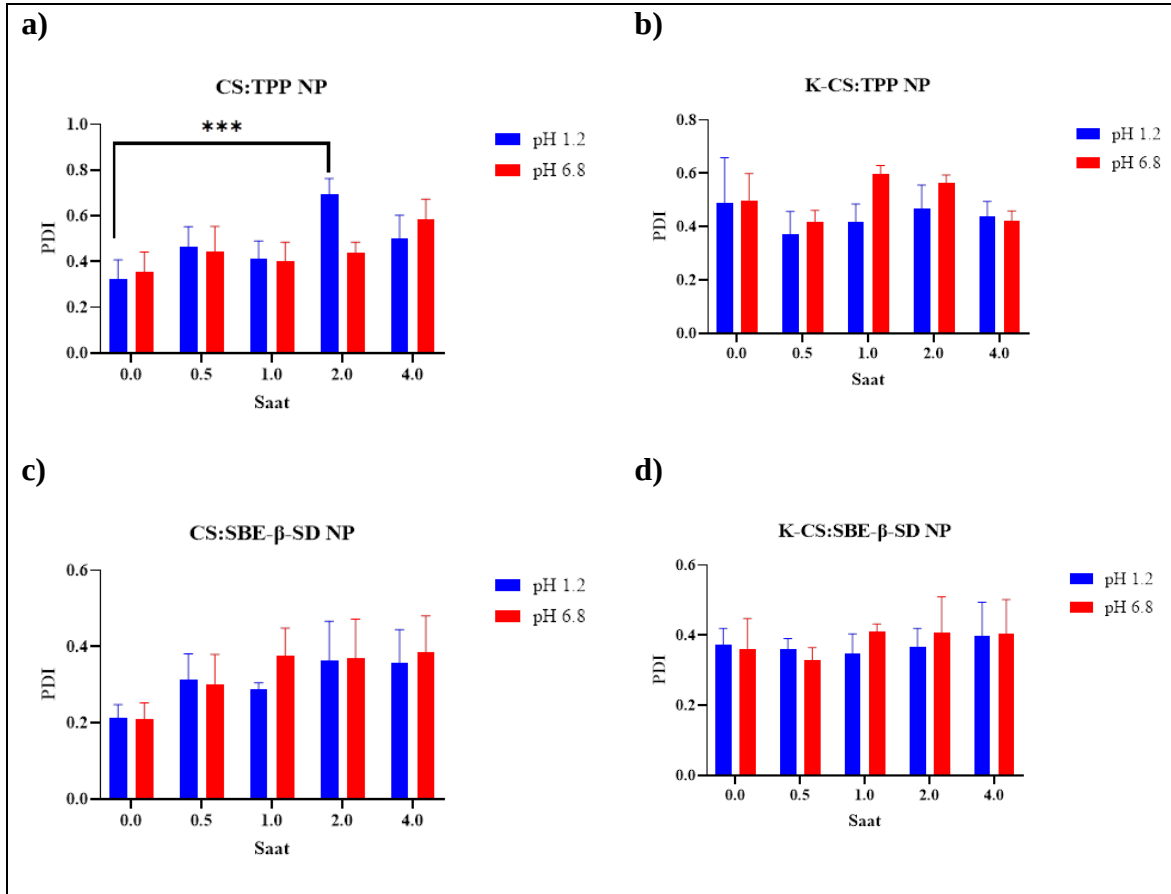
PB (nm) ± SS	pH/süre	0	30 dakika	1 saat	2 saat	4 saat
CS:TPP NP	1,2	275,61±24,06	304,81±8,37	375,51±79,42	502,61±23,93	385,62±12,34
CS:TPP NP	6,8	282,72±35,73	509,92±65,33	565,23±65,31	612,53±23,64	625,41±18,67
K-CS:TPP NP	1,2	563,22±12,89	595,54±39,88	602,51±61,66	618,55±6,21	612,64±17,71
K-CS:TPP NP	6,8	586,84±2,16	601,15±32,12	981,22±63,21	986,64±12,32	974,51±61,12
CS:SBE-β-SD NP	1,2	312,51±15,64	360,73±13,51	385,61±9,69	426,45±5,63	316,56±21,32
CS:SBE-β-SD NP	6,8	326,41±25,79	563,24±18,31	601,53±28,12	616,29±28,12	626,45±18,19
K-CS:SBE-β-SD NP	1,2	531,56±24,78	547,98±50,34	598,64±31,22	608,54±18,91	614,53±32,21
K-CS:SBE-β-SD NP	6,8	515,54±27,91	521,51±28,39	869,54±23,67	815,55±23,12	854,67±21,62



Şekil 4.27. a) CS:TPP nanopartiküllerinin b) K-CS:TPP nanopartiküllerinin c) CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin d) K-CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin in vitro stabilite çalışmalarından elde edilen partikül büyüklüğü değerlerinin değişimi

Çizelge 4.38. İn vitro stabilite çalışmalarında nanopartiküllerin polidispersite indeksi değerleri

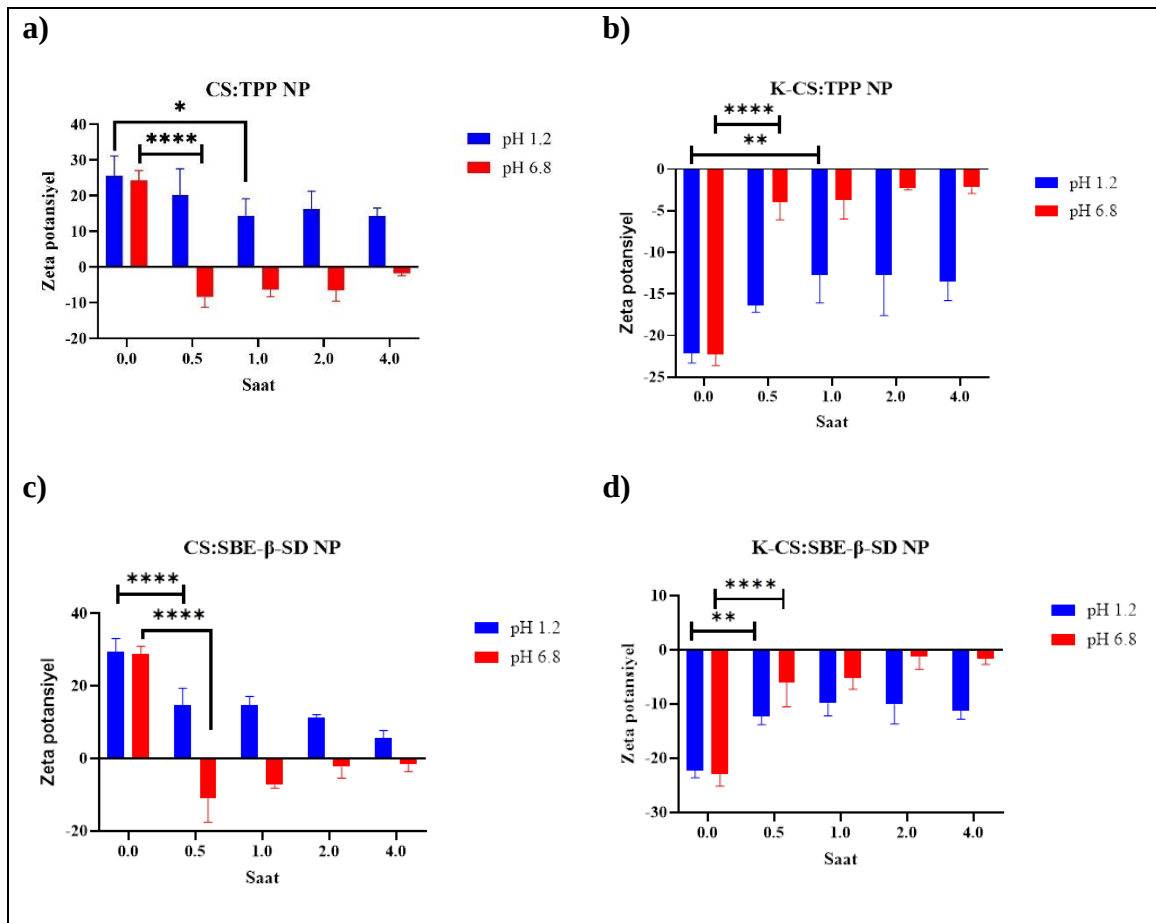
PDI $\pm$ SS	pH/süre	0	30 dakika	1 saat	2 saat	4 saat
CS:TPP NP	1,2	0,321 $\pm$ 0,086	0,462 $\pm$ 0,091	0,412 $\pm$ 0,078	0,692 $\pm$ 0,072	0,501 $\pm$ 0,101
CS:TPP NP	6,8	0,354 $\pm$ 0,087	0,444 $\pm$ 0,112	0,404 $\pm$ 0,081	0,437 $\pm$ 0,048	0,585 $\pm$ 0,088
K-CS:TPP NP	1,2	0,489 $\pm$ 0,171	0,372 $\pm$ 0,085	0,416 $\pm$ 0,069	0,468 $\pm$ 0,088	0,440 $\pm$ 0,055
K-CS:TPP NP	6,8	0,499 $\pm$ 0,102	0,418 $\pm$ 0,043	0,599 $\pm$ 0,031	0,563 $\pm$ 0,031	0,423 $\pm$ 0,036
CS:SBE- β -SD NP	1,2	0,212 $\pm$ 0,036	0,312 $\pm$ 0,069	0,289 $\pm$ 0,016	0,364 $\pm$ 0,103	0,356 $\pm$ 0,089
CS:SBE- β -SD NP	6,8	0,209 $\pm$ 0,044	0,302 $\pm$ 0,078	0,376 $\pm$ 0,073	0,369 $\pm$ 0,103	0,385 $\pm$ 0,096
K-CS:SBE- β -SD NP	1,2	0,373 $\pm$ 0,047	0,360 $\pm$ 0,031	0,347 $\pm$ 0,057	0,368 $\pm$ 0,052	0,398 $\pm$ 0,096
K-CS:SBE- β -SD NP	6,8	0,362 $\pm$ 0,086	0,328 $\pm$ 0,037	0,410 $\pm$ 0,022	0,408 $\pm$ 0,102	0,404 $\pm$ 0,098



Şekil 4.28. a) CS:TPP nanopartiküllerinin b) K-CS:TPP nanopartiküllerinin c) CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin d) K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin in vitro stabilite çalışmalarından elde edilen PDI değerlerinin değişimi

Çizelge 4.39. İn vitro stabilite çalışmalarında nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri

ÇP (mv) ± SS	pH/süre	0	30 dakika	1 saat	2 saat	4 saat
CS:TPP NP	1,2	25,5±5,6	20,1±7,4	14,4±4,7	16,3±4,9	14,3±2,2
CS:TPP NP	6,8	24,2±2,7	-8,48±2,8	-6,4±1,9	-6,6±3,4	-1,8±0,6
K-CS:TPP NP	1,2	-22,5±1,8	-16,4±0,8	-12,7±3,4	-12,2±4,9	-13,5±2,3
K-CS:TPP NP	6,8	-22,3±1,3	-3,9±2,1	-3,6±2,3	-2,6±0,23	-2,2±0,7
CS:SBE-β-SD NP	1,2	29,4±3,7	14,9±4,5	14,8±2,2	11,2±0,9	5,6±2,1
CS:SBE-β-SD NP	6,8	28,9±2,1	-10,9±6,7	-7,3±0,9	-2,3±3,2	-1,6±2,1
K-CS:SBE-β-SD NP	1,2	-22,3±1,3	-12,3±1,5	-9,9±2,3	-10,1±3,6	-11,2±1,6
K-CS:SBE-β-SD NP	6,8	-22,9±2,3	-6,1±4,5	-5,1±2,1	-1,2±2,3	-1,6±1,1



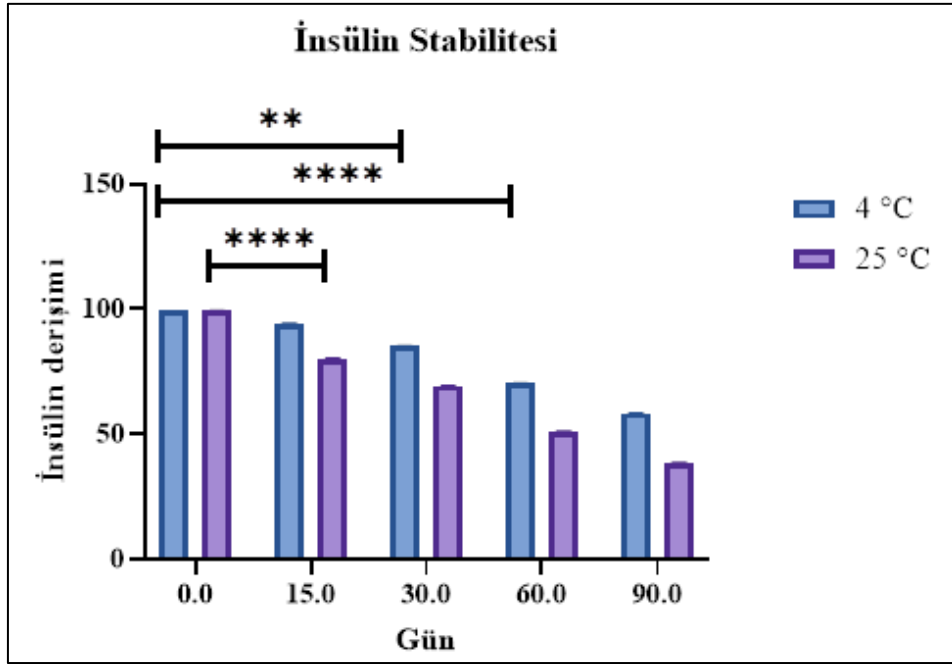
Şekil 4.29. a) CS:TPP nanopartiküllerinin b) K-CS:TPP nanopartiküllerinin c) CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin d) K-CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin in vitro stabilite çalışmalarından elde edilen zeta potansiyel değerlerinin değişimi

4.11. Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular

İnsülinin distile suda 100 µg/mL'lik çözeltisi hazırlanarak insülin çözeltisinin stabilitesi 0., 15., 30., 60. ve 90. günlerde UV-Vis spektrofotometresinde miktar tayini yapılarak hem 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında hem de 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde değerlendirildi. Çizelge 4.40'ta 4°C sıcaklık ± ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında ve 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde bekletilen insülin çözeltisinin 90 günlük miktar tayini sonuçları gösterilmektedir. Şekil 4.30'da insülin çözeltisinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında ve 25°C sıcaklık %60±5 bağıl nem koşullarında miktar tayini sonuçlarının 90 günlük değişim grafiği gösterilmiştir.

Çizelge 4.40. 4°C sıcaklık ± ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında ve 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde bekletilen insülin çözeltisinin 90 günlük miktar tayini sonuçları (µg/mL)

Gün Sıcaklık	0	15	30	60	90
4 °C	99,14	94,16	85,16	70,16	58,36
25 °C	99,36	80,12	69,36	51,12	38,53



Şekil 4.30. İnsülin çözeltisinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında ve 25°C sıcaklık %60±5 bağıl nem koşullarında miktar tayini sonuçlarının 90 günlük değişim grafiği

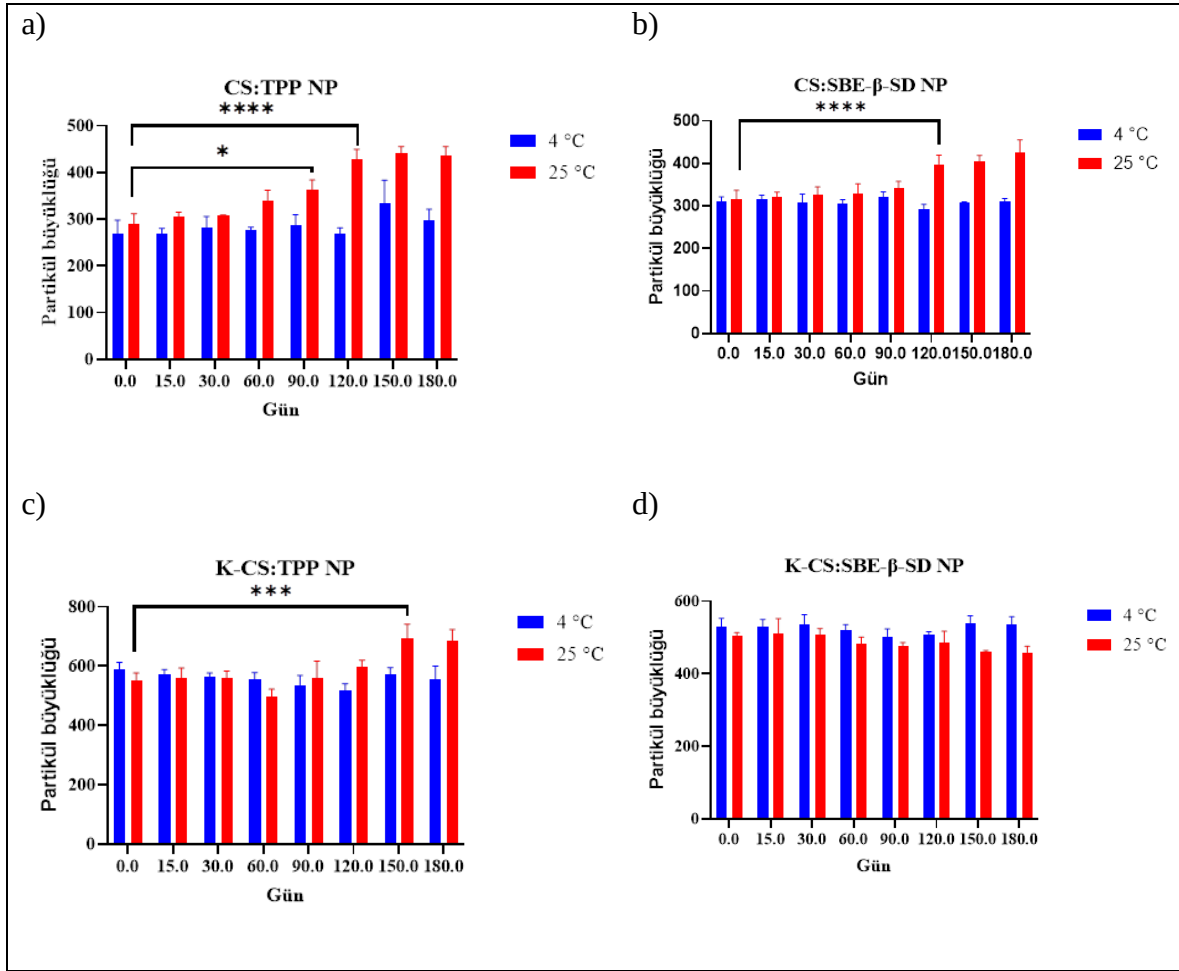
Nanopartiküller 4°C sıcaklık ± ortam nemi ve 25°C sıcaklık %60±5 bağıl nem koşullarında 6 ay boyunca bekletildi. 0., 15., 30., 60., 90., 120., 150. ve 180. günlerde nanopartiküller partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve enkapsülasyon etkinliği açısından değerlendirildi. Çizelge 4.41’de 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında bekletilen nanopartiküllerin, Çizelge 4.42’de 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde bekletilen nanopartiküllerin 6 aylık partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları verilmiştir. Şekil 4.31’de CS:TPP nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında ve 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde 6 ay bekletilmeleri sonucundaki partikül büyüklüğündeki değişimler, CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında ve 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde 6 ay bekletilmeleri sonucundaki partikül büyüklüğündeki değişimler, K-CS:TPP nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında ve 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde 6 ay bekletilmeleri sonucundaki partikül büyüklüğündeki değişimler ve K-CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında ve 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde 6 ay bekletilmeleri sonucundaki partikül büyüklüğündeki değişimler gösterilmiştir.

Çizelge 4.41. 4°C sıcaklık $\pm$ ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında bekletilen nanopartiküllerin 6 aylık partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları

4°C PB (nm) $\pm$ SS/Gün	0	15	30	60	90	120	150	180
CS:TPP NP	268,52 $\pm$ 29,18	269,61 $\pm$ 11,22	282,63 $\pm$ 23,61	276,21 $\pm$ 6,91	286,54 $\pm$ 23,21	267,98 $\pm$ 13,15	335,21 $\pm$ 48,24	296,61 $\pm$ 24,91
CS:SBE- β -SD NP	310,21 $\pm$ 11,22	315,61 $\pm$ 9,82	306,91 $\pm$ 21,12	305,16 $\pm$ 9,22	320,59 $\pm$ 12,11	292,21 $\pm$ 11,32	307,34 $\pm$ 2,13	310,51 $\pm$ 6,82
K- CS:TPP NP	589,16 $\pm$ 23,61	570,25 $\pm$ 18,91	563,27 $\pm$ 13,91	556,36 $\pm$ 21,24	536,53 $\pm$ 32,61	517,55 $\pm$ 23,16	570,47 $\pm$ 24,71	555,61 $\pm$ 44,53
K- CS:SBE- β -SD NP	530,62 $\pm$ 22,33	529,85 $\pm$ 19,91	536,68 $\pm$ 26,12	520,14 $\pm$ 14,53	502,54 $\pm$ 21,21	508,58 $\pm$ 7,45	540,41 $\pm$ 19,21	536,93 $\pm$ 20,21

Çizelge 4.42. 25°C sıcaklık %60 $\pm$ 5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde bekletilen nanopartiküllerin 6 aylık partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları

25°C PB (nm) $\pm$ SS/Gün	0	15	30	60	90	120	150	180
CS:TPP NP	290,63 $\pm$ 21,22	305,64 $\pm$ 9,81	306,96 $\pm$ 2,31	340,82 $\pm$ 21,21	362,28 $\pm$ 21,91	428,57 $\pm$ 21,32	440,25 $\pm$ 15,61	435,5 $\pm$ 19,61
CS:SBE- β -SD NP	315,65 $\pm$ 21,31	320,65 $\pm$ 12,22	326,53 $\pm$ 18,41	328,51 $\pm$ 23,63	342,52 $\pm$ 15,69	398,21 $\pm$ 19,28	403,52 $\pm$ 21,32	426,65 $\pm$ 28,62
K- CS:TPP NP	553,24 $\pm$ 23,91	560,59 $\pm$ 32,91	558,92 $\pm$ 24,62	498,58 $\pm$ 23,91	560,44 $\pm$ 56,61	598,51 $\pm$ 21,62	695,21 $\pm$ 46,12	685,12 $\pm$ 38,69
K- CS:SBE- β -SD NP	503,65 $\pm$ 9,51	510,99 $\pm$ 41,12	508,16 $\pm$ 16,35	482,25 $\pm$ 18,91	475,12 $\pm$ 11,25	486,24 $\pm$ 31,21	460,42 $\pm$ 3,91	458,91 $\pm$ 16,98



Şekil 4.31. a) CS:TPP nanopartiküllerinin b) CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin c) K-CS:TPP nanopartiküllerinin d) K-CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında ve 25°C sıcaklık %60±5 bağıl nem koşullarında partikül büyüklüğü değerlerinin 6 aylık değişim grafikleri

Çizelge 4.43'te 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında bekletilen nanopartiküllerin, Çizelge 4.44'te 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde bekletilen nanopartiküllerin 6 aylık polidispersite indeksi ölçüm sonuçları verilmiştir. Şekil 4.32'de CS:TPP nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında ve 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde 6 ay bekletilmeleri sonucundaki polidispersite indeksindeki değişimler, CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında ve 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde 6 ay bekletilmeleri sonucundaki polidispersite indeksindeki değişimler K-CS:TPP nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında ve 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde 6 ay bekletilmeleri sonucundaki polidispersite indeksindeki değişimler ve K-CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında ve

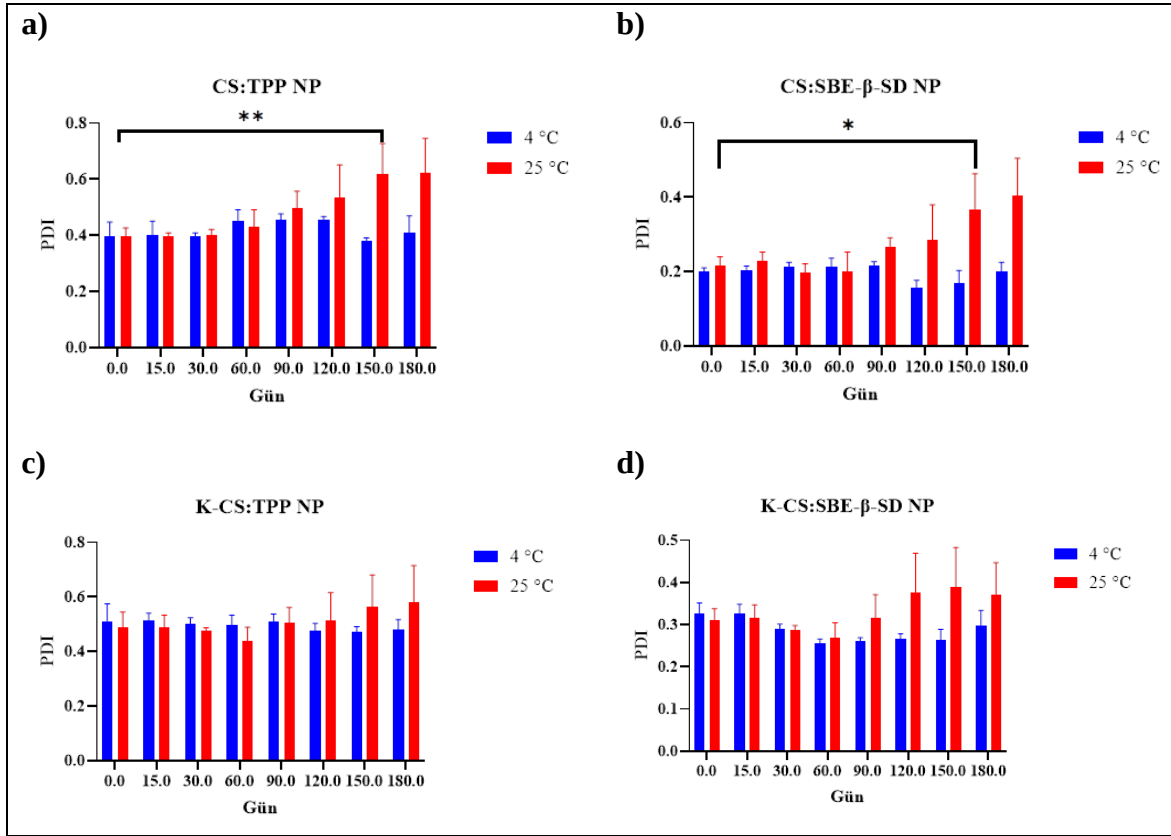
25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde 6 ay bekletilmeleri sonucundaki polidispersite indeksindeki değişimler gösterilmiştir.

Çizelge 4.43. 4°C sıcaklık $\pm$ ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında bekletilen nanopartiküllerin 6 aylık polidispersite indeksi ölçüm sonuçları

4°C PDI $\pm$ SS/Gün	0	15	30	60	90	120	150	180
CS:TPP NP	0,397 $\pm$ 0,056	0,401 $\pm$ 0,056	0,398 $\pm$ 0,012	0,452 $\pm$ 0,036	0,456 $\pm$ 0,026	0,457 $\pm$ 0,012	0,381 $\pm$ 0,019	0,409 $\pm$ 0,060
CS:SBE- β - SD NP	0,201 $\pm$ 0,009	0,205 $\pm$ 0,010	0,213 $\pm$ 0,012	0,213 $\pm$ 0,023	0,216 $\pm$ 0,011	0,156 $\pm$ 0,021	0,168 $\pm$ 0,035	0,201 $\pm$ 0,024
K-CS:TPP NP	0,512 $\pm$ 0,063	0,514 $\pm$ 0,026	0,501 $\pm$ 0,023	0,498 $\pm$ 0,036	0,511 $\pm$ 0,026	0,478 $\pm$ 0,025	0,471 $\pm$ 0,021	0,482 $\pm$ 0,036
K-CS:SBE- β - SD NP	0,326 $\pm$ 0,026	0,325 $\pm$ 0,023	0,289 $\pm$ 0,012	0,255 $\pm$ 0,011	0,261 $\pm$ 0,008	0,266 $\pm$ 0,012	0,264 $\pm$ 0,025	0,298 $\pm$ 0,036

Çizelge 4.44. 25°C sıcaklık %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde bekletilen nanopartiküllerin 6 aylık polidispersite indeksi ölçüm sonuçları

25°C PDI $\pm$ SS/Gün	0	15	30	60	90	120	150	180
CS:TPP NP	0,396 $\pm$ 0,032	0,398 $\pm$ 0,011	0,401 $\pm$ 0,023	0,432 $\pm$ 0,069	0,497 $\pm$ 0,056	0,536 $\pm$ 0,115	0,619 $\pm$ 0,109	0,623 $\pm$ 0,123
CS:SBE- β - SD NP	0,215 $\pm$ 0,025	0,228 $\pm$ 0,025	0,198 $\pm$ 0,023	0,201 $\pm$ 0,052	0,268 $\pm$ 0,023	0,286 $\pm$ 0,094	0,368 $\pm$ 0,096	0,403 $\pm$ 0,102
K-CS:TPP NP	0,489 $\pm$ 0,056	0,487 $\pm$ 0,046	0,475 $\pm$ 0,012	0,437 $\pm$ 0,052	0,505 $\pm$ 0,056	0,513 $\pm$ 0,103	0,565 $\pm$ 0,116	0,579 $\pm$ 0,136
K-CS:SBE- β - SD NP	0,312 $\pm$ 0,026	0,315 $\pm$ 0,032	0,286 $\pm$ 0,012	0,269 $\pm$ 0,036	0,315 $\pm$ 0,0562	0,375 $\pm$ 0,094	0,389 $\pm$ 0,094	0,372 $\pm$ 0,075



Şekil 4.32. a) CS:TPP nanopartiküllerinin b) CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin c) K-CS:TPP nanopartiküllerinin d) K-CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında ve 25°C sıcaklık %60±5 bağıl nem koşullarında polidispersite indeksi değerlerinin 6 aylık değişim grafikleri

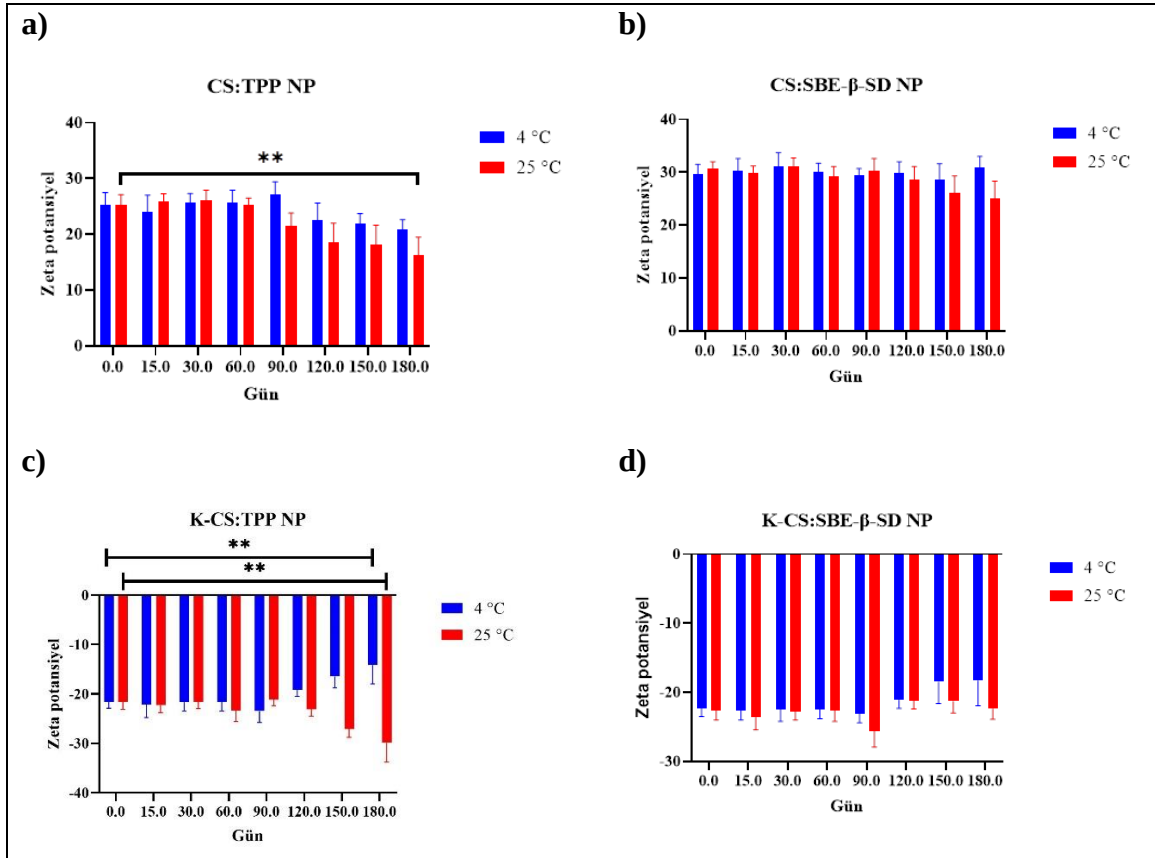
Çizelge 4.45'te 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında bekletilen nanopartiküllerin, Çizelge 4.46'da 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde bekletilen nanopartiküllerin 6 aylık zeta potansiyel ölçüm sonuçları verilmiştir. Şekil 4.33'te CS:TPP nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında ve 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde 6 ay bekletilmeleri sonucundaki zeta potansiyeldeki değişimler, CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında ve 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde 6 ay bekletilmeleri sonucundaki zeta potansiyeldeki değişimler, K-CS:TPP nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında ve 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde 6 ay bekletilmeleri sonucundaki zeta potansiyeldeki değişimler ve K-CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında ve 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde 6 ay bekletilmeleri sonucundaki zeta potansiyeldeki değişimler gösterilmiştir.

Çizelge 4.45. 4°C sıcaklık $\pm$ ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında bekletilen nanopartiküllerin 6 aylık zeta potansiyeli ölçüm sonuçları

4°C ÇP $\pm$ SS/Gün	0	15	30	60	90	120	150	180
CS:TPP NP	25,2 $\pm$ 2,3	23,9 $\pm$ 3,1	25,6 $\pm$ 1,7	25,6 $\pm$ 2,3	27,1 $\pm$ 2,3	22,5,8 $\pm$ 3,1	21,9 $\pm$ 1,8	20,8 $\pm$ 1,8
CS:SBE- β - SD NP	29,6 $\pm$ 1,9	30,2 $\pm$ 2,4	31,1 $\pm$ 2,6	30,1 $\pm$ 1,6	29,5 $\pm$ 1,2	29,9 $\pm$ 2,1	28,7 $\pm$ 2,9	30,9 $\pm$ 2,1
K-CS:TPP NP	-21,6 $\pm$ 1,3	-22,2 $\pm$ 2,6	-21,7 $\pm$ 1,8	-21,6 $\pm$ 1,9	-23,5 $\pm$ 2,3	-19,2 $\pm$ 1,3	-16,5 $\pm$ 2,3	-14,2 $\pm$ 3,8
K- CS:SBE- β - SD NP	-22,3 $\pm$ 1,2	-22,6 $\pm$ 1,4	-22,5 $\pm$ 1,7	-22,5 $\pm$ 1,3	-23,1 $\pm$ 1,3	-21,1 $\pm$ 1,2	-18,5 $\pm$ 3,1	-18,3 $\pm$ 3,6

Çizelge 4.46. 25°C sıcaklık %60 $\pm$ 5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabiniinde bekletilen formülasyonların 6 aylık zeta potansiyeli ölçüm sonuçları

25°C ÇP $\pm$ SS/Gün	0	15	30	60	90	120	150	180
CS:TPP NP	25,3 $\pm$ 1,8	25,9 $\pm$ 1,4	26,1 $\pm$ 1,8	25,3 $\pm$ 1,2	21,5 $\pm$ 2,3	18,5 $\pm$ 3,5	18,1 $\pm$ 3,5	16,3 $\pm$ 3,2
CS:SBE- β -SD NP	30,8 $\pm$ 1,2	29,9 $\pm$ 1,3	31,2 $\pm$ 1,5	29,2 $\pm$ 1,9	30,3 $\pm$ 2,3	28,5 $\pm$ 2,6	26,1 $\pm$ 3,2	25,1 $\pm$ 3,2
K-CS: TPP NP	-21,6 $\pm$ 1,5	-22,3 $\pm$ 1,5	-21,6 $\pm$ 1,4	-23,4 $\pm$ 2,2	-21,2 $\pm$ 1,2	-23,1,1 $\pm$ 2,1	-27,1 $\pm$ 1,7	-29,9 $\pm$ 3,9
K- CS:SBE- β -SD NP	-22,6 $\pm$ 1,4	-23,6 $\pm$ 1,8	-22,8 $\pm$ 1,2	-22,6 $\pm$ 1,6	-25,6 $\pm$ 2,3	-21,2 $\pm$ 1,2	-21,3 $\pm$ 1,7	-22,4 $\pm$ 1,5



Şekil 4.33. a) CS:TPP nanopartiküllerinin b) CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin c) K-CS:TPP nanopartiküllerinin d) K-CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında ve 25°C sıcaklık %60±5 bağıl nem koşullarında zeta potansiyel değerlerinin 6 aylık değişim grafikleri

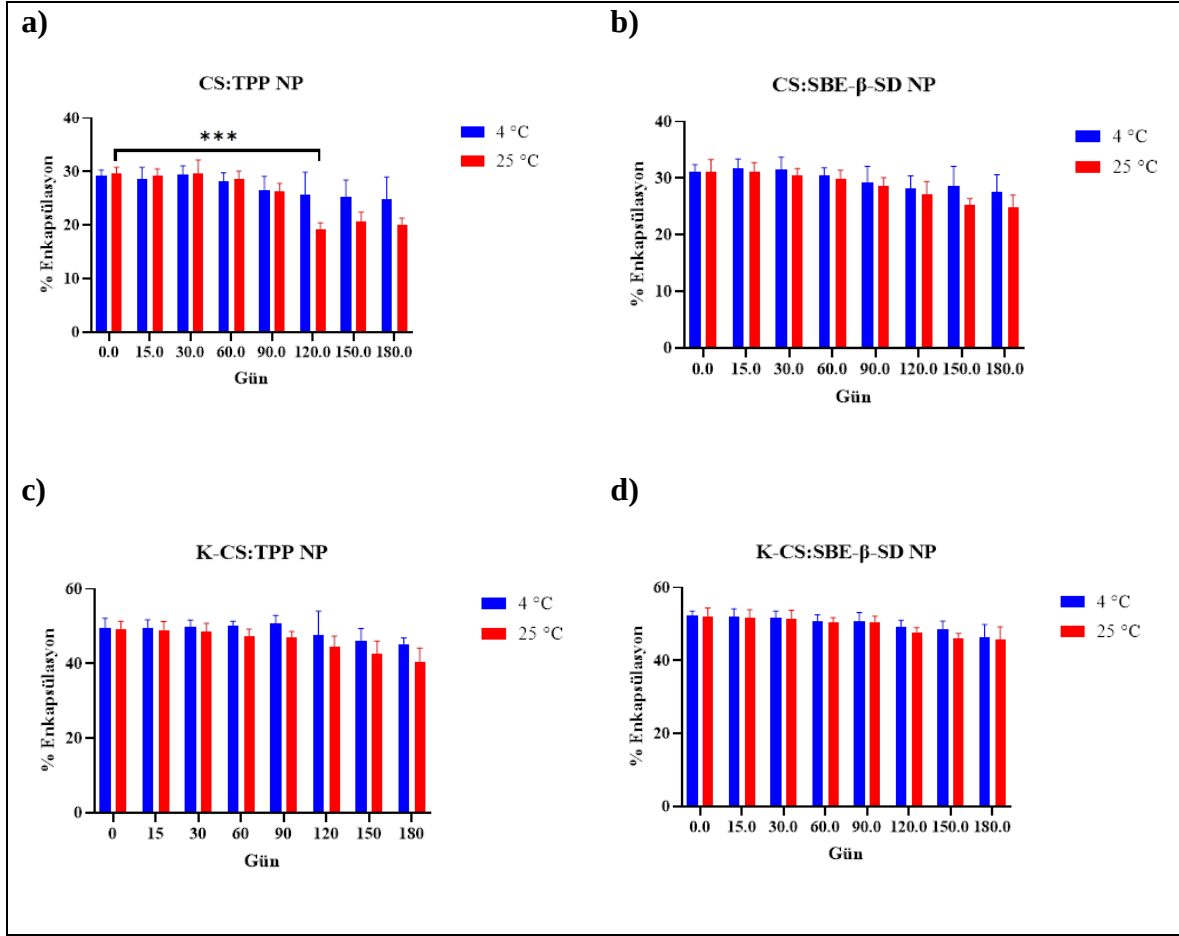
Çizelge 4.47’de 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında bekletilen nanopartiküllerin, Çizelge 4.48’de 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde bekletilen nanopartiküllerin 6 aylık enkapsülasyon etkinliği sonuçları verilmiştir. Şekil 4.34’te CS:TPP nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında ve 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde 6 ay bekletilmeleri sonucundaki enkapsülasyon etkinliğindeki değişimler, CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında ve 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde 6 ay bekletilmeleri sonucundaki enkapsülasyon etkinliğindeki değişimler, K-CS:TPP nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında ve 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde 6 ay bekletilmeleri sonucundaki enkapsülasyon etkinliğindeki değişimler ve K-CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip olan buzdolabında ve 25°C %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde 6 ay bekletilmeleri sonucundaki enkapsülasyon etkinliğindeki değişimler gösterilmiştir.

Çizelge 4.47. 4°C sıcaklık $\pm$ ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında bekletilen nanopartiküllerin 6 aylık % enkapsülasyon etkinliği değerleri

4°C % EE $\pm$ SS/Gün	0	15	30	60	90	120	150	180
CS:TPP NP	29,2 $\pm$ 1,1	28,5 $\pm$ 2,3	29,5 $\pm$ 1,6	28,2 $\pm$ 1,6	26,5 $\pm$ 2,6	25,7 $\pm$ 4,2	25,2 $\pm$ 3,2	24,8 $\pm$ 4,2
CS:SBE- β -SD NP	31,2 $\pm$ 1,2	31,8 $\pm$ 1,6	31,6 $\pm$ 2,1	30,5 $\pm$ 1,3	29,3 $\pm$ 2,8	28,1 $\pm$ 2,3	28,5 $\pm$ 3,6	27,5 $\pm$ 3,1
K-CS:TPP NP	49,5 $\pm$ 2,6	49,6 $\pm$ 2,1	49,8 $\pm$ 1,9	50,1 $\pm$ 1,2	50,6 $\pm$ 2,3	47,5 $\pm$ 6,5	46,2 $\pm$ 3,2	45,2 $\pm$ 1,7
K-CS:SBE- β -SD NP	52,2 $\pm$ 1,3	51,9 $\pm$ 2,3	51,8 $\pm$ 1,8	50,9 $\pm$ 1,6	50,9 $\pm$ 2,3	49,3 $\pm$ 1,8	48,5 $\pm$ 2,3	46,5 $\pm$ 3,4

Çizelge 4.48. 25°C sıcaklık %60 $\pm$ 5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabininde bekletilen nanopartiküllerin 6 aylık % enkapsülasyon etkinliği sonuçları

25°C % EE $\pm$ SS/Gün	0	15	30	60	90	120	150	180
CS:TPP NP	29,6 $\pm$ 1,2	29,2 $\pm$ 1,3	29,6 $\pm$ 2,6	28,5 $\pm$ 1,6	26,2 $\pm$ 1,6	19,2 $\pm$ 1,2	20,6 $\pm$ 1,8	20,1 $\pm$ 1,2
CS:SBE- β -SD NP	31,2 $\pm$ 2,1	31,2 $\pm$ 1,6	30,5 $\pm$ 1,2	29,9 $\pm$ 1,5	28,5 $\pm$ 1,6	27,5 $\pm$ 2,3	25,2 $\pm$ 1,2	24,9 $\pm$ 2,1
K-CS:TPP NP	49,1 $\pm$ 2,2	49,0 $\pm$ 2,3	48,5 $\pm$ 2,3	47,4 $\pm$ 1,9	47,1 $\pm$ 1,5	44,6 $\pm$ 2,7	42,5 $\pm$ 3,5	40,5 $\pm$ 3,6
K-CS:SBE- β -SD NP	52,1 $\pm$ 2,3	51,6 $\pm$ 2,3	51,3 $\pm$ 2,5	50,5 $\pm$ 1,2	50,5 $\pm$ 1,6	47,8 $\pm$ 1,2	46,2 $\pm$ 1,2	45,9 $\pm$ 3,4



Şekil 4.34. a) CS:TPP nanopartiküllerinin b) CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin c) K-CS:TPP nanopartiküllerinin d) K-CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin 4°C ± ortam nemi koşullarına sahip buzdolabında ve 25°C sıcaklık %60±5 bağıl nem koşullarında % enkapsülasyon etkinliği değerlerinin 6 aylık değişim grafikleri

5. TARTIŞMA

5.1. Etkin Madde ve Diğer Maddelerin Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

5.1.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FT-IR) analizi bulgularının değerlendirilmesi

FT-IR, maddelerin kimyasal yapısını aydınlatmak için maddelerin yapısındaki spesifik bağları tespit etmede kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullanılan insüline ($C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$) ait FT-IR spektrumunda 3325 cm^{-1} ve 1637 cm^{-1} 'de pikler görüldü (Bkz. Şekil 4.1). 3325 cm^{-1} 'deki pik insülinin yapısında bulunan $-NH_2$ bağlarını ve 1637 cm^{-1} 'de görülen pik ise $C=N$ bağını temsil etmektedir. İnsülin ile yapılan bir çalışmada ise insüline ait FT-IR spektrumunda 1654 cm^{-1} 'de zayıf bir pik ve $3400\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ 'de ise güçlü bir pik görülmüştür (Mikulska, Filipowska, Osyczka, Nowakowska ve Szczubialka, 2015). Çalışmada kullanılan insüline ait FT-IR spektrumu ve insüline ait piklerin literatür ile benzerlik gösterdiği görüldü.

Çalışmada insülin dışında kullanılan tüm maddelere ait FT-IR analizleri de incelendi (Bkz. Şekil 4.16).

TPP'ye ait FT-IR spektrumunda 1125 cm^{-1} 'deki pik $P=O$ bağını, 870 cm^{-1} 'deki pik ve 709 cm^{-1} 'deki pik $O-P-O$ bağını temsil etmektedir. TPP'nin FT-IR analizini gösteren bir çalışmada ise benzer spektrum ve benzer pikler görülmüştür (Ferreira Tomaz ve diğerleri, 2018).

Çalışmamızda kullanılan düşük molekül ağırlıklı kitosana ait FT-IR spektrumunda 3291 cm^{-1} 'deki pik $O-H$ bağını, 2898 cm^{-1} $N-H$ bağını, 1648 cm^{-1} 'deki pik amit bağını, 1374 cm^{-1} 'deki pik $-CH_3$ bağını ve 1025 cm^{-1} 'deki pik ise $C-O$ bağını temsil etmektedir. Sethi ve arkadaşlarının düşük molekül ağırlıklı kitosan kullanarak 5-Fluorourasil nanopartikülleri hazırladıkları çalışmalarında, bizim çalışmamızda 3291 cm^{-1} 'de izlediğimiz $O-H$ bağını 3355 cm^{-1} 'de, 2898 cm^{-1} 'de izlediğimiz $N-H$ bağını 2875 cm^{-1} 'de, 1648 cm^{-1} 'deki pik amit bağını ise 1653 cm^{-1} 'de izlediklerini ifade etmişlerdir (Sethi, Ahmad, Huma, Khalid ve Ahmad, 2021). Kumar ve Koh'un kitosanın FTIR spektrumunu inceledikleri çalışmalarında

benzer spektrum ve benzer pikler görülmüştür (Kumar ve Koh, 2012). Kitosana ait FTIR sonuçları literatürle benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda kullanılan SBE- β -SD ait FT-IR spektrumunda 3387 cm^{-1} 'deki pik aromatik halkaya bağlı -OH bağı, 1152 cm^{-1} 'deki pik C-O bağı, 1028 cm^{-1} 'deki pik ise C-H bağı temsil etmektedir. Çalışmamızdan elde edilen spektrumda SBE- β -SD'ye ait karakteristik piklerin ve dalga boylarının literatür ile benzerlik gösterdiği görüldü (Alvi ve diğerleri, 2021).

Çalışmamızda enterik kaplama amacıyla kullanılan Kollicoat® MAE 100 P'ye ait FT-IR spektrumunda 2981 cm^{-1} 'deki pik $-\text{CH}_3$ bağı, 1697 cm^{-1} 'deki pik karboksil grubuna ait bağı, 1155 cm^{-1} 'deki pik C-O bağı ve 753 cm^{-1} 'deki pik C-H bağı temsil etmektedir. Dupeyrón ve arkadaşlarının Kollicoat® MAE 100 P ile elde ettiği FT-IR spektrumunda spektrum ve karakteristik pikler benzerlik göstermiş, dalga boylarında ufak farklılıklar izlenmiştir (Dupeyrón, González, Sáez, Ramón ve Rieumont, 2005).

Çalışmada ayrıca CS:TPP nanopartikülleri, K-CS:TPP nanopartikülleri, CS:SBE- β -SD nanopartikülleri ve K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumları incelenmiştir.

CS:TPP nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumunda 3264 cm^{-1} 'deki $-\text{H}$ bağlarının oluştuğunu, 1538 cm^{-1} 'de ortaya çıkan pikin ise kitosan TPP çapraz bağlanması ile oluşan N-O-P bağı düşünüldü. Loutfy ve arkadaşları, 3264 cm^{-1} 'de gördüğümüz bağı 3360 'da, 1538 cm^{-1} 'de gördüğümüz çapraz bağlanmayı işaret eden bağı ise 1530 cm^{-1} 'de izlemişlerdir (Loutfy ve diğerleri, 2016). K-CS:TPP nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumlarının ana hatlarıyla Kollicoat® MAE 100 P'ye ait FT-IR spektruma benzerlik gösterdiği, nanopartiküllerin iyi bir şekilde kaplandığını düşündürmüştür.

CS:SBE- β -SD nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumlarında SBE- β -SD'e ait 3387 cm^{-1} 'deki pikin 3298 cm^{-1} 'e kayması $-\text{H}$ bağlarının oluştuğunu göstermektedir. Kitosana ait 1648 cm^{-1} 'de gördüğümüz amit bağı pikinin ise 1654 cm^{-1} 'e kaydığı görüldü. Kitosana ait 1374 cm^{-1} 'deki pik 1381 cm^{-1} 'e, SBE- β -SD'e ait 1152 cm^{-1} 'deki pik 1136 cm^{-1} 'e ve 1028 cm^{-1} 'de gözlenen pikin ise 1023 cm^{-1} 'e kaydığı gözlemlendi. Tüm bu değişimlerin kitosanın katyonik amin ve SBE- β -SD'nin anyonik sülfobutil grupları arasındaki etkileşimden kaynaklandığı

düşünüldü. Liu ve arkadaşları, 3298 cm^{-1} 'de gördüğümüz piki 3438 cm^{-1} 'de, 1654 cm^{-1} 'de gördüğümüz piki 1635 cm^{-1} 'de, 1136 cm^{-1} 'de gördüğümüz piki 1159 cm^{-1} 'de ve 1023 cm^{-1} 'de gördüğümüz piki ise 1035 cm^{-1} 'de izlemişlerdir (Liu ve diğerleri, 2016). K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumlarında 1041 cm^{-1} 'deki ve 855 cm^{-1} 'deki pik Kollicoat® MAE 100 P'ye ait pikleridir. K-CS:TPP nanopartiküllerinin spektrumlarında olduğu gibi K-CS:SBE- β -SD spektrumu da Kollicoat® MAE 100 P spektrumuna benzerlik göstermekte olup, nanopartiküllerin iyi bir şekilde kaplandığını düşündürmüştür.

İnsülin yüklü nanopartiküllerin (CS:TPP, CS:SBE- β -SD, K-CS:TPP, K-CS:SBE- β -SD nanopartikülleri) FT-IR spektrumlarında insüline ait pikler gözlenmedi bu durumda insülinin nanopartiküller içinde enkapsüle olduğunu göstermiştir. Sahu, insülin yüklü aljinat-kitosan nanopartikülleri geliştirmiş nanopartiküllerin FT-IR spektrumlarında, 1634 ve 1531 cm^{-1} 'de gözlenen karakteristik insülin piklerinin nanopartiküllerin spektrumunda maskelenerek 1598 cm^{-1} 'de yeni bir pik görüldüğünü ifade etmişlerdir. (Sahu, 2013).

5.1.2. İnsülinin erime noktasının değerlendirilmesi

İnsülinin erime noktasının tayini için Diferansiyel Taramalı Kalorimetre kullanmıştır. Termogramda 60,45 ve 73,87 $^{\circ}\text{C}$ 'de geniş bir endotermik pik gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.2). Bu pikin keskin olmaması kullanılan insülinin saf olmamasına yani içerisinde yardımcı maddelerin bulunmasına bağlı olabileceği düşünüldü. Literatürde ise DSC analizlerinde insülin 60-65 $^{\circ}\text{C}$ 'de endotermik bir pik verdiği bildirilmektedir (Ansari ve diğerleri, 2016; Erzengin ve diğerleri, 2022; Sarmiento, Ferreira, Veiga ve Ribeiro, 2006a).

5.1.3. DSC bulgularının değerlendirilmesi

DSC analizleri formülasyonda kullanılan her madde (kitosan, TPP, SBE- β -SD, Kollicoat® MAE 100 P ve mannitol) ve her formülasyon (CS:TPP, CS:SBE- β -SD, K-CS:TPP, K-CS:SBE- β -SD nanopartikülleri) için ayrı ayrı yapıldı. Sıvı halde piyasa preparatı olarak elimizde bulunan insülin çözeltisinin DSC çalışması sıvı halde yapıldı. Humulin®-R bileşiminde insülin dışında metakrezol, gliserol, HCl ve NaOH de bulunmaktadır. Etkin maddemiz katı halde olmadığı için 1:1 karışımlarının DSC analizleri yapılamadı. DSC çalışmaları için hazırlanan nanopartiküller, mannitol eklenmeden liyofilize edildi. Humulin®-R ait DSC termogramında 35-80 $^{\circ}\text{C}$ arası torba şeklinde gözlenen pik

Humulin®-R ve gliserole ait piklerin birleşimi olarak düşünüldü. Literatürde gliserole ait DSC spektrumunda 83 °C’de endotermik bir gözlemlendiği ifade edilmiştir (Ma, Qiao, Wang, Yao ve Xu, 2019). 100°C’de izlenen pikin ise m-krezole ait olabileceği düşünüldü ama yapılan literatür taramasında m-krezole ait bir DSC bulgusuna rastlanmadı. Mumuni ve arkadaşlarının insülin içeren nanopartikül geliştirmek için yaptıkları çalışmada da insülin kaynağı olarak Humulin® kullanılmış, ancak DSC termogramlarında bizim bulduğumuz gibi torba şeklinde bir pik yerine, 94 °C civarında keskin bir pik görülmüştür, ancak 100°C’de ayrıca bir pik görülmemiştir (Mumuni ve diğerleri, 2020). Han ve arkadaşları insan rekombinant insülini kullanarak hyaluronik asit nanopartikül geliştirmek üzere yaptıkları çalışmada insülinin DSC termogramını inceleyerek, 219 °C’de izledikleri pikin insülin dekompozisyonundan kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. 30-100°C arasında izledikleri pik hakkında yorum yapmamışlardır. Bu durumda bu pikin insüline ait karakteristik pik olduğu düşünülmüştür (Han ve diğerleri, 2012).

DSC analizlerinde kitosanın 73,64 °C’de endotermik bir pik verirken, 305,16 °C’de ekzotermik bir pik verdiği görüldü (Bkz. Şekil 4.17). TPP’nin termogramında ise 77,71, 120,08 ve 189,76 °C’de endotermik pikler görüldü (Bkz. Şekil 4.17). Yapılan bir çalışmada kitosanın 89,04 °C’de endotermik bir pik ve 312,26 °C’de ise ekzotermik bir pik verdiği bildirilmiştir (Acharyulu, Gomathi ve Sudha, 2013). Kurkumin enkapsüle etmek amacıyla TPP ile çapraz bağlanarak kitosan nanopartiküllerinin hazırlandığı bir çalışmada yapılan DSC çalışmaları hem kitosan için hem de TPP için, elde ettiğimiz DSC bulgularıyla uyumlu olmuştur. Araştırmacılar kitosan için 305,9 °C’de ekzotermik pik izlerken, TPP için 75°C’de, 118.9 °C’de ve 190 °C civarında pikler bulmuşlardır (Nair, Morris, Billa ve Leong, 2019). Yapılan başka bir çalışmada ise TPP için 74,13 ve 167,38 °C’de endotermik pikler verdiği bildirilmiştir (Govindasamy, Krishnamoorthy ve Rajappan, 2013). SBE-β-SD’ye ait DSC termogramında 263,90 °C’de küçük bir endotermik bir pik görüldü (Bkz. Şekil 4.17). Arora ve arkadaşları SBE-β-SD’nin 272,22 °C’de endotermik bir pik verdiği bildirilmiştir (Arora ve diğerleri, 2019). Sonuçlar benzer olarak değerlendirilmiştir.

Kollicoat® MAE 100 P’nin termogramında 204,97 °C’de endotermik bir pik görüldü (Bkz. Şekil 4.17). Yapılan bir çalışmada, metakrilik asit ve etil akrilatın birebir karışımdan oluşan Kollicoat® MAE 100 P’nin 210 °C civarında çok keskin olmayan bir pik verdiği ifade edilmiştir (N. Kim ve diğerleri, 2014). Mannitolün termogramında izlenen 169,07 °C’de

endotermik pikin (Bkz. Şekil 4.17) literatürde 168,4 °C civarında izlendiği bildirilmiştir (Jaipal ve diğerleri, 2015).

Çalışmada kullanılan yardımcı maddelerin DSC termogramları ve verdikleri pikler incelendiğinde sonuçların genel olarak literatür ile uyumlu olduğu görüldü.

DSC analizlerinde hazırlanan nanopartiküllerin kitosan ve TPP/ SBE- β -SD'nin karakteristik piklerini vermemesi ve piklerde anlamlı kaymalar izlenmesi kitosanın ve TPP/ SBE- β -SD arasındaki çapraz bağlanmayı doğrulamaktadır (Bkz. Şekil 4.18). Kaplı nanopartiküllerde ise FT-IR sonuçlarına benzer olarak yaklaşık 10 °C'lik bir kayma ile sadece Kollicoat® MAE 100 P'ye ait pikin görülmesi etkin bir kaplama yapıldığını doğrulamıştır. K-CS:TPP nanopartikülleri 187,29 °C'de, K-CS:SBE- β -SD nanopartikülleri ise 190,25 °C'de endotermik pikler vermiştir. Kaplı nanopartiküllerle yapılan DSC çalışmalarında genellikle, kaplama materyaline ait pikler izlenmiştir. Bu durum kaplama etkinliğinin yüksek olması şeklinde yorumlanmaktadır. Hem kaplı olmayan hem de Kollicoat® MAE 100 P nanopartiküllerinin DSC termogramlarında insülin piki izlenmemesi, insülinin nanopartiküllere başarılı bir şekilde enkapsüle edildiğini işaret etmiştir.

5.1.4. İnsülinin UV-Vis spektrofotometre ile analiz bulgularının değerlendirilmesi

İnsülin distile suda çözünerek hazırlanan çözeltisinin UV-Vis spektrofotometrede 200-800 nm aralığında yapılan dalga boyu taramasında insülinin maksimum absorbans verdiği dalga boyu 272 nm olarak belirlendi (Bkz. Şekil 4.3). Literatürde ise insülinin maksimum absorbans verdiği dalga boyu 272-276 nm olarak verilmiştir (Correia, Neves-Petersen, Jeppesen, Gregersen ve Petersen, 2012; Royatvand, Fallah Hoseini, Ezzatpanah ve Sekehchi, 2013; Sharda, Attri, Kaur ve Choudhury, 2021). Sonuç olarak bulduğumuz dalga boyu literatür ile uyumlu olmuştur.

5.1.5. İnsülinin miktar tayini yönteminin geliştirilmesi ve miktar tayini yönteminin validasyonundan elde edilen bulguların değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan miktar tayini analiz yönteminin her zaman aynı ve her zaman doğru ve kesin bir şekilde sonucu gösterdiğini, güvenilirliğini ve yöntemin kullanım amacına uygunluğunu göstermek için validasyon çalışmaları yapıldı. İn vitro analizlerde kullanılan miktar tayini yönteminin validasyon işlemi üç farklı pH'da (1,2, 6,8, 7,4) yapıldı.

Kullanılan miktar tayini analiz yönteminin doğrusallık çalışmaları pH 1,2 çözeltisi ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tampon çözeltilerinde ayrı ayrı yapıldı. Tampon çözeltisi ortamlarında elde edilen kalibrasyon doğrularına ait R^2 değerleri pH 1,2 için 0,9990, pH 6,8 için 0,9991, pH 7,4 için 0,9991 olarak bulundu (Bkz. Şekil 4.5-4.7). R^2 değerleri 1'e yakın olduğu için analiz yönteminin doğrusallığı kanıtlandı. İnsülin analogu olan insülin glulisin ile yapılan bir çalışmada insülin glulisinin belirli derişimleri ile oluşturulan kalibrasyon doğrusunun R^2 değeri 0,99 bulunarak yöntemin doğrusallığı kanıtlanmıştır (Presas ve diğerleri, 2018).

Kullanılan miktar tayini analiz yönteminin tekrarlanabilirliğini gösteren deney içi ve deneyler arası kesinlik çalışmaları pH 1,2 çözeltisi ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tampon çözeltilerinde ayrı ayrı yapıldı ve sonuçlar %BS olarak değerlendirildi. Deney içi kesinlik çalışmalarının pH 1,2 için %BS değeri 0,9, pH 6,8 için %BS değeri 0,79 ve pH 7,4 fosfat için %BS değeri 0,64 olarak, deneyler arası kesinlik çalışmalarının pH 1,2 için %BS değerleri 1,6, 1,3 ve 1,75, pH 6,8 için %BS değerleri 1,5, 1,83 ve 0,85 ve pH 7,4 için %BS değerleri 1,4, 0,9 ve 1,07 olarak bulundu. pH 1,2 çözeltisi ve pH 6,8 ve 7,4 fosfat tampon çözeltilerinde %BS değerlerinin %2'nin altında bulunması ile kullanılan miktar tayini analiz yönteminin kesinliğini yani deney içi ve deneyler arası tekrarlanabilirlik kanıtlandı (Bkz. Çizelge 4.1-4.6). Yapılan bir çalışmada insülinin üç farklı derişimi için deney içi ve deneyler arası kesinlik kanıtlanmıştır (Su, Wu, Zhang ve Feng, 2010).

Kullanılan miktar tayini analiz yöntemi ile elde edilen sonuçların gerçeğe yakınlığını ifade eden doğruluk çalışmalarında sonuçları değerlendirebilmek amacıyla % geri elde bulgularının % BS değerleri kullanıldı. Geri elde değerlerinin ortalaması pH 1,2 için 99,39, 101,08 ve 99,99, pH 6,8 için 99,88, 100,36 ve 99,48 ve pH 7,4 için 99,12, 98,73 ve 98,17 olarak bulundu. % BS değerleri ise pH 1,2 için 0,56, 0,38 ve 0,34, pH 6,8 için 0,01, 0,25 ve 0,56 ve pH 7,4 için 0,29, 0,12 ve 0,01 olarak bulundu. Çalışmada elde edilen % geri elde

bulgularının pH 1,2 çözeltisi ve 6,8 ve 7,4 fosfat tampon çözeltileri için % BS değerlerinin %2'nin altında bulunması ile kullanılan miktar tayini analiz yönteminin doğruluğunu yani gerçeğe yakınlığı kanıtlandı (Bkz. Çizelge 4.7-4.9). İnsülin ile yapılan bir çalışmada % geri elde değerleri 98 ile 101 aralığında, % BS ise 2,75 ve daha küçük bulunmuştur (Sarmiento, Ribeiro, Veiga ve Ferreira, 2006b).

Kullanılan miktar tayini analiz yönteminin sadece amaçlanan maddeyi saptayabilme özelliğini gösteren özgünlük ve seçicilik için formülasyonlarda kullanılan her maddenin (kitosan, TPP, SBE- β -SD, Kollicoat® MAE 100 P ve mannitol), kitosan-TPP- Kollicoat® MAE 100 P karışımı ve kitosan-SBE- β -SD-Kollicoat® MAE 100 P karışımının pH 1,2 çözeltisi ve 6,8 ve 7,4 fosfat tampon çözeltisi ortamlarında dalga boyu taraması yapıldı. Kullanılan maddeler insülinin maksimum absorbans verdiği dalga boyunda (272 nm) herhangi bir pik vermedi (Bkz. Şekil 4.8-4.13). Bu durum ile de kullanılan miktar tayini analiz yönteminin insülin için özgün ve seçici olduğu kanıtlandı.

Kullanılan miktar tayini analiz yönteminin insülin için saptama (LOD) ve tayin (LOQ) sınırı değerleri pH 1,2, 6,8 ve 7,4 için ayrı ayrı hesaplanmadı. LOD değeri pH 1,2 için 0,873 $\mu\text{g/mL}$, pH 6,8 için 0,109 $\mu\text{g/mL}$ ve pH 7,4 için 1,040 $\mu\text{g/mL}$ ve LOQ değerleri ise pH 1,2 için 2,645 $\mu\text{g/mL}$, pH 6,8 için 0,331 $\mu\text{g/mL}$ ve pH 7,4 için 3,153 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulundu (Bkz. Çizelge 4.10). Yöntem validasyonunda çalışılan kalibrasyon ölçüm aralığının (5-100 $\mu\text{g/mL}$) en düşük derişimi bulunan LOD ve LOQ değerlerinin her birinin üzerindedir. Çalışmada bulunan sonuçlar kullanılan miktar tayini yönteminin her pH için oldukça hassas olduğunu kanıtlandı. Yapılan bir çalışmada insüline ait LOD değeri 0,35 $\mu\text{g/mL}$ ve LOQ değeri 0,7 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur (Ravi, Peh, Darwis, Krishna Murthy ve Raghu Raj Singh, 2007). Her pH için oldukça hassas olduğunu kanıtlayan yöntem literatür ile benzerliğini de kanıtlamış oldu.

İki günlük stabilite sonuçlarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). Böylece örneklerin 24 saat boyunca stabilitesini koruduğu kanıtlandı (Bkz. Şekil 4.13-4.15).

Tüm sonuçlar incelendiğinde insülin miktar tayini için geliştirdiğimiz yöntemin hassas, güvenilir, insüline spesifik olduğu kanıtlandı.

5.2. Nanopartiküllerin Hazırlanmasının Optimize Edilmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Kitosan, ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılan, kontrollü ilaç salımı sağlayan, hidrofilik makromoleküler ilaçların absorpsiyon artırıcı etkisi olan, mukoadesif, toksik olmayan, biyouyumlu bir polimerdir. Çalışmada insülin yüklü kitosan nanopartikülleri hazırlanırken iyonik jelasyon yöntemi kullanıldı. Çapraz bağlayıcı olarak ise TPP ve TPP'ye alternatif olarak SBE- β -SD kullanıldı. SBE- β -SD'nin, insülinin bağırsaktan emiliminin artırılmasına da katkı sağlayacağı düşünüldü. Hidrofilik siklodekstrinler ise insülinin nötr pH'da kendi kendine kümelenmesini ve insülinin hidrofobik yüzeylere adsorpsiyonunu engelleyerek insülinin stabilitesini iyileştirmeye yardımcı olmaktadır. Siklodekstrinler ayrıca membran akışkanlığını bozmakta ve insülin gibi protein/peptit yapısındaki moleküllerin membran boyunca emilimini artırmaktadır (Sajeesh ve Sharma, 2006). Kitosan türevleri ile hazırlanan insülin nanopartiküllerinin hazırlanmasında çeşitli yöntemler kullanılsa da en yaygın kullanılan yöntem çapraz bağlayıcı olarak TPP'nin kullanıldığı iyonik jelasyon yöntemidir. Bu yöntemin kolay olması, toksik solvanlara ihtiyaç duyulmaması ve büyük ölçekte hazırlamaya uygun olması yöntemin en önemli avantajlarından (Mahdizadeh Barzoki, Emam-Djomeh, Rafiee-Tehrani, Mortazavian ve Moosavi Movahedi, 2019). Fakat iyonik jelasyon yöntemi partikül agregasyonuna, yüksek polidispersite indeksine ve yetersiz fiziksel/kimyasal stabiliteye neden olabilmektedir. Bu sorunun ana nedeninin kitosan ve TPP arasında istenmeyen molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlanma olabileceği düşünülmektedir (Agardan, 2020).

Bu çalışmada hazırlanan insülin yüklü nanopartiküllerin, düşük partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksine, yüksek zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliğine sahip olması amaçlandı. Optimum formülasyon seçiminde, kaplama yapılacağı da düşünülerek düşük partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi özellikle göz önünde bulunduruldu.

İyonik jelasyon yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutlarının hem kitosan ve TPP çözeltilerinin derişimine hem de kitosan:TPP oranına bağlı olduğu bilinmektedir (Peniche ve Peniche, 2011).

Çalışmada kullanılan kitosan, %0,5 (h/h) asetik asit içeren distile suda çözülerek %0,25 (a/h) derişimde kitosan çözeltisi elde edildi. Kitosan çözeltilerinin pH'ları, insülinin izoelektrik

noktasının (pH 5,3) altında ve üstünde çalışılması amaçlanarak pH 3, 4,6, 5,2 ve 6 olarak ayarlandı (Panigrahy ve Kumar, 2022). Literatürde iyonik jelasyon yöntemi ile kitosan nanopartikül hazırlamak için ve farklı oranda asit içeren kitosanın farklı derişimlerde çözeltileri hazırlanmış, farklı kitosan/TPP oranları, farklı karıştırma hız/süreleri çalışılmıştır (Kouchak ve Azarpanah, 2015). Bu durumun elde edilen naopartiküllerin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi vb. karakteristik özelliklerini etkilediği görülmüştür (Calvo ve diğerleri, 1997; Garrait, Beyssac ve Subirade, 2014). Örneğin Milotti ve arkadaşları iyonik jelasyon yöntemi ile kitosan nanopartikülleri hazırladıkları bir çalışmada %0,05 (h/h) asetik asit içeren distile suda kitosan derişimi %0,25 (a/h) olacak şekilde kitosan çözeltisi hazırlamıştır (Millotti ve diğerleri, 2011). Kitosan nanopartikülleri hazırlanan bir çalışmada CS:TPP oranı 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 ve 7:1 olarak denenmiştir. CS:TPP oranı artıkça nanopartiküllerin partikül büyüklüğü de artmıştır (Hejjaji, Smith ve Morris, 2018). Birkaç çalışmada daha görülen bu durumdan dolayı, çalışmamızda CS:TPP oranı çok yüksek denemeler yapılmamıştır.

Çalışmamızda, nanopartikülleri hazırlamak için 900 rpm hıza ayarlanan manyetik karıştırıcıda kitosan çözeltisi üzerine CS:TPP/SBE- β -SD oranı 2:1, 1:1, 0.5:1 olacak şekilde TPP veya SBE- β -SD çözeltileri damla damla ilave edildikten sonra 30 dakika karıştırıldı ve 30 dakika sonunda üzerine insülin ilave edildi. Eklenen 2 mg insüline eşdeğer Humulin®-R çözeltisi ile birlikte 10 dakika daha aynı rpm hızda karıştırılmaya devam edildi ve böylece insülin yüklü nanopartiküller elde edildi (Erel, Kotmakçı, Akbaba, Karadağlı ve Kantarcı, 2016). Hazırlanan nanopartiküller 15000 rpm hızda 30 dakika santrifüj edildi (Bayat, Larijani, Ahmadian, Junginger ve Rafiee-Tehrani, 2008). İnsülin yüklü kitosan nanopartikülleri hazırlanan bir çalışmada çapraz bağlayıcı olarak TPP ve SBE- β -SD (2:1 ve 1:1 oranlarında) kullanılmış ve karıştırma hızı 900 rpm olarak seçilmiştir. Aynı çalışmada kitosan (pH 3 ve 5,3'e ayarlanmış) ve çapraz bağlayıcı 30 dakika karıştırılmış ve 30 dakika sonunda karışıma insülin de eklenerek ekstra 10 dakika daha karıştırılma yapılmış ve insülin yüklü kitosan nanopartikülleri hazırlanmıştır ve 30 dakika sonra insülin eklenmesi enkapsülasyon etkinliğini artırmıştır (Mutlu-Agardan ve Han, 2021).

İnsülin yüklü nanopartiküllerin hazırlanmasında kitosan pH'sı, CS:TPP oranı ve CS:SBE- β -SD oranı değiştirilerek hazırlanan nanopartiküller partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve enkapsülasyon etkinlikleri açısından değerlendirildi. CS:TPP oranı 1:1 ve 1:0.5 olduğunda çalışılan tüm pH'larda partikül büyüklüğü mikrometre boyutlarına çıktı,

polidispersite indeksi kabul edilmeyecek derecede ($PDI > 0,600$) arttı, zeta potansiyel değeri -10 ile +10 arasında değişiklik gösterdi ve enkapsülasyon etkinliklerinde ise çok büyük bir fark gözlenmedi. CS:TPP oran 2:1 olduğunda ise kitosan pH'sı arttıkça partikül büyüklüğünde artış gözlemlendi, zeta potansiyel değerlerinde de düşüş gözlemlendi ancak enkapsülasyon etkinliğinde ise anlamlı bir değişiklik olmadı (pH 6 hariç). Bu bulgular göz önünde bulundurulduğunda CS:TPP nanopartikülleri için kitosan pH'sı 3 ve CS:TPP oranı 2:1 seçildi. Optimum formülasyon olarak seçilen CS:TPP nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü $289,17 \pm 34,64$ nm, polidispersite indeksi $0,398 \pm 0,090$, zeta potansiyeli $28,2 \pm 2,8$ mV ve enkapsülasyon etkinliği $\% 30,2 \pm 2,3$ olarak bulundu.

CS:SBE- β -SD nanopartikül hazırlamak için denenen hiçbir CS:SBE- β -SD oranında ve çalışılan hiçbir pH'da partikül büyüklükleri mikrometre seviyelerine çıkmadı. Genel olarak pH arttıkça nanopartiküllerin partikül büyüklüğünde artış gözlemlendi (kitosan pH'sı 3 aynı zamanda CS: SBE- β -SD oranı 1:1 olan nanopartiküller hariç). CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin polidispersite indeksi genel olarak CS:TPP nanopartiküllerine göre daha düşük bulundu ve en düşük polidispersite indeksi CS:SBE- β -SD oranı 1:1 olduğunda elde edildi. Zeta potansiyel değeri de 30 mV'un üstünde olması hedeflendiğinden, CS:SBE- β -SD nanopartikülleri için kitosan pH'sı 3 CS:SBE- β -SD oranı 1:1 olduğunda hazırlanan nanopartiküller optimum formülasyon olarak seçildi. Optimum formülasyon olarak seçilen CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin ise partikül büyüklüğü $334,25 \pm 25,42$ nm, polidispersite indeksi $0,215 \pm 0,091$, zeta potansiyel değeri $32,5 \pm 3,5$ mV ve enkapsülasyon etkinliği $\% 31,2 \pm 2,3$ olarak kaydedildi.

TPP ile insülin yüklü kitosan nanopartikülleri hazırlanan bir çalışmada insülin yüklü kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü 312,80 nm ve polidispersite indeksi de 0,481 olarak bulunmuştur (Azevedo ve diğerleri, 2011). Başka bir çalışmada ise insülin yüklü CS:TPP nanopartiküllerinin CS:TPP oranı 4:1 olduğunda nanopartiküllerin partikül büyüklüğünün 215 nm, polidispersite indeksinin 0,16, zeta potansiyelinin ise $20,7 \pm 0,7$ mV olduğu bildirilmiştir (Makhlof ve diğerleri, 2011). İnsülin yüklü kitosan nanopartikülleri hazırlanırken iyonik jelasyon yöntemi kullanılan başka bir çalışmada anyonik çapraz bağlayıcı olarak hem TPP hem de karboksimetil- β -siklodekstrin kullanılmıştır. İnsülin ve heparinin model makromolekül olarak seçildiği çalışmada kitosanın, TPP veya karboksimetil- β -siklodekstrin ile çapraz bağlanmasıyla nanopartiküller hazırlanmıştır. Karboksimetil- β -siklodekstrin ile hazırlanan nanopartiküllerin TPP ile hazırlanan

nanopartiküllere göre daha düşük polidispersite indeksine sahip olduğu, daha homojen bir dağılım gösterdiği bulunmuştur (Krauland ve Alonso, 2007). Bizim çalışmamızda da SBE- β -SD çapraz bağlayıcı olarak kullanıldığında, TPP ile hazırlanan nanopartiküllere göre daha düşük polidispersite indeksine sahip nanopartiküller elde edildi.

5.3. Kollicoat® MAE 100 P Kaplı Nanopartiküllerin Hazırlanmasının Optimize Edilmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Optimum CS:TPP ve CS:SBE- β -SD nanopartikülleri seçildikten sonra nanopartiküllere enkapsüle insülinin midede salımını en aza indirmek amacıyla Kollicoat® MAE 100 P (Metakrilik asit-Etil akrilat kopolimeri 1:1) kullanarak enterik kaplama yapıldı. Yapılan bir çalışmada kitosan nanopartiküllerini enterik kaplamak amacıyla Eudragit S 100® (Metakrilik asit-Metil metakrilat kopolimeri 1:2) kullanılmış ve etanol içersinde çözölen Eudragit S 100® çözöltisi (2 mg/mL) nanopartiköl dispersiyonuna eklenmiştir (S.Chen ve diğörleri, 2017). Kollicoat® MAE 100 P ile granöl ve tablet kaplanmasıyla ilgili çalışmalar bulunsa da, kitosan nanopartiköl kaplanmasıyla ilgili literatör bulunmadığından Kollicoat® MAE 100 P, Eudragit S 100® ile benzer % oranında etanolde çözölerek çalışmaya başlandı. Kollicoat® MAE 100 P etanoldeki çözöltileri 1, 3 ve 5 mg/mL olacak şekilde CS:TPP ve CS:SBE- β -SD nanopartiköllerinin üzerine damla damla ilave edildi ve partiköl büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve % enkapsölasyon etkinliğı göz önünde bulundurularak kaplama değörlendirildi. Nanopartiköller kaplanmasına bağılı olarak partiköl büyüklerinin artması ve Kollicoat® MAE 100 P anyonik bir madde olduğı için zeta potansiyelin düşmesi beklendi. Fakat bu denemelerde istenilen sonuçlara ulaşılamadı. Kollicoat® MAE 100 P 1, 3 ve 5 mg/mL derişiminde etanolde çözölerek kullanılıp nanopartiköllerin üzerine ilave edildiğinde CS:TPP nanopartiköllerinde partiköl büyüklüğü mikrometre boyutlarına ulaşdı, polidispersite indeksi 0,500'ün üzerine çıktı, enkapsölasyon etkinliğinde anlamlı bir değışiklik gözlenmedi ($p>0,05$). Ayrıca asıl düşmesi beklenen zeta potansiyel değörleriinde anlamlı düşüş görölmedi. CS:SBE- β -SD nanopartiköllerinde ise Kollicoat® MAE 100 P miktarının artmasına bağılı olarak partiköl büyüklüğü uygun olarak arttı, polidispersite indeksi arttı ama hala aynı işlemdaki CS:TPP nanopartiköllerin polidispersite indeksinden küçüktü, zeta potansiyelde Kollicoat® MAE 100 P miktarının artışına bağılı olarak çok az bir düşüş meydana geldi ve Kollicoat® MAE 100 P miktarının artışına bağılı olarak enkapsölasyon etkinliklerinde artış gözlendi. Kollicoat® MAE 100 P miktarının yetersiz kaldığı düşünölüp Kollicoat® MAE 100 P etanoldeki çözöltisinin

derişimi artırıldı fakat o zamanda nanopartiküllerin enterik kaplanması aşamasında homojen bir nanopartikül dispersiyonu elde edilemedi, agregatlar meydana geldi (Resim 4.1). Bunun üzerine, Kollicoat® MAE 100 P çözeltisi üzerine nanopartikül dispersiyonu damlatarak kaplama yapılmasının denenmesine karar verilerek CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 ve 1:3 olacak şekilde Kollicoat® MAE 100 P:etanol çözeltisi üzerinde nanopartiküller damla damla ilave edildi. Ancak sonuçlar benzer oldu, hedeflediğimiz partikül boyuyu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel sağlayamadı.

Literatürde bir çalışmada sığır serum albümini yüklü kitosan nanopartiküllerinin enterik kaplanmasında Eudragit® L 100 (Metakrilik asit-Metil metakrilat kopolimeri 1:1) kullanılmıştır. Eudragit® L 100 2 mg/mL olacak şekilde 5 mL pH 6,8 fosfat tampon çözeltisinde çözölmüş ve nanopartikül süspansiyonu damla damla Eudragit® L 100 çözeltisine ilave edilerek 20 dakika karıştırılmıştır. Çalışmada enterik kaplı nanopartiküllerin partikül büyüklüğünün arttığı, zeta potansiyel değerinin düştüğü ve polidispersite indeksinin de arttığı bildirilmiştir (Xu ve diğerleri, 2018). Bunun üzerine diğer yöntemden farklı olarak önce 1, 3 ve 5 mg/mL derişimlerinde ardından CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 ve 1:3 olacak şekilde, Kollicoat® MAE 100 P'nin pH 6,8 fosfat tamponunda çözeltileri hazırlandı ve bu çözelti üzerine CS:TPP ve CS:SBE-β-SD nanopartikülleri damla damla ilave edildi. Kollicoat® MAE 100 P:pH 6,8 fosfat tampon çözeltisi 1, 3 ve 5 mg/mL derişiminde kullanılıp nanopartiküllerinin üzerine ilave edildiğinde Kollicoat® MAE 100 P miktarının artmasına bağılı olarak hem CS:TPP hem de CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin partikül büyüklüğünde, polidispersite indeksinde ve enkapsülasyon etkinliklerinde artış, zeta potansiyel değerinde ise azalma gözlemlendi ancak yeterli ve uygun bulunmadı.

Tüm kriterler incelendiğinde en iyi enterik kaplama CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı 1:3 olarak kullanıldığında ve Kollicoat® MAE 100 P, pH 6,8 fosfat tamponunda çözöldüğünde elde edildi.

CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 ve 1:3 olacak şekilde Kollicoat® MAE 100 P:pH 6,8 fosfat tampon çözeltisi üzerine nanopartiküller damla damla ilave edildiğinde CS:TPP ve CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinde Kollicoat® MAE 100 P 1:1, 1:2 ve 1:3 oranlarında nanometre boyutlarında partiküller elde edildi, polidispersite indeksleri arttı ve nanopartiküllerin yüzeyi negatif yüklü Kollicoat® MAE 100 P ile kaplandığı için

Kollicoat® MAE 100 P miktarının artmasına bağlı olarak nanopartiküllerin zeta potansiyelleri eksi yöne doğru arttı. Böylece CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı 1:3 olduğunda $581,32 \pm 79,68$ nm partikül büyüklüğüne, $0,571 \pm 0,055$ polidispersite indeksine, $-22,9 \pm 0,3$ mV zeta potansiyel değerine ve $\%49,8 \pm 3,5$ enkapsülasyon etkinliğine sahip K-CS:TPP nanopartikülleri ve $555,32 \pm 38,46$ nm partikül büyüklüğüne, $0,375 \pm 0,081$ polidispersite indeksine, $-21,6 \pm 0,2$ mV zeta potansiyel değerine ve $\%52,1 \pm 2,5$ enkapsülasyon etkinliğine sahip CS:SBE- β -SD nanopartikülleri elde edildi ve bu oranda kaplamanın en uygun olduğuna karar verilerek, bu oranlar kullanılarak hazırlanan kaplı nanopartiküller opitumum formülasyonlar olarak seçildi. Literatürde enterik kaplanan kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğünde artış, zeta potansiyellerinde eksi yönde artış izlenmiştir. Kurkumin yüklü kitosan nanopartiküllerin Eudragit FS 30 D (Metil akrilat-Metil metakrilat-Metakrilik asit kopolimeri 7:3:1) ile kaplanmasıyla kaplı nanopartiküllerin partikül büyüklüğü yaklaşık iki katına çıkmış, polidispersite indeksi artmış, zeta potansiyel değeri pozitif iken negatife dönmüş ve enkapsülasyon etkinliğinde ise anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Sareen, Jain, Rajkumari ve Dhar, 2016). Başka bir çalışmada ise insülin kitosan kompleks nanopartikülleri hazırlanmış ve hipromelloz ftalat ile enterik kaplanmıştır. Enterik kaplama işlemi partikül büyüklüğünü ve enkapsülasyon etkinliğini artırırken zeta potansiyel değerinin de düşmesine neden olmuştur (Cui, Zhang, Zheng ve Kawashima, 2004).

Kaplanan nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliklerindeki artış, bir miktar insülinin kaplama tabakasında biriktiğini akla getirdi ve salımda ani salım (burst release) etkisi yaratabileceği düşünüldü.

5.4. Geçirimli Elektron Mikroskobu Görüntüleme Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Nanopartiküllerin TEM analizleri insülin yüklü ve insülin yüklü olmayan CS:TPP, CS:SBE- β -SD, K-CS:TPP ve K-SBE- β -SD nanopartikülleri ile yapıldı. TEM görüntüleri incelendiğinde oluşan nanopartiküllerin küresel olduğu gözlenmekte ve Kollicoat® MAE 100 P ile kaplanan nanopartiküllerde ayrıca bir kaplama tabakası da görülmektedir. Görüntülerin bazılarında parçalanmış partiküller de izlenmiştir. Görüntülerde görünen nanopartiküllerden salınan ve yüzeyde gözlenen insülinlerin, nanopartiküllerin sudaki seyreltik dispersiyonunun bir hafta bekletildiği için olabileceği düşünüldü. Görüntülenen nanopartiküllerin partikül büyüklükleri genel olarak ölçülen partikül büyüklüklerine benzer

bulundu. Huang ve arkadaşları insülin yüklü düşük molekül ağırlıklı kitosan nanopartiküllerinin TEM görüntülerini incelediklerinde nanopartiküllerin küresel olduğunu bildirmişlerdir (Huang, Du, Yuan ve Hu, 2009). Başka bir literatürde ise enterik kaplı jelatin nanopartikülleri ile enterik kaplı olmayan jelatin nanopartiküllerin TEM görüntülerinde kaplama tabakasına ait farklılık görülmüştür (A. Ahmad ve diğerleri, 2021).

5.5. Liyofilizasyon Bulgularının Değerlendirilmesi

Liyofilizasyon yani dondurarak kurutma işlemi; nanopartikülleri katı hale getirerek stabilitesini sağlamak, raf ömrünü artırmak ve taşınmasını/depolanmasını kolaylaştırmak için yapılan bir dehidrasyon işlemidir. Bu işlem buzun süblimleştirilmesi ve donmamış suyun vakum altında resorpsiyonu yardımıyla suyun formülasyondan çıkarılması esasına dayanmaktadır. Bu işlem koşullarında nanopartiküller fiziksel ve kimyasal stabilitelerini bozacak stres koşulları ile karşılaşabilmekte bunu önlemek amacıyla liyofilizasyon işleminde formülasyona kriyoprotektanlar ve liyoprotektanlar gibi farklı ekspiyanlar eklenmektedir. Liyofilizasyondan sonra nanopartiküllerin kolayca redisperse olabilmesi ve etkin maddenin yapısında dolayısıyla etkinliğinde (özellikle protein yapılı terapötikler için) değişiklik olmaması gerekmektedir (Fonte, Reis ve Sarmento, 2016).

Çalışmada nanopartiküllerin stabilitesine olumlu katkı sağlayacağı düşünülerek liyofilizasyon işlemi ile kuru toz haline getirmek istenildi. Bu amaçla liyoprotektan olarak mannitol kullanıldı. Denemeler mannitolsüz ve mannitol oranı %1, 3, 5 ve 7 olarak kullanılarak yapıldı.

CS:TPP ve CS:SBE- β -SD nanopartikülleri için liyofilizasyon sonrası denenen tüm mannitol oranlarında partikül büyüklüğü değerleri 2-3 katına çıkarken, polidispersite indeksleri kabul edilmeyecek oranda arttı. Mannitol yokken yapışkan bir toz kütlesi elde edilirken mannitol oranı artıkça nanopartiküllerin dağılabilirliğinde artış gözlemlendi ancak tam bir redispersiyon sağlanamadı. Zeta potansiyel değerlerinde ise anlamsız değişimler gözlemlendi.

Benzer sonuçlar kaplı nanopartiküller için de gözlemlendi. K-CS:TPP ve K-CS:SBE- β -SD nanopartikülleri için partikül büyüklüğü değerlerinde 2-3 kat artış görüldü, polidispersite indeksi kabul sınırlarının üstüne çıktı ve zeta potansiyel değerlerinde anlamsız değişimler

görüldü. Mannitol oranı artıkça nanopartiküllerin dağılılabirliğinde artış gözlemlendi ancak tam bir redispersiyon sağlanamadı.

İnsülin oral yoldan verilmesi için insülin yüklü kitosan nanopartikülleri hazırlanan bir çalışmada nanopartiküllerin liyofilize edilmesi için farklı oranlarda (%1, 2, 5, 7 ve 10 (a/h)) farklı liyoprotektanlar (sükroz, mannitol, glikoz ve treholoz) denenmiş ve %5 sükroz liyofilizasyon işlemi için seçilmiştir (Mahjub, Radmehr, Dorkoosh, Ostad ve Rafiee-Tehrani, 2014). İnsülin yüklü kitosan nanopartikülleri oluşturulan başka bir çalışmada liyoprotektan olarak 5 mg/mL mannitol kullanılmış ve mannitol kullanımı partikül büyüklüğünün azalmasını sağlarken zeta potansiyel değerinin de artmasına katkıda bulunmuştur (Diop ve diğerleri, 2015). Başka bir çalışmada ise mannitol oranı %7 olduğunda insülin yüklü kitosan nanopartiküllerinin homojen bir dağılım gösterdiği gözlemlenmiş ve mannitol oranının değişmesinin zeta potansiyel değerini anlamlı bir şekilde değiştirmedeği bildirilmiştir (C. Wong, Al-Salami ve Dass, 2020b). Literatürde liyofilizasyon sonucu elde edilen kitosan nanopartiküllerine ilişkin olumlu bulgulara rastlansa da bizim çalışmamızda hedeflediğimiz sonuçlara ulaşamadı. Peptit-proteinlerin liyofilizasyonu oldukça titizlikle valide edilerek yapılması gereken bir işlemdir. Pek çok farklı liyoprotektan tipi, yüzdesi, dondurma sıcaklığı, süresi denenerek incelenmesi gerektiği ve süremizin yeterli olmamasından dolayı, liyofilizasyon işleminden vazgeçerek çalışmalara taze hazırlanan formülasyonlar ile devam edilmesine karar verildi.

5.6. İn Vitro Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi

İn vitro salım çalışmaları optimum nanopartikül formülasyonları için diyaliz torba yöntemiyle yapıldı. İn vitro salım çalışmalarında nanopartiküllerin oral yoldan alınması sonrası maruz kalacağı gastrointestinal kanal pH ortamlarını taklit edebilmek amacıyla nanopartiküller diyaliz torbaya yerleştirilerek mideyi taklit eden pH 1,2 ortamında 2 saat, ince bağırsak taklit eden pH 6,8 ortamında 6 saat ve kolonu taklit eden pH 7,4 fosfat tamponunda ise 16 saat tutularak 24 saatlik salım çalışmaları gerçekleştirildi. Literatürde benzer in vitro salım çalışmaları mevcuttur (Mutlu-Agardan ve Han, 2021).

CS:TPP nanopartiküllerinin in vitro insülin salım çalışmalarının değerlendirilmesi

CS:TPP nanopartiküllerinden pH 1,2'de % 42,07, pH 6,8'de ise kümülatif olarak % 66,5 ve pH 7,4 ortamında ise kümülatif olarak % 74,12 insülin salımı gözlemlendi. Kitosan asidik sıvılarda çözündüğü için pH 1,2 çözeltisinde nanopartiküllerin enkapsüle insülinin yarıya yakınına salındığı görüldü. Pozitif yüklü kitosan ile negatif yüklü TPP'nin elektrostatik etkileşimi sayesinde, oluşan çapraz bağların tam olarak açılmadığı böylece insülinin tamamının salınmadığı düşünüldü. Verilerimize göre insülinin salınmasını hedeflediğimiz pH 6,8'de insülinin %24,43'ünün ve kolon pH'sını taklit eden pH 7,4'de ise kalan insülinin %7,62'sinin salınması gözlemlendi. İnsülinin yarısından fazlasının midede salınması burada gastrik proteazlar ve asidik ortam nedeniyle emilemeden hızla parçalanacağını işaret ettiğinden, bu partiküllerin insülinin oral yoldan verilmesi için uygun olmadığı şeklinde yorumlandı.

CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin in vitro insülin salım çalışmalarının değerlendirilmesi

CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinden pH 1,2'de % 32,38, pH 6,8'de ise kümülatif olarak % 63,09'luk ve pH 7,4 ortamında ise kümülatif olarak % 72,91'lik salım gözlemlendi. Mide ortamında insülinin CS:TPP nanopartiküllerine göre yaklaşık %10 daha az salım gözlemlendi, bu bulgu SBE-β-SD'nin kitosan ile yaptığı çapraz bağların SBE-β-SD'nin yapısından dolayı kitosan ile TPP arasındaki bağlara göre daha kuvvetli olduğu şeklinde yorumlandı. CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin CS:TPP nanopartiküllerine göre insülini midenin asidik ortamında daha iyi koruduğunu göstermektedir. pH 6,8'de yani insülinin asıl salınmasını istediğimiz ince bağırsak pH'sında %30,71'lik salım gözlemlendi bu değerin CS:TPP nanopartiküllerine göre % 6 daha fazla olduğu görüldü. pH 7,4 fosfat tamponunda ise kalan insülinin % 9,82'sinin yani nanopartiküllerin kolona gelene kadar enkapsüle insülinin çoğunun salındığı görüldü. Oral insülinin kolonda salınmasını amaçlayan çalışmalar da literatürde mevcuttur. Kolon hedefli uygulamalar, epitel yüzeyinin yakın çevresinde daha uzun tutulma süresi, azalan P-glikoprotein ekspresyonu, jejunum ve ileum ile karşılaştırıldığında permeabilite artırıcılara daha iyi yanıt verme ve proteolitik enzimlerin daha düşük derişimde olması gibi pek çok avantaja sahiptir (M. Patel, 2013).

K-CS:TPP nanopartiküllerinin in vitro salım çalışmalarının değerlendirilmesi

K-CS:TPP nanopartiküllerinden pH 1,2'de % 20,09, pH 6,8'de kümülatif olarak % 74,41 ve pH 7,4 ortamında ise kümülatif olarak % 83,04 salım gözlemlendi. K-CS:TPP nanopartiküllerinin mide ortamını taklit eden pH 1,2 çözeltisinde enkapsüle insülinin % 20,09'unu salarak CS:TPP ve CS:SBE- β -SD nanopartiküllerine göre insülinin midenin asidik ortamından iyi koruduğunu ve enterik kaplamanın başarılı olduğunu gösterdi. Kollicoat® MAE 100 P asidik pH'da çözünür özellikte olmadığından, pH 1,2'de gerçekleşen % 20,09'luk salımın ise kaplama tabakasına adsorbe olan insülinin ani salımından kaynaklandığı düşünüldü. Kaplı nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliklerinde CS:TPP ve CS:SBE- β -SD'ye göre belirgin artış olduğu da göz önünde bulundurulduğunda, pH 1,2'de görülen ani salım Kollicoat® MAE 100 P tabakasına enkapsüle olmayan insülinlerin adsorbe olduğunu doğrulandı. pH 6,8 ortamında ise enkapsüle insülinin % 54,32'lik salımı gözlemlendi ve insülinin bağırsaktan emilebilecek miktarının kaplı olmayan nanopartiküllere göre daha fazla olacağı şeklinde yorumlandı. Nanopartiküller pH 7,4 fosfat ortamında ise kalan enkapsüle insülinin % 8,63'ünü salarak kolonda da bir miktar salım olacağını gösterdi. CS:TPP nanopartiküllerinin Kollicoat® MAE 100 P ile kaplanmasının oldukça avantajlı olduğu sonucuna varıldı.

K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin in vitro salım çalışmalarının değerlendirilmesi

K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinden pH 1,2'de % 16,57, pH 6,8'de ortamında kümülatif olarak % 73,44'lük ve pH 7,4 ortamında ise kümülatif olarak % 81,26'lık salım gözlemlendi. K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin mide ortamını taklit eden pH 1,2 çözeltisinde enkapsüle insülinin % 16,57'sini salarak insülini midenin asidik ortamından CS:TPP ve CS:-SBE- β -SD nanopartiküllerine anlamlı olarak daha fazla koruyabildiği görüldü ($p < 0,05$). K-CS:SBE- β -SD'nin nanopartiküllerinin pH 1,2'deki salımları K-CS:TPP nanopartiküllerine göre yaklaşık %4 daha az bulunmakla birlikte bu fark anlamlı bulunmamıştır. % 16,57'lik salım da K-CS:TPP nanopartiküllerinde olduğu gibi kaplama tabakasında biriken insülinin ani salımı olarak düşünüldü. Bağırsacı taklit eden pH 6,8 fosfat tamponunda ise nanopartiküllerin enkapsüle insülinin % 56,87'sini salarak insülinin daha büyük bir miktarının emilim bölgesine ulaştırabileceği düşünüldü. Nanopartiküller pH 7,4 fosfat tampon ortamında ise enkapsüle insülinin % 7,82'si salarak nanopartiküllerin bir miktar da kolonda salım yapabileceğini gösterdi.

pH 1,2 çözeltisi ortamındaki salımın son saatinde yani 2. saatin sonunda tüm nanopartiküllerin in vitro salımlarında anlamlı bir fark gözlenmektedir ($p<0,05$). Bu durum kaplamanın başarılı olduğunu ve SBE- β -SD'nin kitosan ile daha güçlü bir çapraz bağlanmayı sağladığını göstermektedir. pH 6,8 fosfat tampon çözeltisi ortamında salımın 4. saatinde de tüm nanopartiküllerin in vitro salımlarında anlamlı bir fark ve pH 6,8 fosfat tampon çözeltisi ortamında salımın son saatinde (8.saat) ise CS:TPP ve K-CS:TPP nanopartikülleri arasında, CS:SBE- β -SD ve K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin in vitro salımlarında anlamlı fark gözlenmektedir ($p<0,05$). Bu sonuçlar ve salım yüzdeleri incelendiğinde Kollicoat® MAE 100 P ile kaplanan ve kaplı olmayan CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin insülinini TPP ile çapraz bağlanarak hazırlanan nanopartiküllere göre daha yavaş saldığı bu yavaş salım kitosan ile SBE- β -SD arasında daha kuvvetli ve daha zor açılan bir çapraz bağ olduğunu düşündürmektedir. Salımın son saatinde ise CS:TPP ve K-CS:TPP nanopartikülleri, CS:SBE- β -SD ve K-CS:SBE- β -SD nanopartikülleri in vitro salımlarında anlamlı bir fark gözlenmekte ($p<0,05$) ve bu durum da enterik kaplamanın başarılı bir şekilde gerçekleştiğini doğrulamaktadır.

Yapılan bir çalışmada in vitro salım profilleri değerlendirildiğinde kitosan nanopartiküllerinin mide ortamını taklit eden pH 1,2 ortamında insülinin ani salımını geciktirdiğı bildirilmiş bu durumda negatif yüklü insülin ve pozitif yüklü kitosan arasında güçlü iyonik etkileşimlerin olabileceğine bağlanmıştır (Mukhopadhyay ve diğerleri, 2013). Yapılan başka bir çalışmada ise insülin içeren kitosan nanopartiküllerinin asidik ortamda insülin salınımının patlama etkisi, hem kitosan hem de insülinin asidik pH'da yüksek çözünürlüğü ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar, insülinin nanopartiküllerin yüzeyine gevşek bir şekilde bağlandığını ve bu nedenle insülinin kolayca dışarı çıkabileceğini ve daha yüksek pH'larda (pH 6,5 ve 7,2) kitosan ve insülinin düşük pH'lara göre çözünürlüklerinin düşük olduğunu ve buna bağlı olarak ani salım gözlemediklerini bildirmişlerdir (M. Avadi ve diğerleri, 2011).

Chen ve arkadaşları yapılan bir çalışmada ise Eudragit S 100® kaplı insülin yüklü kitosan nanopartiküllerinin in vitro salım profilleri incelenmiş. Eudragit S 100® kaplı olmayan nanopartiküllerin insülini pH 1,2 çözeltisi ortamında insülin ve kitosanın bu pH'daki çözünürlüğünün fazla olmasından dolayı tamamına yakını saldığını fakat enterik kaplı nanopartiküllerin %10 civarı insülin salımı gerçekleştirdiğı bildirilmiştir. Kolona hedefleme yapmak için sıklıkla tercih edilen bir polimer olan Eudragit S 100®'ün nanopartiküllerin

etrafında bir film tabakası oluşturup kitosanın bu ortamda çözünmesini engelleyerek insülin yüklü kitosan nanopartiküllerini koruduğu düşünülmüştür. pH 6,8’de kaplamanın çözünmeye başlamasıyla yaklaşık %40 salım sağlanmış pH 7,4 ortamlarında ise Eudragit S 100®’ün hızla çözünmesine bağlı olarak enkapsüle insülinin salımının arttığı bildirilmiştir (S.Chen ve diğerleri, 2017).

5.6.1. Optimum formülasyonların in vitro salım kinetiklerinin tayinine ait bulguların değerlendirilmesi

Optimum formülasyonların salım profillerinin kinetik modellemesi yapılırken zamana karşı elde edilen % kümülatif salım verileri DD Solver® programına girildi. Programın verdiği R^2_{adj} , MSC ve AIC değerleri yorumlandı. Uygun kinetik modele karar verirken R^2_{adj} değerinin 1’e yakın olması, MSC değerinin daha yüksek olması ve AIC değerinin ise düşük olmasına dikkat edilerek yorum yapıldı. Hazırlanan nanopartiküllerin in vitro salım çalışmaları ile eşleştirilen salım kinetiği modelleri Kollicoat® MAE 100 P ile enterik kaplı ve enterik kaplı olmayan nanopartiküllerde farklılık göstermiştir.

CS:TPP nanopartiküllerinin salım profillerinin Peppas-Sahlin salım kinetik modeli ile uyumlu olduğu bulundu. CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin salım profilleri ise Weibull salım kinetik modeli ile eşleşti. Fakat değerler Peppas-Sahlin ile de çok yakındır. Weibull kinetiği, heterojen matrislerden parabolik ilaç salımını ifade etmekte, hemen hemen her sistemle yüksek oranda eşleştiğinden, genelde ayırıcı bir kinetik model olmamaktadır. Peppas-Sahlin salım kinetik modelinde salımda hem Fickian difüzyonu hem de polimer zincirinin gevşemesi etkili olarak görülmektedir (Abbasnezhad ve diğerleri, 2021). TPP ve SBE- β -SD ile kitosan arasındaki çapraz bağlanmanın zamanla açılması/gevşemesi söz konusu olduğundan, gevşemeye bağlı olarak insülin serbestleşerek difüzyonla membran dışına çıkmıştır. Yapılan bir çalışmada insülinin oral yoldan verilebilmesi için asetillenmiş kaju sakızı ile kitosan nanopartikülleri elde edilmiş ve bu nanopartiküllerin salım kinetik modelleri de Peppas-Sahlin modeli ile eşleşmiştir (Silva ve diğerleri, 2019). Başka bir çalışmada ise insülin yüklü kitosan nanopartiküllerinin salımları pH 4 ve 7,4’de değerlendirilmiş ve ilk beş saatte ani bir salım gözlenirken 48 saate kadar da sürekli bir salım gözlenmiştir bu salım Weibull kinetik modeli ile uyumlu bulunmuştur. Weibull kinetik modeli Fickian olmayan difüzyon modeli ile ilişkilidir. Asidik pH’da görülen ani salımın kitosanın amino gruplarının protonasyonu ile su moleküllerinin nanopartiküllere nüfuz

etmesine ve nanopartiküllerin şişmesine böylece insülinin ortamına salınmasıyla ilişkilendirilmiştir (Nejabat, Kalani, Nejabat ve Hadizadeh, 2021).

Kollicoat® MAE 100 P ile kaplanan K-CS:TPP ve K-CS:SBE- β -SD nanopartikülleri ise 1.derece salım kinetik modeli ile uyumlu bulunmuştur. Birinci dereceden kinetik model, dozaj formunda bulunan etkin maddenin derişimine bağımlı ilaç salımını temsil etmektedir. Bu kinetik model ilacın şişmiş gözenekli bir polimerik matrsten salındığını göstermektedir (Mahjub ve diğerleri, 2014). Herhangi bir zamanda salınan ilaç miktarı nanopartiküllerde enkapsüle olan başlangıç ilaç miktarı ve k sabiti ile ilişkilidir (Dhanasekaran, Rameshthangam, Venkatesan, Singh ve Vijayan, 2018). Andreani ve arkadaşları tarafından oral insülin verilmesi için PEG kaplı silika nanopartikülleri hazırlanmış ve salım kinetik modelleri incelenmiştir. PEG kaplı silika nanopartiküllerinin çoğunun 1.dereceden kinetikle uyumlu olduğu görülmüştür (Andreani ve diğerleri, 2014).

5.7. MTT Sitotoksisite Testlerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

MTT testi, etkin maddelerin, yardımcı maddelerin, ilaç taşıyıcı sistemlerin derişimlerine bağılı olarak hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirmek için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Tolosa, Donato ve Gómez-Lechón, 2015). Çalışmamızda hazırlanan nanopartiküllerin sitotoksik potansiyellerini değerlendirmek için L-929 (fare fibroblast) hücre hattı kullanılmıştır. MTT testi için, insülin çözeltileri 200, 100 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ derişimde direkt Humulin R® seyreltilerek, nanopartiküller de bu derişimlerde insülin içerecek şekilde seyreltmelerle hazırlandı. DMEM ile hazırlanan insülin çözeltileri ve nanopartikül dispersiyonları 96 kuyucuklu plakaların gözlerine 100 μl olarak uygulandı ve 24 saat boyunca inkübasyona bırakılarak hücre canlılığı üzerine etkileri incelendi. K-CS:TPP ve K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin DMEM içinde güçlkle dağıtılabildi, oldukça bulanık süt gibi görünen nanopartikül dispersiyonu, hücrelere uygulandı ancak deney sonucunda çok yüksek absorbanlar elde edildi. Bu şekilde berrak olmayan sistemlerin MTT testlerinde sağlıklı sonuçlar yerine, partiküllerden kaynaklanan yüksek absorbansa bağılı olarak sanal yüksek bir canlılık elde edilmektedir. Kaplı nanopartiküller için %300 civarında canlılık elde edildiğinden bu sonuçlar sağlıklı bulunmadığından teze konmamıştır. Borderwala ve arkadaşları Eudragit S 100 kaplı lipit taşıyıcılar hazırlayarak sitotoksisite çalışmalarını yapmışlar ve kaplı nanopartiküllerinin MTT testi için hazırlanmasında özel bir hazırlama metodu belirtmemişler, deney sırasında bir olumsuzluk yaşadıklarından söz etmemişlerdir

(Borderwala, Rathod, Yadav, Vyas ve Shah, 2021). Mohammadi ve arkadaşları ise polivinil alkol (PVA) ve hidroksi etil selüloz (HEC) ile göz insertleri hazırlamış, insertleri Eudragit® L 100 ile kaplamışlardır. L-929 hücre hattında gerçekleştirdikleri sitotoksisite testlerinde, yüksek derişimde Eudragit® L 100 içeren formülasyonlarında bile, bizim yaşadığımız şekilde bir sıkıntı yaşamamışlar ve %60'ın altında canlılık bildirmemişlerdir (Mohammadi, Mirzaeei, Taghe ve Mohammadi, 2019).

İnsülin çözeltisine ait sitotoksisite testlerinde, derişimin 50'den 100 µg/mL'ye çıkmasıyla hücre canlılığında yaklaşık %10'luk hafif bir düşme görülmüş, ancak bu düşme anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). CS:TPP nanopartiküllerinin hücre canlılıkları değerlendirildiğinde, artan derişime bağlı olarak hücre canlılığında azalma görülmüş, 100 ve 200 µg/mL insülin içeren nanopartiküllerin uygulandığı kuyucukların % canlılık değerleri kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azalmakla birlikte % 80'nin altına inmediğinden sitotoksik olarak değerlendirmek mümkün değildir. CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin çalışılan her üç konsatrasyon için hücre canlılığı sonuçları CS:TPP nanopartiküllerinden yüksek bulunmuştur. Burundan beyne idebenon hedeflemek için CS:SBE-β-SD nanopartikülleri hazırlanmış, CS:SBE-β-SD ile ilgili yüksek derişimde dahi hücre canlılığını azaltmadığı bildirilmiştir (De Gaetano ve diğerleri, 2022). Kitosan nanopartiküllerin sitotoksik etkilerinin nispeten düşük olduğu, derişime bağlı olduğu ve nanopartiküllerin partikül büyüklüğünden etkilendiği gösterilmiştir (Omar Zaki, Ibrahim ve Katas, 2015). Varela-Fernández ve arkadaşları lactoferrin içeren CS:TPP ve CS:SBE-β-SD nanopartikülleri hazırlamışlar, nanopartiküllerin sitotoksik potansiyellerini koryoallantoik membran deneyi (HET-CAM) ile değerlendirmişler ve toksisite izlemediklerini bildirmişlerdir (Varela-Fernandez ve diğerleri, 2021).

5.8. İn vitro Stabilite Bulgularının Değerlendirilmesi

CS:TPP nanopartikülleri pH 1,2'de 2 saat boyunca şişerek partikül büyüklüğü anlamlı bir şekilde arttı ($p<0,05$) bu da salım sonuçları ile uyumlu görüldü. 4. saatin sonunda ise nanopartiküllerin partikül büyüklüğü azaldı bu durum da nanopartiküllerin mideyi taklit eden pH 1,2 çözeltisinde parçalanmaya başladığını düşündürdü. Bu ortamdaki polidispersite indekslerindeki değişim incelendiğinde polidispersite indeksinin 2 saatin sonunda anlamlı bir şekilde arttığı, zeta potansiyel değerlerinin ise düştüğü gözlemlendi. Nanopartiküllerin pH 1,2 çözeltisinde 2 saatten sonra parçalanmaya başladığına, 4. saatteki partikül

büyükluğündeki azalma göz önünde bulundurularak karar verildi. İn vitro salım çalışmalarında CS:TPP nanopartiküllerinin 2. saatin sonunda pH 1,2’de yüklenen insülinin % 42,07’sini saldığı da düşünöldüğünde sonuçların birbirini desteklediğı göröldü.

CS:TPP nanopartiküllerinin partiköl büyüklüğü pH 6,8’de 4 saat boyunca anlamlı bir şekilde artması ($p<0,05$), CS:TPP nanopartiküllerinin in vitro salım çalışmalarında gözlenen 4 saatte enkapsüle insülinin % 22,45’inin salınmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu sonuçlar da nanopartiküllere enkapsüle olan insülinin salımının bağırsak ortamında kitosanın şişmesine bağılı olarak gerçekleştiğini gösterdi. pH 1,2’de kitosanın çözünürlüğü daha fazla olduğı için, kitosan ve TPP arasındaki çapraz bağların daha fazla gevşediğı buna bağılı olarak salımın da daha fazla olduğı düşünöldü. Aynı ortamda polidispersite indeksi değişimleri anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). CS:TPP nanopartiküllerinin zeta potansiyel değeri ise anlamlı olarak azaldı ($p<0,05$), bu durum da kitosanın şişmesine bağılı olarak anyonik TPP’nin ve insülinin nanopartiköl yüzeyinde birikmeye başlamasından kaynaklanabileceğı şeklinde yorumlandı.

CS:SBE-β-SD nanopartikülleri de CS:TPP nanopartikülleri ile benzer davranış gösterdi. Ancak in vitro salım çalışmasından elde edilen sonuçlar da göz önünde bulundurulduğunda, SBE-β-SD’nin molekül ağırlığı ve büyüklüğü TPP’ye göre çok büyük olduğundan, sterik engel yaratarak insülinin salımını yaklaşık % 10 azalttığı şeklinde yorumlandı. Partiköl büyüklüğünde pH 1,2’de 2.saat sonunda anlamlı bir şekilde artış gözlendi ($p<0,05$), 4. saatin sonunda ise nanopartiküllerin partiköl büyüklüğü azaldı. bu durumda nanopartiküllerin mideyi taklit eden pH 1,2 çözeltisinde parçalanmaya başladığını düşündürdü. Polidispersite indekslerinde ise anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p>0,05$). Aynı ortamda zeta potansiyel değeri ise anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$). Bu düşüşün, in vitro salım çalışmalarında CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin 2. saatin sonunda pH 1,2’de yüklenen insülinin % 32,38’sini saldığı da değerlendirildiğinde, kitosan ve SBE-β-SD arasındaki çapraz bağların gevşemesine bağılı olarak nanopartiköl yüzeyine yaklaşan anyonik insülinde kaynaklandığı düşünöldü.

CS:SBE-β-SD nanopartiküllerinin partiköl büyüklüğü pH 6,8’de anlamlı bir şekilde arttı ($p<0,05$) ve in vitro salım sonuçlarına göre bu partiküller pH 6,8’de 4 saatte % 26,97’lik salım gösterdi. Bu sonuçlar da nanopartiküllere enkapsüle olan insülinin salımının bağırsak ortamında kitosanın şişmesi sayesinde partiköl büyüklüğünün büyümesi ve yüzey alanının

değişmesi ile ilgili olacağını düşündürdü. Polidispersite indeksinde 4 saat boyunca anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p>0,05$). CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerleri ise anlamlı olarak azaldı ($p<0,05$), bu durum da kitosan ve SBE- β -SD arasındaki çapraz bağlanmanın kuvvetinin azalmasına bağlı olarak anyonik SBE- β -SD'nin ve insülinin nanopartikül yüzeyinde birikmeye başlamasından kaynaklandığı düşünüldü.

K-CS:TPP nanopartiküllerinin partikül büyüklüğünde pH 1,2'de anlamlı bir değişim görülmedi ($p>0,05$) ve in vitro salım çalışması sonuçlarına göre K-CS:TPP nanopartikülleri, kaplı olmayan nanopartiküllerden daha az salım gösterdi. Bu durum enterik kaplamanın başarısını ve nanopartikülleri midenin asidik ortamına karşı koruduğunu gösterdi. Polidispersite indeksi değerlerinde ise anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p>0,05$). Aynı ortamda zeta potansiyel değerlerinin yükselmesinin (- yönde azalmasının) ise yüzeyde biriken negatif yüklü insülinin salınmasına bağlı olarak kaplama tabakasındaki negatif yük şiddetinin azaldığını düşündürdü.

K-CS:TPP nanopartiküllerinin partikül büyüklüğünde pH 6,8'de anlamlı bir şekilde büyüme gözlemlendi ($p<0,05$). Bu durum enkapsüle insülinin pH 6,8 fosfat tamponunda % 44,57'lik salımı ile birlikte değerlendirildiğinde, kaplama tabakasındaki aşınmaya/çözünmeye bağlı olarak ortamla teması artan CS:TPP nanopartiküllerinin şişmelerindeki artışla ilişkilendirildi. PDI değerlerinde anlamlı bir değişim gözlenmezken ($p>0,05$) zeta potansiyel değerlerinde ise Kollicoat® MAE 100 P'nin çözünmesine bağlı olarak artış izlendi. Kollicoat® MAE 100 P pH 6,8 fosfat tamponunda çözündükçe kaplamanın kademeli olarak incelendiği ve kaplamadan kaynaklanan negatif yükün azaldığı düşünüldü.

K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin pH 1,2'de partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi değerlerinde anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p>0,05$). İn vitro salım sonuçlarında ise CS:SBE- β -SD nanopartikülleri %16,57'lik bir salım gösterdi. Bunlar göz önüne alındığında enterik kaplamanın başarılı olduğu ve nanopartikülleri midenin asidik ortamından ve enzimatik bozunmadan koruduğu gözlenmektedir. Polidispersite indekslerinde ise herhangi bir değişim gözlenmemektedir. Aynı ortamda zeta potansiyeller incelendiğinde zeta potansiyel değerlerinin yükselmesinin (- yönde azalmasının) K-CS:TPP nanopartiküllerinde olduğu gibi yüzeyde biriken negatif yüklü insülinin salınmasına bağlı olarak kaplama tabakasındaki negatif yük şiddetinin azalmasına bağlı olduğu düşünüldü.

pH 6,8’de K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin partikül büyüklüğünde ve zeta potansiyel değerinde anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0,05$). Bu durum enkapsüle insülinin pH 6,8 fosfat tampon çözeltisi ortamında 4 saatte %44,47’lik salımı ile ilişkilendirilmektedir. Bu ortamda Kollicoat® MAE 100 P çözünmeye başladı ve partikül büyüklüğü kitosanın şişmesine bağlı olarak arttı. PDI değerlerinde ise anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p > 0,05$). Zeta potansiyel değerlerinde ise Kollicoat® MAE 100 P’nin çözünmesine bağlı olarak artış meydana geldi. Kollicoat® MAE 100 P pH 6,8 fosfat tamponunda çözündükçe kaplamanın kademeli olarak incelindiği ve kaplamadan kaynaklanan negatif yükün azaldığı düşünüldü.

Xu ve arkadaşları ise Eudragit® L 100 ile kaplanan kitosan nanopartiküllerin 0,1 M HCl asit içeren ortamda 2 saat boyunca partikül büyüklüğünü ve zeta potansiyel değerini koruduğunu, Eudragit® L 100 ile nanopartiküllerin kaplanması sayesinde nanopartiküllerin midenin asidik pH’sında stabilitelerini koruyacağını ve nanopartiküllerin pH 6,8 ortamında dağıtıldığında Eudragit® L 100 tabakasının çözünmesine bağlı olarak nanopartiküllerin partikül büyüklüğünün azaldığını ve zeta potansiyellerinin de arttığını bildirmişlerdir (Xu ve diğerleri, 2018). Bizim çalışmamızda Kollicoat® MAE 100 P ile kaplanan nanopartiküllerde literatürde görüldüğü gibi pH 6,8’de partikül büyüklüğünde azalma görülmedi, izlenen 4 saatlik süre boyunca şişme devam etti. Bu durumun oluşmasında kaplama tabakası kalınlığının ve partikül büyüklüğünün dolayısıyla yüzey alanlarının etkili olabileceği düşünüldü.

El Leithy ve arkadaşları insülin yüklü folat-kitosan nanopartiküllerinin pH 6,8 ve 7,4 ortamlarında partiküllerin su alarak şiştiğini ve insülinin salımına izin verdiklerini bildirmişlerdir (El Leithy, Abdel-Bar ve Ali, 2019). Başka bir çalışmada ise enoksaparin yüklü kitosanan nanopartikülleri ile Eudragit® L 100 kaplı insülin yüklü kitosan nanopartiküllerinin in vitro stabiliteleri değerlendirilmiş. Eudragit® L 100 kaplı nanopartiküllerin pH 1,2 ortamında partikül büyüklüğünde 2 saat boyunca anlamlı bir değişiklik olmazken ($p > 0,05$), kaplı olmayan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü bir saatte artmış daha sonraki bir saat boyunca düşmüştür. Bu durum kaplı olmayan nanopartiküllerin pH 1,2’de bozulduğunu ve Eudragit® L 100 kaplamanın ise pH 1,2’de nanopartiküllerin stabilitesini sağladığını düşündürmüştür (Patriota ve diğerleri, 2021).

5.9. Stabilité Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Stabilite çalışmaları için nanopartiküller $4^{\circ}\text{C} \pm$ ortam nemi ve $25^{\circ}\text{C} \%60 \pm 5$ bağıl nem koşullarında 6 ay süreyle bekletildi. 0., 15. gün ve 1., 2., 3., 4., 5. ve 6. aylarda nanopartiküller partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve % enkapsülasyon etkinliği değerleri ölçülerek değerlendirildi. Karşılaştırma yapabilmek amacıyla distile suda $100 \mu\text{g/mL}$ derişimde insülin çözeltisi hazırlanarak belirlenen stabilite koşullarında 3 ay süreyle bekletildi. İnsülin çözeltisinin insülin miktarı tayin edildi. Ölçülen insülin miktarlarının hem $4^{\circ}\text{C} \pm$ ortam nemi ve $25^{\circ}\text{C} \%60 \pm 5$ bağıl nem koşullarında sırasıyla 1. aydan ve 15. günden itibaren anlamlı azalma gösteriğı görüldü ($p < 0,05$). 3. ayın sonunda $4^{\circ}\text{C} \pm$ ortam nemide bekletilen çözeltinin içerisindeki insülin miktarı $\%41.64$, $25^{\circ}\text{C} \%60 \pm 5$ bağıl nem koşullarında bekletilen çözeltinin içerisindeki insülin miktarı $\%61.47$ oranında azalmıştır. İnsülinin çözelti içerisinde zamana bağılı olarak parçalandığı, stabilitesinin uygun olmadığı görüldü. Flakon bütünlüğü bozulmadan 4°C 'de 36 ay raf ömrü bulunan piyasa preparatı için bu bulgu şaşırtıcı olmuştur. Bu azalmanın nedeninin, seyreltmeye bağılı olarak, osmolalitede, pH'da ve iyon dengesinde meydana gelmiş değışiklikler olabileceğı düşünöldü. Ayrıca düşük insülin derişimlerinde ($< 100 \mu\text{g/mL}$) insülin monomer yapısında bulunduğı, insülin monomerlerinin kısmi açılmaya uğradığı ve stabiliteyi olumsuz yönde etkileyecek fibriller oluşturduğu bilinmektedir (C. Wong ve diğeri, 2016).

CS:TPP, CS:SBE- β -SD, K-CS:TPP ve K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin $4^{\circ}\text{C} \pm$ ortam nemi koşullarında partikül büyüklüğünde anlamlı bir değışimin olmadığı gözlendi ($p > 0,05$). $25^{\circ}\text{C} \%60 \pm 5$ bağıl nem koşullarında CS:TPP nanopartiküllerinin partikül büyüklüğünde 3. aydan itibaren, CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin partikül büyüklüğünde 4. aydan itibaren, K-CS:TPP nanopartiküllerin partikül büyüklüğünde 5. aydan itibaren artış gözlenirken K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin partikül büyüklüğünde anlamlı bir değışim gözlenmedi ($p > 0,05$). CS:TPP, CS:SBE- β -SD, K-CS:TPP nanopartiküllerinin partikül boyutundaki artışın nanopartiküllerin agregasyonuna bağılı olduğı düşünöldü. Çapraz balayıcı olarak TPP yerine SBE- β -SD kullanılmasının nanopartiküllerin stabilitesini olumlu yönde etkilediğı görüldü.

$25^{\circ}\text{C} \%60 \pm 5$ bağıl nem koşullarında CS:TPP ve CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin polidispersite indekslerinde 5. aydan itibaren anlamlı bir artış gözlenirken ($p < 0,05$), $4^{\circ}\text{C} \pm$ ortam nemi koşullarında CS:TPP ve CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin polidispersite

indekslerinde anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p>0,05$). K-CS:TPP ve K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin $4^{\circ}\text{C} \pm$ ortam nemi ve $25^{\circ}\text{C} \%60\pm5$ bağıl nem koşullarında polidispersite indekslerinde de anlamlı bir değişim gözlenmedi. CS:TPP nanopartiküllerinin polidispersite indekslerinde gözlenen artış nanopartiküllerin partikül büyüklüğünün artması ile kitosan ile TPP arasındaki inter/intra moleküler etkileşimlerle de ilişkilendirildi. K-CS:TPP ve K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin kaplanmasıyla kitosan ilişkili agregasyon sorunlarının önleendiği görüldü.

$25^{\circ}\text{C} \%60\pm5$ bağıl nem koşullarında CS:TPP nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerlerinde 3. aydan itibaren başlayan azalma 6. ay itibariyle anlamlı olmuştur ($p<0,05$). $4^{\circ}\text{C} \pm$ ortam nemi koşullarında ise CS:TPP nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerlerinde anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p>0,05$). CS:TPP nanopartiküllerinin Kollicoat® MAE 100 P ile kaplanmasıyla elde edilen nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerinde $4^{\circ}\text{C} \pm$ ortam nemi koşullarında artış, $25^{\circ}\text{C} \%60\pm5$ bağıl nem koşullarında düşüş gözlemlendi. CS:TPP ve K-CS:TPP nanopartiküllerinde gözlenen değişimlerin aksine CS:SBE- β -SD ve K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerlerinde her iki koşulda da anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p>0,05$). CS:TPP ve K-CS:TPP nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerlerindeki değişimin kitosan ile TPP arasındaki çapraz bağların gevşemesine bağlı gözleendiği düşünöldü. CS:SBE- β -SD ve K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerlerinde bir değişimin gözlenmemesi ise kitosan ile SBE- β -SD arasındaki çapraz bağların TPP ile olan bağlara göre daha kuvvetli olduğu şeklinde yorumlandı.

CS:TPP nanopartiküllerinin enkapsölasyon etkinliklerinde sadece $25^{\circ}\text{C} \%60\pm5$ bağıl nem koşullarında anlamlı bir azalış gözlenirken ($p<0,05$) CS:SBE- β -SD, K-CS:TPP ve K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin enkapsölasyon etkinliklerinde hem $4^{\circ}\text{C} \pm$ ortam nemi koşullarında hem de $25^{\circ}\text{C} \%60\pm5$ bağıl nem koşullarında anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p>0,05$). $25^{\circ}\text{C} \%60\pm5$ bağıl nem koşullarında CS:TPP nanopartiküllerinin enkapsölasyon etkinliklerinde anlamlı bir azalışın ($p<0,05$) kitosan ile TPP arasındaki çapraz bağların gevşemesine bağlı olarak nanopartiküller içerisinde enkapsüle olan insülinin salınması ile ilişkilendirildi.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde iyonik jelasyon yöntemi ile kitosan nanopartiküllerinin hazırlanmasında çapraz bağlayıcı olarak SBE- β -SD kullanılmasının kitosan ile SBE- β -SD arasındaki çapraz bağlanmanın kitosan ile TPP arasındaki çapraz bağlanmadan daha kuvvetli

olduğu düşünöldü. SBE- β -SD'in sterik engel yaratarak enkapsüle edilen insülini daha iyi koruması, istenmeyen kitosan TPP intra/inter moleküler etkileşimlerin önüne geçmesi sayesinde kitosan nanopartiküllerin stabilitesini iyileştireceği ve nanopartiküllerin Kollicoat® MAE 100 P ile kaplanmasıyla da daha stabil nanopartiküller elde edilebileceği düşünöldü.

Siklodekstrinler, siklodekstrin kompleksi oluşturarak veya nanopartikül yapısına konjuge edilerek protein yapıli ilaçların stabilitesini artırmak için nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılabilmektedir (Pandey, 2021). Stabilite çalışması sonuçlarına göre CS:SBE- β -SD ve K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerin stabiliteilerinin CS:TPP ve K-CS:TPP daha iyi olduğı göröldü. Kranz ve Gutsche etilselöloz film kaplamalara metakrilik asit-etil akrilat kopolimerlerinin eklenmesiyle pelletlerin stabiliteilerinin iyileştiiğini altı aylık stabilite çalışmaları ile kanıtlamışlardır (Kranz ve Gutsche, 2009). Fernandez ve arkadaşları laktoferrin yüklü CS:TPP ve CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin uzun süreli stabilite çalışmasını 4, 25 ve 37 °C'de değerdendirilmişler ve nanopartiküllerin partikül büyüklüğünde anlamlı bir değışim gözlemedikleri için hem CS:TPP hem de CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin 3 ay boyunca stabil kaldıklarını bildirmişlerdir (Varela-Fernandez ve diğerdleri, 2021). Çalışmayı sadece 3 ay sürdürdükleri için, bizim 5. ve 6. aylarda gözlediğimiz değışimleri gözlemleyememişlerdir.

Literatürdeki pek çok çalışmanın aksine, Morris ve arkadaşları TPP kullanılarak iyonik jelyasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan nanopartiküllerinin 4 ve 25 °C'de 12 ay bekletilen nanopartiküllerinin partikül büyüklüklerinin taze hazırlanan nanopartiküller ile benzer değerdelerde olduğunu sadece 40 °C'de bekletilen nanopartiküllerin bozulduğunu bildirmişlerdir (Morris, Castile, Smith, Adams ve Harding, 2011). Araştırmacılar sadece partikül büyüklüğü ölçerek yapılan stabilite çalışmasının stabiliteyi değerdendirmek için yeterli olmadığını bildirmiş, stabiliteyi artırmak için uygun kriyoprotektanların kullanımıyla liyofilizasyon yapılmasını önermişlerdir. İnsülinin oküler yoldan verilebilmesi için insülin yüklü kitosan nanopartiküllerin geliştirildiğı bir çalışmada nanopartiküllerin altı aylık stabiliteileri (4-25°C) incelenmiş ve partikül büyüklüğünde nanopartiküllerin agregasyonuna bağlanan bir artış gözlenmiştir. Fakat taze hazırlanan nanopartiküllerin in vitro salım profilleri ile altı ay bekletilen nanopartiküllerin in vitro salım profilleri benzerlik gösterdiği için nanopartiküllerde meydana gelen partikül büyüklüğü değışimi anlamsız kabul edilmiş ve nanopartiküllerin test edilen koşullar altında stabil olduğı bildirilmiştir (Rathore ve

diğerleri, 2020). C. Wong ve arkadaşları insülin yüklü kitosan nanopartikülerinin 4 °C’de 2 ay bekletilmesinden sonra nanopartikülleri partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri bakımından incelemişler ve bu değerlerde gözlenen değişimi ihmal edilebilir olarak değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar negatif yüklü çapraz bağlayıcı ile insülinin birlikte karıştırılmasının nanopartiküllerin agregasyonu önleyeceğini ve düşük molekül ağırlıklı kitosanın kullanıldığı bu çalışmada zıt yüklerin elektrostatik etkileşimlerinin insülinin stabilitesini olumlu yönde etkileyeceğini bildirmişlerdir (C. Wong, Al-Salami ve Dass, 2020a).

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Tez kapsamında insülinin karakterizasyonu ve insülinin miktar tayini yöntemi valide edilmiştir. Çapraz bağlayıcı olarak TPP ve SBE- β -SD kullanılarak iyonik jelasyon yöntemi ile insülin yüklü kitosan nanopartiküllerinin (CS:TPP ve CS:SBE- β -SD), bu nanopartiküllerin Kollicoat® MAE 100 P ile kaplanması ile de K-CS:TPP ve K-CS:SBE- β -SD nanopartiküllerinin hazırlanma koşulları optimize edilmiştir. Hazırlanan nanopartiküller in vitro olarak incelenmiştir.

- Optimum CS:TPP nanopartikülleri için partikül büyüklüğü $289,17 \pm 34,64$ nm, polidispersite indeksi $0,398 \pm 0,090$, zeta potansiyeli $28,2 \pm 2,8$ mV ve enkapsülasyon etkinliği $\%30,2 \pm 2,3$ olarak, optimum CS:SBE- β -SD nanopartikülleri için partikül büyüklüğü $334,25 \pm 25,42$ nm, polidispersite indeksi $0,215 \pm 0,091$, zeta potansiyeli $32,5 \pm 3,5$ mV ve enkapsülasyon etkinliği $\%31,2 \pm 2,3$ olarak belirlenmiştir. Böylece CS:TPP ve CS:SBE- β -SD nanopartiküllerin küçük partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksine, yüksek zeta potansiyel ve enkapsülasyon etkinliğine sahipti.
- Optimum K-CS:TPP nanopartikülleri için partikül büyüklüğü $581,32 \pm 79,68$ nm, polidispersite indeksi $0,517 \pm 0,055$, zeta potansiyeli $-22,9 \pm 0,3$ mV ve enkapsülasyon etkinliği $\%49,8 \pm 3,5$ olarak, optimum K-CS:SBE- β -SD nanopartikülleri için partikül büyüklüğü $555,32 \pm 38,46$ nm, polidispersite indeksi $0,375 \pm 0,081$, zeta potansiyeli $-21,6 \pm 0,2$ mV ve enkapsülasyon etkinliği $\%52,1 \pm 2,5$ olarak belirlenmiştir. Böylece kaplı nanopatiküller, kaplı olmayan nanopartiküllere göre yüksek partikül büyüklüğü, polidispersite indeksine ve enkapsülasyon etkinliğine sahipken negatif zeta potansiyeline sahip olmuştur.
- FT-IR ve DSC analizleri sonuçları literatür ile uyumlu bulundu.
- İnsülinin miktar tayini yönteminin validasyon çalışmaları, geliştirilen yöntemin hassas, güvenilir ve insüline spesifik olduğunu kanıtladı.
- Optimum formülasyonlar için kitosan pH'sı 3, karıştırılma hızı 900 rpm, CS:TPP oranı 2:1, CS:SBE- β -SD oranı 1:1 ve CS:Kollicoat® MAE 100 P oranı 1:3 olarak seçildi. Optimum formülasyonların uygun partikül büyüklüğüne, düşük polidispersite indeksine, yüksek zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğu görüldü.

- SBE- β -SD ile hazırlanan nanopartiküllerin polidispersite indeksi TPP ile hazırlanan nanopartiküllere göre daha düşük bulundu, SBE- β -SD'nin daha homojen bir sistem oluşturduğu düşünüldü.
- Kaplanan nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliklerinin artması kaplama tabakasına insülin moleküllerinin adsorbe olduğunu, pH 1,2'de kaplı nanopartiküllerden salınan insülinin adsorbe olan insülin olduğu düşünüldü.
- İn vitro salım çalışmalarında kaplı nanopartiküllerin pH 1,2'de daha az insülin salması kaplamanın başarısını gösterdi.
- SBE- β -SD ile hazırlanan nanopartiküllerin TPP ile hazırlanan nanopartiküllere göre pH 1,2'de daha az insülin salması SBE- β -SD'nin kitosan ile daha güçlü bir çapraz bağlanma gerçekleştirilmesiyle ve SBE- β -SD'nin daha büyük ve dallanmış bir yapısı olduğundan sterik engel yaratarak insülinin salımını azalttığı düşünüldü.
- Kaplı ve kaplı olmayan nanopartiküllerinin salım kinetiklerinde fark görülmektedir.
- MTT testinde CS:SBE- β -SD nanopartiküllerin çalışılan her üç derişim için hücre canlılığı sonuçları CS:TPP nanopartiküllerine göre yüksek bulundu.
- İn vitro stabilite sonuçları kaplı nanopartiküllerin pH 1,2'de Kollicoat® MAE 100 P tabakası sayesinde korunduğunu gösterdi.
- Altı aylık stabilite sonuçları kaplama yapılmasının stabiliteyi iyileştirdiğini gösterirken SBE- β -SD ile hazırlanan nanopartiküllerin TPP ile hazırlanan nanopartiküllere göre stabilitesinin daha yüksek olduğunu gösterdi.

Tüm sonuçlar incelendiğinde enterik kaplamanın başarılı olduğu ve nanopartiküller hazırlanırken çapraz bağlayıcı olarak sıklıkla kullanılan TPP yerine SBE- β -SD'nin kullanılmasının nanopartiküllerin polidispersite indeksinin düşürülmesi ve stabilitesinin iyileştirilmesi bakımından uygun olduğu sonucuna varıldı.

6.2. Öneriler

- İnsülinin hazırlama işlemleri ve salım çalışmaları sırasında protein yapısında değişiklik olup olmadığı sirkular dikroizm gibi tekniklerle incelenerek kontrol edilmelidir.
- İn vitro salım çalışmalarında Humulin®'nin salımı da yapıp nanopartiküllerden insülin salım sonuçları ile karşılaştırılabilir.

- Liyofilizasyon işlemi; uygun kriyoprotektan tipi, yüzdesi, dondurma sıcaklığı ve süresi gibi çeşitli faktörler detaylı olarak incelenerek optimize edilebilir.
- Sitotoksik değerlendirme için enterik kaplı nanopartiküllerin DMEM içerisinde dağıtılması düşük oranda etanol veya DMSO kullanarak sağlanmalı ve MTT testleri tekrar edilmelidir.
- Test çalışmamızda elde edilen verilerin diyabetik sıçanlarda yapılacak in vivo çalışmalar ile desteklenmesi uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

- A. Mumuni, M., E. Calister, U., Aminu, N., C. Franklin, K., Musiliu Oluseun, A., Usman, M., Abdulmumuni, B., Y. James, O., C. Ofokansi, K., and A. Anthony, A. (2020). Mucin-grafted polyethylene glycol microparticles enable oral insulin delivery for improving diabetic treatment. *Applied Sciences*, 10(8), 2649.
- Abbasnezhad, N., Zirak, N., Shirinbayan, M., Kouidri, S., Salahinejad, E., Tcharkhtchi, A., and Bakir, F. (2021). Controlled release from polyurethane films: Drug release mechanisms. *Journal of applied polymer science*, 138(12), 50083.
- Abdel-Moneim, A., and Ramadan, H. (2022). Novel strategies to oral delivery of insulin: Current progress of nanocarriers for diabetes management. *Drug development research*, 83(2), 301-316.
- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., and Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Advanced drug delivery reviews*, 58(15), 1688-1713.
- Acharyulu, S. R., Gomathi, T., and Sudha, P. (2013). Physico-chemical characterization of cross linked chitosan-polyacrylonitrile polymer blends. *Der Pharmacia Lettre*, 5(2), 354-363.
- Adeoye, O., and Cabral-Marques, H. (2017). Cyclodextrin nanosystems in oral drug delivery: a mini review. *International journal of pharmaceutics*, 531(2), 521-531.
- Agardan, N. B. M. (2020). Studies on the formulation optimization and controlled ionic gelation of chitosan nanoparticles using TPP-HP-[beta]-CD inclusion complex. *Journal of the Faculty of Pharmacy of Istanbul University*, 50(1), 54-60.
- Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., and Aminabhavi, T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of controlled release*, 100(1), 5-28.
- Ahmad, A., Ansari, M. M., Mishra, R. K., Kumar, A., Vyawahare, A., Verma, R. K., Raza, S. S., and Khan, R. (2021). Enteric-coated gelatin nanoparticles mediated oral delivery of 5-aminosalicylic acid alleviates severity of DSS-induced ulcerative colitis. *Materials Science and Engineering: C*, 119, 111582.
- Ahmad, K. (2014). Insulin sources and types: a review of insulin in terms of its mode on diabetes mellitus. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 34(2), 234-237.
- Ahmed, T. A., and Aljaeid, B. M. (2016). Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug design, development and therapy*, 10, 483.
- Alai, M. S., Lin, W. J., and Pingale, S. S. (2015). Application of polymeric nanoparticles and micelles in insulin oral delivery. *Journal of food and drug analysis*, 23(3), 351-358.

- Alvi, Z., Akhtar, M., Mahmood, A., Nazir, I., Sadaquat, H., Ijaz, M., Syed, S. K., Waqas, M. K., and Wang, Y. (2021). Enhanced Oral Bioavailability of Epalrestat SBE7- β -CD Complex Loaded Chitosan Nanoparticles: Preparation, Characterization and in-vivo Pharmacokinetic Evaluation. *International journal of nanomedicine*, 16, 8353.
- Amado, J. R. R., Prada, A. L., Duarte, J. L., Keita, H., da Silva, H. R., Ferreira, A. M., Sosa, E. H., and Carvalho, J. C. T. (2017). Development, stability and in vitro delivery profile of new loratadine-loaded nanoparticles. *Saudi pharmaceutical journal*, 25(8), 1158-1168.
- Andreani, T., de Souza, A. L. R., Kiill, C. P., Lorenzón, E. N., Fanguero, J. F., Calpena, A. C., Chaud, M. V., Garcia, M. L., Gremião, M. P. D., and Silva, A. M. (2014). Preparation and characterization of PEG-coated silica nanoparticles for oral insulin delivery. *International journal of pharmaceutics*, 473(1-2), 627-635.
- Ansari, M. J., Anwer, M. K., Jamil, S., Al-Shdefat, R., Ali, B. E., Ahmad, M. M., and Ansari, M. N. (2016). Enhanced oral bioavailability of insulin-loaded solid lipid nanoparticles: pharmacokinetic bioavailability of insulin-loaded solid lipid nanoparticles in diabetic rats. *Drug delivery*, 23(6), 1972-1979.
- Arai, K., Takei, T., Okumura, M., Watanabe, S., Amagai, Y., Asahina, Y., ... and Iwaoka, M. (2017). Preparation of selenoinsulin as a long-lasting insulin analogue. *Angewandte Chemie*, 129(20), 5614-5618.
- Arora, A., Aggarwal, G., Singh, T. G., Singh, M., Arora, G., and Nagpal, M. (2019). Inclusion complexes of atorvastatin calcium–sulfobutyl ether β cyclodextrin with enhanced hypolipidemic activity. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(11), 060-068.
- Arpaç, B., Gökberk, B. D., Küçüktürkmen, B., Gündüz, I. Ö., Palabıyık, İ. M., and Bozkır, A. (2022). Design and in vitro/in vivo Evaluation of Polyelectrolyte Complex Nanoparticles Filled in Enteric-Coated Capsules for Oral Delivery of Insulin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Asal, H. A., Shoueir, K. R., El-Hagrasy, M. A., and Toson, E. A. (2022). Controlled synthesis of in-situ gold nanoparticles onto chitosan functionalized PLGA nanoparticles for oral insulin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, 2188-2196.
- Avadi, M. R., Sadeghi, A. M. M., Mohammadpour, N., Abedin, S., Atyabi, F., Dinarvand, R., and Rafiee-Tehrani, M. (2010). Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1), 58-63.
- Avadi, M., Sadeghi, A., Mohammadpour Dounighi, N., Dinarvand, R., Atyabi, F., and Rafiee-Tehrani, M. (2011). Ex vivo evaluation of insulin nanoparticles using chitosan and arabic gum. *International Scholarly Research Notices*, 2011.
- Azevedo, J., Sizilio, R., Brito, M., Costa, A., Serafini, M., Araújo, A., Santos, M., Lira, A., and Nunes, R. (2011). Physical and chemical characterization insulin-loaded chitosan-TPP nanoparticles. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 106(3), 685-689.

- Bahman, F., Greish, K., and Taurin, S. (2019). Nanotechnology in insulin delivery for management of diabetes. *Pharmaceutical nanotechnology*, 7(2), 113-128.
- Bayat, A., Larijani, B., Ahmadian, S., Junginger, H. E., and Rafiee-Tehrani, M. (2008). Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and its quaternized derivatives. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 4(2), 115-120.
- Baynes, H. W. (2015). Classification, pathophysiology, diagnosis and management of diabetes mellitus. *J diabetes metab*, 6(5), 1-9.
- Berthomieu, C., and Hienerwadel, R. (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis research*, 101(2), 157-170.
- Bhattacharyya, A., Mukherjee, D., Mishra, R., and Kundu, P. P. (2016). Development of pH sensitive polyurethane–alginate nanoparticles for safe and efficient oral insulin delivery in animal models. *RSC advances*, 6(48), 41835-41846.
- Bhattacharyya, A., Mukherjee, D., Mishra, R., and Kundu, P. P. (2017). Preparation of polyurethane–alginate/chitosan core shell nanoparticles for the purpose of oral insulin delivery. *European polymer journal*, 92, 294-313.
- Borderwala, K., Rathod, S., Yadav, S., Vyas, B., and Shah, P. (2021). Eudragit S-100 surface engineered nanostructured lipid carriers for colon targeting of 5-fluorouracil: optimization and in vitro and in vivo characterization. *Aaps Pharmscitech*, 22(6), 1-15.
- Brogden, R. N., and Heel, R. (1987). Human insulin. *Drugs*, 34(3), 350-371.
- Bruno, B. J., Miller, G. D., and Lim, C. S. (2013). Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. *Therapeutic delivery*, 4(11), 1443-1467.
- Builders, P. F., Kunle, O. O., Okpaku, L. C., Builders, M. I., Attama, A. A., and Adikwu, M. U. (2008). Preparation and evaluation of mucinated sodium alginate microparticles for oral delivery of insulin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(3), 777-783.
- Butalia, S., Kaplan, G. G., Khokhar, B., and Rabi, D. M. (2016). Environmental risk factors and type 1 diabetes: past, present, and future. *Canadian journal of diabetes*, 40(6), 586-593.
- Camlik, G., Ozakca, I., Bilakaya, B., Ozcelikay, A. T., Velaro, A. J., Wasnik, S., and Degim, I. T. (2022). Development of composite carbon quantum dots-insulin formulation for oral administration. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 76, 103833.
- Calvo, P., Remuñan-López, C., Vila-Jato, J. L., and Alonso, M. J. (1997). Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharmaceutical research*, 14(10), 1431-1436.
- Carrier, R. L., Miller, L. A., and Ahmed, I. (2007). The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of controlled release*, 123(2), 78-99.

- Chaturvedi, K., Ganguly, K., Nadagouda, M. N., and Aminabhavi, T. M. (2013). Polymeric hydrogels for oral insulin delivery. *Journal of controlled release*, 165(2), 129-138.
- Chen, M.C., Sonaje, K., Chen, K.-J., and Sung, H.-W. (2011). A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. *Biomaterials*, 32(36), 9826-9838.
- Chen, S., Guo, F., Deng, T., Zhu, S., Liu, W., Zhong, H., Yu, H., Luo, R., and Deng, Z. (2017). Eudragit S100-coated chitosan nanoparticles co-loading tat for enhanced oral colon absorption of insulin. *Aaps Pharmscitech*, 18(4), 1277-1287.
- Chikanbanjar, N., Semwal, N., and Jyakhwa, U. (2020). A review article on analytical method validation. *J. Pharm. Innov*, 1, 48-58.
- Choi, C., Nam, J. P., and Nah, J. W. (2016). Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 33, 1-10.
- Choonara, B. F., Choonara, Y. E., Kumar, P., Bijukumar, D., du Toit, L. C., and Pillay, V. (2014). A review of advanced oral drug delivery technologies facilitating the protection and absorption of protein and peptide molecules. *Biotechnology advances*, 32(7), 1269-1282.
- Cikrikci, S., Mert, B., and Oztop, M. H. (2018). Development of pH sensitive alginate/gum tragacanth based hydrogels for oral insulin delivery. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(44), 11784-11796.
- Cilek, A., Celebi, N., Tırnaklı, F., and Tay, A. (2005). A lecithin-based microemulsion of rh-insulin with aprotinin for oral administration: Investigation of hypoglycemic effects in non-diabetic and STZ-induced diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 298(1), 176-185.
- Clogston, J. D., and Patri, A. K. (2011). Zeta potential measurement. In *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery* (s. 63-70): Springer.
- Correia, M., Neves-Petersen, M. T., Jeppesen, P. B., Gregersen, S., and Petersen, S. B. (2012). UV-light exposure of insulin: pharmaceutical implications upon covalent insulin dityrosine dimerization and disulphide bond photolysis. *PloS one*, 7(12), e50733.
- Costello, R. A., Nicolas, S., and Shivkumar, A. Continuing Education Activity.
- Cui, F., Zhang, L., Zheng, J., and Kawashima, Y. (2004). A study of insulin-chitosan complex nanoparticles used for oral administration. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 14(6), 435-439.
- Çankaya, N., ve Sökmen, Ö. (2016). Kitosan-kil biyonanokompozitleri. *Politeknik Dergisi*, 19(3), 283-295.
- D'Souza, B., Bhowmik, T., Uddin, M. N., Oettinger, C., and D'Souza, M. (2015). Development of β -cyclodextrin-based sustained release microparticles for oral insulin delivery. *Drug development and industrial pharmacy*, 41(8), 1288-1293.

- Daeihamed, M., Dadashzadeh, S., Haeri, A., and Faghieh Akhlaghi, M. (2017). Potential of liposomes for enhancement of oral drug absorption. *Current drug delivery*, 14(2), 289-303.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., and Mozafari, M. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57.
- De Gaetano, F., d'Avanzo, N., Mancuso, A., De Gaetano, A., Paladini, G., Caridi, F., Venuti, V., Paolino, D., and Ventura, C. A. (2022). Chitosan/Cyclodextrin nanospheres for potential nose-to-brain targeting of idebenone. *Pharmaceutics*, 15(10), 1206.
- De Marchi, J., Cé, R., Onzi, G., Alves, A., Santarém, N., da Silva, A. C., Pohlmann, A., Guterres, S., and Ribeiro, A. (2022). IgG functionalized polymeric nanoparticles for oral insulin administration. *International journal of pharmaceutics*, 121829.
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., ... and Weiss, R. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature reviews Disease primers*, 1(1), 1-22.
- Degim, Z., Ünal, N., Eşsiz, D., and Abbasoglu, U. (2004). The effect of various liposome formulations on insulin penetration across Caco-2 cell monolayer. *Life sciences*, 75(23), 2819-2827.
- Değim, Z., Değim, T., Acartürk, F., Erdoğan, D., Özoğul, C., and Köksal, M. (2005). Rectal and vaginal administration of insulin–chitosan formulations: An experimental study in rabbits. *Journal of drug targeting*, 13(10), 563-572.
- Dhanasekaran, S., Rameshthangam, P., Venkatesan, S., Singh, S. K., and Vijayan, S. R. (2018). In vitro and in silico studies of chitin and chitosan based nanocarriers for curcumin and insulin delivery. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(10), 4095-4113.
- Di Santo, M. C., D'Antoni, C. L., Rubio, A. P. D., Alaimo, A., and Pérez, O. E. (2021). Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles designed to encapsulate polyphenolic compounds for biomedical and pharmaceutical applications– A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 142, 111970.
- DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., and Oram, R. A. (2018). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 391(10138), 2449-2462.
- Diop, M., Auberval, N., Viciglio, A., Langlois, A., Bietiger, W., Mura, C., Peronet, C., Bekel, A., David, D. J., and Zhao, M. (2015). Design, characterisation, and bioefficiency of insulin–chitosan nanoparticles after stabilisation by freeze-drying or cross-linking. *International journal of pharmaceutics*, 491(1-2), 402-408.
- Divya, K., and Jisha, M. (2018). Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental Chemistry Letters*, 16(1), 101-112.

- Dupeyrón, D., González, M., Sáez, V., Ramón, J., and Rieumont, J. (2005). *Nano-encapsulation of protein using an enteric polymer as carrier*. Paper presented at the IEE Proceedings-Nanobiotechnology.
- Edson, E. J., Bracco, O. L., Vambergue, A., and Koivisto, V. (2010). Managing diabetes during pregnancy with insulin lispro: a safe alternative to human insulin. *Endocrine Practice*, 16(6), 1020-1027.
- El-Dakroury, W. A., Zewail, M. B., and Amin, M. M. (2022). Design, optimization, and in-vivo performance of glipizide-loaded O-carboxymethyl chitosan nanoparticles in insulin resistant/type 2 diabetic rat model. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 104040.
- El Leithy, E. S., Abdel-Bar, H. M., and Ali, R. A.-M. (2019). Folate-chitosan nanoparticles triggered insulin cellular uptake and improved in vivo hypoglycemic activity. *International journal of pharmaceutics*, 571, 118708.
- El Maalouf, I. R., Capoccia, K., and Priefer, R. (2022). Non-invasive ways of administering insulin. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 102478.
- Erel, G., Kotmakçı, M., Akbaba, H., Karadağlı, S. S., and Kantarcı, A. G. (2016). Nanoencapsulated chitosan nanoparticles in emulsion-based oral delivery system: In vitro and in vivo evaluation of insulin loaded formulation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 36, 161-167.
- Erzengin, S., Guler, E., Eser, E., Polat, E. B., Gunduz, O., and Cam, M. E. (2022). In vitro and in vivo evaluation of 3D printed sodium alginate/polyethylene glycol scaffolds for sublingual delivery of insulin: Preparation, characterization, and pharmacokinetics. *International journal of biological macromolecules*, 204, 429-440.
- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., and Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 90, 21-27.
- Ferreira Tomaz, A., Sobral de Carvalho, S. M., Cardoso Barbosa, R., L. Silva, S. M., Sabino Gutierrez, M. A., B. de Lima, A. G., and L. Fook, M. V. (2018). Ionically crosslinked chitosan membranes used as drug carriers for cancer therapy application. *Materials*, 11(10), 2051.
- Fonte, P., Araújo, F., Silva, C., Pereira, C., Reis, S., Santos, H. A., and Sarmento, B. (2015). Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: *Revisited approaches*. *Biotechnology advances*, 33(6), 1342-1354.
- Fonte, P., Reis, S., and Sarmento, B. (2016). Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Journal of controlled release*, 225, 75-86.
- Fotakis, G., and Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters*, 160(2), 171-177.

- Gaidhani, K. A., Harwalkar, M., Bhambere, D., and Nirgude, P. S. (2015). Lyophilization/freeze drying—a review. *World journal of pharmaceutical research*, 4(8), 516-543.
- Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., and Martín, C. (2020). Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6275.
- Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C., and McCarron, P. (2005). Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44(2-3), 65-73.
- Garnock-Jones, K. P., and Plosker, G. L. (2009). Insulin glulisine. *Drugs*, 69(8), 1035-1057.
- Garrait, G., Beyssac, E., and Subirade, M. (2014). Development of a novel drug delivery system: chitosan nanoparticles entrapped in alginate microparticles. *Journal of microencapsulation*, 31(4), 363-372.
- Gedawy, A., Martinez, J., Al-Salami, H., and Dass, C. R. (2018). Oral insulin delivery: existing barriers and current counter-strategies. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 70(2), 197-213.
- Gorai, B., and Vashisth, H. (2022). Progress in simulation studies of insulin structure and function. *Frontiers in Endocrinology*, 13.
- Govindasamy, G., Krishnamoorthy, K., and Rajappan, M. (2013). Selection of excipients for nanoparticles formulations of nateglinide through drug-excipients compatibility study. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 371-377.
- Hamman, J. H., Enslin, G. M., and Kotzé, A. F. (2005). Oral delivery of peptide drugs. *BioDrugs*, 19(3), 165-177.
- Han, L., Zhao, Y., Yin, L., Li, R., Liang, Y., Huang, H., Pan, S., Wu, C., and Feng, M. (2012). Insulin-loaded pH-sensitive hyaluronic acid nanoparticles enhance transcellular delivery. *Aaps Pharmscitech*, 13(3), 836-845.
- He, Z. X., Zhou, Z. W., Yang, Y., Yang, T., Pan, S. Y., Qiu, J. X., and Zhou, S. F. (2015). Overview of clinically approved oral antidiabetic agents for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 42(2), 125-138.
- Hejjaji, E. M., Smith, A. M., and Morris, G. A. (2018). Evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan nanoparticles prepared using different chitosan to tripolyphosphate (CS: TPP) ratios. *International journal of biological macromolecules*, 120, 1610-1617.
- Herdiana, Y., Wathoni, N., Shamsuddin, S., and Muchtaridi, M. (2021). Drug release study of the chitosan-based nanoparticles. *Heliyon*, e08674.
- Hirsch, I. B. (2005). Insulin analogues. *New England Journal of Medicine*, 352(2), 174-183.

- Homayun, B., Lin, X., and Choi, H. J. (2019). Challenges and recent progress in oral drug delivery systems for biopharmaceuticals. *Pharmaceutics*, 11(3), 129.
- Hong, S., Choi, D. W., Kim, H. N., Park, C. G., Lee, W., and Park, H. H. (2020). Protein-based nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 12(7), 604.
- Hu, Q., and Luo, Y. (2018). Recent advances of polysaccharide-based nanoparticles for oral insulin delivery. *International journal of biological macromolecules*, 120, 775-782.
- Huang, X., Du, Y.-Z., Yuan, H., and Hu, F.-Q. (2009). Preparation and pharmacodynamics of low-molecular-weight chitosan nanoparticles containing insulin. *Carbohydrate polymers*, 76(3), 368-373.
- Huang, X., Han, S., Chen, Z., Zhao, L., Wang, C., Guo, Q., Li, Y., and Sun, Y. (2021). Layered double hydroxide modified with deoxycholic and hyaluronic acids for efficient oral insulin absorption. *International journal of nanomedicine*, 16, 7861.
- Ilonen, J., Lempainen, J., and Veijola, R. (2019). The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(11), 635-650.
- Ismail, R., and Csoka, I. (2017). Novel strategies in the oral delivery of antidiabetic peptide drugs—Insulin, GLP 1 and its analogs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 115, 257-267.
- Iyer, G., Dyawanapelly, S., Jain, R., and Dandekar, P. (2022). An overview of oral insulin delivery strategies (OIDS). *International journal of biological macromolecules*.
- Jacob, S., and Nair, A. B. (2018). Cyclodextrin complexes: Perspective from drug delivery and formulation. *Drug development research*, 79(5), 201-217.
- Jaipal, A., Pandey, M., Charde, S., Raut, P., Prasanth, K., and Prasad, R. (2015). Effect of HPMC and mannitol on drug release and bioadhesion behavior of buccal discs of buspirone hydrochloride: In-vitro and in-vivo pharmacokinetic studies. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 315-326.
- Jansook, P., Ogawa, N., and Loftsson, T. (2018). Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International journal of pharmaceutics*, 535(1-2), 272-284.
- Jhaveri, J., Raichura, Z., Khan, T., Momin, M., and Omri, A. (2021). Chitosan nanoparticles—insight into properties, functionalization and applications in drug delivery and theranostics. *Molecules*, 26(2), 272.
- Johns, E. C., Denison, F. C., Norman, J. E., and Reynolds, R. M. (2018). Gestational diabetes mellitus: mechanisms, treatment, and complications. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 29(11), 743-754.
- Kadrić, S. I., Ćesić, A. K., and Dujčić, T. (2021). Pharmacogenetics of new classes of antidiabetic drugs. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(6), 659.

- Kamei, N., Khafagy, E.-S., Hirose, J., and Takeda-Morishita, M. (2017). Potential of single cationic amino acid molecule "Arginine" for stimulating oral absorption of insulin. *International journal of pharmaceutics*, 521(1-2), 176-183.
- Karamanou, M., Protogerou, A., Tsoucalas, G., Androutsos, G., and Poulakou-Rebelakou, E. (2016). Milestones in the history of diabetes mellitus: The main contributors. *World journal of diabetes*, 7(1), 1.
- Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., Jacobsen, L. M., Schatz, D. A., and Lernmark, Å. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature reviews Disease primers*, 3(1), 1-17.
- Keating, G. M. (2012). Insulin detemir. *Drugs*, 72(17), 2255-2287.
- Kerr, D., Wizemann, E., Sensi, J., Zacho, M., and Ampudia-Blasco, F. J. (2013). Stability and performance of rapid-acting insulin analogs used for continuous subcutaneous insulin infusion: a systematic review. *Journal of diabetes science and technology*, 7(6), 1595-1606.
- Kharroubi, A. T., and Darwish, H. M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World journal of diabetes*, 6(6), 850.
- Kim, J. U., Shahbaz, H. M., Lee, H., Kim, T., Yang, K., Roh, Y. H., and Park, J. (2020). Optimization of phytic acid-crosslinked chitosan microspheres for oral insulin delivery using response surface methodology. *International journal of pharmaceutics*, 588, 119736.
- Kim, N. A., Choi, D. H., Lim, J. Y., Kim, K. H., Lim, D. G., Lee, E., Park, E.-S., and Jeong, S. H. (2014). Investigation of polymeric excipients for dutasteride solid dispersion and its physicochemical characterization. *Archives of pharmacological research*, 37(2), 214-224.
- Kouchak, M., and Azarpanah, A. (2015). Preparation and in vitro evaluation of chitosan nanoparticles containing diclofenac using the ion-gelation method. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 10(2).
- Kranz, H., and Gutsche, S. (2009). Evaluation of the drug release patterns and long term stability of aqueous and organic coated pellets by using blends of enteric and gastrointestinal insoluble polymers. *International journal of pharmaceutics*, 380(1-2), 112-119.
- Krauland, A. H., and Alonso, M. J. (2007). Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as macromolecular drug delivery system. *International journal of pharmaceutics*, 340(1-2), 134-142.
- Kumar, S., and Koh, J. (2012). Physicochemical, optical and biological activity of chitosan-chromone derivative for biomedical applications. *International journal of molecular sciences*, 13(5), 6102-6116.
- Leroux-Stewart, J., Rabasa-Lhoret, R., and Chiasson, J. L. (2015). α -Glucosidase inhibitors. *International textbook of diabetes mellitus*, 673-685.

- Li, P., Tan, A., Prestidge, C. A., Nielsen, H. M., and Müllertz, A. (2014). Self-nanoemulsifying drug delivery systems for oral insulin delivery: in vitro and in vivo evaluations of enteric coating and drug loading. *International journal of pharmaceutics*, 477(1-2), 390-398.
- Li, S., Qin, T., Chen, T., Wang, J., and Zeng, Q. (2021). Poly (vinyl alcohol)/poly (hydroxypropyl methacrylate-co-methacrylic acid) as pH-sensitive semi-IPN hydrogels for oral insulin delivery: Preparation and characterization. *Iranian Polymer Journal*, 30(4), 343-353.
- Lin, Y.-H., Chen, C.-T., Liang, H.-F., Kulkarni, A. R., Lee, P.-W., Chen, C.-H., and Sung, H.-W. (2007). Novel nanoparticles for oral insulin delivery via the paracellular pathway. *Nanotechnology*, 18(10), 105102.
- Liu, F., Antoniou, J., Li, Y., Majeed, H., Liang, R., Ma, Y., Ma, J., and Zhong, F. (2016). Chitosan/sulfobutylether- β -cyclodextrin nanoparticles as a potential approach for tea polyphenol encapsulation. *Food Hydrocolloids*, 57, 291-300.
- Loftsson, T., and Duchêne, D. (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International journal of pharmaceutics*, 329(1-2), 1-11.
- Loutfy, S. A., El-Din, H. M. A., Elberry, M. H., Allam, N. G., Hasanin, M., and Abdellah, A. M. (2016). Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of chitosan nanoparticles: in vitro liver cancer model. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7(3), 035008.
- Ma, X., Qiao, C., Wang, X., Yao, J., and Xu, J. (2019). Structural characterization and properties of polyols plasticized chitosan films. *International journal of biological macromolecules*, 135, 240-245.
- Macedo, A., Filipe, P., Thomé, N. G., Vieira, J., Oliveira, C., Teodósio, C., ... and Fonte, P. (2020). A brief overview of the oral delivery of insulin as an alternative to the parenteral delivery. *Current Molecular Medicine*, 20(2), 134-143.
- Mahdizadeh Barzoki, Z., Emam-Djomeh, Z., Rafiee-Tehrani, M., Mortazavian, E., and Moosavi Movahedi, A. A. (2019). Optimization and development of insulin nanoparticles by new thiolated chitosan derivative with ionic gelation method using a model-based methodology. *Journal of Food and Bioprocess Engineering*, 2(1), 25-34.
- Mahjub, R., Dorkoosh, F. A., Amini, M., Khoshayand, M. R., and Rafiee-Tehrani, M. (2011). Preparation, statistical optimization, and in vitro characterization of insulin nanoparticles composed of quaternized aromatic derivatives of chitosan. *Aaps Pharmscitech*, 12(4), 1407-1419.
- Mahjub, R., Radmehr, M., Dorkoosh, F. A., Ostad, S. N., and Rafiee-Tehrani, M. (2014). Lyophilized insulin nanoparticles prepared from quaternized N-aryl derivatives of chitosan as a new strategy for oral delivery of insulin: in vitro, ex vivo and in vivo characterizations. *Drug development and industrial pharmacy*, 40(12), 1645-1659.
- Makhlof, A., Tozuka, Y., and Takeuchi, H. (2011). Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(5), 445-451.

- Mansoor, S., Kondiah, P. P., Choonara, Y. E., and Pillay, V. (2019). Polymer-based nanoparticle strategies for insulin delivery. *Polymers*, 11(9), 1380.
- Manu, P., Rogozea, L. M., and Cernea, S. (2021). Pharmacological management of diabetes mellitus: a century of expert opinions in cecil textbook of medicine. *American Journal of Therapeutics*, 28(4), e397-e410.
- Martínez-López, A., Carvajal-Millan, E., Sotelo-Cruz, N., Micard, V., Rascón-Chu, A., López-Franco, Y., Lizardi-Mendoza, J., and Canett-Romero, R. (2019). Enzymatically cross-linked arabinoxylan microspheres as oral insulin delivery system. *International journal of biological macromolecules*, 126, 952-959.
- Mathieu, C., Gillard, P., and Benhalima, K. (2017). Insulin analogues in type 1 diabetes mellitus: getting better all the time. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(7), 385-399.
- McIntyre, H. D., Catalano, P., Zhang, C., Desoye, G., Mathiesen, E. R., and Damm, P. (2019). Gestational diabetes mellitus. *Nature reviews Disease primers*, 5(1), 1-19.
- Meneguín, A. B., Silvestre, A. L. P., Sposito, L., de Souza, M. P. C., Sabio, R. M., Araujo, V. H. S., Cury, B. S. F., and Chorilli, M. (2021). The role of polysaccharides from natural resources to design oral insulin micro-and nanoparticles intended for the treatment of Diabetes mellitus: A review. *Carbohydrate polymers*, 256, 117504.
- Mikulska, A., Filipowska, J., Osyczka, A. M., Nowakowska, M., and Szczubiałka, K. (2015). Osteoinductive activity of insulin-functionalized cell culture surfaces obtained using diazonium chemistry. *Frontiers in Chemistry*, 2, 117.
- Millotti, G., Perera, G., Vigl, C., Pickl, K., Sinner, F. M., and Bernkop-Schnürch, A. (2011). The use of chitosan-6-mercaptopnicotinic acid nanoparticles for oral peptide drug delivery. *Drug delivery*, 18(3), 190-197.
- Mobasser, M., Shirmohammadi, M., Amiri, T., Vahed, N., Fard, H. H., and Ghojaziadeh, M. (2020). Prevalence and incidence of type 1 diabetes in the world: a systematic review and meta-analysis. *Health promotion perspectives*, 10(2), 98.
- Mohammadi, G., Mirzaeei, S., Taghe, S., and Mohammadi, P. (2019). Preparation and evaluation of Eudragit® L100 nanoparticles loaded impregnated with KT tromethamine loaded PVA-HEC insertions for ophthalmic drug delivery. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(4), 593.
- Mohanty, R. R., and Das, S. (2017). Inhaled insulin-current direction of insulin research. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDDR*, 11(4), OE01.
- Morocco, C. (2013). Sodium tripolyphosphate (STPP) as a novel corrosion inhibitor for mild steel in 1 M HCl. *Journal of optoelectronics and advanced materials*, 15(5-6), 451-456.
- Morris, G. A., Castile, J., Smith, A., Adams, G. G., and Harding, S. E. (2011). The effect of prolonged storage at different temperatures on the particle size distribution of tripolyphosphate (TPP)-chitosan nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, 84(4), 1430-1434.

- Mukhopadhyay, P., Mishra, R., Rana, D., and Kundu, P. P. (2012). Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: a review. *Progress in polymer science*, 37(11), 1457-1475.
- Mukhopadhyay, P., Sarkar, K., Chakraborty, M., Bhattacharya, S., Mishra, R., and Kundu, P. (2013). Oral insulin delivery by self-assembled chitosan nanoparticles: in vitro and in vivo studies in diabetic animal model. *Materials Science and Engineering: C*, 33(1), 376-382.
- Muntoni, E., Marini, E., Ahmadi, N., Milla, P., Ghè, C., Bargoni, A., ... and Battaglia, L. (2019). Lipid nanoparticles as vehicles for oral delivery of insulin and insulin analogs: Preliminary ex vivo and in vivo studies. *Acta diabetologica*, 56(12), 1283-1292.
- Mutlu-Agardan, N. B., and Han, S. (2021). In vitro and in vivo evaluations on nanoparticle and phospholipid hybrid nanoparticles with absorption enhancers for oral insulin delivery. *Pharmaceutical Development and Technology*, 26(2), 157-166.
- Nagase, Y., Hirata, M., Wada, K., Arima, H., Hirayama, F., Irie, T., Kikuchi, M., and Uekama, K. (2001). Improvement of some pharmaceutical properties of DY-9760e by sulfobutyl ether β -cyclodextrin. *International journal of pharmaceuticals*, 229(1-2), 163-172.
- Nair, R. S., Morris, A., Billa, N., and Leong, C.-O. (2019). An evaluation of curcumin-encapsulated chitosan nanoparticles for transdermal delivery. *Aaps Pharmscitech*, 20(2), 1-13.
- Nejabat, M., Kalani, M. R., Nejabat, M., and Hadizadeh, F. (2021). Molecular dynamic and in vitro evaluation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles as an insulin delivery system at two different pH values. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-9.
- Nguyen, M. N., Tran, P. H., and Tran, T. T. (2019). A single-layer film coating for colon-targeted oral delivery. *International journal of pharmaceuticals*, 559, 402-409.
- Ogoshi, T., and Harada, A. (2008). Chemical sensors based on cyclodextrin derivatives. *Sensors*, 8(8), 4961-4982.
- Oiknine, R., Bernbaum, M., and Mooradian, A. D. (2005). A critical appraisal of the role of insulin analogues in the management of diabetes mellitus. *Drugs*, 65(3), 325-340.
- Olorunsola, E. O., Udoh, I. E., Ekott, M. B., Alozie, M. F., and Davies, K. G. (2022). Biopharmaceutics and clinical outcomes of emerging dosage forms of insulin: A systematic review. *Diabetes Epidemiology and Management*, 100120.
- Omar Zaki, S. S., Ibrahim, M. N., and Katas, H. (2015). Particle size affects concentration-dependent cytotoxicity of chitosan nanoparticles towards mouse hematopoietic stem cells. *Journal of Nanotechnology*, 2015.
- Pandey, A. (2021). Cyclodextrin-based nanoparticles for pharmaceutical applications: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(6), 4297-4310.

- Pang, H., Huang, X., Xu, Z. P., Chen, C., and Han, F. Y. (2022). Progress in oral insulin delivery by PLGA nanoparticles for the management of diabetes. *Drug Discovery Today*, 103393.
- Panigrahy, S. K., and Kumar, A. (2022). Biopolymeric nanocarrier: An auspicious system for oral delivery of Insulin. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 33(16), 2145-2164.
- Paschou, S. A., Papadopoulou-Marketou, N., Chrousos, G. P., and Kanaka-Gantenbein, C. (2018). On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Endocrine connections*, 7(1), R38-R46.
- Patel, M. M. (2013). Colon targeting: an emerging frontier for oral insulin delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 10(6), 731-739.
- Patel, S., Sen, A. K., Dash, D. K., Sadhu, P., Kumari, M., and Baile, S. B. (2021). *Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of Thiazolidinedione Derivative as Novel Antidiabetic Agents*. *Synthesis*, 33(35A).
- Patriota, Y. B. G., Arruda, I. E. S., de Jesus Oliveira, A. C., de Oliveira, T. C., Silva, E. d. L. V., Chaves, L. L., Ribeiro, F. d. O. S., da Silva, D. A., Soares, M. F. d. L. R., and Soares-Sobrinho, J. L. (2021). Synthesis of Eudragit® L100-coated chitosan-based nanoparticles for oral enoxaparin delivery. *International journal of biological macromolecules*, 193, 450-456.
- Peniche, H., and Peniche, C. (2011). Chitosan nanoparticles: a contribution to nanomedicine. *Polymer International*, 60(6), 883-889.
- Petersmann, A., Müller-Wieland, D., Müller, U. A., Landgraf, R., Nauck, M., Freckmann, G., Heinemann, L., and Schleicher, E. (2019). Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 127(S 01), S1-S7.
- Pickup, J. C., and Renard, E. (2008). Long-acting insulin analogs versus insulin pump therapy for the treatment of type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 31(Supplement_2), S140-S145.
- Pivari, F., Mingione, A., Brasacchio, C., and Soldati, L. (2019). Curcumin and type 2 diabetes mellitus: prevention and treatment. *Nutrients*, 11(8), 1837.
- Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., and Vickers, M. H. (2018). The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3342.
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., and Hübner, H. (2017). Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. In *Cell viability assays* (s. 1-17): Springer.

- Presas, E., McCartney, F., Sultan, E., Hunger, C., Nellen, S., Alvarez, C. V., Werner, U., Bazile, D., Brayden, D. J., and O'Driscoll, C. M. (2018). Physicochemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic analyses of amphiphilic cyclodextrin-based nanoparticles designed to enhance intestinal delivery of insulin. *Journal of controlled release*, 286, 402-414.
- Ramachandran, A. (2014). Know the signs and symptoms of diabetes. *The Indian journal of medical research*, 140(5), 579.
- Rathore, P., Mahor, A., Jain, S., Haque, A., and Kesharwani, P. (2020). Formulation development, in vitro and in vivo evaluation of chitosan engineered nanoparticles for ocular delivery of insulin. *RSC advances*, 10(71), 43629-43639.
- Ravi, S., Peh, K. K., Darwis, Y., Krishna Murthy, B., and Raghu Raj Singh, T. (2007). Development and validation of an HPLC–UV method for the determination of insulin in rat plasma: Application to pharmacokinetic study. *Chromatographia*, 66(9), 805-809.
- Rekha, M., and Sharma, C. P. (2013). Oral delivery of therapeutic protein/peptide for diabetes–future perspectives. *International journal of pharmaceuticals*, 440(1), 48-62.
- Renukuntla, J., Vadlapudi, A. D., Patel, A., Boddu, S. H., and Mitra, A. K. (2013). Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *International journal of pharmaceuticals*, 447(1-2), 75-93.
- Roy, L., and Bhattacharjee, M. (2020). Overview of novel routes of insulin: current status. *Int J Adv Med*, 7, 1597.
- Royatvand, S., Fallah Hoseini, H., Ezzatpanah, H., and Sekehchi, M. (2013). Determination of insulin concentration in camel milk using ultra violet–visible absorption spectroscopy. *Food Bioscience Technology*, 3, 53-60.
- Safdar, R., and Thanabalan, M. (2022). Developments in insulin delivery and potential of chitosan for controlled release application: A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 103873.
- Sahu, S. K. (2013). Development and evaluation of insulin incorporated nanoparticles for oral administration. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- Sajeesh, S., and Sharma, C. P. (2006). Cyclodextrin–insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery. *International journal of pharmaceuticals*, 325(1-2), 147-154.
- Sareen, R., Jain, N., Rajkumari, A., and Dhar, K. (2016). pH triggered delivery of curcumin from Eudragit-coated chitosan microspheres for inflammatory bowel disease: characterization and pharmacodynamic evaluation. *Drug delivery*, 23(1), 55-62.
- Sarmiento, B., Ferreira, D., Veiga, F., and Ribeiro, A. (2006a). Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate polymers*, 66(1), 1-7.

- Sarmiento, B., Ribeiro, A., Veiga, F., and Ferreira, D. (2006b). Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of insulin from nanoparticulate systems. *Biomedical Chromatography*, 20(9), 898-903.
- Sethi, A., Ahmad, M., Huma, T., Khalid, I., and Ahmad, I. (2021). Evaluation of Low Molecular Weight Cross Linked Chitosan Nanoparticles, to Enhance the Bioavailability of 5-Flourouracil. *Dose-Response*, 19(2), 15593258211025353.
- Seyam, S., Nordin, N. A., and Alfatama, M. (2020). Recent progress of chitosan and chitosan derivatives-based nanoparticles: pharmaceutical perspectives of oral insulin delivery. *Pharmaceuticals*, 13(10), 307.
- Sharda, D., Attri, K., Kaur, P., and Choudhury, D. (2021). Protection of lead-induced cytotoxicity using paramagnetic nickel–insulin quantum clusters. *RSC advances*, 11(40), 24656-24668.
- Shekunov, B. Y., Chattopadhyay, P., Tong, H. H., and Chow, A. H. (2007). Particle size analysis in pharmaceuticals: principles, methods and applications. *Pharmaceutical research*, 24(2), 203-227.
- Silva, E. d. L. V., de Jesus Oliveira, A. C., Patriota, Y. B. G., Ribeiro, A. J., Veiga, F., Hallwass, F., Silva-Filho, E. C., da Silva, D. A., Soares, M. F. d. L. R., and Wanderley, A. G. (2019). Solvent-free synthesis of acetylated cashew gum for oral delivery system of insulin. *Carbohydrate polymers*, 207, 601-608.
- Singh, M. N., Hemant, K. S. Y., Ram, M., and Shivakumar, H. G. (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in pharmaceutical sciences*, 5(2), 65.
- Sonaje, K., Lin, Y. H., Juang, J. H., Wey, S. P., Chen, C. T., and Sung, H. W. (2009). In vivo evaluation of safety and efficacy of self-assembled nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials*, 30(12), 2329-2339.
- Song, M., Wang, H., Chen, K., Zhang, S., Yu, L., Elshazly, E. H., ... and Gong, R. (2018). Oral insulin delivery by carboxymethyl- β -cyclodextrin-grafted chitosan nanoparticles for improving diabetic treatment. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup3), S774-S782.
- Song, R. (2016). Mechanism of metformin: a tale of two sites. *Diabetes care*, 39(2), 187-189.
- Sonia, T. A., and Sharma, C. P. (2012). An overview of natural polymers for oral insulin delivery. *Drug discovery today*, 17(13-14), 784-792.
- Srikanth, N. A., Nair, R. S., and Siddharth, K. S. (2020, November). A Review on Comprehensive analysis in curbing Diabetes Mellitus with the aid of Nanotools. In *2020 IEEE 15th International Conference on Industrial and Information Systems (ICIIS)* (pp. 300-305). IEEE.
- Su, Z., Wu, S., Zhang, H., and Feng, Y. (2010). Development and validation of an improved Bradford method for determination of insulin from chitosan nanoparticulate systems. *Pharmaceutical Biology*, 48(9), 966-973.

- Sun, L., Liu, Z., Tian, H., Le, Z., Liu, L., Leong, K. W., ... and Chen, Y. (2018). Scalable manufacturing of enteric encapsulation systems for site-specific oral insulin delivery. *Biomacromolecules*, 20(1), 528-538.
- Szente, L., and Fenyvesi, É. (2017). Cyclodextrin-lipid complexes: cavity size matters. *Structural Chemistry*, 28(2), 479-492.
- Tan, M. L., Choong, P. F., and Dass, C. R. (2010). Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Peptides*, 31(1), 184-193.
- Tan, S. Y., Wong, J. L. M., Sim, Y. J., Wong, S. S., Elhassan, S. A. M., Tan, S. H., Lim, G. P. L., Tay, N. W. R., Annan, N. C., and Bhattamisra, S. K. (2019). Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 13(1), 364-372.
- Tibaldi, J. M. (2014). Evolution of insulin: from human to analog. *The American journal of medicine*, 127(10), S25-S38.
- Tolosa, L., Donato, M. T., and Gómez-Lechón, M. J. (2015). General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. In *Protocols in in vitro hepatocyte research* (s. 333-348): Springer.
- Tuçcu-Demiröz, F., Saar, S., Kara, A. A., Yıldız, A., Tunçel, E., and Acartürk, F. (2021). Development and characterization of chitosan nanoparticles loaded nanofiber hybrid system for vaginal controlled release of benzydamine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 161, 105801.
- Varela-Fernandez, R., Garcia-Otero, X., Diaz-Tome, V., Regueiro, U., Lopez-Lopez, M., Gonzalez-Barcia, M., Lema, M. I., and Otero-Espinar, F. J. (2021). Design, optimization, and characterization of lactoferrin-loaded chitosan/TPP and chitosan/sulfobutylether- β -cyclodextrin nanoparticles as a pharmacological alternative for keratoconus treatment. *ACS applied materials and interfaces*, 13(3), 3559-3575.
- Von Zuben, E. D. S., Eloy, J. O., Inácio, M. D., Araujo, V. H. S., Baviera, A. M., Gremião, M. P. D., and Chorilli, M. (2022). Hydroxyethylcellulose-Based Hydrogels Containing Liposomes Functionalized with Cell-Penetrating Peptides for Nasal Delivery of Insulin in the Treatment of Diabetes. *Pharmaceutics*, 14(11), 2492.
- Wang, F., Carabino, J. M., and Vergara, C. M. (2003). Insulin glargine: a systematic review of a long-acting insulin analogue. *Clinical therapeutics*, 25(6), 1541-1577.
- Wang, J. J., Zeng, Z. W., Xiao, R. Z., Xie, T., Zhou, G. L., Zhan, X. R., and Wang, S. L. (2011). Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International journal of nanomedicine*, 6, 765.
- Wang, M., Wang, C., Ren, S., Pan, J., Wang, Y., Shen, Y., Zeng, Z., Cui, H., and Zhao, X. (2022). Versatile Oral Insulin Delivery Nanosystems: From Materials to Nanostructures. *International journal of molecular sciences*, 23(6), 3362.

- Weiss, M., Steiner, D. F., and Philipson, L. H. (2015). Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure-activity relationships.
- Wong, C. Y., Al-Salami, H., and Dass, C. R. (2017). Potential of insulin nanoparticle formulations for oral delivery and diabetes treatment. *Journal of controlled release*, 264, 247-275.
- Wong, C. Y., Al-Salami, H., and Dass, C. R. (2018a). Microparticles, microcapsules and microspheres: a review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin. *International journal of pharmaceutics*, 537(1-2), 223-244.
- Wong, C. Y., Al-Salami, H., and Dass, C. R. (2018b). Recent advancements in oral administration of insulin-loaded liposomal drug delivery systems for diabetes mellitus. *International journal of pharmaceutics*, 549(1-2), 201-217.
- Wong, C. Y., Al-Salami, H., and Dass, C. R. (2020a). Formulation and characterisation of insulin-loaded chitosan nanoparticles capable of inducing glucose uptake in skeletal muscle cells in vitro. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 57, 101738.
- Wong, C. Y., Al-Salami, H., and Dass, C. R. (2020b). Lyophilisation improves bioactivity and stability of insulin-loaded polymeric-oligonucleotide nanoparticles for diabetes treatment. *Aaps Pharmscitech*, 21(3), 1-20.
- Wong, C. Y., Al-Salami, H., and Dass, C. R. (2021). Fabrication techniques for the preparation of orally administered insulin nanoparticles. *Journal of Drug Targeting*, 29(4), 365-386.
- Wong, C. Y., Luna, G., Martinez, J., Al-Salami, H., and Dass, C. R. (2019). Bio-nanotechnological advancement of orally administered insulin nanoparticles: Comprehensive review of experimental design for physicochemical characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 572, 118720.
- Wong, C. Y., Martinez, J., and Dass, C. R. (2016). Oral delivery of insulin for treatment of diabetes: status quo, challenges and opportunities. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 68(9), 1093-1108.
- Wong, T. W. (2010). Design of oral insulin delivery systems. *Journal of drug targeting*, 18(2), 79-92.
- Wu, J., Wang, Y., Yang, H., Liu, X., and Lu, Z. (2017). Preparation and biological activity studies of resveratrol loaded ionically cross-linked chitosan-TPP nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, 175, 170-177.
- Xu, B., Zhang, W., Chen, Y., Xu, Y., Wang, B., and Zong, L. (2018). Eudragit® L100-coated mannosylated chitosan nanoparticles for oral protein vaccine delivery. *International journal of biological macromolecules*, 113, 534-542.
- Xue, J., Shi, Y., Li, C., Xu, X., Xu, S., and Cao, M. (2018). Methylcellulose and polyacrylate binary hydrogels used as rectal suppository to prevent type I diabetes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 172, 37-42.

- Yadav, P., and Yadav, A. B. (2022). Preparation and Optimization of Insulin Loaded Solid Lipid Nanoparticles for the Targeted Delivery of Insulin to the Lungs for Diabetes Treatment via Inhalation. In *Composite Materials for Extreme Loading* (pp. 73-86). Springer, Singapore.
- Yaribeygi, H., Atkin, S. L., and Sahebkar, A. (2019). Natural compounds with DPP-4 inhibitory effects: Implications for the treatment of diabetes. *Journal of cellular biochemistry*, 120(7), 10909-10913.
- Yazdi, J. R., Tafaghodi, M., Sadri, K., Mashreghi, M., Nikpoor, A. R., Nikoofal-Sahlabadi, S., Chamani, J., Vakili, R., Moosavian, S. A., and Jaafari, M. R. (2020). Folate targeted PEGylated liposomes for the oral delivery of insulin: In vitro and in vivo studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 194, 111203.
- Yilmaz, B., and Kadioglu, Y. (2012). Determination of insulin in rabbit plasma using high-performance liquid chromatography. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18(1), 31-36.
- Yien, L., Zin, N. M., Sarwar, A., and Katas, H. (2012). Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International journal of Biomaterials*, 2012.
- Zaric, B. L., Obradovic, M., Sudar-Milovanovic, E., Nedeljkovic, J., Lazic, V., and Isenovic, E. R. (2019). Drug delivery systems for diabetes treatment. *Current pharmaceutical design*, 25(2), 166-173.
- Zhang, F., Pei, X., Peng, X., Gou, D., Fan, X., Zheng, X., ... and Cui, S. (2022). Dual crosslinking of folic acid-modified pectin nanoparticles for enhanced oral insulin delivery. *Biomaterials Advances*, 212746.
- Zhang, T., Lin, M., Li, W., Fan, X., Du, T., Zhao, Y., and Zhang, X. (2016). Comparison of the efficacy and safety of insulin detemir and insulin glargine in hospitalized patients with type 2 diabetes: a randomized crossover trial. *Advances in Therapy*, 33(2), 178-185.
- Zulfakar, M. H., and Chin, H. H. (2020). Physicochemical Properties and Glucose-Lowering Activity of an Aloe Vera-Insulin Buccal Delivery System. *Current Trends in Biotechnology & Pharmacy*.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:

Soyadı, adı : TURAN, Tuğçe
Uyruğu : T.C.

Eğitim:

Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2019
Lise	Ahmet Erdem Anadolu Lisesi	2014

İş Deneyimi:

Yıl	Yer	Görev
2019-Devam ediyor	Serdar Eczanesi	2. Eczacı

Yabancı Dil:

İngilizce

Bildiriler

Turan, T., Mutlu Ağardan B.N. (2021). Preparation Of Chitosan Tripolyphosphate and Chitosan Sulfobutyl-Ether- β -Cyclodextrin Nanoparticles for Oral Insulin Delivery, 3rd GPSS.

Yayınlar

Turan, T., ve Ağardan, N. B. M. (2022). Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler ile Oral İnsülin Tedavisinde Son Gelişmeler: Sistematiik Derleme, *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*. 11(2),104-118



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...