T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

TİP 2 DİYABET TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE ORAL YOLLA UYGULANACAK PROTEİN/PEPTİT İÇEREN KENDİLİĞİNDEN EMÜLSİFİYE OLAN NANOFORMÜLASYONUNUN GELİŞTİRİLMESİ, IN VİTRO/IN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

MERVE ÇELİK TEKELİ

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞUBAT 2020


GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

TİP 2 DİYABET TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE ORAL YOLLA UYGULANACAK PROTEİN/PEPTİT İÇEREN KENDİLİĞİNDEN EMÜLSİFİYE OLAN NANOFORMÜLASYONUNUN GELİŞTİRİLMESİ, IN VİTRO/IN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

Merve ÇELİK TEKELİ

DOKTORA TEZİ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞUBAT 2020

Merve ÇELİK TEKELİ tarafından hazırlanan "TİP 2 DİYABET TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE ORAL YOLLA UYGULANACAK PROTEİN/PEPTİT İÇEREN KENDİLİĞİNDEN EMÜLSİFİYE OLAN NANOFORMÜLASYONUNUN GELİŞTİRİLMESİ İN VİTRO-İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Yardımcı Danışman: Doç. Dr. Yeşim AKTAŞ
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Erciyes Üniversitesi

Başkan : Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Üye : Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Üye : Prof. Dr. Sevgi TAKKA
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Üye : Doç. Dr. Zeynep ŞAFAK TEKSİN
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Üye : Doç. Dr. İpek EROĞLU
Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Tez Savunma Tarihi: 27/02/2020

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- 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 çalışmasında 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.

Merve ÇELİK TEKELİ

27/02/2020

TİP 2 DİYABET TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE ORAL YOLLA UYGULANACAK PROTEİN/PEPTİT İÇEREN KENDİLİĞİNDEN EMÜLSİFİYE OLAN NANOFORMÜLASYONUN GELİŞTİRİLMESİ, IN VİTRO/IN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Merve ÇELİK TEKELİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2020

ÖZET

Tez çalışmamızın temel amacı; tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan peptit yapılı bir molekül olan exendin-4'ün oral yoldan uygulanmak üzere kendiliğinden nanoemülsifiye olan sistemlerinin (SNEDDS) geliştirilmesi ve karakterizasyonunun incelenmesi, *in vitro/in vivo* olarak değerlendirilmesidir. Önformülasyon çalışmaları sonucunda en uygun formülasyon %15 etil oleat, %42,5 Cremophor EL®, %21,25 Labrasol®: %21,25 propilen glikol içeren exendin-4 yüklü ***H5*** formülasyonu olarak belirlenmiştir. Exendin-4 yüklü ***H5*** formülasyonunun 50 mL bidistile su ile seyreltilmesi sonucu damlacık büyüklüğü 24,28±0,43 nm, polidispersite indeksi 0,17 ± 0,01, zeta potansiyeli -1,28±3,61 mV, viskozitesi 79,60±3,30 m.Pas, pH'sı 5,40±0,00, türbiditesi 6,37±0,00 ve yükleme etkinliği %88,25±0,00 bulunmuştur. Uzun süreli stabilite çalışmaları sonucunda exendin-4 yüklü SNEDDS ve enzim inhibitörü olarak ilave edilen exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin damlacık büyüklüğü ve polidispersite indeksi sonuçlarında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($p>0.05$). *In vitro* salım çalışmaları sonucunda exendin-4 yüklü ***H5*** SNEDDS'lerde pH 6,8'de 2. saatin sonunda yığılmalı salınan exendin-4 %73,79 bulunmuştur. Lipoliz çalışmaları sonuçlarına göre açlık ve tokluk koşullarında formülasyonlarda kullanılan etil oleatın yavaş sindirildiği bulunmuştur. Caco-2 hücreleriyle yapılan sitotoksisite ve intestinal permeabilite çalışması sonucunda, exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin Caco-2 hücrelerine sitotoksik etki göstermediği ve exendin-4'ün Caco-2 hücrelerinden permeabilitesini artırdığı bulunmuştur. *In vivo* çalışmalarda exendin-4 ve exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS'lerle, Byetta® (sc)'ya yakın bir farmakodinamik cevap elde edildiği, formülasyona kimostatinin ilavesinin exendin-4'ü enzimatik parçalanmaya karşı koruyarak kan glikoz seviyesinde daha fazla bir düşüşe neden olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, *in vitro*/*in vivo* çalışmalar sonucunda peptit/proteinlerin oral biyoyararlanımını artırmada SNEDDS formülasyonlarının ve enzim inhibitörleriyle kombinasyon halinde kullanımlarının ümit verici olduğu düşünülmektedir.

Bilim Kodu : 1020
Anahtar Kelimeler : Exendin-4, Kendiliğinden Nanoemülsifiye Olan Sistem, Kimostatin, Lipoliz, Permeabilite, Farmakokinetik, Biyoyararlanım, Farmakodinamik
Sayfa Adedi : 210
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ
İkinci Danışman : Doç. Dr. Yeşim AKTAŞ

DEVELOPMENT OF ORAL SELF EMULSIFYING NANOFORMULATION CONTAINING PROTEIN / PEPTIDE FOR TYPE 2 DIABETES TREATMENT, IN VITRO / IN VIVO EVALUATION

(Ph. D. Thesis)

Merve ÇELİK TEKELİ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

February 2020

ABSTRACT

The aim of thesis is to development and characterization of self nanoemulsifying system for oral administration of exendin-4 which is a peptide molecule used in the treatment of type 2 diabetes, and evaluation *in vitro* / *in vivo*. As a result of the preformulation studies, the most suitable formulation was determined as exendin-4 loaded H5 formulation containing 15% ethyl oleate, 42.5% Cremophor EL®, 21.25% Labrasol®: 21.25% propylene glycol. The droplet size was found 24,28 ± 0,43 nm, polydispersity index was found 0,17 ± 0,01, zeta potential was found -1,28 ± 3,61 mV, viscosity was found 79,60 ± 3.30 m.Pas, pH was found 5.40 ± 0.00, turbidity was found 6.37 ± 0.00 and encapsulation efficiency was found 88.25 ± 0.00% for exendin-4 loaded ***H5*** formulation as a result of dilution of with 50 mL bidistile water. In long-term stability studies, no significant differences were found in droplet size and polydispersity index results for exendin-4 and exendin-4/ enzyme inhibitor chymostatin loaded SNEDDS ($p>0.05$). As a result of the in vitro release studies, the cumulative release of exendin-4 at pH 6.8 was found to be 73.79% at the end of the 2nd hour for exendin-4 loaded ***H5*** SNEDDS. According to the results of lipolysis studies, ethyl oleate used in formulations was found to be digested slowly in fasted and fed conditions. As a result of the study of cytotoxicity and intestinal permeability with Caco-2 cells, it was found that exendin-4 and exendin-4/chymostatin loaded SNEDDS did not show cytotoxic effect on Caco-2 cells and increased permeability of exendin-4 across Caco-2 cells. *In vivo* studies, it was found that pharmacodynamic response was obtained close to Byetta® (sc) with SNEDDS containing exendin-4 and exendin-4/chymostatin. The addition of chymostatin to the formulation provided further decrease in blood glucose level by protecting exendin-4 against enzymatic degradation. In conclusion, SNEDDS formulations and their use in combination with enzyme inhibitors are thought to be promising in increasing the oral bioavailability of peptide/proteins as a result of in vitro/in vivo studies.

Science Code : 1020
Key Words : Exendin-4, Self Nanoemulsifying System, Chymostatin, Lipolysis, Permeability, Pharmacokinetics, Bioavailability, Pharmacodynamics
Page Number : 210
Supervisor : Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ
Co-supervisor : Assoc. Dr. Yeşim AKTAŞ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince değerli bilgilerini benimle paylaşan, bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde her türlü yardım, tavsiye ve yönlendirmeleri yapan, sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ'ye teşekkürü bir borç bilir ve saygılarımı sunarım. Doktora eğitimimim her aşamasında gereken kolaylıkları sağlayarak bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen, tezin çalışılması için Anabilim Dalının tüm olanaklarını kullanıma sunan tez ikinci danışmanın değerli hocam Doç. Dr. Yeşim AKTAŞ'a en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Doktora çalışmalarım boyunca Anabilim Dalının tüm olanaklarının kullanılmasında destek veren Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK'e, tez çalışmalarımla ilgili değerlendirmeleriyle katkı sağlayan tez izleme komitesi üyeleri Doç. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN ve Doç. Dr. İpek EROĞLU'na olmak üzere tüm değerli hocalarıma, doktora çalışmalarım boyunca her zamanda yanımda olan ve maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili dostum Dr. Ayşe Nur OKTAY'a, tez çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan Dr. Ecz. Alptuğ Eren KARAKÜÇÜK'e, Arş. Gör. Sıla GÜLBAĞ'a, Arş. Gör. Hazal Ezgi GÜLTEKİN'e, Arş. Gör. Gamze Rüzgar ÖZEMRE'ye, Arş. Gör. Esra KODAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında yanımda bulunan, her türlü desteği veren, sabır ve fedakârlık göstererek her an yanımda olan kardeşim Alihan ÇELİK ve eşim Yasin TEKELİ'ye, buralara kadar gelmemde büyük emekleri olan ve yaşamımın her döneminde bana güvendikleri ve destek verdikleri için annem Şükran ÇELİK ve rahmetli babam Asım ÇELİK'e en derin duygularımla sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

'2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı 2015/2' ile burs desteği almamı sağlayan ve sonrasında ise 217S416 numaralı "Oral Yoldan Uygulanmak Üzere Exendin-4'ün Kendiliğinden Emülsifiye Olan Nanoformülasyonunun Geliştirilmesi, in vitro/in vivo Değerlendirilmesi" isimli proje kapsamında destekleyerek doktora tezimin gerçekleşmesini sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ xi

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xiv

RESİMLERİN LİSTESİ xx

SİMGE VE KISALTMALAR xxi

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. Diyabet ve Tedavisi 5

2.2. Exendin-4 (Eksenatid) 8

2.3. Peptit ve Proteinlerin Oral Verilişleri 10

2.3.1. Terapötik peptit ve proteinlerin özellikleri 10

2.3.2. Veriliş yolları 12

2.3.3. Gastrointestinal bariyerler: intestinal absorpsiyon mekanizmaları 13

2.4. Peptit/Proteinlerin Oral Biyoyararlanımlarının Artırılmasında Çeşitli Yaklaşımlar 17

2.4.1. Kimyasal modifikasyon 17

2.4.2. Mukoadezif polimerik sistemlerin geliştirilmesi 18

2.4.3. Absorpsiyon artırıcı maddeler 18

2.4.4. Enzim inhibitörleri 19

2.4.5. İlaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi 19

2.5. Kendiliğinden Emülsifiye Olan İlaç Taşıyıcı Sistemler 26

2.5.1. Emülsifikasyon mekanizması 29

Sayfa

2.5.2. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerin hazırlanması 30

2.5.3. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerde yapılan karakterizasyon çalışmaları 38

3. GEREÇ VE YÖNTEM 43

3.1. Gereç 43

3.1.1. Kullanılan kimyasal malzemeler 43

3.1.2. Kullanılan kitler 44

3.1.3. Kullanılan hücre 44

3.1.4. Kullanılan cihazlar 44

3.1.5. Kullanılan yazılımlar 45

3.2. Yöntem 45

3.2.1. Önformülasyon çalışmaları 47

3.2.2. ELISA yöntemi ile exendin-4'ün miktar tayini 64

3.2.3. Exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sistemlerin hazırlanması 65

3.2.4. Exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sistemlerin karakterizasyon çalışmaları 67

3.2.5. Kısa süreli fiziksel stabilite çalışmaları 68

3.2.6. Uzun süreli fiziksel stabilite çalışmaları 69

3.2.7. *İn vitro* salım çalışmaları 69

3.2.8. *In vitro* lipoliz çalışmaları 70

3.2.9. SDS-PAGE ile stabilite çalışmaları 71

3.2.10. Formülasyonların hücre canlılığına etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi 74

3.2.11. Hücrelerin bütünlüğünün değerlendirilmesi ve geçiş çalışmaları 75

3.2.12. *In vivo* çalışmalar 77

3.2.13. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi 83

4. BULGULAR 85

Sayfa

4.1. Önformülasyon Çalışmaları 85

4.2. ELISA Yöntemi ile Exendin-4'ün Miktar Tayini 108

4.3. Exendin-4 ve Exendin-4/Kimostatin Yüklü Kendiliğinden Nanoemülsifiye Olabilen Sistemlerin Karakterizasyon Çalışmaları 108

4.4. Kısa Süreli Fiziksel Stabilite Çalışmaları 110

4.5. Uzun Süreli Fiziksel Stabilite Çalışmaları 121

4.6. *İn vitro* Salım Çalışmaları 126

4.7. *İn vitro* Lipoliz Çalışmaları 127

4.8. SDS-PAGE ile Stabilite Çalışmaları 128

4.9. Formülasyonların Hücre Canlılığına Etkisinin MTT testi ile Değerlendirilmesi 129

4.10. Hücrelerin Bütünlüğünün Değerlendirilmesi ve Geçiş Çalışmaları 130

4.11. *İn Vivo* Çalışmalar 131

4.11.1. Farmakokinetik çalışmalar 132

4.11.2. Farmakodinamik Çalışmalar 144

5. TARTIŞMA 167

5.1. Önformülasyon Çalışmaları 168

5.2. ELISA Yöntemi İle Exendin-4'ün Miktar Tayini 173

5.3. Exendin-4 ve Exendin-4/Kimostatin Yüklü Kendiliğinden Nanoemülsifiye Olabilen Sistemlerin Karakterizasyon Çalışmaları 173

5.4. Kısa Süreli Fiziksel Stabilite Çalışmaları 174

5.5. Uzun Süreli Fiziksel Stabilite Çalışmaları 175

5.6. *İn Vitro* Salım Ve Lipoliz Çalışmaları 175

5.7. SDS-PAGE İle Stabilite Çalışmaları 177

5.8. Formülasyonların Hücre Canlılığına Etkisinin MTT Testi İle Değerlendirilmesi 179

5.9. Hücrelerin Bütünlüğünün Değerlendirilmesi ve Geçiş Çalışmaları 179

5.10. *İn Vivo* Çalışmalar 181

Sayfa

5.10.1. Farmakokinetik çalışmalar 182

5.10.2. Farmakodinamik çalışmalar 185

6. SONUÇ 189

KAYNAKLAR 193

EKLER 207

EK-1. Etik Kurul Belgesi 208

ÖZGEÇMİŞ 209

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge		Sayfa
Çizelge 2.1.	Exendin-4'ün veriliş yollarına göre farmakokinetik parametreleri	10
Çizelge 2.2.	Peptit/proteinlerin oral nanotaşıyıcı sistemlerle ilgili çalışmaları	21
Çizelge 2.3.	Exendin-4 'ün nanotaşıyıcılar ile yapılan çalışmaları	23
Çizelge 2.4.	Lipit bazlı Tip I, II, III, IIIB, IV formülasyonların sınıflandırılması	25
Çizelge 2.5.	Oral yoldan uygulanmak üzere lipit-bazlı ilaç taşıyıcı sistemler şeklinde hazırlanmış ticari ürünler	26
Çizelge 2.6.	Peptit/protein içeren kendiliğinden emülsifiye sistemlerle yapılan çalışmalara örnekler	28
Çizelge 2.7.	Lipofilik taşıyıcıların sınıflandırılması	34
Çizelge 2.8.	Yüzey etkin maddelerin sınıflandırılması	36
Çizelge 2.9.	Tez çalışması kapsamında formülasyon geliştirmede kullanılan yardımcı maddeler	37
Çizelge 3.1.	Üçgen faz diyagramı için çalışılan oranlar	48
Çizelge 3.2.	3^2 faktöriyel D-optimal deney tasarımı	56
Çizelge 3.3.	Hedeflenen ürün profili	56
Çizelge 3.4.	Önformülasyon çalışmaları sonucunda belirlenen formülasyonlar ve yardımcı madde oranları	66
Çizelge 3.5.	*In vivo* deney tasarımında diyabetik olmayan ve diyabetik hayvan grupları	78
Çizelge 4.1.	Önformülasyon çalışmalarında üçgen faz diyagramından seçilen formülasyonlar ve oranları	87
Çizelge 4.2.	A, B, C, D formülasyonları için damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve emülsifikasyon zamanı sonuçları (n=3)	88
Çizelge 4.3.	C1 (1:50), C1 (1:250), C2 (1:50), C2 (1:250) formülasyonlarının emülsifikasyon zamanları damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve emülsifikasyon zamanı sonuçları (n=3)	90
Çizelge 4.4.	E1, E2, E3, E4 ve E5 formülasyonlarının emülsifikasyon zamanları damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve emülsifikasyon zamanı sonuçları (n=3)	93

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.5. 3^2 Faktöriyel D-optimal deney tasarımı sonucunda yapılan 18 deneyin sonuçları 95

Çizelge 4.6. Design Expert® Version 9.0.6 tarafından üretilen model denklemler için ANOVA sonuçları 96

Çizelge 4.7. G1, G2, G3, G4 ve G5 formülasyonlarının emülsifikasyon zamanları damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve emülsifikasyon zamanı sonuçları (n=3) 100

Çizelge 4.8. H1, H2, H3, H4 ve H5 formülasyonlarının emülsifikasyon zamanları damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve emülsifikasyon zamanı sonuçları (n=3) 102

Çizelge 4.9. I1, I2, I3, I4 ve I5 formülasyonlarının emülsifikasyon zamanları damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve emülsifikasyon zamanı sonuçları (n=3) 104

Çizelge 4.10. J1, J2, J3, J4 ve J5 formülasyonlarının emülsifikasyon zamanları damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve emülsifikasyon zamanı sonuçları (n=3) 106

Çizelge 4.11. Yükleme etkinliği araştırılan formülasyonlar için yardımcı madde oranları ve yükleme etkinliği sonuçları 109

Çizelge 4.12. H5, I5 ve J5 formülasyonları için emülsifikasyon zamanı, damlacık büyüklüğü, zeta potansiyel, türbidite, viskozite ve pH sonuçları (n=3)... 110

Çizelge 4.13. J5, H5 ve I5 formülasyonlarının kısa süreli stabilite çalışmalarında damlacık büyüklüğü sonuçları (n=3) 111

Çizelge 4.14. J5, H5 ve I5 formülasyonların kısa süreli stabilite çalışmalarında polidispersite indeksi sonuçları (n=3) 112

Çizelge 4.15. J5, H5 ve I5 formülasyonlarının kısa süreli stabilite çalışmalarında zeta potansiyel sonuçları (n=3) 113

Çizelge 4.16. J5, H5 ve I5 formülasyonların kısa süreli stabilite çalışmalarında türbidite sonuçları (n=3) 114

Çizelge 4.17. J5, H5 ve I5 formülasyonların kısa süreli stabilite çalışmalarında pH sonuçları (n=3) 115

Çizelge 4.18. J5, H5 ve I5 formülasyonlarının kısa süreli stabilite çalışmalarında viskozite sonuçları (n=3) 116

Çizelge 4.19. Exendin-4 yüklü H5 formülasyonu ve exendin-4/kimostatin yüklü H5 formülasyonu için emülsifikasyon zamanı, damlacık büyüklüğü, zeta potansiyel ve viskozite ölçümlerine ait sonuçlar (n=3) 118

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.20. Exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin uzun süreli stabilite çalışmalarında damlacık büyüklüğü sonuçları (n=3) 122

Çizelge 4.21. Exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin uzun süreli stabilite çalışmalarında polidispersite indeksi sonuçları (n=3)..... 123

Çizelge 4.22. Exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin uzun süreli stabilite çalışmalarında zeta potansiyel sonuçları (n=3) 124

Çizelge 4.23. Exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin uzun süreli stabilite çalışmalarında viskozite sonuçları (n=3) 125

Çizelge 4.24. Exendin-4 çözeltisi, exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin permeabilite değerleri 131

Çizelge 4.25. Diyabetik olmayan ve diyabetik sıçanlarda exendin-4'ün farmakokinetik parametreleri (ort ± ss)..... 143

Çizelge 4.26. Diyabetik olmayan ve diyabetik sıçanlarda % bağıl biyoyararlanım sonuçları 144

Çizelge 4.27. Diyabetik olmayan sıçanlara ait plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi (ort±ss) 149

Çizelge 4.28. Diyabetik sıçanlara ait plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi..... 155

Çizelge 4.29. Diyabetik olmayan sıçanlara ait kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi (ort±ss) 160

Çizelge 4.30. Diyabetik sıçanlara ait kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi (ort±ss) 165

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Antidiyabetik ilaçların şematik gösterimi 7

Şekil 2.2. GLP-1 molekülü ve Eksenatid'in aminoasit dizilimi 9

Şekil 2.3. Peptit/proteinlerin yapısı 11

Şekil 2.4. Peptit/proteinlerin veriliş yolları..... 12

Şekil 2.5. Başarılı oral peptit emilimi için önemli olan bariyerler 16

Şekil 2.6. Oral yolla kullanılan nanotaşıyıcılar 20

Şekil 2.7. Üçgen faz diyagramı..... 31

Şekil 2.8. SNEDDS'lerin oral yoldan alımı takiben GİK'te geçirdiği aşamalar 41

Şekil 3.1. Yöntem akış şeması..... 46

Şekil 3.2. Önformülasyon çalışmalarının akış şeması 48

Şekil 3.3. Exendin-4 içermeyen SNEDDS'lerin hazırlanması 49

Şekil 3.4. Maisine®/Labrasol®/propilen glikol içeren SNEDDS'lerle yapılan önformülasyon çalışmalarının akış şeması 51

Şekil 3.5. Labrasol®/propilen glikol oranı 4:1 içeren formülasyonların üçgen faz diyagramı 52

Şekil 3.6. Maisine®/Cremophor EL®/propilen glikol içeren SNEDDS'lerle yapılan önformülasyon çalışmalarının akış şeması 53

Şekil 3.7. Etil oleat®/Cremophor EL®/absolü etanol içeren SNEDDS'lerle yapılan önformülasyon çalışmalarının akış şeması 54

Şekil 3.8. Cremophor EL®: absolü etanol 3:1 içeren formülasyonlarla çizilen üçgen faz diyagramı 55

Şekil 3.9. Etil oleat®/Cremophor EL®/Labrasol®/absolü etanol içeren SNEDDS'lerle yapılan önformülasyon çalışmalarının akış şeması 57

Şekil 3.10. Etil oleat: Cremophor EL®/Labrasol® (1:2): Absolü etanol içeren formülasyonların üçgen faz diyagramı. 58

Şekil 3.11. Etil oleat®/Cremophor EL®/Labrasol®/propilen glikol içeren SNEDDS'lerle yapılan önformülasyon çalışmalarının akış şeması 59

Şekil 3.12. Etil oleat: Cremophor EL®/Labrasol® (2:1): Propilen glikol içeren formülasyonların üçgen faz diyagramı 60

Şekil **Sayfa**

Şekil 3.13. Etil oleat: Cremophor EL®/Labrasol® (3:1): Propilen glikol içeren formülasyonların üçgen faz diyagramı 61

Şekil 3.14. Etil oleat®/Cremophor EL®/Labrasol®/propilen glikol/absolü etanol içeren SNEDDS'lerle yapılan önformülasyon çalışmalarının akış şeması 62

Şekil 3.15. Etil oleat: Cremophor EL®/Labrasol® (2:1): propilen glikol/absolü etanol (3:1) içeren formülasyonların üçgen faz diyagramı..... 63

Şekil 3.16. Exendin-4 ELISA kitinin (EK-070-94/ Phoenix Pharmaceuticals, CA) çalışma prensibi 64

Şekil 3.17. Exendin-4 yüklü kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sistemlerin hazırlanması..... 66

Şekil 3.18. Exendin-4 ELISA kitinin (FEK-070-94/Phoenix Pharmaceuticals-ABD) çalışma prensibi 81

Şekil 4.1. Önformülasyon çalışmalarının akış şeması 86

Şekil 4.2. A, B, C, D formülasyonları için a) damlacık büyüklüğü b) polidispersite indeksi c) zeta potansiyel sonuçları (n=3) 89

Şekil 4.3. C1 ve C2 formülasyonlarının 1:50 ve 1:250 oranlarında (a) damlacık büyüklüğü (b) polidispersite indeksi (c) zeta potansiyel sonuçları (n=3) 91

Şekil 4.4. E1, E2, E3, E4 ve E5 formülasyonlarının (a) damlacık büyüklüğü (b) polidispersite indeksi (c) zeta potansiyel sonuçları (n=3) 94

Şekil 4.5. (a) Damlacık büyüklüğü etkileşim grafikleri, (b) Polidispersite indeksi etkileşim grafikleri, (c) Zeta potansiyel etkileşim grafikleri 97

Şekil 4.6. (a) Damlacık büyüklüğü yüzey-cevap grafikleri, (b) Polidispersite indeksi yüzey-cevap grafikleri, (c) Zeta potansiyel yüzey-cevap grafikleri 98

Şekil 4.7. G1, G2, G3, G4 ve G5 formülasyonları için a) damlacık büyüklüğü b) polidispersite indeksi c) zeta potansiyel sonuçları (n=3) 101

Şekil 4.8. H1, H2, H3, H4 ve H5 formülasyonları için (a) damlacık büyüklüğü (b) polidispersite indeksi (c) zeta potansiyel sonuçları (n=3) 103

Şekil 4.9. I1, I2, I3, I4 ve I5 formülasyonları için (a) damlacık büyüklüğü (b) polidispersite indeksi (c) zeta potansiyel sonuçları (n=3) 105

Şekil 4.10. J1, J2, J3, J4 ve J5 formülasyonları için (a) damlacık büyüklüğü (b) polidispersite indeksi (c) zeta potansiyel sonuçları (n=3) 107

Şekil 4.11. ELISA kitinin kalibrasyon eğrisi 108

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.12. J5, H5 ve I5 formülasyonlarının kısa süreli stabilite çalışmalarında damlacık büyüklüğü sonuçları (n=3) 111

Şekil 4.13. J5, H5 ve I5 formülasyonların kısa süreli stabilite çalışmalarında polidispersite indeksi sonuçları (n=3) 112

Şekil 4.14. J5, H5 ve I5 formülasyonlarının kısa süreli stabilite çalışmalarında zeta potansiyel sonuçları (n=3) 113

Şekil 4.15. J5, H5 ve I5 formülasyonlarının kısa süreli stabilite çalışmalarında türbidite sonuçları (n=3) 114

Şekil 4.16. J5, H5 ve I5 formülasyonlarının kısa süreli stabilite çalışmalarında pH sonuçları (n=3) 115

Şekil 4.17. J5, H5 ve I5 formülasyonlarının kısa süreli stabilite çalışmalarında viskozite sonuçları (n=3) 116

Şekil 4.18. Exendin-4 yüklü H5 formülasyonunun damlacık büyüklüğü grafiği 118

Şekil 4.19. Exendin-4/kimostatin yüklü H5 formülasyonunun damlacık büyüklüğü grafiği 119

Şekil 4.20. Exendin-4 yüklü H5 formülasyonunun kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği 119

Şekil 4.21. Exendin-4/kimostatin yüklü H5 formülasyonunun kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği 120

Şekil 4.22. Exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin uzun süreli stabilite çalışmalarında damlacık büyüklüğü sonuçları (n=3) 122

Şekil 4.23. Exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin uzun süreli stabilite çalışmalarında polidispersite indeksi sonuçları (n=3) 123

Şekil 4.24. Exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin uzun süreli stabilite çalışmalarında zeta potansiyel sonuçları (n=3) 124

Şekil 4.25. Exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin uzun süreli stabilite çalışmalarında viskozite sonuçları (n=3) 125

Şekil 4.26. Exendin-4 yüklü H5 formülasyonun pH 6,8'deki salım profili (n=3) 126

Şekil 4.27. Exendin-4 içeren formülasyonlar ve exendin-4/kimostatin içeren formülasyonların FaSSIF ve FeSSIF biyouyumlu ortamlarında lipolizi sırasında harcanan NaOH miktarı (n=3) 127

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.28. Exendin-4 içeren formülasyon bileşenlerinin ayrı ayrı jele yüklenmesi 128

Şekil 4.29. Exendin-4 çözeltilerinin, exendin-4 yüklenmemiş boş formülasyonun, 50 ng/mL exendin-4 yüklü formülasyonun, 50 ng/mL exendin-4 ve 2,5 ng/mL kimostatin yüklü formülasyonun hücre canlılığına etkisi..... 129

Şekil 4.30. Hücre bütünlüğü değerlendirilmesi için deneyin başlangıcında, deneyin sonunda ve 24. saatin sonunda ölçülen TEER değerleri (ohm.cm^2) 130

Şekil 4.31. Exendin-4 çözeltisi ve formülasyonlardan zamana karşı hücre tek tabasından geçen % yığılmalı exendin-4 miktarları 131

Şekil 4.32. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4 çözelti (oral) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)..... 133

Şekil 4.33. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4 SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4 plazma konsantrasyon zaman profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5) 134

Şekil 4.34. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4/kimostatin SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5) 135

Şekil 4.35. Diyabetik olmayan sıçanlara Byetta® (sc) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)..... 136

Şekil 4.36. Diyabetik olmayan sıçanlara ait exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profili..... 137

Şekil 4.37. Diyabetik sıçanlara exendin-4 çözelti (oral) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4 plazma konantrasyon zaman profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)..... 138

Şekil 4.38. Diyabetik sıçanlara exendin-4 SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)..... 139

Şekil 4.39. Diyabetik sıçanlara exendin-4/kimostatin SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profilleri (a) her bir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5) 140

Şekil 4.40. Diyabetik sıçanlara Byetta® (sc) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4-plazma konsantrasyon-zaman profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)..... 141

Şekil 4.41. Diyabetik sıçanlara ait exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profili..... 142

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.42. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4 çözelti (oral) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5) 145

Şekil 4.43. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4 SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5) 146

Şekil 4.44. Diyabetik olmayan sıçanlara Exendin-4/kimostatin SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5) 147

Şekil 4.45. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4 çözelti (sc) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5) 148

Şekil 4.46. Diyabetik olmayan sıçanlara ait plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profili 149

Şekil 4.47. Diyabetik sıçanlara exendin-4 çözelti (oral) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)..... 151

Şekil 4.48. Diyabetik sıçanlara exendin-4 SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)..... 152

Şekil 4.49. Diyabetik sıçanlara exendin-4/kimostatin SNEDDS çözelti uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5) 153

Şekil 4.50. Diyabetik sıçanlara exendin-4 çözelti (sc) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)..... 154

Şekil 4.51. Diyabetik sıçanlara ait plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi 155

Şekil 4.52. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4 çözelti (oral) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)..... 156

Şekil 4.53. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4 SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5) 157

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.54. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4/kimostatin SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5) 158

Şekil 4.55. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4 çözelti (sc) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)..... 159

Şekil 4.56. Diyabetik olmayan sıçanlara ait kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri..... 160

Şekil 4.57. Diyabetik sıçanlara exendin-4 çözelti (oral) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)..... 161

Şekil 4.58. Diyabetik sıçanlara exendin-4 SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)..... 162

Şekil 4.59. Diyabetik sıçanlara exendin-4/kimostatin SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5) 163

Şekil 4.60. Diyabetik sıçanlara exendin-4 çözelti (sc) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)..... 164

Şekil 4.61. Diyabetik sıçanlara ait kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri..... 165

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 3.1. Kapsül içerisindeki formülasyonun *in vitro* salım çalışmaları 70

Resim 3.2. *In vitro* a) gastrik lipoliz b) intestinal lipoliz 71

Resim 3.3. Moleküler ağırlık belirleyici (Precision Plus Protein™ Dual Xtra mol wt 2-250 kDa) SDS-PAGE'de gözlenen bantları 72

Resim 3.4. Caco-2 hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (x10)..... 75

Resim 3.5. Tek tabaka oluşturan Caco-2 hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (x10) 76

Resim 3.6. TEER değeri ölçümü 77

Resim 3.7. Sıçanlardan kan örneklerinin alınması..... 79

Resim 4.1. (a) Yağ fazı/yüzey etkin madde/yardımcı çözücü içeren formülasyonlar (b) Formülasyonlara bidistile su eklendikten sonra oluşan berrak ve bulanık görünümdeki formülasyonlar 85

Resim 4.2. Formülasyonların TEM görüntüleri a) exendin-4 içermeyen formülasyon b) exendin-4 yüklü formülasyon c) exendin-4/kimostatin yüklü formülasyon..... 121

SİMGE VE KISALTMALAR

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

Simgeler	**Açıklamalar**
AUC_{0-t}	Sıfırdan t'ye Kadar Plazma Eğrisi Altında Kalan Alan
Cl	Klirens
C_{maks}	Plazma Doruk Konsantrasyon
k_d	Uzaklaşma Hız Sabiti
mL	Mililitre
ng	Nanogram
µg	Mikrogram
mV	Milivolt
MRT	Ortalama Yaşam Süresi
nm	Nanometre
R^2	Determinasyon Katsayısı
t_{maks}	C_{maks}'a ulaşmak için geçen süre
$t_{1/2}$	Biyolojik Yarılanma Ömrü
P_{app}	Permabilite Katsayısı
V_d	Sanal Dağılım Hacmi

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
DB	Damlacık Büyüklüğü
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DoE	Design of Experiment (Deney Tasarımı)
DPP4-İ	Dipeptidil Peptidaz-4 İnhibitörleri
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Assay)
EMA	European Medical Agency (Avrupa İlaç Ajansı)
Ex-4	Exendin-4

Kısaltmalar	Açıklamalar
FASGIF	Fasted State Simulated Gastric Fluid (Açlık Koşullarını Taklit Eden Mide Sıvısı)
FASSIF	Fasted State Simulated Intestinal Fluid (Açlık Koşullarını Taklit Eden İnce Bağırsak Ortamı)
FBS	Fetal Bovin Serum
FDA	Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
FESSIF	Fed State Simulated Intestinal Fluid (Tokluk Koşullarını Taklit Eden İnce Bağırsak Ortamı)
GIP	Glikoza-Bağımlı İnsülinotropik Peptit
GİK	Gastrointestinal Kanal
GİS	Gastrointestinal Sistem
GLP-1	Glucagone Like Peptide-1 (Glukagon Benzeri Peptit-1)
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
MWM	Moleküler Weight Marker (Moleküler Ağırlık Belirleyici)
Ort	Ortalama
PDİ	Polidispersite İndeksi
SEDDS	Self Emulsifying Drug Delivery System (Kendiliğinden Emülsifiye Olabilen Sistemler)
SNEDDS	Self Nanoemulsifying Drug Delivery System (Kendiliğinden Nanoemülsifiye Olabilen Sistemler)
SNEDDSK	Self Nanoemulsifying Drug Delivery System Containing Chymostatin (Kimostatin içeren Kendiliğinden Nanoemülsifiye Olabilen Sistemler)
SS	Standart Sapma
STZ	Streptozosin
TEM	Transmission Electron Microscopy (Geçirimli Elektron Mikroskobu)
ZP	Zeta Potansiyel

1. GİRİŞ

Son yıllarda biyoteknolojideki gelişmelerle hastalıkların teşhis ve tedavisinde terapötik peptit/protein yapıdaki moleküllerin kullanımı önem kazanmıştır. Terapötik peptit/ proteinler ilaç pazarının çoğunluğunu oluşturan küçük molekül ağırlıklı ilaçlarla karşılaştırıldığında, hedefe spesifik bağlanma özellikleri sayesinde yüksek aktivite, düşük toksisite ve minimum ilaç–ilaç etkileşimleri gibi birçok avantaj sunmaktadır. Terapötik peptit pazarının 2024 yılı itibariyle 45 milyar Amerikan dolarını aşması beklenmektedir. Genellikle terapötik peptit/proteinlerin verilişleri en yaygın olarak parenteral yolla sağlanmaktadır. Bununla beraber zayıf hasta uyuncu, enjeksiyonda ağrı hissi, doz tekrarı, sterilizasyon tekniklerinin bazı durumlarda etkin madde ve formülasyon üzerindeki olumsuz etkileri parenteral yolun sakıncalarıdır. Bu nedenle parenteral yol dışında peptitlerin oral, transmukozal, nazal, bukkal, rektal, pulmoner, vajinal, oküler ve transdermal yolla uygulamaları için çeşitli araştırmalar ve yaklaşımlar bulunmaktadır. Oral yol, hasta uyuncu ve kullanım kolaylığı açısından en çok tercih edilen yoldur. Fakat terapötik peptit/proteinlerin gastrointestinal enzimlerle parçalanmaları, fiziksel ve kimyasal instabiliteleri, kısa yarı ömürlü olmaları, düşük lipofilisiteleri, büyük molekül ağırlıkları ve karaciğerden ilk geçiş etkisine uğramaları sebebiyle oral biyoyararlanımları (%1-2) düşüktür. Terapötik peptit/proteinlerin oral biyoyararlanımlarının artırılmasında yapılan çalışmalarda çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. Bunlar kimyasal modifikasyon, mukoadezif veriliş sistemlerinin geliştirilmesi, absorpsiyon artırıcı maddelerin ilavesi, proteaz inhibitörlerinin formülasyona eklenmesi ve ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesidir.

Diyabet; hipergliseminin, lipit ve protein metabolizmasındaki bozuklukların, akut ve kronik komplikasyonların eşlik ettiği insülin salgılamasında bozukluk gözlenen bir sendromdur. Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun 2019'da açıkladığı verilerde; 11 yetişkinden 1'inin (463 milyon) diyabet hastası olduğu, bunların 232 milyonuna henüz tanı konulmadığı, küresel sağlık harcamalarının %10'unun diyabete harcandığı, (760 milyar ABD Doları), 6 doğumdan 1'inin gebelik diyabetinden etkilendiği, 2045'de diyabetik yetişkinlerin sayısının 700,2 milyona ulaşacağı bildirilmiştir. Ülkemizde ise bugün 6,6 milyon diyabet hastasının bulunduğu, yetişkinlerde diyabet prevalansının %12 olduğu ve sağlık harcamalarının %23,2'sinin diyabet tedavisine harcandığı bildirilmiştir.

Tez çalışmamızda seçtiğimiz peptit exendin-4 (Ex-4); endojen inkretin olan Glukagon benzeri peptit-1'i (GLP-1) taklit ederek, glikoz bağımlı insülin sekresyonu ve β-hücre

kitlesini artırıcı etki sağlayan Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan peptit yapıda bir moleküldür. 2005'de FDA tarafından onaylanan exendin-4'ün Byetta® ticari ismiyle 5 µg ve 10 µg'lık subkütan formları mevcuttur.

Nanoteknolojideki gelişmeler doğrultusunda terapötik peptit/proteinlerin gastrointestinal sistemde (GİS) parçalanmasını önlemek ve fiziksel, kimyasal stabilitelerini, oral biyoyararlanımlarını artırmak amacıyla nanotaşıyıcılar geliştirilmiştir. Exendin-4 içeren formülasyonların hazırlanmasında yüksek düzeyde enerjinin kullanıldığı yöntemler sıcaklık ve basınca bağlı olarak peptit yapısındaki etkin maddelerin, biyoaktivitesinde ve konformasyonunda değişiklik meydana getirebilmektedirler. Bu nedenle tez çalışmamız kapsamında oral yoldan verilebilecek exendin-4'ün kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sisteminin (SNEDDS) geliştirilmesi amaçlanmıştır.

SNEDDS, nanoemülsiyonların bir alt grubunu oluşturmaktadır. SNEDDS'ler yağ, yüzey etkin madde, yardımcı çözücü/yardımcı yüzey etkin madde bileşenlerinden oluşmaktadır. Sulu bir ortamla karşılaştıklarında hafif bir çalkalama ile nanoboyutta damlacıklar oluşturmaktadır. SNEDDS'lerin üstünlükleri; oral biyoyararlanımın artırılması ve buna bağlı olarak doz azaltılmasının sağlanması, ilaçların mide ortamından korunması, yiyecek etkisine bağlı değişikliklerin azaltılması, yüksek ilaç yükleme etkinliği ve kontrollü salım sağlanması olarak sıralanmaktadır. Ayrıca formülasyonlarının kapsül içerisinde sunulması oral yoldan hasta uyuncunun artırılmasında önemlidir. Bu formülasyonlar özellikle suda çözünürlüğü düşük olan peptit/protein yapısındaki etkin maddeler için uygun taşıyıcı sistemlerdir. Peptit/proteinlerin oral biyoyararlanımını artırmak için yapılan çalışmalar son zamanlarda önem kazanmıştır.

Tez çalışmamızın temel amacı; Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan peptit yapılı bir molekül olan exendin-4'ün oral yoldan uygulanmak üzere biyoyararlanımı artıracak ve ticarileşme potansiyeli yüksek olan SNEDDS formülasyonunun geliştirilmesi ve karakterizasyonunun incelenmesi, *in vitro*/*in vivo* olarak değerlendirilmesidir. Bu bağlamda, *in vitro* ve *in vivo* bölümden oluşan tez çalışmamızın başlıca hedefleri aşağıda özetlenmektedir:

- Exendin-4'ün subkütan uygulanan ticari ürünü Byetta®'ya alternatif olarak oral yoldan uygulanmak üzere exendin-4 içeren SNEDDS'in geliştirilmesi ve karakterizasyonu,
- Geliştirilen exendin-4 içeren SNEDDS'in fiziksel stabilitesinin incelenmesi,

- En uygun exendin-4 içeren SNEDDS, exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS formülasyonlarının emilim sonrası lipolize uğrayıp uğramadığının anlaşılması için *in vitro* lipoliz çalışmalarının yapılması,
- En uygun exendin-4 içeren SNEDDS, exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS formülasyonlarının Caco-2 hücre hattında sitotoksisitesinin ve intestinal permeabilitesinin *in vitro* değerlendirilmesi,
- En uygun exendin-4 içeren SNEDDS, exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS formülasyonlarının Wistar tipi sıçanlarda, farmakokinetik ve farmakodinamik ve biyoyararlanımının ticari ürün olan Byetta® ile karşılaştırılmasıdır.

Tez çalışmamızda kullandığımız exendin-4'ün herhangi bir oral ticari formu bulunmamaktadır. Exendin-4 içeren SNEDDS ve exendin-4/ kimostatin içeren SNEDDS'in *in vitro/in vivo* çalışmalarıyla etkinliğinin değerlendirilmesi ve elde edilen verilerin parenteral olarak kullanılan ticari ürün Byetta® (steril injeksiyonluk çözelti) ile karşılaştırılması hedeflenmektedir. Bu çalışma kapsamında exendin-4'ün oral yolla verilmesi amacıyla kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sisteminin hazırlanması, literatürde exendin-4 ve exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS ile yapılan in vitro/in vivo çalışmaların bulunmaması bu çalışmanın özgün yönünü oluşturmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabet ve Tedavisi

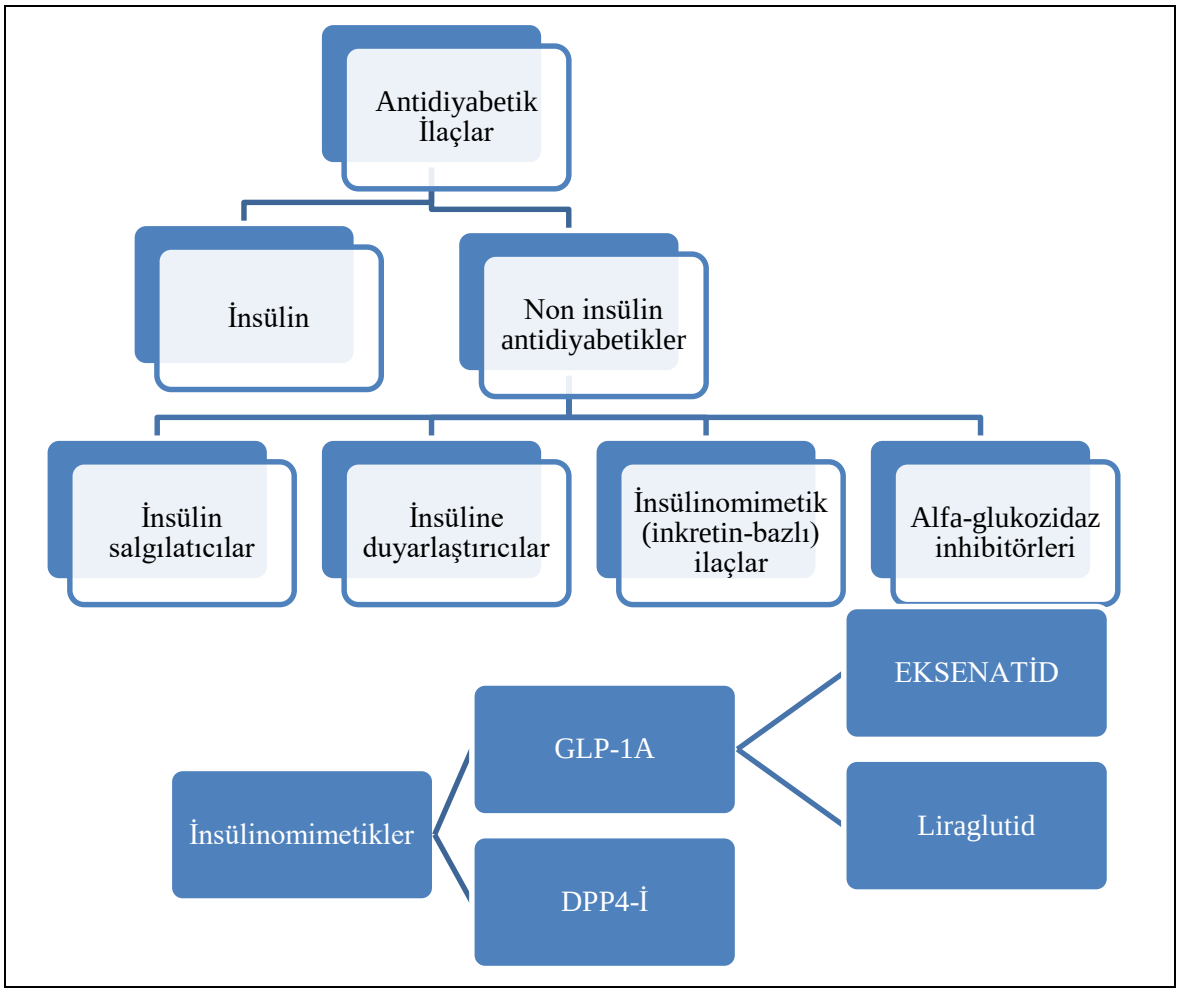
Diabetes mellitus, insülin etkisi, insülin salımı ya da her ikisinde de bozukluk sebebiyle ortaya çıkan hiperglisemiyle ilişkili akut ve kronik komplikasyonların eşlik ettiği metabolik bir hastalıktır (Türkiye Diyabet Vakfı [TÜRKDİAB], 2017: 14, 45). Uluslararası Diyabet Federasyonu Diyabet Atlası dokuzuncu baskı verilerine göre 2019'da, 11 kişiden birinde (463 milyon) diyabet tespit edilmiştir. 2045'de bu sayının 700,2 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca, iki diyabetli yetişkinden birine (232 milyon) tanı konmadığı, altı doğumdan birinin hamilelikte hiperglisemiden etkilendiği, küresel sağlık harcamalarının % 10'unun (760 milyar ABD Doları) diyabete harcandığı, 2045'de bu sayının 845 milyar Amerikan Dolarına ulaşacağı tahmin edilmektedir. Türkiye'de ise diyabet prevalansı %12 olarak Avrupa ülkeleri içinde en hızlı artışı göstermektedir (International Diabetes Federation, 2019).

Diyabet, Dünya Sağlık Örgütüne göre dört klinik tip olarak sınıflandırılmıştır. Bunlar; Tip 1 diyabet, Tip 2 diyabet, gestasyonel diyabet ve diğer spesifik diyabet tipleridir. Tip 1 diyabet, pankreasta ilerleyen beta-hücre harabiyetine yol açan bir dizi olay sonucu mutlak insülin eksikliğinin ortaya çıktığı diyabet tipidir. Tip 2 diyabet dünyada en sık rastlanan diyabet tipidir. Tüm diyabetlilerin yaklaşık %90'ı Tip 2 diyabetlidir. Tip 2 diyabet obezite, insülin sekresyon bozukluğu ve dokularda insülinin kullanılamaması (insülin direnci) ile karakterize bir hastalıktır. Gestasyonel diyabet ise gebelik sırasında karbonhidrat intoleransı olarak tanımlanmıştır (Türkiye Diyabet Vakfı [TÜRKDİAB], 2011) (Durna, 2002; Ulusal Diyabet Kongresi, 2011)

Diyabet tedavisinde genel amaç hipergliseminin mümkün olduğunca normal sınırlara düşürülmesi ve normale yakın tutulmasıdır. Diyabet tedavisi; diyetin düzenlenmesi ve egzersiz, Tip 2 diyabetlilerin ideal ağırlığına döndürülmesi, insülin uygulanması, gerektiğinde Tip 2 diyabetlilere oral antidiyabetik ilaç verilmesini içerir. Tip 1 diyabet tedavisinde insülin içeren ilaçlar kullanılmaktadır. Öte yandan tip 2 diyabet tedavisinde insülin ve oral antidiyabetikler beraber kullanılmaktadır. Genellikle hafif semptomlu hastalara başlangıçta oral antidiyabetik bir ilaç tedavisi uygulanmaktadır. Glikoz seviyesinde yeterli bir düşüş sağlanamamışsa ve bu durum ilaç kombinasyonlarıyla da

kontrol altında tutulamamışsa, tedavide insülin tek başına veya oral antidiyabetiklerle beraber kullanılmaktadır. İnsülin tedavisinde parenteral yolla verilen insülinin, vücutta doğal fizyolojik süreçlerle salınan insülinin etkileriyle tamamen aynı olmaması tedavinin etkinliğini azaltmaktadır. İnsülin ürünleri; kısa etkililer (nötral regüler insülin, semilente insülin), orta etkililer (izofan insülin, karma lente insülin), uzun etkililer (protamin çinko insülin, ultralente insülin) olarak sınıflandırılabilirler. İnsülin ürünlerinin yan etkileri; hipoglisemi, lipodistrofi, kilo alımı, görme bozukluğu, alerjik reaksiyonlar, ödem olarak görülmektedir. Tedavide insülin dozunun doğru ayarlanmaması, Tip 2 diyabetlilerde insülin reseptör sıklığının azalması, dokuların duyarsızlığının artması sonucu hipoglisemiye neden olmaktadır.

Son yıllarda, endojen insülinin salımını kontrol eden, hipoglisemiyi kontrol altında tutan insülin pompaları ve uzun etkili insülin analogları bulunmaktadır. Ancak parenteral yolla uygulanan insülin, iğne fobisi ve lipodistrofi gibi nedenlerden dolayı hasta uyuncu açısından sorun teşkil etmektedir. Oral yol bilindiği üzere hasta uyuncu açısından en fazla tercih edilen uygulama yoludur. Oral antihiperglisemik ilaçlar insülin duyarlılaştırıcı (sensitizer), insülin salgılatıcı (sekretogog), alfa glukozidaz inhibitörleri ve insülinomimetik (inkretin-bazlı) ilaçlar olarak dört grupta sınıflandırılabilir. İnsülin salgılatıcı (sekretogog) ilaçlar grubunda pankreas beta hücrelerinden insülin salımını artıran sulfonilüreler, birinci kuşak (tolbutamid, klorpropamid) ve ikinci kuşak sülfonilüreler (Glipizid, Gliklazid, Glibenklamid, Glimepirid), etki mekanizması benzer glinidler (Repaglinid, Nateglinid) yer alır. İnsülin duyarlılaştırıcı (sensitizer) ilaç grubunda biguanid (metformin) ve tiazolidindion (pioglitazon) olmak üzere iki alt grup ilaç yer alır. Biguanidler pankreas dışındaki yapılar üzerinde etki göstererek insülin düzeyini azaltırlar, tiazolidindionlar ise daha ziyade yağ dokusu düzeyinde insülin duyarlılığını artırıcı etki gösterirler. Alfa glukozidaz inhibitörleri (akarboz, miglitol) barsaktan glikoz absorpsiyonunu geciktirirler. Bu grup ilaçlar tokluk hiperglisemi tedavisinde etkilidir, ancak gastrointestinal yan etkiler nedeniyle uzun süreli kullanımları zordur (Kayaalp ve Gürlek, 2009). Antidiyabetik ilaçlar Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Antidiyabetik ilaçların şematik gösterimi (Kayaalp ve Gürlek, 2009)

İnsülinomimetik ilaçlar grubunda amilin agonistleri, inkretin mimetik ilaçlar ve yeni geliştirilmekte olan maddeler yer almaktadır. Genel olarak endojen insülin sekresyonunu artırarak etkili olmaktadırlar. Amilin, insülinle beraber beta hücrelerinden salgılanır. Pramlintid amilin'in sentetik analoğu olup, kan şekeri regülasyonunda Tip 2 diyabetlilerde kullanılmaktadır. İnkretinler, intestinal bölgeden salınan insülin salımının düzenlenmesinden sorumlu hormonlardır. Bu hormonlar Glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) ve glikoza-bağımlı insülinotropik peptittir (GIP). Tip 2 diyabette inkretin hormonların (GLP-1 ve GIP) seviyesi ve/veya etkisi azalmakta ve glukagon sekresyonu inhibe edilememektedir. İnkretin mimetik ilaçlar, inkretin hormonları taklit eden glukagon benzeri peptid-1 reseptör agonistleri (GLP-1A: Glukagon benzeri peptid-1 reseptör agonistleri) ya da inkretinlerin parçalanmasını inhibe eden dipeptidil peptidaz-4 inhibitörleri (DPP4-İ) olarak sınıflandırılabilir. Glikoz-bağımlı etkilerinden dolayı hipoglisemiye yol açmamaktadırlar. İnkretin mimetikler pankreas beta hücrelerinden insülin salgılanmasını

artırırlar ve glukagon salgılanmasını azaltırlar. Midenin boşalmasını geciktirerek besinlerin sindirimini ve barsaktan emilmesini yavaşlatırlar. Ayrıca iştahı azalttıkları için besin alımını azaltma ve kilo kaybı yapma potansiyelleri vardır. Glukagon benzeri peptid-1 reseptör agonistleri (GLP-1A) grubunda yer alan eksenatid ve liraglutid endojen inkretin olan GLP-1'i taklit eder. Dipeptidil peptidaz-4 inhibitörleri (DPP4-İ) grubunda yer alan siltagliptin ve vildagliptin glukagon salgılanmasını inhibe ederek, insülin salımını artırarak etki gösterirler (Katzung, 2017; Kayaalp ve Gürlek, 2009; Ükinç, Gürlek ve Umsan, 2007).

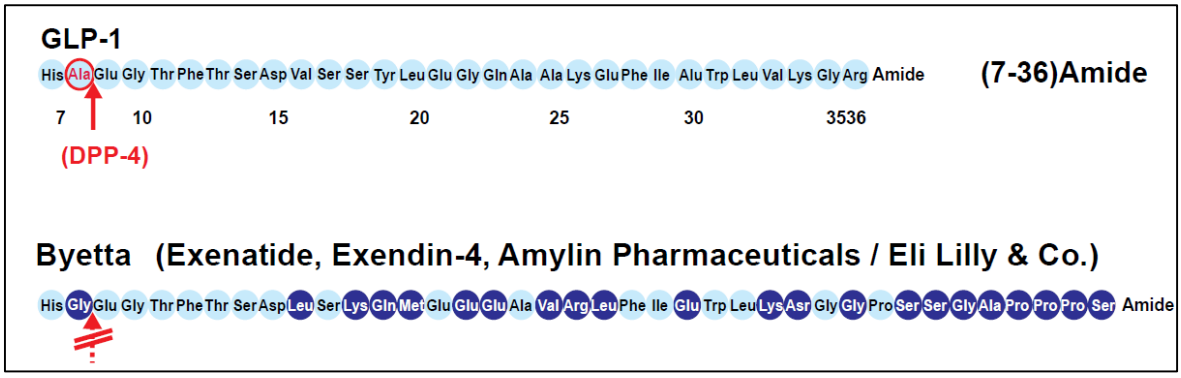
2.2. Exendin-4 (Eksenatid)

Exendin-4, 39 aminoasitten oluşan doğada bulunan en iyi GLP-1 agonisti moleküldür. Bir tür sürüngen olan Gilia monster (Heloderma suspectum) tükürüğünden izole edilmiş olup molekül GLP-1 ile aminoasit dizilimine %50 'den fazla benzerlik göstermektedir. DPP-4 enziminin degrade edici etkisini önlemek amacıyla doğal GLP-1 molekülündeki 2. aminoasit pozisyonundaki Ala, exendin-4 molekülünde Gly ile değiştirilmiştir. Bu sayede exendin-4 enzim etkisine karşı direnç kazanmakla beraber GLP-1 molekülünün 1-2 saat olan plazma yarı ömrü 4-6 saate çıkmıştır. GLP-1 molekülü ve exendin-4'ün aminoasit dizilimi Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

Exendin-4, GLP-1 reseptörlerine yüksek afinitede bağlanarak vücutta glikoz bağımlı insülin salgılanmasını, gastrik boşalmanın geciktirilmesini, glukagon salımının ve iştahın baskılanmasını sağlamaktadır (Kayaalp ve Gürlek, 2009; Ükinç ve diğerleri, 2007). Exendin-4'ün aminoasit dizilimi "His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH_2" olarak belirtilmiştir (Chen ve Drucker, 1997). Exendin-4'ün molekül ağırlığı 4186,57 Da, izoelektrik noktası 4,96 olup (Kim ve diğerleri, 2013), çözünürlüğü DMSO'da 20 °C'de yaklaşık 1 mg/mL bulunmuştur (Bachhav ve Kalia, 2011).

Wang ve diğerleri yaptıkları bir çalışmada; Madin Darby Canine Kidney (MDCK) hücrelerinden exendin-4'ün geçişini incelemiş, permeabilite katsayısını (P_{app}) 1×10^{-7} cm^2/s olarak bulmuşlardır. Exendin-4'ün intestinal membrandan geçişinin zayıf olduğunu ve geçişin pasif parasellüler yolla olduğunu belirtmişlerdir (Wang ve diğerleri, 2014). Exendin-4'ün, Tip 2 diyabetli hastalara subkütan enjeksiyonla uygulanmasını takiben plazma doruk konsantrasyonuna (C_{maks}) yaklaşık iki saatte ulaştığı belirtilmiştir. Subkütan yoldan 10 μg

dozda verildiğinde ortalama doruk eksenatid konsantrasyonu 211 pg/mL ve ortalama eğri altında kalan alan (AUC) ise 1036 pgxs/mL olarak bulunmuştur. Exendin-4, 5- 10 µg terapötik doz aralığında uygulandığında AUC değerinin verilen dozla orantılı olarak arttığı belirtilmiştir. Subkutan tek doz uygulandığında ortalama sanal dağılım hacminin 28,3 litre, ortalama klirensin 9,1 L/s, ve ortalama terminal yarı ömrünün 2,4 saat olduğu belirtilmiştir (Malone, Trautmann, Wilhelm, Taylor ve Kendall, 2009). Exendin-4'ün Byetta® ticari ismiyle 5 µg ve 10 µg'lık subkütan formları mevcuttur (Satman ve diğerleri, 2018: 15-254). Byetta® Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nden (FDA) 2005 yılında, Avrupa Birliği'nde 2006 yılında, Türkiye'de ise 2008 yılında Tip 2 diyabetin tedavisi için ruhsat almıştır (U.S. Food and Drug Administration 2016). Sunulan vaka raporlarında ve yapılan çalışmalarda Byetta®'nın pankreatit riskini artırdığı belirtilmektedir (Bain ve Stephens, 2008; Frey, Zhou, Harvey ve White, 2006). Ülkemizde henüz kullanım onayı bulunmayan Bydureon® (exendin-4 içeren PLGA mikropartikülleri) ticari preparatı uzatılmış salım göstermektedir. Bydureon®, FDA tarafından 2012'de onaylanarak haftada bir subkütan injeksiyon şeklinde kullanılmak üzere Avrupa ve Amerika'da satışa sunulmuştur (Kayaalp ve Gürlek, 2009; Satman ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.2. GLP-1 molekülü ve Eksenatid'in aminoasit dizilimi (Bhansali, Maji, Rao, Banerjee ve Kumar, 2010).

Gedulin ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada Çizelge 2.1'de exendin-4 'ün veriliş yollarına göre sıçanlarda saptanan farmakokinetik parametreleri verilmiştir.

Çizelge 2.1. Exendin-4'ün veriliş yollarına göre farmakokinetik parametreleri (Gedulin ve diğerleri, 2008)

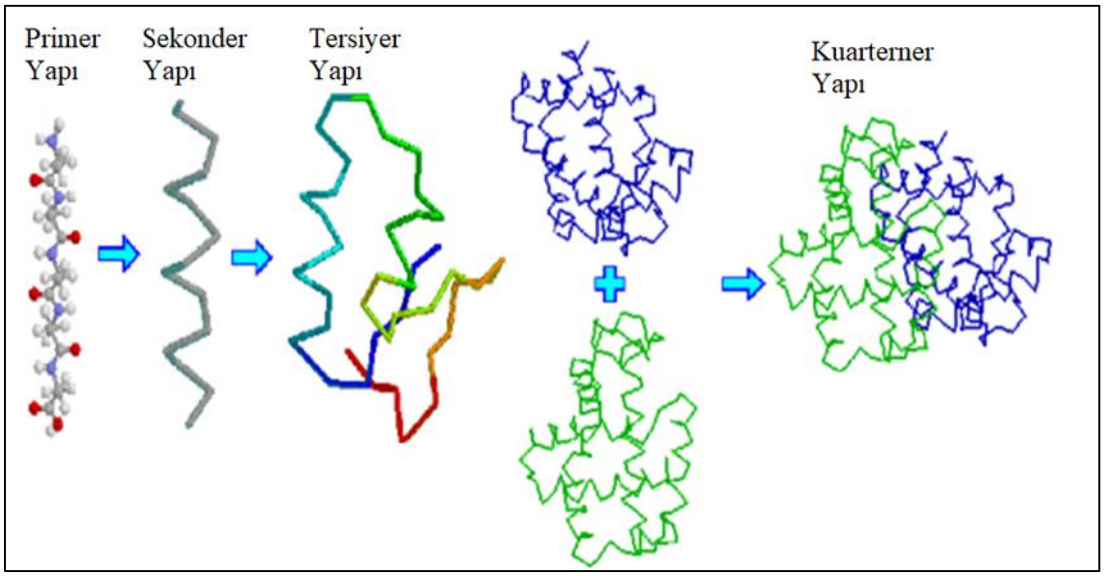
Veriliş Yolu	k_a (dk^{-1})	k_e (dk^{-1})	AUC_{480}	Doz (µg)	AUC/doz (pM dk/µg)	Bağıl Biyoyararlanım (%)	C_{maks} (pM /µg)
İntraduodenal	0,49	0,045	2895	1000	2,89	0,0053	0,115
Sublingual	0,21	0,011	42737	210	203,5	0,37	2,11
İntranazal	0,15	0,017	92100	100	921	1,68	16,06
Aerosol	0,41	0,017	100285	2000	50,1	0,092	0,71
İntravenöz	0,091	0,017	11482000	210	54600	100	3757
Subkütan	0,099	0,035	7080240	210	33715	61,7	134,3
İntratrakeal	0,12	0,014	1556000	210	7410	13,6	327,1

2.3. Peptit ve Proteinlerin Oral Verilişleri

Tez çalışmamız peptit yapısında olan exendin-4'ün oral verilişini kapsadığı için, bu bölümde peptit ve proteinlerle ilgili genel özellikler, oral ve diğer veriliş yolları kısaca açıklanmıştır.

2.3.1. Terapötik peptit ve proteinlerin özellikleri

Peptit/proteinler; aminoasitlerin α-amino ve α-karboksil gruplarının peptit bağları ile birbirlerine bağlanmasıyla oluşan büyük molekül ağırlıklarına sahip, biyolojik ortamlarda kolay metabolize olan ve dayanıksız kompleks yapıda biyoaktif maddelerdir. Peptitler 20'den az amino asit içerirken, proteinler 50 veya daha fazla amino asit içerir. Polipeptitler ise 20–50 amino asit içermektedir. Peptit/protein yapıları primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapı olmak üzere dört grupta sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.3). Primer (birincil) yapı; polipeptit zincirindeki kovalent olarak bağlanmış lineer amino asitlerin dizilerinden oluşmaktadır. Sekonder (ikincil) yapının, polipeptit zinciri dönüşlü ve kıvrımlıdır. Alfa-heliks ve beta-tabakaları, ikincil yapının ortak özellikleridir, geri kalanı β-bükülmeler, küçük kıvrımlar ve rastgele sarmallardır. Tersiyer (üçüncül) yapıda, sekonder yapının çeşitli elemanlarının daha belirgin katlanmasıyla oluşmuştur. Kuaterner (dördüncül) yapı ise, ayrı protein zincirlerinin (alt birimler veya monomerler) spesifik birleşmesi ile oluşmaktadır. Peptit/proteinlerin yapısı, fonksiyonu ile doğrudan ilişkilidir ve yapısındaki değişiklik işlevini de değiştirebilir (Banga, 2015; Öner, 2002; Ratnaparkhi, Chaudhari ve Pandya, 2011).

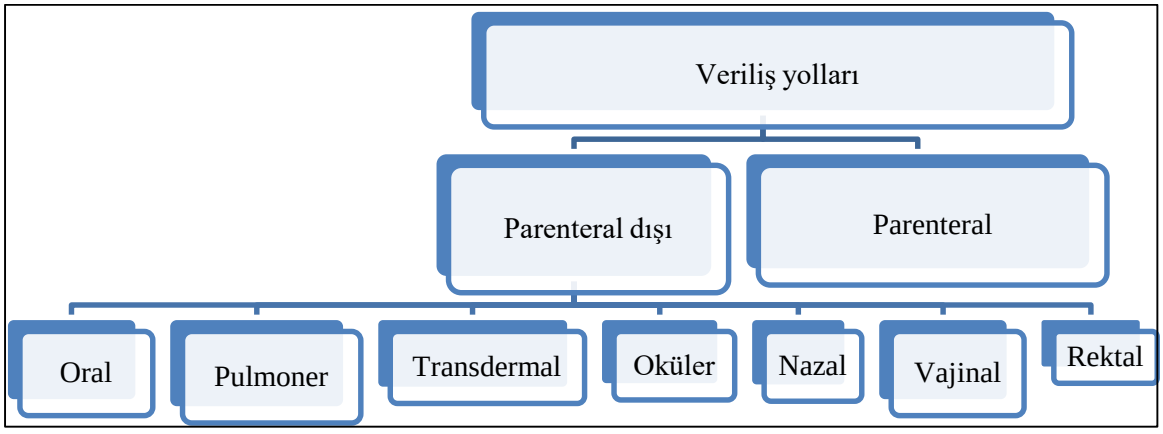


Şekil 2.3. Peptit/proteinlerin yapısı

Çeşitli doğal kaynaklardan şimdiye kadar insan fizyolojisinde önemli ve çeşitli işlevleri bulunan 7000'den fazla peptit tespit edilmiştir. En yaygın metabolik hastalıklar ve kanser olmak üzere 60'dan fazla peptit klinik kullanım için FDA tarafından onaylanmıştır, 600'den fazla peptit için preklinik ve klinik çalışmalar yapılmaktadır. Terapötik peptitlerin sayısının yakın gelecekte daha da artması beklenmektedir. Farmakolojik profilleri, intrinsik özellikleri, yüksek selektivite ve potensleri terapötik peptitleri güvenlik, etkinlik ve tolere edilebilirlik açısından küçük moleküllere göre cazip kılmaktadır. Fakat terapötik peptitlerin zayıf fiziksel ve kimyasal stabiliteleri, agregasyona meyilli, hidrolize ve oksidasyona açık olmaları, kısa yarı ömürlü olmaları ve karaciğerde ilk geçiş etkisine uğramaları, düşük membran permeabiliteleri, immünojenisiteleri gibi özellikleri peptitlerin terapötik özelliklerini etkilemektedir. Peptitlerin terapötik özelliklerini iyileştirmede; füzyon, glikozilasyon, siklizasyon gibi geleneksel yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bu yaklaşımlar, peptitlerin plazma yarılanma ömürlerini, proteolitik stabilitelerini, çözünürlüklerini, biyolojik membranlardan emilimlerini iyileştiririp agregasyona eğilimlerini azaltmalarında farklı derecelerde başarı sağlamışlardır (Fosgerau ve Hoffmann, 2015; Li, Clark ve Tan, 2018).

2.3.2. Veriliş yolları

Peptit/proteinlerin veriliş yolları oral, pulmoner, transdermal, oküler, nazal, vajinal rektal ve parenteral yol olarak sıralanmaktadır. Peptit/proteinlerin veriliş yolları Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Peptit/proteinlerin veriliş yolları (Ibraheem, Elaissari ve Fessi, 2014)

Genellikle terapötik peptit/proteinlerin verilişleri en yaygın parenteral yolla sağlanmaktadır. Bununla beraber zayıf hasta uyuncu, enjeksiyonda ağrı hissi, doz tekrarı, sterilizasyon tekniklerinin bazı durumlarda etkin madde ve formülasyon üzerindeki olumsuz etkileri gereği parenteral yolun sakıncalarındandır. Bu yüzden parenteral yol dışında alternatif olarak oral, transmukozal (nazal, bukkal, rektal, pulmoner, vajinal, oküler) ve transdermal yolla peptit/proteinlerin verilişi için çeşitli araştırmalar yapılmaktadır (Ibraheem ve diğerleri, 2014).

Peptit/proteinlerin oral yoldan verilişleri

Tez kapsamında oral yoldan uygulanmak üzere exendin-4 içeren SNEDDS'ler geliştirileceği için bu bölümde peptitlerin oral verilişleri ile ilgili bilgiler ayrıntılı olarak verilmektedir. Oral yol, hasta uyuncu ve kullanım kolaylığı açısından en çok tercih edilen yoldur. Oral yol i.v infüzyonla verilen belli antidiyabetik peptitler için (örn. insülin), portal ven pankreatik salımı taklit ettiği için daha fizyolojik bir yoldur. Ayrıca oral yol, patent süresi dolan enjektabl peptitlerin patent sürelerini uzatmada önemli bir fırsat olarak karşımıza çıkmaktadır (Choonara ve diğerleri, 2014).

Öte yandan, oral yolla ilaç uygulanması molekülün absorpsiyonunda gastrik içerik ve sekresyonlarla etkileşme, membran permeabilitesi, intestinal geçiş ve gastrik boşalma gibi nedenlerden dolayı bazı problemlere yol açabilmektedir (Aguirre ve diğerleri, 2016). Etkili bir oral taşıyıcı sistem geliştirilmesi için GİK'ten emilimi kısıtlayacak terapötik proteinlerin ve peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinin (molekül ağırlığı, pH, stabilite, hidrofobisite, iyonizasyon sabiti, izoelektrik noktaları) ve biyolojik bariyerlerin (midede proteolizis, değişken pH, zayıf permeasyon ve membran dışa atımı) göz önünde bulundurulmalıdır (Park, Kwon ve Park, 2011; Renukuntla, Vadlapudi, Patel, Boddu ve Mitra, 2013).

2.3.3. Gastrointestinal bariyerler: intestinal absorpsiyon mekanizmaları

Peptit/proteinlerin oral yolla etkin bir şekilde taşınmasında gastrointestinal bariyerlerin rolü çok önemlidir. Oral alımı takiben gastrointestinal epitel emilim için fiziksel ve biyokimyasal bariyer olarak davranmaktadır. Fiziksel bariyer, geçirgen olmayan gastrointestinal epitelden oluşurken, biyokimyasal bariyer enzimatik parçalanmadan (degradasyon) sorumludur (Catnach, Fairclough ve Hammond, 1994; Kompella ve Lee, 2001).

GİK dört tabakadan oluşur. Bunlar mukoza, submukoza, muskularis externa ve seröz membran olarak tanımlanır. GİK mukozası; etkin maddelerin emilimini sağlayan çıkıntılar (villüsler) içeren mukus salgılayıcı tabakadır. GİK mukozal yüzeyi, peptit/proteinlerin emilimine karşı etkili bariyer sağlayan ve sistemik dolaşıma girişini seçici olarak sınırlayan sıkı bağlantılarla bağlı tek tabakalı epitelyal hücrelerle korunan, geniş bir ara yüzeye sahiptir (Antunes, Andrade, Ferreira, Morck Nielsen ve Sarmento, 2013).

Peptit/protein moleküllerinin biyoyararlanımı intestinal mukozayı geçmeleri ve sistemik dolaşıma katılmalarına bağlıdır. GİK pH'sı 1-7 aralığında değişmektedir. Mide pH'sı 1-3, duodenum 6,0-6,5, kalın bağırsak pH'sı 5,5-7,0 dir (Graaff, 1986). Mideden protein emilimi küçük yüzey alanı, pepsinin aktivitesi ve asidik ortamın etkisi gibi birçok faktöre bağlı olarak sınırlı olarak gerçekleşir. İntestinal epitel fosfolipit çift tabaka ve kolesterolden oluşur. Oral alımını takiben etkin maddeler sistemik dolaşıma katılmadan önce lipit membrandan geçmek zorundadır. İnce bağırsak besinlerin (karbonhidratlar, proteinler, lipitler, su, vitamin ve mineraller) %90'ının emiliminden sorumludur. Geri kalan %10 ise mide ve kalın bağırsaktan emilir. İnce bağırsaktaki absorplayıcı mukozal hücrelerin üzerindeki mikrovilluslar kan dolaşımına ya da lenfatik dolaşıma girecek besinlerin emilimi için geniş bir yüzey alanı

sağlamaktadır. Fakat, bazı etkin maddelerin emilimi hepatik enzimler tarafından karaciğerde ilk-geçiş etkisiyle sonuçlandırılabilir. Bu yüzden, lenf nodlarından oluşan ileumdaki Peyer plaklarından peptit/protein ilaçların emilimi peptit ve proteinlerin biyoyararlanımını artırmada önem taşımaktadır. Lenfatik sistemden emilen bileşenler lenf torasik kanalından geçerek kan dolaşımına katılmaktadır. Bu yaklaşımla, karaciğer ilk-geçiş etkisi büyük ölçüde engellenebilir (Shakweh, Ponchel ve Fattal, 2004; Tortora ve Derrickson, 1996).

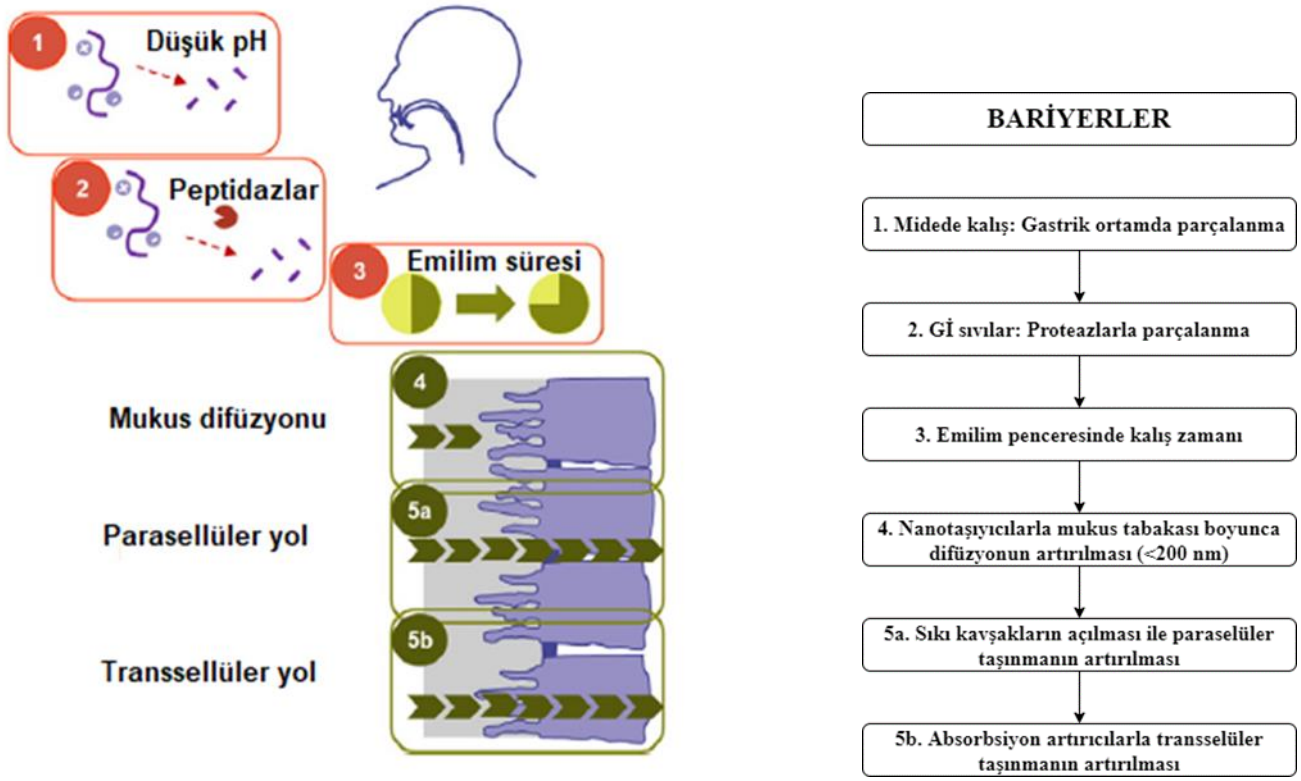
İnce bağırsak, uzun çıkıntılı mukozadan ya da mikrovillus olarak adlandırılan öne doğru çıkıntılar, mukus salgılayan hücreler, sekretin salgılayan enteroendokrin hücreler ve lizozim salgılayan Paneth hücrelerinden oluşur. Besinlerin çoğu ince bağırsakta sindirime ve emilime uğradığı için ince bağırsak peptit/protein yapılı moleküllerin potansiyel emilim bölgesi olarak düşünülebilir (Repassy ve Lapis, 1979). Mukus salgılayan hücrelerin ve enteroendokrin hücrelerin yanısıra, enterositler ve M hücreleri intestinal taşınma için önemlidir. Enterositler ve M hücreleri Peyer plaklarının epitelinde yerleşmişlerdir. Bu hücreler peptit/proteinleri lümenden lenfatik dokulara taşımaktadır. Kalın bağırsağın duvarı basit sütunsal epitelden ve mukus salgılayan goblet hücrelerinden oluşmaktadır. Kolonda proteolitik etkinin olmaması ve kolonda moleküllerin uzun süreli kalış süresi, peptit/protein ilaçların emilimine uygun bir ortam sağlamaktadır (Yun, Cho ve Park, 2013). Kolonda peptit/protein molekülleri; pH duyarlı, mukoadezif ya da kolondaki bakteriler tarafından parçalanmaya uğrayan polimerlerle taşınabilmektedir (Renukuntla ve diğerleri, 2013).

Oral yolla alınan bileşenler midede güçlü asidik (pH 2-3) ortama maruz kalmaktadır. Mide, besinlerin sindirimini başlatan ve istenmeyen patojen ve toksinleri yok eden lipazlar ve proteazları içeren birçok enzim içermektedir. Kısmen sindirilmiş materyal (kimus) varlığında, safra kanalından salınan pankreatik enzimler ve safra asitlerini içeren ince bağırsağın (duodenum) ilk bölümüne gelmektedir. Kimus ince bağırsağın değişen pH'larına sahip jejenum ve ileum bölümlerinden geçmektedir. Bu esnada büyük proteinler intestinal epitel hücrelerin apikal yüzeyindeki peptidazlarla küçük peptitlere parçalanmaktadır (Mrsny, 2012). Peptit/proteinlerin büyük molekül ağırlıkları ve hidrofilik özellikleri intestinal epitelden geçişlerini büyük ölçüde zorlaştırmaktadır. GİK'ten emilim mekanizmaları pasif taşınma, aktif taşınma ve endositoz olarak sınıflandırılmaktadır (Artursson, Neuhoff ve Matsson, 2007: 259-278). Pasif taşınmada moleküller intestinal membrandan basit ya da kolaylaştırılmış difüzyonla konsantrasyon gradiyentiyle, kimyasal enerji harcanmadan molekülün intrinsik fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak

gerçekleşmektedir. Düşük lipofilisite ve büyük moleküler ağırlıkları sebebiyle pasif taşınmayla peptit/proteinlerin emilimi sınırlanmıştır. Aktif taşınmada, moleküllerin konsantrasyon gradiyentine karşı Gİ epitelden geçişi kimyasal enerji harcanarak gerçekleşmektedir. Endositozda ise, emilimi sağlanacak moleküllerin yutulması enerji harcanarak gerçekleşmektedir. Peptit/proteinlerin temel taşınma mekanizmaları transsellüler ve parasellüler yol olarak belirtilmiştir. Transsellüler pasif difüzyon moleküllerin intestinal epitelin apikal ve bazolateral membranlarından pasif akışını kolaylaştıran boyut, yük ve lipofilisiteleri gibi fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır (Ménard ve diğerleri, 2012). Parasellüler yoldan emilim, bitişik enterositlerin arasındaki alanın dar olması ve bitişik hücreler arasındaki tutunma mekanizmasında rol oynayan sıkı bağlantıların varlığı yüzünden kısıtlıdır. Parasellüler yol transsellüler yolla karşılaştırıldığında moleküllerin lipofilisitesine ve hidrojen bağlama kapasitesine bağlı değildir, doğal olarak hücre bağlantılarında hidrofilik kanallar boyunca peptitlerin taşınmasını içermektedir (Oda ve Takeichi, 2011).

Peptit/proteinlerin emiliminde kimyasal bariyer olarak gastrointestinal kanal

GİK'in sıvı içeriği, işlevi ve enzimler peptit/proteinlerin oral yolla taşınmasında etkili olan ana faktörlerden biridir. Proteinler GİK'in çeşitli bölgelerindeki proteolitik enzimlere karşı duyarlıdır. Gastrik ortamın asidik doğası ve enzim aktivitesi, peptit/proteinlerin geri dönüşümsüz olarak aminoasitlere ve küçük absorplanabilir oligopeptitlere parçalanmasına sebep olmaktadır. Proteinlerin midede kimyasal sindirimi pepsinle tetiklenmektedir. Ayrıca, ince bağırsakta tripsin, kimotripsin, ekzopeptidaz ve endopeptidazlar gibi pankreatik ve fırçamsı kenar enzimleri peptit/proteinlerin esansiyel olmayan aminoasitlere parçalanmasına katkıda bulunur. Kimyasal (düşük pH), biyokimyasal (enzimlerin varlığı) ve fiziksel (epitel) bariyerler peptit yapıdaki molekülün kan dolaşımına girişini engeller (Rekha ve Sharma, 2013; Renukuntla ve diğerleri, 2013). Başarılı peptit/protein emilimi için gastrik ortamda ve proteazlarla parçalanmanın engellenmesi GİK'in kimyasal bariyerinin aşılmasında; nanotaşıyıcılarla mukus tabakası boyunca difüzyonun sağlanması, parasellüler taşınmanın ve transellüler taşınmanın kolaylaştırılması GİK'in fiziksel bariyerinin aşılmasında önem teşkil etmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Başarılı oral peptit emilimi için önemli olan bariyerler (Lakkireddy ve diğerleri, 2016)

2.4. Peptit/Proteinlerin Oral Biyoyararlanımlarının Artırılmasında Çeşitli Yaklaşımlar

Terapötik peptit/proteinlerin oral biyoyararlanımlarının artırılmasında yapılan çalışmalarda çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir (Ibraheem ve diğerleri, 2014). Bu yaklaşımların ana amacı Gİ bariyerlerin sınırlayıcı etkilerinin üstesinden gelmek ve oral biyoyararlanımı artırmak üzere yoğunlaşmıştır. Enterik kaplama da, ayrıca peptit/proteinlerin parçalanmasında pepsinin etkisinden kurtulmak amacıyla kullanılmaktadır. Oral peptit/protein absorpsiyonunu artırmak için çeşitli yaklaşımlar; kimyasal modifikasyon, mukoadhezif veriliş sistemlerinin geliştirilmesi, absorpsiyon artırıcı maddelerin ilavesi, proteaz inhibitörlerinin formülasyona eklenmesi, ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi olarak sıralanmaktadır (Renukuntla ve diğerleri, 2013; Tan, Choong ve Dass, 2010). Bu teknolojiler tek başına ya da kombinasyon halinde optimum oral ilaç taşıyıcı sistemleri tasarlamak amacıyla kullanılabilir.

2.4.1. Kimyasal modifikasyon

Peptit/proteinlerin polimerlerlerle konjugasyonu ya da peptit/proteinlere fonksiyonel grup eklenmesiyle proteolitik stabilite ve membran permeabilitesinin artırılması sağlanmaktadır. Kimyasal modifikasyona pegilasyon, hidrofobikleştirme ve peptitlerin aminoasit diziliminde değişiklikler yapılması olarak örnek verilebilir (Herman, Hooftman ve Schacht, 1995).

Protein-polimer konjugasyonunda kullanılan polimerler suda çözünebilen, immünojenik olmayan, biyouyumlu ve herhangi bir biyolojik aktivitesi olmayan polimerlerdir. İdeal bir polimer makromoleküllerin biyolojik aktivitesini azaltmayacak ve toksisitesini artırmayacak şekilde seçilmektedir (Grover ve Maynard, 2010). N-(−2-hidroksipropil) metilakrilamid ve polietilen glikol (PEG) protein konjugasyonu için seçilebilecek ideal polimerlerdir. Proteinlere PEG'in kovalent bağlanması (pegilasyon); proteinlerin terapötik potansiyellerini artırmak amacıyla parenteral formülasyonlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Pegilasyon enzimatik stabiliteyi artırmasının yanısıra sterik engel oluşturmasıyla makromolekülün immün sistemden korunmasını sağlamaktadır. Molekül büyüklüğünün artması peptit/proteinin renal klirensini azaltmaktadır. Bir diğer yöntem ise proteinlerin yüzey modifikasyonudur. Yüzey modifikasyonunda peptit omurgasındaki hidrofilik aminoasitlerin

hidrofobik hale getirilmesi ya da transsellüler alımı artıran lipofilik taşıyıcılarla kovalent konjugasyonu yapılmaktadır. Örneğin; laurik, palmitik ve bütirik asit gibi yağ asitlerinin insülin ve desmopressinle konjugasyonu intestinal membran permeabilitesinde önemli bir artış sağlanmıştır (Choonara ve diğerleri, 2014).

2.4.2. Mukoadezif polimerik sistemlerin geliştirilmesi

Mukoadhezif polimerik sistemler, oral peptit/proteinlerin verilişlerinde büyük önem taşımaktadır. Bu sistemler pH, sıcaklık, enzimler gibi çevresel faktörlerdeki değişikliklere yanıt olarak polimer ağ yapısında değişiklik göstermektedirler. pH-duyarlı mukoadezif polimerik taşıyıcılar, peptit/protein moleküllerini mide ve ince bağırsağın üst kısmındaki proteolitik bozulmaya karşı korumak için kullanılmıştır (Park ve diğerleri, 2011). Mukoadezif taşıyıcı sistemler, peptit/protein ve mukusun etkileşimine yardımcı olarak ilacın emilim bölgesinde kalış süresini uzatabilirler. Bu sayede, konsantrasyon gradyanını artırarak Gİ lümen sıvısından peptit/protein emilimini sağlayabilirler. Mukoadezif taşıyıcı sistemlere tiyollenmiş polimerler örnek olarak verilebilir. Polimer omurgalarındaki tiyol grupları, intestinal mukus glikoproteinlerinin sistein bakımından zengin alt etki alanları ile kovalent disülfit bağları oluşturarak, böylece absorpsiyon bölgesinde yüksek bir peptit/ protein konsantrasyonu gradyanı sağlayarak moleküllerin geçişini artırmaktadır (Chin, Mahmud, Kim, Park ve Byun, 2012).

2.4.3. Absorpsiyon artırıcı maddeler

Absorpsiyon artırıcı maddeler, genel olarak peptit/protein absorpsiyonunu birtakım mekanizmaların kombinasyonuyla artırmaktadır (Shaji ve Patole, 2008). Bunlar;

- Sıkı bağlantıların açılması ve tahrip edilmesiyle parasellüler permeabiliteyi artırmak,
- Mukus viskozitesini azaltmak,
- Membran akışkanlığını artırmak olarak sıralanabilir.

Yüzey etkin maddeler (sodium lauril sülfat, Tween 80® vb.) transsellüler yolla hücre epitelini geçerek intestinal membranı bozmakta ve peptit/proteinlerin permeabilitesini artırmaktadır. Safra tuzları; mukus viskozitesini, peptidaz aktivitesini azaltarak ve fosfolipit açil zincirini tahrip ederek karışık misel oluşumuyla peptit/proteinlerin permeabilitesini

artırmaktadır. Benzer olarak yağ asitleri (oleik asit, laurik asit) karışık misellerin oluşumu ve intrasellüler kalsiyum seviyelerinin yükseltilmesiyle parasellüler permeabilitenin artmasına katkıda bulunmaktadır. Şelat yapıcı ajanlar intestinal epitel hücrelerde bulunan kalsiyum iyonlarıyla etkileşerek sıkı bağlantıları açmaktadır (Hamman, Enslin ve Kotzé, 2005).

Kitosan ve türevleri, makromoleküllerin mukozaya biyoadhezyonuyla ve sıkı bağlantıların bütünlüğünü azaltarak permeabiliteyi artırmaktadır. İntestinal membrandan peptit/proteinlerin geçiş yeteneği, absorpsiyon artırıcıların yapısı ve absorpsiyonu artırabilme kapasitesi, absorpsiyon artırıcının taşıyıcı sistemden salımı absorpsiyon artırıcıların etkinliğini artırmadaki üç önemli ana faktördür (Choonara ve diğerleri, 2014; Renukuntla ve diğerleri, 2013).

2.4.4. Enzim inhibitörleri

Enzim inhibitörlerinin kullanımı peptit/proteinlerin oral absorpsiyonlarını engelleyen enzimatik bariyerin etkisini ortadan kaldırır. Enzim inhibitörleri etkilerini hedef enzime geri dönüşlü veya geridönüşsüz bağlanarak, bu enzimi inaktivite ederek veya aktivitesini azaltarak gösterir (Lee, 1990).

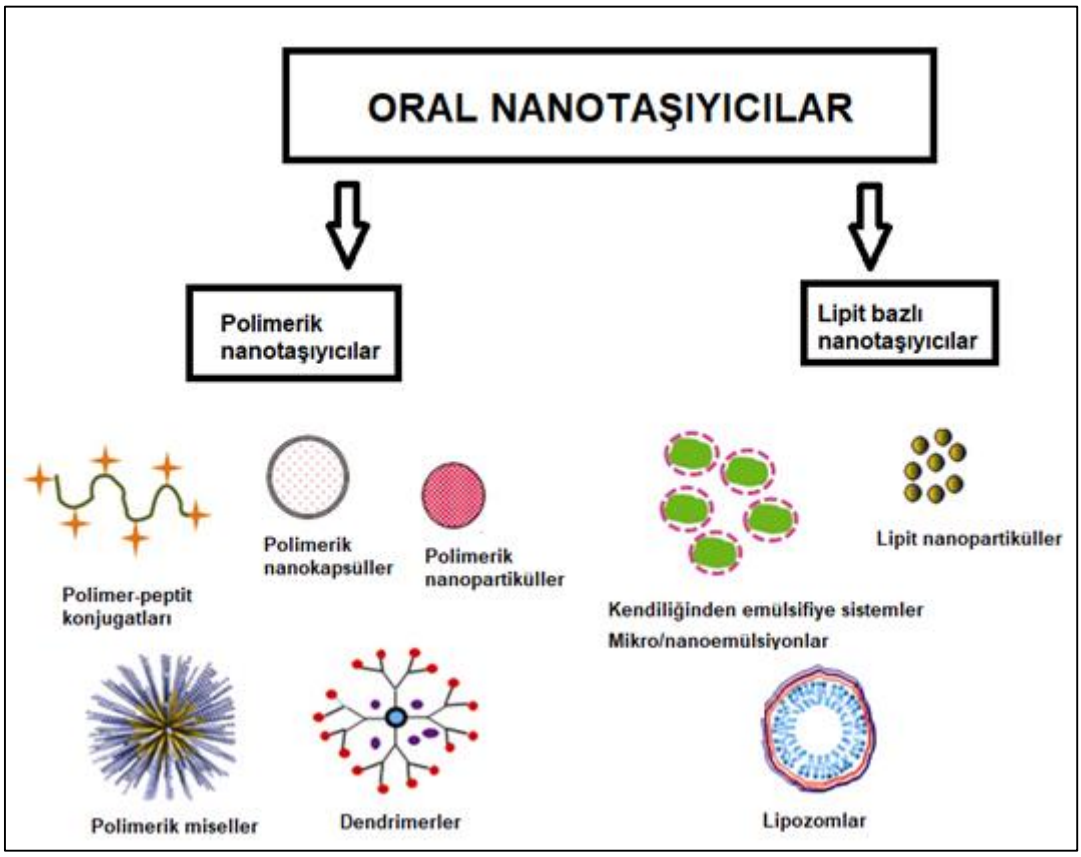
İntestinal proteaz inhibitörlerine örnek olarak, aprotinin (tripsin inhibitörü), soya fasulyesi kimostatin ve FK448 (kimotripsin inhibitör) ve tavuk ovomukoid (tripsin inhibitörü) verilebilir (Bai, 1995).

Bir yandan enzim inhibitörleri peptit/protein parçalanmasına neden olan enzimi inaktive ederken, diğer yandan da absorpsiyon artırıcılar intestinal membrandan absorpsiyonu kolaylaştırmakta, böylece iki yaklaşımın birarada kullanımı peptit/proteinlerin biyoyararlanımını artırmada daha da etkili olmaktadır (Choonara ve diğerleri, 2014).

2.4.5. İlaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi

Terapötik peptit/proteinlerin GİK'te parçalanmasını önleyerek fiziksel ve kimyasal stabilitelerini ve biyoyararlanımlarını artırmak amacıyla ilaç taşıyıcı nanosistemler geliştirilmiştir. Oral yolla kullanılan nanotaşıyıcılar Şekil 2.6'da gösterilmiştir. Bu taşıyıcılar polimerik nanotaşıyıcılar (polimer-peptit konjugatları, polimerik nanokapsüller, polimerik

nanopartiküller), lipit bazlı nanotaşıyıcılar (kendiliğinden emülsifiye sistemler, mikro/nanoemülsiyonlar, lipit nanopartiküller, lipozomlar), polimerik miseller, dendrimerler olarak sınıflandırılabilir (Thanki, Gangwal, Sangamwar ve Jain, 2013).



Şekil 2.6. Oral yolla kullanılan nanotaşıyıcılar (Thanki ve diğerleri, 2013)

Terapötik peptit/protein taşıyan nanoboyuttaki taşıyıcı sistemler oral uygulandıklarında, etkin maddeyi enzimatik ve hidrolitik bozunmaya karşı koruyarak M hücreleriyle hücre içine taşırlar. Peptit/proteinlerin oral nanotaşıyıcı sistemlerle ilgili çalışmaları Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Tez çalışmamızda kullandığımız exendin-4'ün oral nanotaşıyıcılar ile yapılan çalışmaları ise Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.2. Peptit/proteinlerin oral nanotaşıyıcı sistemlerle ilgili çalışmaları

Peptit/Taşıyıcı Sistem	Sonuç	Kaynak
EGF içeren mikroemülsiyon	Akut mide ülserinin iyileşmesini sağlayacak EGF içeren mikroemülsiyon formülasyonu geliştirilmesinin amaçlandığı çalışmada, EGF içeren mikroemülsiyon formülasyonunun i.g. verilişi sonucunda, EGF'nin çözelti dozaj formundan ve hatta i.p. verilen EGF'nin serum fizyolojikteki çözeltisinden daha etkili olduğu sonucuna varıldığı belirtilmiştir.	(Türkyılmaz, 1998)
TGF-α içeren mikroemülsiyon	Aprotinin içeren mikroemülsiyonun TGF-α'yı enzimatik aktiviteden koruyup korumadığı ve mikroemülsiyon formülasyonu içinde oral uygulanan TGF-α'nın, mide ülseri üzerindeki iyileştirici etkinliği araştırılmıştır. Aprotinin içeren TGF-α mikroemülsiyonunun intragastrik uygulanmasından sonra mide asit sekresyonu aprotinin içermeyen TGF-α mikroemülsiyon grubuna göre belirgin olarak azalmıştır.	(Yetkin, 2002)
İnsülin yüklü kazeinle kaplanmış kalsiyum fosfat/PEG nanopartikülleri	Kazeinin partiküllere adsorbe olması sonucunda insülin salımı ilk 3 saat içerisinde pH 3,0'da %12 olurken, fosfat tamponunda (pH 6,5) %46 olarak bulunmuştur.100 IU/kg insülin yüklü nanopartiküllerin diyabetik sıçanların glikoz seviyesinde 12 saat boyunca %80 azalma gösterdiği belirtilmiştir.	(Morçöl, Nagappan, Nerenbaum, Mitchell ve Bell, 2004)
İnsülin içeren mikroemülsiyon	Plazma glikoz düzeylerinde, i.g yoldan insülin mikroemülsiyon uygulamasının, sc uygulamadan elde edilen kan glikozu ile benzer düşüş gösterdiği bulunmuştur. Mikroemülsiyona enzim inhibitorü olarak aprotinin ilave edilmesi plazma glikoz düzeyinde %30'a varan düşüşle sonuçlanmıştır. Aprotinin içeren mikroemülsiyonun, içermeyen mikroemülsiyona göre daha fazla bağıl biyoyararlanım gösterdiği bulunmuştur.	(Cilek, Celebi, Tırnaksız ve Tay, 2005)

Çizelge 2.2. (devam) Peptit/proteinlerin oral nanotaşıyıcı sistemlerle ilgili çalışmaları

Peptit/Taşıyıcı Sistem	Sonuç	Kaynak
İnsülin içeren tiyomer kaplı nanopartiküller	İnsülin içeren tiyomer kaplı nanopartiküllerin insülinin gastrointestinal enzimler tarafından parçalanmasını engellendiği bulunmuştur. Tiyollenmiş nanopartiküler, tiyollenmemiş olanlarla karşılaştırıldığında 2,3 kat daha yüksek biyoyararlanım gösterdiği bulunmuştur.	(Deutel, Greindl, Thaurer ve Bernkop-Schnürch, 2007)
İnsülin içeren oktaarjininle kaplanmış katı lipit nanopartikülleri	Diyabetik sıçanlara uyguladıklarında glikoz seviyelerinde ilk 1,5 saatte %70 düşüş gözlenmiş, biyoyararlanımı %13,9 bulunmuştur.	(Zhang, Zhang, Zhou, ve Lv, 2012a)
İnsülin içeren tiyollenmiş Eudragit L100 nanopartikülleri	Tiyollenmiş ve tiyollenmemiş nanopartikül formülasyonları insülini asidik pH'ya karşı korumuştur. Tiyollenmiş nanopartiküllerle güçlü mukoadezyon sağlanmıştır. Tiyollenmiş ve tiyollenmemiş nanopartikül formülasyonlarının her ikisi de diyabetik sıçanlara uygulandığında glikoz seviyelerinde %30'a kadar düşüş gözlendiği belirtilmiştir.	(Zhang ve diğerleri, 2012b)
İnsülin içeren PLGA-HPMCP55 nanopartikülleri	Bu çalışmada nanopartikül formülasyonları uygulanan diyabetik sıçanların glikoz seviyelerinde %80 düşüş gözlenmiş, biyoyararlanım %11,3 bulunmuştur.	(Wu ve diğerleri, 2012a)
İnsülin içeren PLGA ve Eudragit RS nanopartikülleri	Kapsül içerisindeki PLGA ve Eudragit RS nanopartiküllerinin HPMCP55 kaplı kapsüllerdeki insülin içeren karşılaştırıldığında asidik pH'da daha düşük insülin salımı gözlenmiş ve kapsüle doldurulmuş formülasyonun diyabetik sıçanların glikoz seviyelerinde %50 düşüş sağladığı belirtilmiştir.	(Wu ve diğerleri, 2012b)

Çizelge 2.3. Exendin-4 ’ün nanotaşıyıcılar ile yapılan çalışmaları

Peptit/Taşıyıcı Sistem	Sonuç	Kaynak
Biotinle konjugasyon	Biotinle konjuge halde exendin-4’ün (DB-Ex-4) 0.1, 1, 10 µg/kg dozda diyabetik sıçanlara oral uygulanması sonucu doza bağlı artan hipoglisemik etki gözlenmiştir. Konjuge haldeki exendin-4 serbest exendin-4’e göre 5,3 kat fazla hipoglisemik etki göstermiştir. Bağıl biyoyararlanım %3,95 bulunmuştur.	(Jin ve diğerleri, 2009)
Kitosan/ɣPGA nanopartikülleri	Exendin-4 Kitosan/ɣPGA nanopartiküllerinin serbest exendin-4’ün sc enjeksiyonuna göre bağıl biyoyararlanımı % 14 bulunmuştur.	(Nguyen ve diğerleri, 2011)
Kitosan/ɣPGA nanopartikülleri	Diyabetik sıçanlara insülin ve exendin-4 çözeltisi içeren enterik kaplı kapsülün oral uygulanması sonucu sıçanlarda kanda insülin ve exendin-4 seviyesi saptanamamıştır. Exendin-4 KS/ɣPGA NP ve insülin KS/ɣPGA NP verilen sıçanlarda insülin ve exendin-4 seviyesi benzer bulunmuştur. İnsülin ve exendin-4 KS/ɣPGA NPlerinin ise insülin KS/ɣPGA NP ve exendin-4 KS/ɣPGA NP’e göre seviyesi 2 kat fazla bulunmuştur.	(Chuang ve diğerleri, 2013)

Çizelge 2.3. (devam) Exendin-4 ’ün nanotaşıyıcılar ile yapılan çalışmaları

Peptit/Taşıyıcı Sistem	Sonuç	Kaynak
Nanopartikül	Exendin-4’ün oral yoldan uygulanması için düşük molekül ağırlıklı kitosanla konjugasyonu yapılmıştır. Diyabetik sıçanlarda yapılan oral hipoglisemik testte; kan glikoz seviyelerindeki değişiklikler zamana karşı ölçüldüğünde serbest exendin-4 ihmal edilebilir düzeyde hipoglisemik etki gösterirken LMWC-exendin-4 (4- 40 μg exendin-4/kg) glikoz seviyesini düşürme derecesi %22,90 ± 2,0 ve %41,07±4,7 bulunmuştur. Bu sonuçların düşük molekül ağırlıklı kitosanın mukoadhezif karakterinin ve epitel hücrelerdeki sıkı bağlantıları açma yeteneğiyle ilişkili olduğu düşünülmüştür.	(Ahn ve diğerleri, 2013)
Çok tabakalı nanopartikül	Diyabetik sıçanlarda yapılan *in vivo* çalışmada serbest exendin-4, çok tabakalı NP’ler, çok tabakalı NPler/Pluronic F-127 kan glikoz seviyesini sırasıyla %26,9, %60,8, %74,3 azaltmıştır.	(Oh ve diğerleri, 2014)
Nanopartikül/Mikropartikül	Farmakokinetik verilere göre DX-50 Byetta™ subkütan enjeksiyonuna göre bağıl biyoyararlanımı NP matriks yüzeyindeki dekstranın (enterositler tarafından lenfatik dolaşıma NPlerin geçmesini sağladığı için KC ilk geçiş etkisini ortadan kaldırarak) varlığına bağlı %77 bulunmuştur.	(Soudry-Kochavi, Naraykin, Nassar ve Benita, 2015)

Yapılan literatür taramasında exendin-4'ün oral yoldan uygulanmak üzere kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sistemler ile ilgili bir çalışmasına rastlanmamıştır. Daha önce de belirtildiği üzere tezimizde exendin-4'ün oral yoldan kullanılmak üzere SNEDDS formülasyonunun geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sistemler lipit bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerin alt grubunu oluşturmaktadır.

Lipit bazlı ilaç taşıyıcı sistemler

Lipit bazlı ilaç taşıyıcı sistemler lipofilik etkin maddelerin formülasyonu için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Lipit formülasyonları, suda az çözünen etkin maddelerin GİK boyunca geçişi sırasında çözünmüş bir halde kalmasını sağlayarak ilacın absorpsiyonu kolaylaştırabilir. Lipit bazlı taşıyıcı ilaç taşıyıcı sistemler; saf trigliserit yağlarından karışık gliseridlere, lipofilik yüzey etkin maddelerden, hidrofilik yüzey etkin maddeler ve suda çözünebilen yardımcı çözücülere kadar değişen yardımcı madde sınıfı içeren beş farklı formülasyon halinde sınıflandırılmıştır (Pouton ve Porter, 2008). Bileşen oranlarına göre yapılan bu sınıflandırma Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. Lipit bazlı Tip I, II, III, IIIB, IV formülasyonların sınıflandırılması (Pouton, 2006)

	Tip I (%)	Tip II (%)	Tip III (%)	Tip III B (%)	Tip IV (%)
Yağlar:Trigliseritler ya da karışık mono ve digliseritler	100	40–80	40–80	<20	-
Suda çözünmeyen yüzey etkin maddeler (HLB<12)	-	20–60	-	-	0-20
Suda çözünen yüzey etkin maddeler (HLB>12)	-	-	20-40	20-50	30-80
Hidrofilik yardımcı çözücüler (PEG, propilen glikol, Transcutol® vb.)	-	-	0-40	20-50	0-50

Özetle; Tip I formülasyonlar sadece yağ içeren ve sindirim gerektiren formülasyonlardır. Tip II formülasyonlar suda çözünmeyen kendiliğinden emülsifiye sistemler (SEDDS), Tip III formülasyonlar suda çözünebilen az miktarda yüzey etkin maddeleri/ kosolvan (Tip III A) ya da daha fazla miktarda yüzey etkin maddeler/kosolvan (Tip IIIB) içeren formülasyonlardır. Tip IV formülasyonlar ise yağ içermeyen hidrofilik formülasyonlardır. Tip IV formülasyonlardaki yüzey etkin maddeler/ kosolvan karışımında yüzey etkin maddenin varlığı kosolvanın tek başına formülasyonda bulunmasına nazaran seyreltme sonucu (miseller çözelti) daha iyi solvan kapasitesi sağlamaktadır. Formülasyonda yardımcı çözücü bulunması yüzey etkin maddenin dispersiyonunu kolaylaştırmasının yanısıra gerekli yüzey etkin madde konsantrasyonunu azaltmakta ve bu şekilde olası bir iritasyonu engellemektedir (Pouton, 2006). Lipit formülasyonları, suda az çözünen etkin maddelerin GİK boyunca geçişi sırasında çözünmüş bir halde kalmasını sağlayarak ilacın absorpsiyonu kolaylaştırmaktadır (Arslan ve Tirnaksiz, 2013). Oral yoldan uygulanmak üzere lipit-bazlı olan ilaç taşıyıcı sistemler şeklinde hazırlanmış ticari ürünler Çizelge 2.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. Oral yoldan uygulanmak üzere lipit-bazlı ilaç taşıyıcı sistemler şeklinde hazırlanmış ticari ürünler (Zanchetta, Chaud ve Santana, 2015).

Ticari İsim	Onay tarihi	Etkin madde	Terapötik Kullanım	Firma
Accutane®	1982	izotretinoin	akne tedavisi	Hofmann La Roche®
Sandimmune®	1990	siklosporin A	immünsupresif	Novartis®
Vesanoid®	1995	tretionin	lösemi	Hofmann La Roche®
Neoral®	1995	siklosporin A	immünsupresif	Novartis®
Norvir®	1996	ritonavir	antiretroviral	Abbott®
Fortovase®	1997	sakunavir	antiretroviral	Novartis®
Gengraf®	2000	siklosporin A	immünsupresif	Abbott®
Kaletra®	2000	lopinavir+ ritonavir	antiretroviral	Abbott®
Aptivus®	2005	tipranavir	antiretroviral	Boehringer®

2.5. Kendiliğinden Emülsifiye Olan İlaç Taşıyıcı Sistemler

Kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sistemler (SNEDDS); doğal veya sentetik yağlar, katı veya sıvı yüzey etkin maddeler, yardımcı yüzey etkin madde/ hidrofilik çözücü/ yardımcı çözücülerin izotropik/homojen karışımlarıdır. Bu sistemler, oral alımı takiben

GİK'teki sulu ortamda damlacık büyüklüğü 300 nm'nin altında Y/S nanoemülsiyonları oluşturmaktadır. Bu formülasyon bağırsak lümenine salındığında, nanoboyutta emülsiyon oluşturmak üzere dağılır, bu sayede hidrofobik etkin madde bağırsakta çözelti içinde kalmaktadır. Böylece emilim hızını kısıtlayan dissolüsyon aşamasını geçerek bağırsaktan emilim sonrası daha tutarlı bir plazma konsantrasyon-zaman profiline ve artmış biyoyararlanıma ulaşılabilir (Arslan ve Tirnaksiz, 2013; Gursoy ve Benita, 2004; Pouton, 1997).

Kendiliğinden emülsifiye olan sistemlerin üstünlükleri; oral biyoyararlanımın artırılması ve buna bağlı olarak doz azaltılmasının sağlanması, ilaçların mide ortamından korunması, yiyecek etkisine bağlı değişikliklerin azaltılması, yüksek etkin madde yükleme etkinliği sağlanması, kontrollü salım sağlanması, formülasyonun yumuşak veya sert jelatin kapsüller içerisinde verilebilmesi olarak sıralanmaktadır. Kendiliğinden emülsifiye olan ilaç taşıyıcı sistemler suda çözünürlük sorunu olan BCS II ve BCS IV etkin maddelerin ve peptit/protein yapıda etkin maddelerin oral biyoyararlanımlarını artırma amacı ile kullanılmaktadır (Khalid ve diğerleri, 2018; Kommuru, Gurley, Khan ve Reddy, 2001; Rao, Yajurvedi ve Shao, 2008; Q. Zhang ve diğerleri, 2012). Peptit/protein içeren kendiliğinden emülsifiye sistemlerle yapılan çalışmalar Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.6. Peptit/protein içeren kendiliğinden emülsifiye sistemlerle yapılan çalışmalara örnekler

Taşıyıcı Sistem	Sonuç	Kaynak
İnsülin içeren tiyollenmiş-kitosanla kaplanmış SNEDDS	İnsülin içeren tiyollenmiş-kitosanla kaplanmış kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sistemler diyabetik sıçanlara oral yolla uygulandığında , oral insülin çözeltisine göre serum insülin konsantrasyonunu 3,3 kat artırdığı gösterilmiştir.	(Sakloetsakun, Dünnhaupt, Barthelmes, Perera ve Bernkop-Schnürch, 2013)
İnsülin içeren kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sistemler	İnsülin içeren kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sistemler geliştirilmiş ve Eudragit L100 polimeriyle kaplanmış enterik kaplı kapsülle formülasyonun verilmesi amaçlanmıştır. Enterik kaplı kapsüldeki formülasyonun insülin çözeltisine göre biyoyararlanımı 2,7 kat artırdığı bulunmuştur.	(Li, Tan, Prestidge, Nielsen ve Müllertz, 2014)
İnsülin içeren aljinat/kitosan nanoemülsiyonu	Diyabetik sıçanlara oral yolla insülin içeren aljinat/kitosan nanoemülsiyonunun 25 ve 50 IU/kg dozda uygulanması sonucu insülin çözeltisine (sc) göre bağıl biyoyararlanımları sırasıyla %8,42 ve %5,72 bulunmuştur.	(Li ve diğerleri, 2013)
ß–laktamaz (BLM) içeren kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sistemler	BLM yüklenmiş formülasyonun diyabetik sıçanlara 4500 mU/kg dozda verilmesi sonucu BLM çözeltisine göre biyoyararlanım 1,5 kat artmış ve %6,34 bulunmuştur.	(Rao ve diğerleri, 2008)
İnsülin–fosfolipit kompleksi içeren SNEDDS	Diyabetik sıçanlara insülin–fosfolipit kompleksi içeren SNEDDS ve insülin-fosfolipit kompleksi çözeltisinin i.g. verilmesi sonucunda SNEDDS'in çözeltiye göre biyoyararlanımı 7 kat artırdığı bulunmuştur.	(Zhang ve diğerleri, 2012c)

2.5.1. Emülsifikasyon mekanizması

Kendiliğinden emülsifikasyon mekanizması henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Emülsifiye sistemde, dispersiyonun yüzey alanını arttırmak için gereken enerji olduğunda kendiliğinden emülsifikasyon meydana gelmektedir (Gürsoy ve Çevik, 2011).

Konvansiyonel emülsiyonun serbest enerjisi, yağ ve su fazları arasında yeni bir yüzey oluşturmak için gereken enerjinin doğrudan bir fonksiyonudur ve aşağıdaki "Eş.2.1" ile tanımlanabilir:

$$\Delta G = \sum N\pi r2\sigma \quad (2.1)$$

Burada ΔG, süreçle ilgili serbest enerjidir (serbest karışma enerjisi yok sayıldığında), N damlacıkların sayısı, r damlacıkların yarıçapını ve σ arayüzey enerjisini göstermektedir (Rani, Rana, Saraogi, Kumar ve Gupta, 2019).

Emülsiyon oluşumunda fazlar, arayüzey alanını azaltmak için zamanla ayrılma eğilimindedir. Emülsifiye edici ajanlarla (yüzey etkin madde, yardımcı çözücü) arayüzey enerjisi azaltılarak ve koalesansa karşı mekanik bir bariyer oluşturularak emülsiyon damlacık tabakası oluşturmak üzere emülsiyon stabilize edilmektedir (Constantinides, 1995; Craig, Barker, Banning ve Booth, 1995).

Emülsifikasyonun kolay gerçekleşmesi, damlacık yüzeyinde oluşan sıvı kristal veya jel fazlarına su girişinin kolay olmasına bağlıdır. Yağ ve sulu sürekli fazlar arasındaki arayüz, suya ikili bir karışımın (yağ/ yüzey etkin madde) ilavesi üzerine oluşturulmaktadır. Bunu, ara yüz boyunca sulu penetrasyonun bir sonucu olarak suyun yağ fazı içinde çözünmesi izlemektedir. Bu, fazlararası çözünme sınırına ulaşılana kadar gerçekleşmektedir. Daha fazla sulu penetrasyon dispers sıvı kristal fazın oluşumuna yol açmaktadır. Böylece, kendiliğinden emülsifiye olan sistemin hafifçe çalkalanmasının ardından, su hızla sulu çekirdeklere nüfuz ederek, arayüzün bozulması ve damlacık oluşumuna yol açmaktadır. Yağ damlacıklarını çevreleyen sıvı kristal arayüzü oluşumunun bir sonucu olarak, SNEDDS koalesansa karşı stabil hale gelmektedir (Gursoy ve Benita, 2004; Wakerly, Pouton, Meakin ve Morton, 1986).

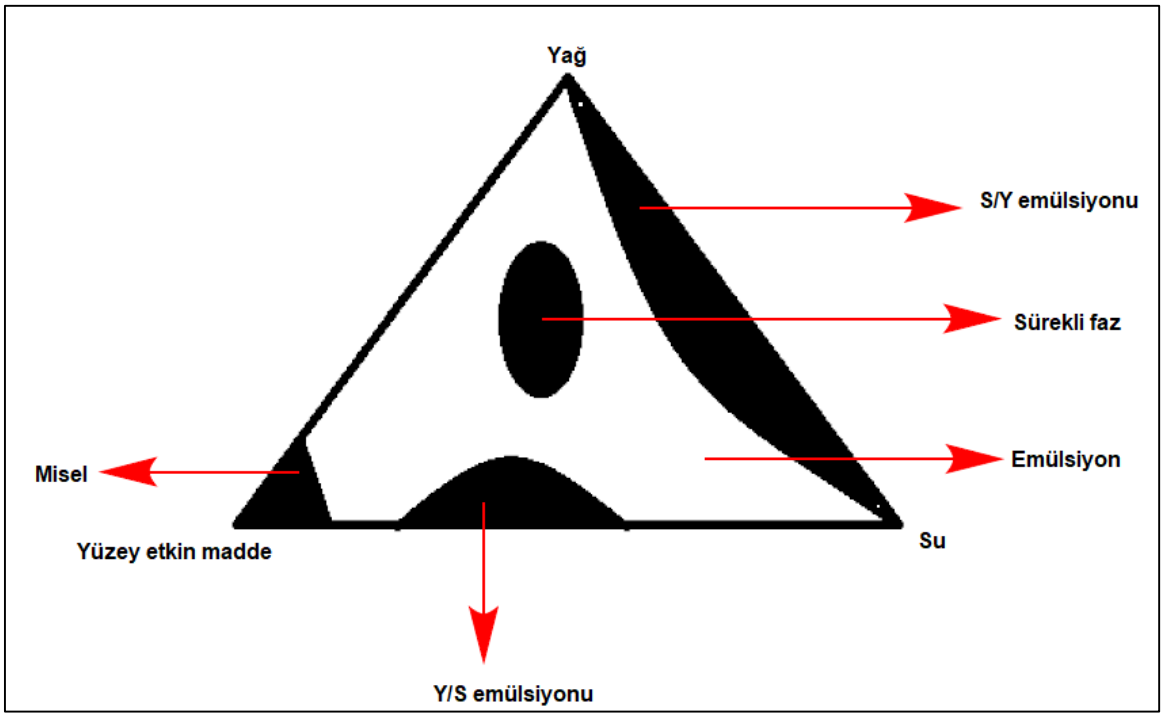
2.5.2. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerin hazırlanması

SNEDDS'lerin hazırlanmasında, yüzey etkin madde veya yüzey etkin madde karışımları yağ fazına eklenmektedir. Bu karışıma su eklendiğinde bu sistem kendiliğinden mikro/nanoemülsiyon oluşturmaktadır. Kendiliğinden emülsifiye sistemin hazırlanmasında uygun bir yüzey etkin madde veya yüzey etkin madde karışımı seçilerek bu karışımın yağ içindeki konsantrasyonu optimize edilmektedir. Kendiliğinden emülsifikasyon elde edebilmek için çok düşük yağ-su arayüzey gerilimi ve/veya büyük arayüzey bozulmalarına ihtiyaç vardır (Arslan ve Tirnaksiz, 2013; Pouton, 1997).

Yağ-su arayüzeyinin bozulması, suyun formülasyona girmesi veya yardımcı çözücülerin formülasyondan uzağa difüze olmasına neden olmaktadır. SNEDDS'lerin optimize edilmesi için üçgen faz diyagramları kullanılmaktadır. Bir dizi SNEDDS formülasyonu, genellikle farklı yüzey etkin madde/yüzey etkin madde kombinasyonları ve yağ kullanılarak hazırlanmaktadır. Doğru şekilde tartılmış etkin madde bir cam şişe içine yerleştirilir ve yağ, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde eklenir. Bu bileşenler manyetik karıştırıcıda hafifçe karıştırılarak SNEDDS'ler hazırlanmaktadır (Arslan ve Tirnaksiz, 2013; Mehta, Borade ve Bendre, 2011).

Üçgen faz diyagramları

Kendiliğinden emülsifiye sistemlerin hazırlanmasında genellikle üçgen faz diyagramlarından (Şekil 2.7) yararlanılmaktadır. Bu diyagramlar, SNEDDS'in termodinamik olarak stabil nano/mikro taşıyıcı olarak Gİ lümeninde kendiliğinden emülsifiye olması ve faz davranışı hakkında bilgi sağlamaktadır. Üçgen faz diyagramları, izotropik ve termodinamik olarak kararlı olan SNEDDS'lerin hazırlanmasında kullanılan farklı bileşenlerin miktarlarını optimize etmek için oluşturulmuştur (Xue, Cao, Ren, Qian ve Chen, 2018). Farklı oranlarda yağ, yüzey etkin madde, yardımcı yüzey etkin maddeler kullanılarak bu diyagramların içerisinden seçilen uygun formülasyonlar belirli oranlarda seyreltilerek; damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, türbidite ve morfolojik özellikler açısından değerlendirilmektedir (Ujhelyi ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.7. Üçgen faz diyagramı (Rani ve diğerleri, 2019)

Optimum formülasyonların belirlenmesinde geleneksel yaklaşım olan üçgen faz diyagramı kullanımının yanısıra, yüksek verimli görüntüleme sistemleri ve QbD (tasarımla kalite) yaklaşımın önemli bir basamağını oluşturan deney tasarımı (DoE) da kullanılmaktadır.

Bir formülasyonu veya işlemi optimize etmek için üçgen faz diyagramı gibi geleneksel yaklaşımlar temelde, diğer değişkenleri sabit tutarak, bir seferde bir değişkenin formülasyona veya işleme etkisini gözlemlemeyi sağlamaktadır. Geleneksel yaklaşımla, formülasyon veya işlemde zorluk çıkaran özelliğin çözümüne bir şekilde ulaşılabilir, ancak bu durum gerçek optimum formülasyonun veya işlemin elde edilmesini garanti etmemektedir (Singh, Kumar ve Ahuja, 2005).

Son zamanlarda tasarımla kalite yaklaşımı SNEDDS'lerin hazırlanmasında önem kazanmıştır. Deney Tasarımı (DoE), QbD (Tasarımla kalite) yaklaşımının önemli bir basamağını oluşturan deneme verilerinden elde edilen en yüksek miktarda bilginin, etkili bir şekilde kullanılabilmesi için yapılacak olan denemeleri planlama yöntemidir. DoE, kritik işlem parametreleri ve formülasyon değişkenlerinin arasındaki etkileşimlerin belirlenmesinde önemli bir yaklaşımdır (Demir, Aksu ve Özsoy, 2017; Karakucuk, Celebi ve Teksin, 2016; Khan, Islam, Roni ve Jalil, 2012). DoE yaklaşımında istatistiksel deneysel tasarımlar (Box-Behnken, merkezi kompozit tasarım, D-optimal tasarım, full-faktöriyel

tasarım vb.) kullanılarak, matematiksel denklemlerin üretilmesini ve verilerin yüzey-cevap grafikleriyle (RSM) değerlendirilmesini sağlamaktadır (Das ve diğerleri, 2019: 297-350; Lewis, 2002: 1922-1937).

Yüksek verimli görüntüleme sistemleri yöntemiyle hızlı ve verimli bir şekilde kendiliğinden emülsifiye sistemlerde optimum formülasyon seçimi yapılabilmektedir. Bu sistemlerde formülasyonlar bir robot dağıtıcısı tarafından küçük ölçekte (mikrolitre) hazırlanarak, formülasyonların hızlı türbidite analiziyle mikroemülsiyon görüntüsü ve faz stabilitesi belirlenmektedir (Sakai, Yoshimori, Obata ve Maeda, 2010).

Kendiliğinden emülsifiye sistemlerde kullanılan yardımcı maddeler

Kendiliğinden emülsifikasyonun, yağ/yüzey etkin madde yapısı ve oranına, yüzey etkin madde konsantrasyonuna ve kendiliğinden emülsiyonun (emülsifikasyon) oluştuğu sıcaklığa bağlı olduğu gösterilmiştir. Bu bilgilerin ışığında spesifik farmasötik yardımcı madde kombinasyonlarının etkili kendiliğinden emülsifikasyon sağlayan sistemlere yol açabileceği gösterilmiştir. Söz konusu etkin madde için en uygun yardımcı bileşenleri belirlemek için çözünürlük, stabilite ve etkin madde-yardımcı madde uyumluluk çalışmaları yapılmaktadır. Bu yardımcı bileşenler, doğal, yarı-sentetik veya sentetik yağlar, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin maddelerdir (Charman ve diğerleri, 1992; Rahman, Hussain, Hussain, Mirza ve Iqbal, 2013; Shah, Carvajal, Patel, Infeld ve Malick, 1994).

Yağlar

Yağlar, SNEDDS formülasyonunun en önemli yardımcı maddesidir. Kendiliğinden emülsifikasyonu kolaylaştırarak bağırsak sıvısında etkin maddenin çözünürlüğünün arttırılmasını, etkin maddenin GİK'de enzimatik bozulmaya karşı korunmasını, bağırsaktan lenf sistemi yoluyla taşınan lipofilik ilacın fraksiyonunun artırılması ve böylece GİK'ten etkin maddenin emiliminin artırılmasını sağlamaktadır (Gupta, Kesarla ve Omri, 2013). Kendiliğinden emülsifiye sistemlerde kullanılan yağlar, doğal kaynaklı veya yarı sentetik özelliktedir. Doğal yağların yüksek dozda hidrofobik ilaçları çözme yeteneklerinin düşük olması ve kendiliğinden emülsifikasyonda zorluk göstermeleri bu yağların SNEDDS'lerde kullanımlarını belirgin şekilde azaltmaktadır. Farklı doymuşluk derecesine sahip uzun

zincirli ve orta zincirli trigliseritler SNEDDS'lerin içeriğinde sıklıkla kullanılmaktadır (Charman ve Stella, 1991; Gershanik ve Benita, 2000; Gursoy ve Benita, 2004).

Formülasyonlarda doğal ve sentetik yağlar kullanılmaktadır.

Doğal yağlar

Doğal yağlar, kimyasal olarak gliserolün yağ asidi esterleridir ve çeşitli trigliseritlerin (TG) karışımlarından oluşmaktadır. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerde kullanılan doğal yağlara örnek olarak mısır yağı, soya yağı, zeytinyağı verilebilir.

Yağ asitleri ve yağ asit esterleri

Yağ asitleri, doymuş veya doymamış alifatik hidrokarbonların monokarboksilik asit türevleridir. Yağ asitleri, esas olarak suda zayıf çözünen etkin maddeler için çözücü olarak farmasötik alanda kullanılırken, propilen glikol esterlerinin ayrıca yüzey etkin madde özellikleri veya yardımcı çözücü özellikleri bulunmaktadır. Bu yardımcı maddelerden bazıları yumuşak veya sert jelatin kapsüller ile uyumludur. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerde kullanılan yağ asitlerine örnek olarak stearik asit, oleik asit, linoleik asit verilebilir. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerde kullanılan yağ asidi esterlerine etil oleat örnek verilebilir. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerde kullanılan propilen glikol esterine örnek olarak propilen glikol monolaurat (Lauroglycol 90®) verilebilir.

Yarı sentetik mono, di ve trigliseritler

Doğal olarak oluşan trigliseritlere ek olarak, daha homojen, ticari olarak temin edilebilen birçok yarı sentetik gliserit vardır. Bu yardımcı maddeler çözünmeye yardımcı, emülsifiye edici, süspande edici ve ıslatıcı olarak çeşitli dozaj şekillerinde kullanılabilir. Ayrıca hem yumuşak hem de sert jelatin kapsüllerle uyumludur. Yeni yarı sentetik lipit bileşenlerine amfifilik karakter kazandırılması formülasyonlarda bu bileşenlerin yüzey etkin madde özellikleri göstermesini sağlamıştır. Gattefossé, ABITEC, Croda ve BASF gibi üreticilerin bu alanda onaylanmış çeşitli lipit bileşenleri bulunmaktadır (Nardin ve Köllner, 2018). Kendiliğinden emülsifiye sistemlerde kullanılan yarı sentetik mono, di ve trigliseritlere örnek olarak glyseril triasetat (Captex 500 P®), gliseril mono- dikaprilat (Capmul MCM® C-8), gliseril tricaprilat/kaprat (Miglyol 812®, Labrafac CC®) örnek verilebilir.

Kullanılan yağlar ve yağ asitlerinin zincir uzunluklarına göre sınıflandırılması Çizelge 2.7'de verilmektedir (Shah, Phuapradit, Zhang, Ahmed ve Malick, 2007: 151-170; Zupančič ve diğerleri, 2016b).

Çizelge 2.7. Lipofilik taşıyıcıların sınıflandırılması

Sınıflandırma	Lipofilik Taşıyıcılar
Kısa zincirli yağ asitleri	Triasetin, Capmul® MCM
Orta zincirli yağ asitleri	Miglyol 812®, Captex 500 P® Labrafac CC®)
Uzun zincirli yağ asitleri	Mısır yağı, soya yağı, etil oleat, oleik asit, Maisine®35-1

Yüzey etkin maddeler

Amfifilik özellik gösteren yüzey etkin maddeler, yüksek miktarda hidrofobik ilacı çözerek Gİ lümen içinde çökmeyi önlemektedir. Yüzey gerilimini azaltmak ve yağ ile sulu faz arasında tek tabaka oluşturmak için, yüzey aktif maddelerin eklenmesi oldukça önemlidir (Nardin ve Köllner, 2018). Yüzey etkin maddeler, lipit çift tabakasıyla etkileşerek geçirgenliği artırmaktadır. Yüzey etkin maddeler, hücre membranındaki lipitlerin yapısal düzenini bozarak permeabiliteyi artırmaktadır. Ayrıca, etkin maddenin çözünme hızını artırarak etkin maddenin emiliminde artış sağlamaktadır (Gursoy ve Benita, 2004; Jackson, 1987: 1597–1621; Scott Swenson ve Curatolo, 1992). SNEDDS'lerde birçok yüzey etkin madde özelliği gösteren bileşen kullanılmaktadır. Yüzey etkin maddeler, suda çözünmeyenler (HLB 8-12) ve suda çözünenler (HLB>12) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Suda çözünen yüzey etkin maddelere polioksietilen sorbitan yağ asidi esterleri (Tween® 20, Tween® 60, Tween® 80) ve suda çözünmeyen yüzey etkin maddelere sorbitan yağ asidi esterleri (Span® 20, Span® 60, Span® 80) örnek verilebilir (Shah ve diğerleri, 2007). En sık kullanılanlar hızlı emülsifikasyon sağlayan yüksek hidrofilik − lipofilik denge (HLB)'ye sahip non-iyonik özellikteki yüzey etkin maddelerdir. Non-iyonik yüzey etkin maddeler iyonik yüzey etkin maddelere göre daha az toksiktir ve intestinal permeabilitede geri dönüşümlü değişikliklere neden olabilirler. Genellikle stabil SNEDDS oluşturmak için yüzey etkin madde konsantrasyonu %30 ila %60 a/a aralığındadır (Rahman ve diğerleri, 2013). Yüksek miktarda yüzey etkin madde GİK'te iritasyona neden olabileceğinden dolayı yüzey etkin madde konsantrasyonunu belirlemek çok önemlidir (Gursoy ve Benita, 2004; Swenson, Milisen ve Curatolo, 1994; Wakerly ve diğerleri, 1986). Son yıllarda yağ

asitlerinin PEG ve gliserinle esterifikasyonu sonucu yarı sentetik polietilen glikol (PEG) gliserit ve yağ asitlerinin türevleri ve poligliseril yağ asidi esterleri üretilmiştir.

Yarı sentetik polietilen glikol (PEG) gliserit ve yağ asitlerinin türevleri

Bunlar mono-, di- ve trigliseritlerin PEG ve yağ asitleri karışımıdır. Örnek olarak PEG-6 gliseril linoleat (Labrafil M 2125® CS), PEG-6 gliseril oleat (Labrafil M 1944® CS), PEG-35 hint yağı (Cremophor EL®), PEG-6 gliseril laurat (Gelucire 44/14®), PEG-8 gliseril kaprilat (Labrasol®) verilebilir.

Poligliseril yağ asidi esterleri

Poligliseril yağ asidi esterleri, bir veya daha fazla yağ asidi molekülü ile esterleştirilen eter bağlantıları ile birbirine bağlanmış bir zincir gliserol molekülleri zincirinden oluşur. Bunlara poligliseril -6 dioleat (Plurol Oleique®) örnek verilebilir.

Kolesterol ve fosfolipitler

Kolesterol ve fosfolipitler, karışık miseller ve emülsiyonlarda çözücü ve yüzey etkin madde olarak kullanılırlar. Bunlara lesitin örnek olarak verilebilir. Yüzey etkin maddelerin sınıflandırılması Çizelge 2.8'de verilmiştir.

Çizelge 2.8. Yüzey etkin maddelerin sınıflandırılması (Shah ve diğerleri, 2007: 151-170)

Sınıflandırma	Yüzey etkin maddeler
Poliglikolize gliseritler	PEG-8 gliseril kaprilat/kaprat (Labrasol®) PEG-32 gliseril laurat (Gelucire 44/14®)
Polioksietilen sorbitan yağ asidi esterleri	Polioksietilen 20 sorbitan monolaurat (Tween® 20) Polioksietilen 60 sorbitan monostearat (Tween® 60) Polioksietilen 80 sorbitan monooleat (Tween® 80)
Sorbitan yağ asidi esterleri	Sorbitan monolaurat (Span® 20) Sorbitan monostearat (Span® 60) Sorbitan monooleat (Span® 80)
Polioksietilen hint yağı türevleri	Polioksil 35 hint yağı (Cremophor® EL) Polioksil 40 hidrojenize hint yağı (Cremophor® RH 40)
Fosfolipitler ve PEG bazlı fosfolipitler	Lesitin ve modifiye lesitin

Yardımcı yüzey etkin maddeler ve yardımcı çözücüler:

Yardımcı yüzey etkin maddeler ve yardımcı çözücüler, arayüzey filminin esnekliğini sağlayarak filmin kırılganlığı önlemektedir (Rahman ve diğerleri, 2013). Etanol, propilen glikol (PG) ve polietilen glikol (PEG) gibi organik çözücüler oral yoldan veriliş için uygun çözücülerdir. Bunlar, etkin maddenin büyük miktarlarda hidrofilik yüzey etkin madde veya lipit fazında çözünmesini sağlamktadır. Bu çözücüler, mikroemülsiyon/nanoemülsiyon sistemlerinde yardımcı yüzey etkin maddeler olarak işlev görebilir. Öte yandan, alkoller ve diğer uçucu yardımcı çözücüler, yumuşak jelatin ya da sert jelatin kapsüllerden buharlaşıp etkin maddenin çökmesine yol açabilmektedir (Constantinides, 1995; Gursoy ve Benita, 2004).

<u>Tez çalışması kapsamında formülasyon geliştirmede kullanılan yardımcı maddeler</u>

Tez çalışması kapsamında formülasyon geliştirmede kullanılan yardımcı maddeler ve özellikleri Çizelge 2.9'da verilmiştir.

Çizelge 2.9. Tez çalışması kapsamında formülasyon geliştirmede kullanılan yardımcı maddeler

Yardımcı Bileşen	Kimyasal Adı	Kimyasal Bileşimi	Kayıtlı Olduğu Farmakopeler	HLB değeri	Ticari ismi	Kullanım amacı	Kaynak
Etil oleat	Etil oleat	Oleik asitin etil esteri [18:1 (9)]	EP, USP NF	-	Crodamol™ EO (Croda)	Yağ fazı (çözücü)	(Gibson, 2007: 33-62; Nardin ve Köllner, 2018)
Maisine-35-1(CC)®	Gliseril monolinoat	Monookta dekadienoik asitin (18:2) gliserol esteri	EP, USP NF	3	Maisine-35-1(CC)® (Gattefossé)	Yağ fazı (çözücü)	(Gibson, 2007: 33-62; Maisine®CC; Nardin ve Köllner, 2018)
Labrasol®	PEG-8 kaprilik /kaprik gliseritler	Mono-,di-,trikaprilik asit (C8:0) ve kaprik asitin (C10:0) gliserol esterleri ve PEG400 'ün mono ve diesterleri	EP, USP NF	12	Labrasol® (Gattefossé)	Yüzey etkin madde	(Gibson, 2007: 33-62; Labrasol®; Nardin ve Köllner, 2018)
Cremophor EL®	PEG-35 hint yağı	Gliseril PEG risinoleatın (her bir molekül hint yağı başına 35 mol etilen oksit) PEG yağ asiti esterleri,PEG ve etoksi gliserol karışımları	EP (Makrogogliserol risinoleat), USP NF (Polioksil 35 hint yağı)	12-14	Cremophor EL/ Kolliphor EL® (BASF)	Yüzey etkin madde	(Gibson, 2007: 33-62; Kolliphor®EL; Nardin ve Köllner, 2018)
Propilen glikol	1,2-Propandiol	-	EP, USP NF		Kollisolv® PG (BASF)	Yardımcı çözücü	(Nardin ve Köllner, 2018)
Etanol	Etil alkol	-	EP, USP NF			Yardımcı çözücü	(Nardin ve Köllner, 2018)

2.5.3. Kendiliğinden emülsifiye sistemlerde yapılan karakterizasyon çalışmaları

Damlacık büyüklüğü ve dağılımı tayini

SNEDDS'lerde damlacık büyüklüğü ve dağılımı bu sistemlerin emülsifikasyon performansına, etkin maddenin biyoyararlanımına ve emülsiyonun stabilitesine önemli derecede etki etmektedir (Kumar, Sharma ve Kamble, 2010). SNEDDS'lerde damlacık büyüklüğü dağılımlarını belirlemek için kullanılan yaygın teknikler arasında foton korelasyon spektroskopisi, lazer ışık saçılımı ve Coulter sayacı bulunmaktadır. Bunlardan en sık kullanılan lazer ışık saçılımı yöntemi, numune tarafından yayılan ışığın açısal dağılımını ölçmektedir. Bu yöntemle 0,5 nm ila 200 μm aralığındaki damlacıkların ölçümü yapılmaktadır (Rahman ve diğerleri, 2013; Washington, 1990).

Zeta potansiyel

Yüksek zeta potansiyeli (± 30 mV) güçlü elektrostatik itici kuvvetlerle damlacıkların flokülasyonunu engelleyerek stabil SNEDDS oluşumunu sağlamaktadır. GİK'deki sıvılarla temas sonucu nanoemülsiyon oluşturdukları için zeta potansiyel SNEDDS'ler için kritik bir parametre olarak kabul edilmemektedir (Cherniakov, Domb ve Hoffman, 2015; Krstić, Medarević, Đuriš ve Ibrić, 2018: 473-508).

Emülsifikasyon zamanı

SNEDDS'lerin kendiliğinden emülsifiye mikro/nanoemülsiyon oluşturma zamanı emülsifikasyon zamanı olarak bilinmektedir. Emülsifikasyon zamanı derecelendirme sistemine göre değerlendirilmektedir. Bu sınıflandırmaya gore SNEDDS'lerin seyreltilmesi sonucu; berrak veya mavimsi bir görünüme sahip hızlı bir şekilde (1 dakikadan az) oluşan nanoemülsiyonlar "A Sınıfı", mavimsi beyaz görünümlü daha az saydam nanoemülsiyonlar "B Sınıfı" olarak adlandırılmıştır, 2 dakika içinde sütlü emülsiyon görünümünde oluşan emülsiyonlar; "Sınıf C" olarak, 2 dakika üzerinde oluşan grimsi beyaz emülsiyonlarla hafif yağ görünümü "Sınıf D" olarak, büyük yağ kürecikleri ile zayıf emülsifikasyona sahip emülsiyonlar "Sınıf E" olarak adlandırılmıştır (Shafiq ve diğerleri, 2007).

Morfolojik görüntüleme

SNEDDS'lerde morfolojik görüntüleme Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ve Kriyo-Geçirimli Elektron Mikroskobu (Kriyo-TEM) ile yapılmaktadır. TEM görüntülemede seyreltilmiş formülasyonların bir damlası bakır ızgara üzerine eklendikten sonra üzerine %1 (a/h) fosfotungustik asit içeren çözeltiden 10µL eklenerek boyanıp ve 5 dakika oda sıcaklığında formülasyon kurumaya bırakılarak 100 kV voltajda görüntüler alınmaktadır (Parmar ve diğerleri, 2012). Kriyo-TEM'de ise numune hazırlama benzer olup bakır ızgara sıvı etanda -180 ºC'de dondurularak -196 ºC'deki azot tankına transfer edilip daha sonra görüntüleme yapılmaktadır (Kohli, Chopra, Dhar, Arora ve Khar, 2010).

Türbidite

Türbidite (bulanıklık) ölçümü, emülsiyonların stabilitesini belirlemek için etkili başka bir yöntemdir. Damlacık büyüklüğü artışı ve türbidite arasında doğru orantı bulunmaktadır (Goodarzi ve Zendehboudi, 2019).

Reolojik özellikler ve viskozite

Viskozite, SNEDDS'lerin fiziksel karakterizasyonunda ve stabilitesinin değerlendirilmesinde önemli bir parametredir. SNEDDS'lerin reolojik özellikleri viskozimetrelerle tayin edilmektedir. SNEDDS'lerin viskozite değerleri, kayma hızı−kayma gerilimi grafiğinin eğiminden hesaplanmaktadır ve bu grafikten SNEDDS'lerin akış özellikleri belirlenebilmektedir (Chintalapudi, Murthy, Lakshmi ve Manohar, 2015).

Stabilite testleri

Stabilite çalışmaları 5ºC±3ºC, 25ºC ± 2ºC/60% ± 5% bağıl nem ve 40ºC±5ºC/%75±5% bağıl nemde gerçekleştirilmektedir (ICH Q 1 A (R2), 2003). Stabilite testleri süresince damlacık büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyel, viskozite gibi karakterizasyon parametreleri değerlendirilmektedir.

In vitro salım/çözünme

SNEDDS'lerde yapılan *in vitro* salım/çözünme çalışmalarında diyaliz membran yöntemi (Zupančič ve diğerleri, 2016a), örnek al- ayır yöntemi (Sakloetsakun ve diğerleri, 2013) ve USP palet yöntemi (Shahba, Mohsin ve Alanazi, 2012) kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde çözünme ortamının hacmi, karıştırma metodu, örnek alma teknikleri farklılık gösterebilmektedir. Diyaliz membran yönteminde diyaliz membranın molekül ağırlığı ayırma sınırı (MWCO) önem taşımaktadır. Küçük molekül ağırlıklı etkin maddeler için 10-14 kDa MWCO'ya sahip diyaliz membranlar, büyük molekül ağırlıklı etkin maddeler için ise 50 kDa ve üzerindeki MWCO'ya sahip diyaliz membranlar kullanılmaktadır. Diyaliz membran yönteminde SNEDDS'ler içerisinde düşük hacimde (1-15 mL) çözünme/salım ortamı içeren diyaliz membrana yerleştirilmektedir. Daha sonra bu diyaliz membran ise 500-1000 mL çözünme ortamı bulunan hazneye yerleştirilmektedir.

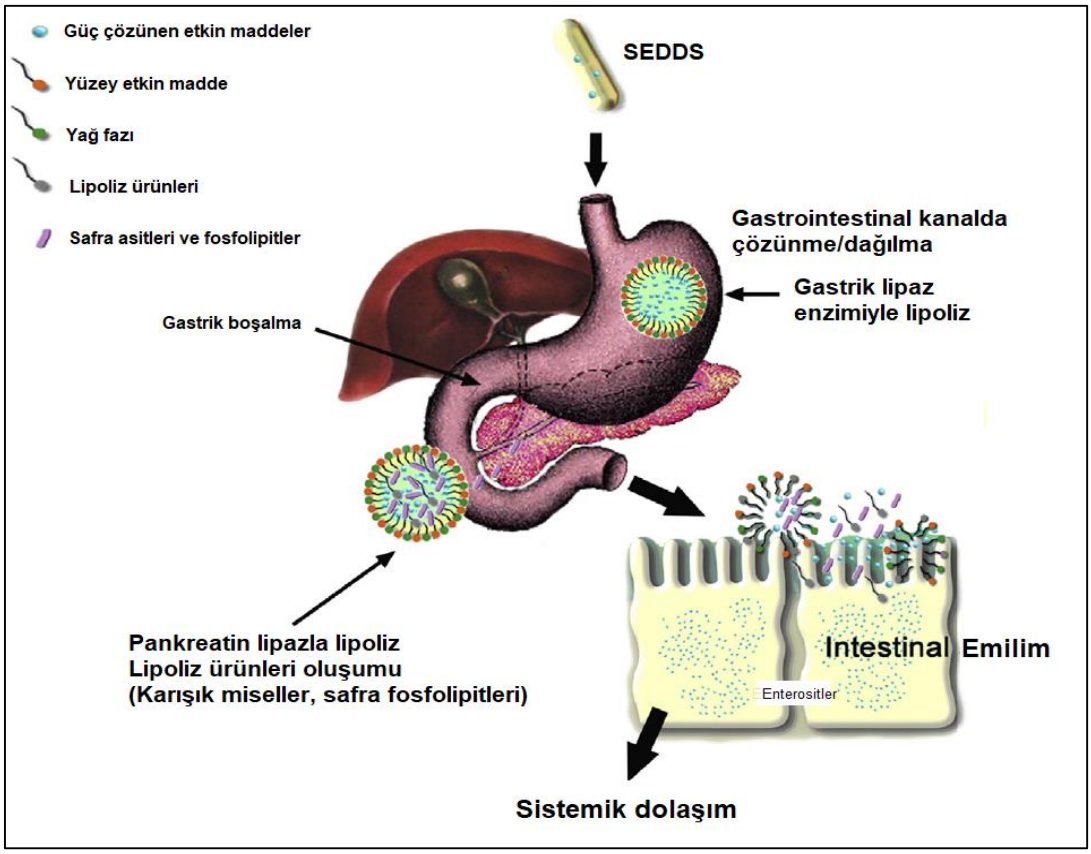
Örnek al-ayır yönteminde kapsüle doldurulmuş SNEDDS'ler mekanik çalkalayıcıya yerleştirilmiş düşük hacimde (1-15 mL) çözünme/salım ortamı içeren hazneye eklenmektedir. USP palet yönteminde ise kapsüle doldurulmuş SNEDDS'ler 500-1000 mL çözünme/salım ortamı bulunan hazneye yerleştirilmektedir. SNEDDS'lerin çözünme/salım ortamıyla teması sonucunda çözünme ortamındaki etkin madde 0,45 µm'lik membran filtreler veya ultrasantrifüjle çözünme/salım ortamından ayrılmaktadır (Bernkop-Schnürch ve Jalil, 2018; D'Souza, 2014). Bu yöntemlerde belirli zaman aralıklarında ortamdan örnekler alınmakta ve yerine eşit hacimde çözünme/salım ortamı sink koşulların sağlanması amacıyla ilave edilmektedir. Ortamda çözünen/salınan etkin madde miktarı valide edilmiş uygun bir analiz yöntemiyle tayin edilmektedir (Sharma, Koka, Yadav, Sharma ve Keservani, 2016). *İn vitro* çözünme/salım testinde *in vivo* Gİ ortamdaki etkin maddenin çözünme profilinin doğru tahmin edilebilmesi için enzimler ve safra tuzlarıyla zenginleştirilmiş biyouyumlu ortamlar son yılllarda sıklıkla kullanılmaktadır (Kohli ve diğerleri, 2010).

In vitro lipoliz

Oral yoldan SNEDDS alımını takiben SNEDDS sindiriminde yer alan birçok faktör sebebiyle çözünme testleri SNEDDS'lerin *in vitro* değerlendirilmesi için yeterli değildir.

Son yıllarda, *in vivo* çözünme profilini daha iyi tahmin edebilmek için, Gİ ortamı daha iyi taklit eden *in vitro* lipoliz testleri geliştirilmiştir (Porter, Pouton, Cuine ve Charman, 2008).

Oral yoldan SNEDDS alımını takiben (Şekil 2.8) formülasyon öncelikle Gİ ortamda emülsifiye olmaktadır. Gastrik mukozadan salınan gastrik lipaz, formülasyondaki lipitlerin midede sindirimini başlatmaktadır. Duodenumda ise pankreatik lipaz/ko-lipaz, lipitleri di-gliseritlere, monogliseritlere ve yağ asitlerine parçalamayı sürdürmektedir. Ayrıca duodenuma geçen lipitlerin sindirimi safra kesesinden safra tuzu, fosfolipit ve kolesterolün salımını uyarmaktadır. Safra tuzu, fosfolipit ve kolesterol, lipoliz ürünleri ile birleşerek karışık miselleri oluşturmaktadır. Karışık misel oluşumu sayesinde kendiliğinden emülsifiye sistemdeki etkin maddenin çözünürlüğü artırılmış olur. Ayrıca formülasyondaki uzun zincirli yağ asitlerinin sindirim ürünleriyle oluşturduğu şilomikronlar sayesinde etkin maddenin şilomikron içerisinde lenfatik dolaşıma katılması sağlamaktadır ve bu şekilde karaciğerdeki ilk geçiş etkisi ortadan kaldırılmaktadır (Bektaş, 2019; Larsen, Sassene ve Müllertz, 2011; Mu, Holm ve Müllertz, 2013).



Şekil 2.8. SNEDDS'lerin oral yoldan alımı takiben GİK'te geçirdiği aşamalar (Carrière, 2016)

In vitro lipoliz çalışmaları, *in vitro* ortamda gastrointestinal koşullar taklit edilerek SNEDDS'lerin içeriğindeki bileşenlerin sindirilmesi sonucu açığa çıkan peptitin *in vivo* performansını öngörmek amacıyla gerçekleştirilir. Bu amaçla, biyouyumlu ortam ve SNEDDS içeren sıcaklık kontrollü bir reaksiyon ortamına lipaz enzimleri eklenerek ve intestinal pH koşulları sağlanarak *in vivo* lipit sindirim durumu taklit edilmeye çalışılmaktadır. Deney sırasında sindirilen lipitler lipazlar tarafından serbest yağ asitlerine dönüştürülür ve bu sırada ortamın pH' sı azalmaktadır. pH kontrollü titrasyon sistemi, pH'yı sabit tutmak için ortama sodyum hidroksit akışına izin verir. Harcanan sodyum hidroksit miktarı pH kontrollü titrasyon sistemi tarafından hesaplanmaktadır. Hesaplanan sodyum klorür miktarı SNEDDS'lerin içeriğindeki bileşenlerin sindirilip sindirilmediğinin *in vitro* koşullarda belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Ali, Siddiqui ve Nazzal, 2010; Feeney ve diğerleri, 2016).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan kimyasal malzemeler

Absolü etanol	Sigma-Amerika
Asetik asit	Sigma- Amerika
Byetta® (17A022)	AstraZeneca- Amerika
Coomassie Brillant Blue	Sigma- Amerika
Cremophor EL®	BASF-Almanya
Dulbecco's Modified Eagle Medium	ATCC – Amerika
Etil oleat	Sigma- Amerika
Exendin-4	Sigma- Amerika
FaSSIF- FaSGIF biyouyumlu ortamlar	Biorelevant-İngiltere
Fetal Bovine Serum	ATCC – Amerika
Kimostatin	Sigma- Amerika
Labrasol®	Gattefossé- Fransa
Maisine®	Gattefossé- Fransa
Moleküler Ağırlık Belirleyici	BioRad- Amerika
MTT	Sigma- Amerika
Pankreatin lipaz	Sigma- Amerika
Penisilin-streptomisin	ATCC- Amerika
Propilen glikol	Sigma- Amerika
SDS-PAGE Numune Tamponu	Sigma- Amerika
Sitrik asit	Merck- Almanya
Sodyum sitrat	Merck- Almanya
Streptozosin	Sigma- Amerika
Tripsin-EDTA	ATCC – Amerika
Tris / Tricine / SDS yükleme tamponu	Sigma- Amerika
Tris-Trisin Jel	BioRad- Amerika

3.1.2. Kullanılan kitler

Exendin-4 ELISA kiti (rat)	Phoenix Pharmaceuticals- Amerika
İnsülin ELISA kiti (rat)	Cloud –Clone Corp.- Amerika

3.1.3. Kullanılan hücre

İnsan kolon karsinoma hücresi (Caco-2)	ATCC – Amerika

3.1.4. Kullanılan cihazlar

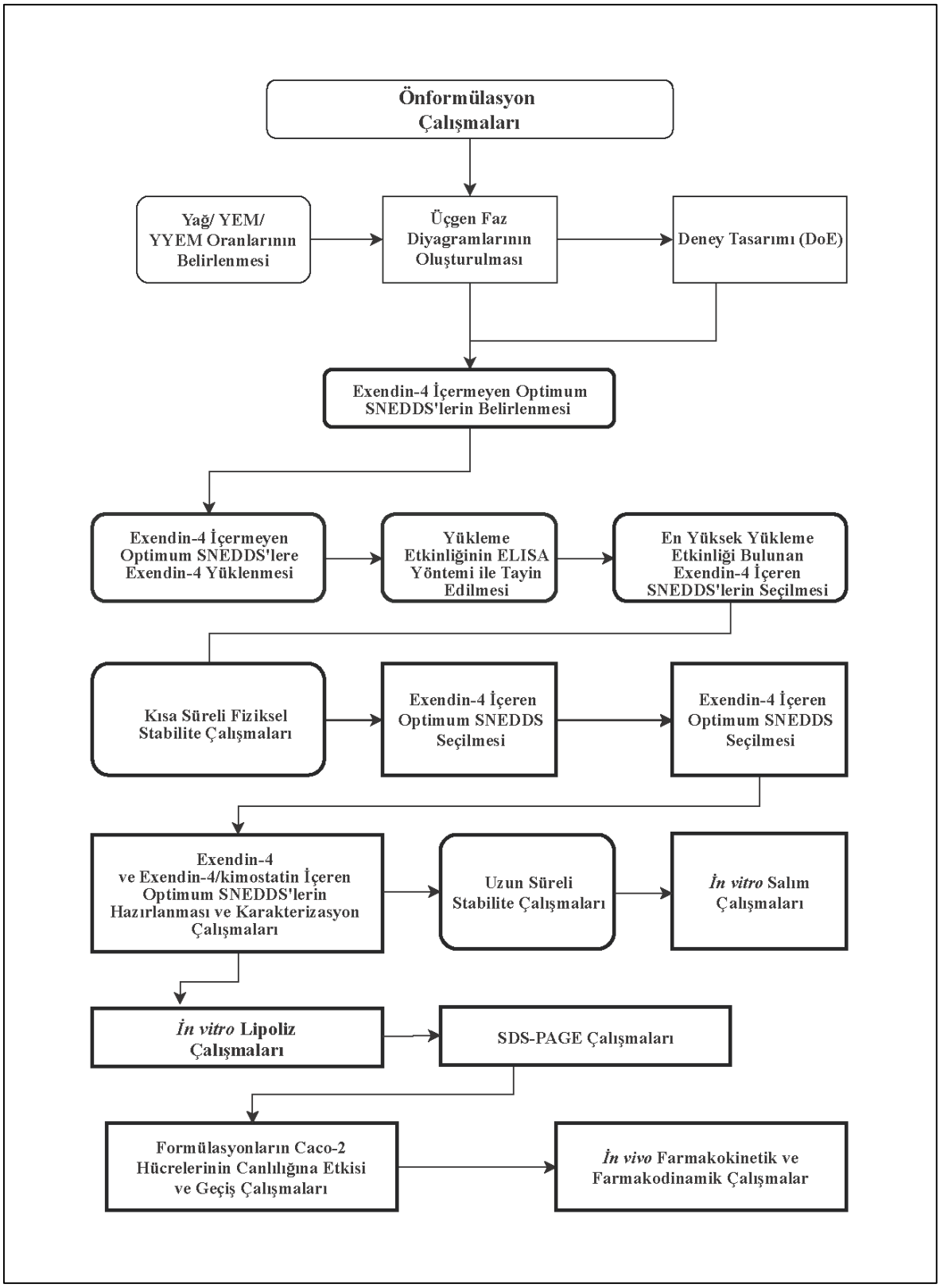
Bidistile su cihazı	SEM Basic Series, Amerika
CO_2'li etüv	New Brunswick, Almanya
Damlacık büyüklüğü ölçüm aleti	Malvern-Zeta Sizer Nano ZS, İngiltere
Derin dondurucu (-80°C)	Arctiko, Danimarka
Dissolüsyon cihazı	Pharma Test, Almanya
Geçirimli Elektron Mikroskobu	FEI G2 S TWIN, Amerika
Hassas terazi	Ohaus, İsviçre
İklim kabini	Nüve TK 252, Türkiye
İnverted mikroskop	Nikon, Amerika
Kan glikoz ölçüm cihazı	VivaChek, Türkiye
Laminar kabin	Nüve, Türkiye
Lipoliz cihazı	Metrohm 902 Titrando, İsviçre
Liyofilizatör	Labconco FreeZone 4.5, Amerika
Manyetik karıştırıcı	IKA RO 10, Almanya
Mikroplaka ELISA okuyucu	BioTek, Amerika
Mini Trans-Blot elektroforez cihazı	Bio-Rad, Amerika
Santrifüj cihazı	Sigma, Amerika
pH ölçüm cihazı	Isolab, Almanya
TEER ölçüm cihazı	WPI EVOM-2, Amerika
Türbidimetre	Velp Turbidimeter, İtalya
Viskozimetre	Brookfield DV-III Rheometer, Amerika
Zeta potansiyel ölçüm aleti	Malvern-Zeta Sizer Nano ZS, Amerika

3.1.5. Kullanılan yazılımlar

Design Expert® Software Version 9.0.6
IBM® SPSS Statistics® V21
PKSolver (Zhang, Huo, Zhou ve Xie, 2010)
Rheocalc V2.4
XLSTAT 2016
CHEMIX School Ver.3.60
AutoCAD 2016

3.2. Yöntem

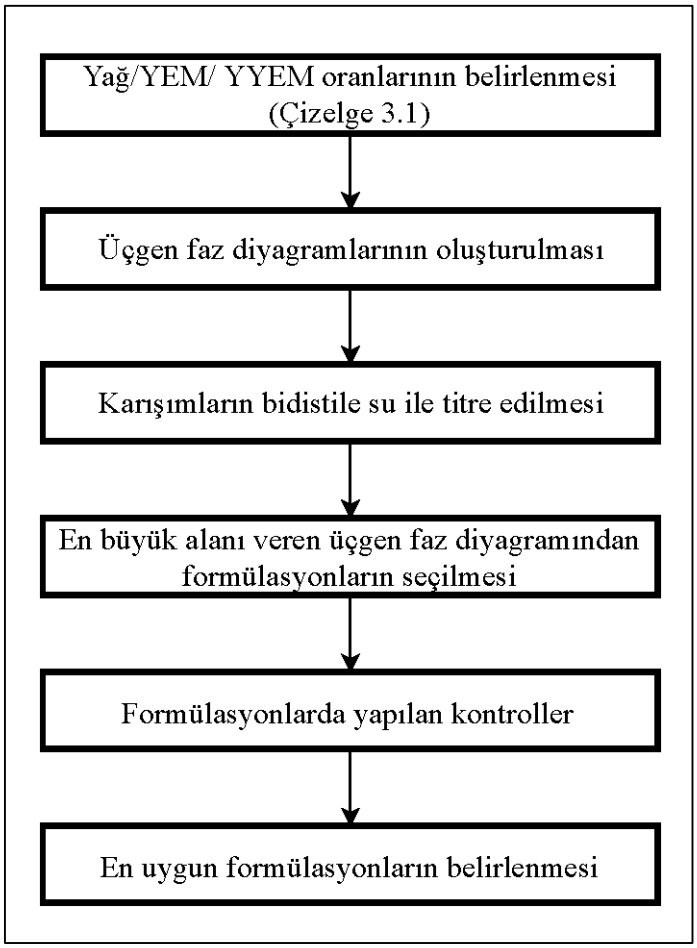
Tez çalışmamız *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar olmak üzere iki ana bölümden oluşmaktadır. *İn vitro* bölümde önformülasyon çalışmaları, ELISA yöntemi ile exendin-4'ün miktar tayini, exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sistemlerin hazırlanması, exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sistemlerin karakterizasyon çalışmaları, kısa süreli fiziksel stabilite çalışmaları, uzun süreli fiziksel stabilite çalışmaları, salım çalışmaları, lipoliz çalışmaları, formülasyonların hücre canlılığına etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi, hücre bütünlüğünün değerlendirilmesi ve geçiş çalışmalarından, *in vivo* bölümde farmakokinetik ve farmakodinamik çalışmalardan oluşmaktadır. Yapılan çalışmalar Şekil 3.1'de gösterildiği gibi özetlenmiştir.



Şekil 3.1. Yöntem akış şeması

3.2.1. Önformülasyon çalışmaları

En uygun SNEDDS formülasyonunu elde edebilmek için kapsamlı önformülasyon çalışmaları yürütüldü. Öncelikle exendin-4 içermeyen SNEDDS'lerin hazırlanmasında farklı yağ (etil oleat, Maisine®), yüzey etkin madde (Labrasol®, Cremophor EL®), yardımcı çözücüler (absolü alkol, propilen glikol) kullanılarak en uygun formülasyon için yardımcı bileşenler belirlendi. Formülasyonların hazırlanmasında üçgen faz diyagramından yararlanıldı. Yağ, sürfaktan, yardımcı çözücünün birbirleriyle karışabilme ve berrak bir çözelti oluşturma durumu belirlendi. Yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde karışımları belirlenen yağ fazı ile titre edilerek yüzey etkin madde, yardımcı yüzey etkin madde ve yağdan oluşan üçgen faz diyagramları oluşturulduktan sonra berrak alan oluşturan bölge belirlendi. Bu alan içindeki üçlü karışımlara su eklendiğinde nanoemülsiyonunun oluşabildiğinin gösterilmesi için karışımlar bidistile su ile titre edildi, böylece nanoemülsiyon alanı olarak bilinen berrak bölgenin sınırları saptanarak en uygun nanoemülsiyon formülasyonu belirlendi (Pouton, 2006; Rao ve diğerleri, 2008; Zhang ve diğerleri, 2012c). Exendin-4 içermeyen SNEDDS formülasyonlarının oluşturulmasındaki önformülasyon basamakları Şekil 3.2'de gösterildiği şekilde yapıldı.



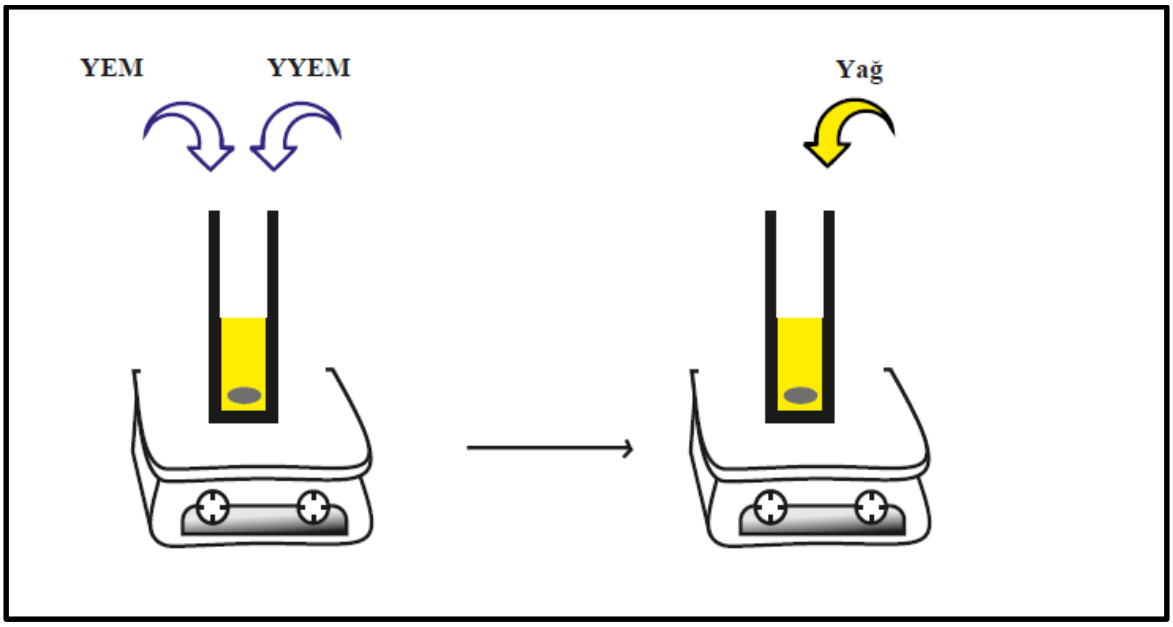
Şekil 3.2. Önformülasyon çalışmalarının akış şeması

Üçgen faz diyagramlarında yararlanılarak % yağ ve % yüzey etkin madde/ % yardımcı çözücü oranları Çizelge 3.1'de belirtildi.

Çizelge 3.1. Üçgen faz diyagramı için çalışılan oranlar

%Yağ (a/a)	%Yüzey Etkin Madde/Yardımcı Çözücü Karışımı (a/a)
10	90
20	80
30	70
40	60
50	50
60	40
70	30
80	20

Önformülasyon çalışmaları kapsamında formülasyonlar hazırlanırken Şekil 3.3'de gösterildiği üzere yüzey etkin madde ve yardımcı çözücü tartıldıktan sonra 500 rpm'de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Yağ fazı bu karışımın üzerine damla damla ilave edildi.



Şekil 3.3. Exendin-4 içermeyen SNEDDS'lerin hazırlanması

Çizelge 3.1'de belirtilen oranlara göre hazırlanan formülasyonlar arasından seçim yapmak amacıyla aşağıdaki karakterizasyon çalışmaları formülasyonların hazırlanmasından hemen sonra ve 5°C ± 3°C sıcaklıkta 1, 7 ve 28 gün bekletilmesinden sonra gerçekleştirildi.

Damlacık büyüklüğü ve polidispersite indeksi

SNEDDS'lerin damlacık büyüklüğü ve dağılımının ölçülmesinde Malvern Zeta Sizer Nano ZS cihazı kullanıldı. Bu cihaz, lazer ışık saçılımı esasına göre çalışmaktadır. Bu yöntemde cihaz, damlacıklar tarafından yayılan ışığın açısal dağılımını ölçmektedir. SNEDDS'lerin 1 mL' sinin üzerine 50 mL bidistile su eklenerek 1:50 oranında örnekler seyreltildi (USP30 NF 25). Seyreltme sonucu oluşan nanoemülsiyonların 1 mL'si tek kullanımlık küvetlere yerleştirilerek 25±0,5°C sıcaklıkta nanoemülsiyonların damlacık büyüklüklerinin ölçümleri gerçekleştirildi. Ölçümler üç kez tekrarlanarak ortalama damlacık büyüklüğü (DB) ve polidispersite indeksi (PDİ) ve standart sapmalar (SS) hesaplandı.

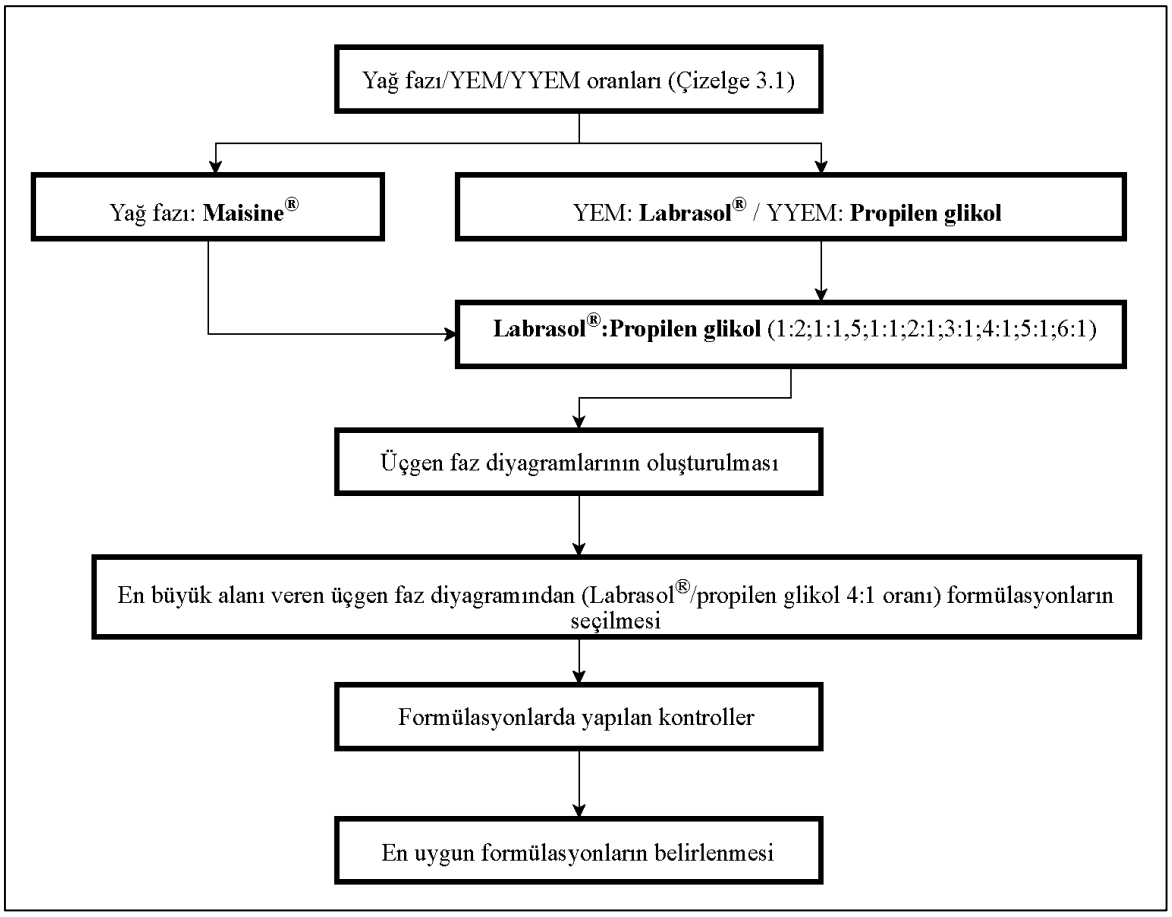
Zeta potansiyel

Zeta potansiyel (ZP), damlacıkların yüzeyindeki elektriksel yükü gösteren ve emülsiyonların fiziksel stabilitesine etki eden önemli bir parametredir. Formülasyonda kullanılan yardımcı maddeler, damlacıkların yüzeyindeki elektriksel yükü etkilemektedir. Yardımcı maddelerin zeta potansiyele etkisini değerlendirmek amacıyla, ölçümler Malvern Zeta Sizer Nano ZS cihazında gerçekleştirildi. SNEDDS'ler 1:50 oranında bidistile su ile seyreltildi (USP30 NF 25). Seyreltme sonucu oluşan nanoemülsiyonların 1 mL'si kapiller hücrelere yerleştirildi ve 25±0,5°C sıcaklıkta nanoemülsiyonların zeta ölçümleri gerçekleştirildi. Ölçümler üç kez tekrarlanarak ortalama zeta potansiyel ve standart sapma hesaplandı.

Emülsifikasyon zamanı

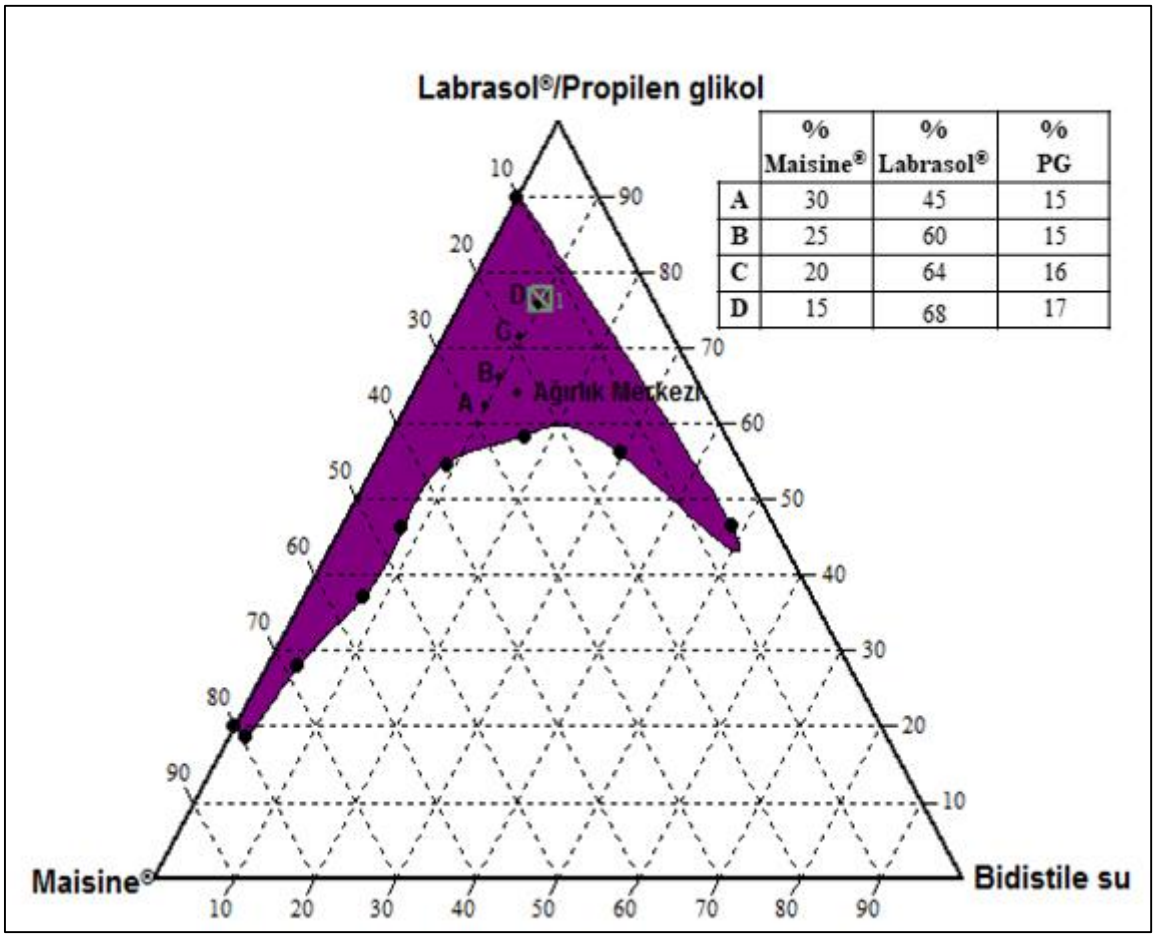
SNEDDS'ler 1:50 oranında bidistile su ile seyreltildi (USP30 NF 25) ve emülsifiye olma zamanları (emülsifikasyon zamanı) ölçüldü. SNEDDS'lerin emülsifikasyon zamanları ve görünümleri derecelendirme sistemine göre değerlendirildi. Bu sınıflandırmaya göre; berrak veya mavimsi bir görünüme sahip hızlı bir şekilde (1 dakikadan az) oluşan nanoemülsiyonlar "A Sınıfı", mavimsi beyaz görünümlü daha az saydam nanoemülsiyonlar "B Sınıfı", 2 dakika içinde süt görünümünde oluşan emülsiyonlar "Sınıf C", 2 dakika üzerinde oluşan grimsi beyaz emülsiyonlarla hafif yağ görünümü "Sınıf D" olarak adlandırıldı.

Önformülasyon çalışmaları-1



Şekil 3.4. Maisine®/Labrasol®/propilen glikol içeren SNEDDS'lerle yapılan önformülasyon çalışmalarının akış şeması

Şekil 3.4'te gösterildiği üzere yüzey etkin madde ve yardımcı çözücü karışımlarının oranlarının belirlenmesinde ilk olarak Labrasol® (yüzey etkin madde): propilen glikol (yardımcı çözücü) için 1:2, 1:1,5, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ve 6:1 oranları çalışıldı. Yağ fazı olarak Maisine® kullanıldı. Çözeltilerde bulanıklık gözlendiği andaki bidistile su miktarları hesaplanarak CHEMIX® programında üçgen faz diyagramları oluşturuldu. Çizilen üçgen faz diyagramlarından en büyük alanı veren Labrasol®/propilen glikol oranı 4:1 olan üçgen faz diyagramı (Şekil 3.5) üzerinde ağırlık merkezi Autocad® programı ile belirlendi ve ağırlık merkezi etrafında seçilen noktalardaki formülasyonlar hazırlandı. SNEDDS'lerin 1 g' nın üzerine 50 mL bidistile su eklenerek 1:50 oranında örnekler seyreltildi (USP30 NF 25).



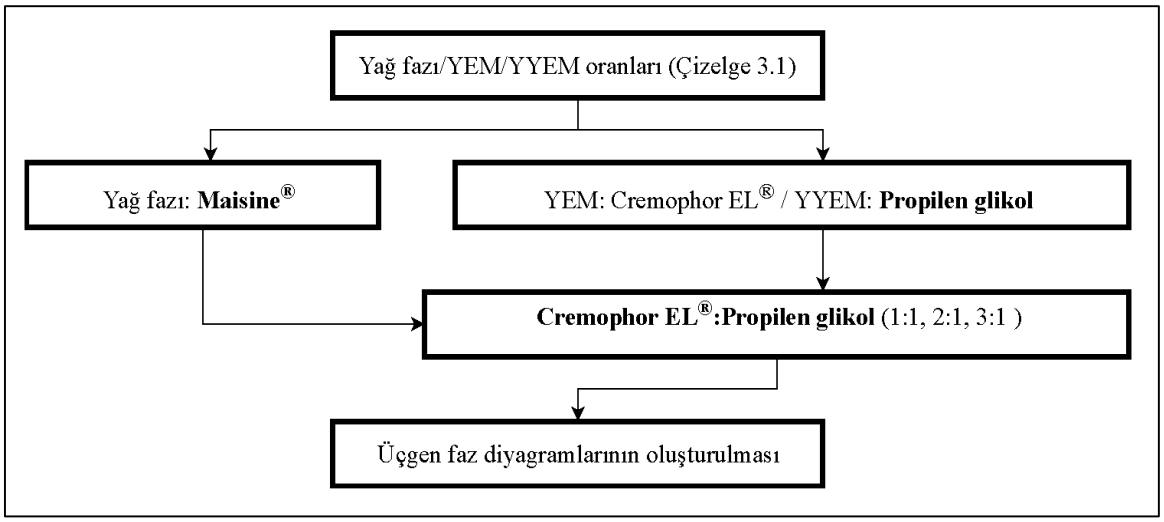
	% Maisine®	% Labrasol®	% PG
A	30	45	15
B	25	60	15
C	20	64	16
D	15	68	17

Şekil 3.5. Labrasol®/propilen glikol oranı 4:1 içeren formülasyonların üçgen faz diyagramı

Seçilen formülasyonlar 5°C ± 3°C'de 28 gün süreyle bekletildi. Bu formülasyonlar emülsifikasyon zamanı, damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel açısından değerlendirildi.

Seçilen formülasyonlara bidistile su ile seyreltme oranının etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Formülasyonlar 1:50 (USP30 NF 25) ve 1:250 (1 g formülasyonunun bir bardak su (250 mL) ile alınması) oranlarında bidistile su ile seyreltildi. Bu formülasyonlar emülsifikasyon zamanı, damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel açısından değerlendirildi.

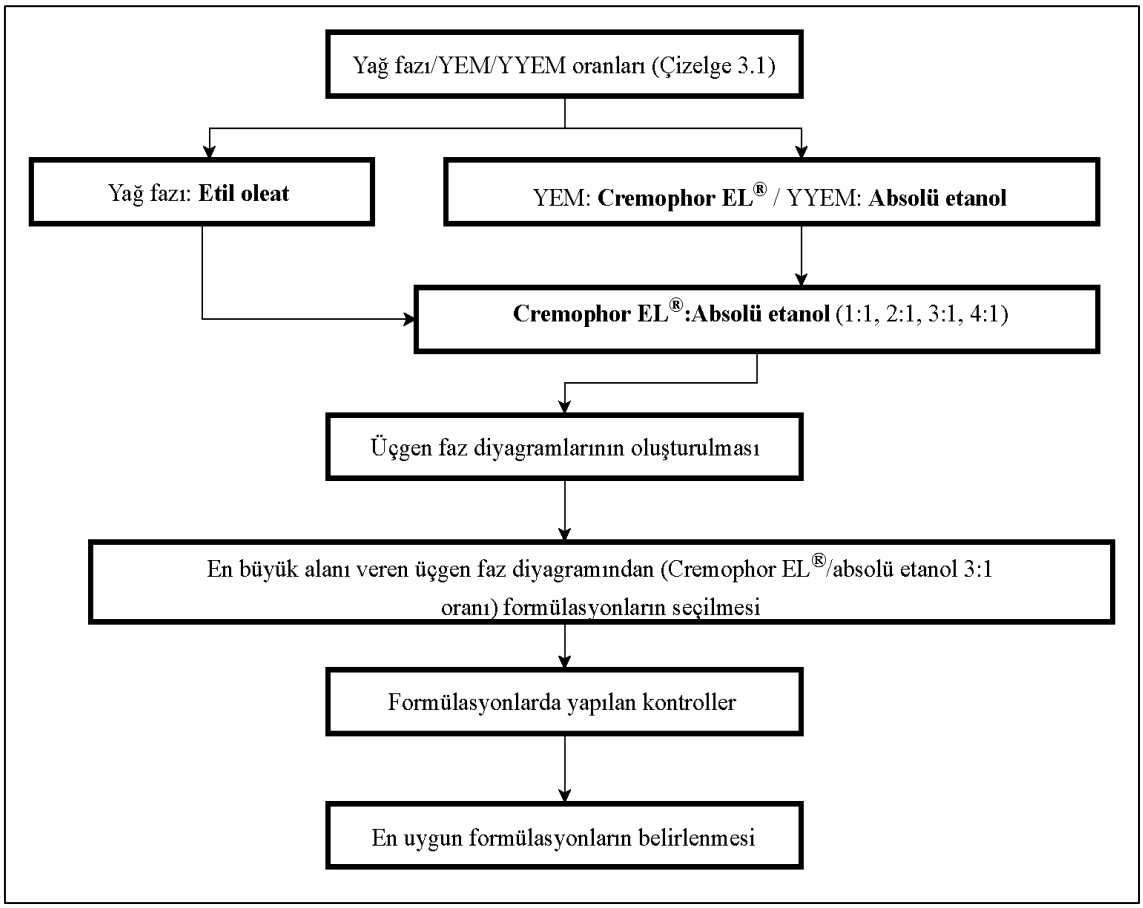
Önformülasyon çalışmaları-2



Şekil 3.6. Maisine®/Cremophor EL®/propilen glikol içeren SNEDDS'lerle yapılan önformülasyon çalışmalarının akış şeması

Şekil 3.6'da gösterildiği üzere Maisine® yağ fazı, Cremophor EL® yüzey etkin madde ve propilen glikol yardımcı çözücü olarak seçildi. Cremophor EL®: Propilen glikol oranları 1:1, 2:1 ve 3:1 olarak belirlendi.

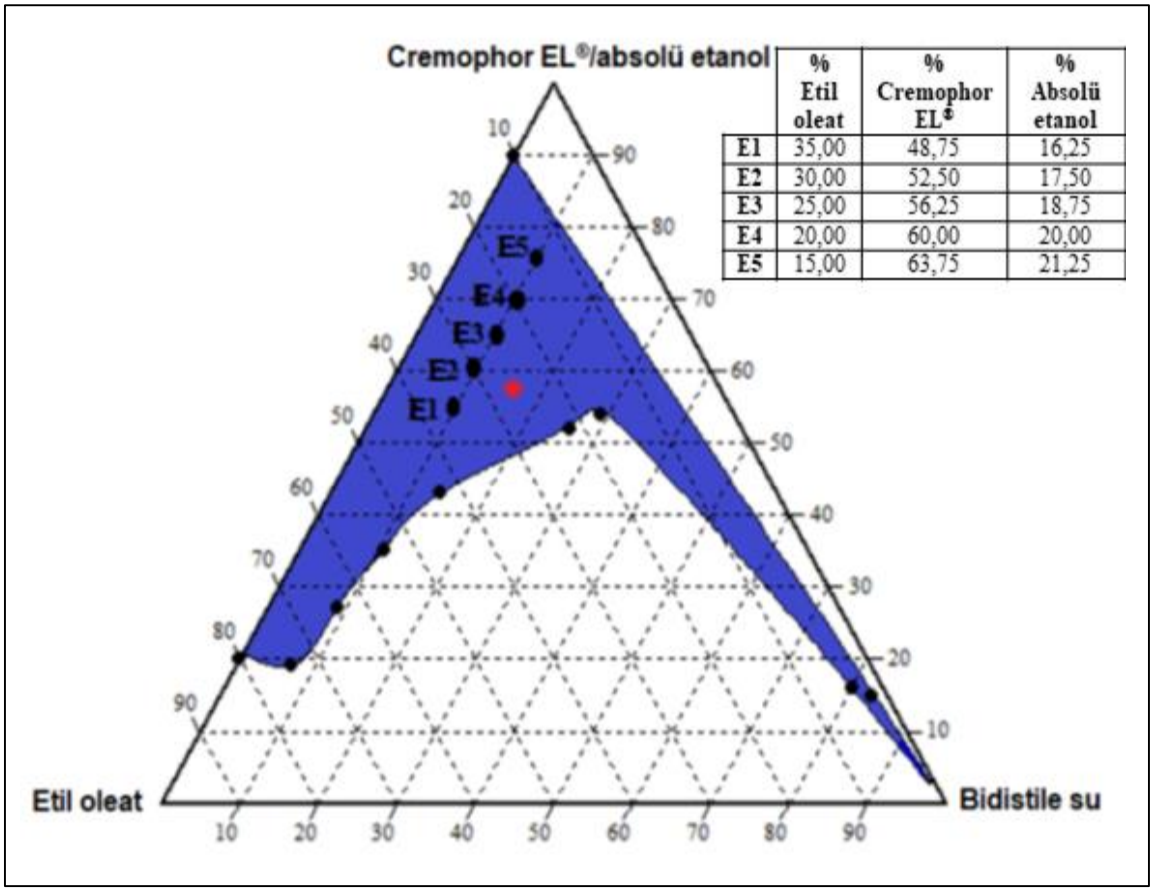
Önformülasyon çalışmaları-3



Şekil 3.7. Etil oleat®/Cremophor EL®/absolü etanol içeren SNEDDS'lerle yapılan önformülasyon çalışmalarının akış şeması

Şekil 3.7'de gösterildiği üzere etil oleat yağ fazı, Cremophor EL® yüzey etkin madde ve absolü etanol yardımcı çözücü olarak seçilen formülasyonlar hazırlandı. Cremophor EL®: absolü etanol 1:1, 2:1, 3:1 ve 4:1 oranlarında hazırlandı. Oluşan berrak çözeltiler bidistile su ile titre edildi. Çözeltilerde bulanıklık gözlendiği andaki bidistile su miktarları hesaplanarak CHEMIX® programında üçgen faz diyagramları oluşturuldu. Çizilen üçgen faz diyagramlarından en büyük alanı veren üçgen faz diyagramı (Şekil 3.8) üzerinde ağırlık merkezi Autocad® programı ile belirlenerek ağırlık merkezi etrafında seçilen noktalardaki formülasyonlar hazırlandı. Hazırlanan formülasyonlar exendin-4'ün saklama koşulları olarak belirtilen 5°C ± 3°C'de 28 gün süreyle bekletildi. Formülasyonlar USP30 NF 25'e göre 100 rpm'de manyetik karıştırıcı üzerinde 1:50 seyreltme oranında bidistile su ile

seyreltildi. Bu formülasyonlar emülsifikasyon zamanı, damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel açısından değerlendirildi.



	% Etil oleat	% Cremophor EL®	% Absolü etanol
E1	35,00	48,75	16,25
E2	30,00	52,50	17,50
E3	25,00	56,25	18,75
E4	20,00	60,00	20,00
E5	15,00	63,75	21,25

Şekil 3.8. Cremophor EL®: absolü etanol 3:1 içeren formülasyonlarla çizilen üçgen faz diyagramı

Deney tasarımı (DoE) yaklaşımı ile formülasyonların optimizasyonu

SNEDDS'lerin hazırlanmasında ön bilgi edinmek amacıyla DoE yaklaşımından faydanıldı. Bu amaçla Design Expert® Version 9.0.6 programına daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen veriler girilerek uygun bir tasarım alanı oluşması sağlandı ve program tarafından en uygun formülasyon belirlendi.

DoE yaklaşımında ile formülasyonların optimizasyonunda; hem eleme hem de formülasyon optimizasyonu amacıyla D-optimal tasarımı kullanıldı. Yanıt yüzey yöntem bilimi (RSM) bağımlı değişkenler ile buna etki eden bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin anlaşılmasında, istenen yanıt değerlerini elde etmek için olması gereken faktör değerlerinin

tahmin edilmesinde ve bu sayede optimum formülasyonun belirleneceği tasarım alanının oluşturulmasında kullanıldı. Bağımsız değişkenler yağ miktarı ve yüzey etkin madde/yardımcı çözücü oranı, bağımlı değişkenler ise damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, ve zeta potansiyel olarak seçildi.

DoE ile formülasyonların optimizasyonunda yardımcı madde olarak etil oleat (yağ fazı), Cremophor EL® (yüzey etkin madde), absolü etanol (yardımcı çözücü) kullanıldı. Yüzey etkin madde/yardımcı çözücü oranı önceki çalışmalardan elde edilen verilere dayanarak 3:1 seçildi. Bağımsız değişkenler; yağ miktarı (A) yüzey etkin madde/yardımcı çözücü miktarı (B) olarak belirlendi (Çizelge 3.2). Bağımlı değişkenler olarak damlacık büyüklüğü (DB), polidispersite indeksi (PDİ) ve zeta potansiyel (ZP) olarak belirlendi. İstatistiksel tasarım için Design Expert® Version 9.0.6 kullanıldı. 3^2 (3 düzey, 2 faktör) rastgele deney düzeni 2 tekrarlı toplam 18 deney yapıldı.

Çizelge 3.2. 3^2 faktöriyel D-optimal deney tasarımı

	Bağımsız değişken	
Seviye	Yağ miktarı (g)	Yüzey etkin madde/Yardımcı çözücü miktarı (g)
Düşük	0,5	1,5
Orta	1	2
Yüksek	1,5	2,5

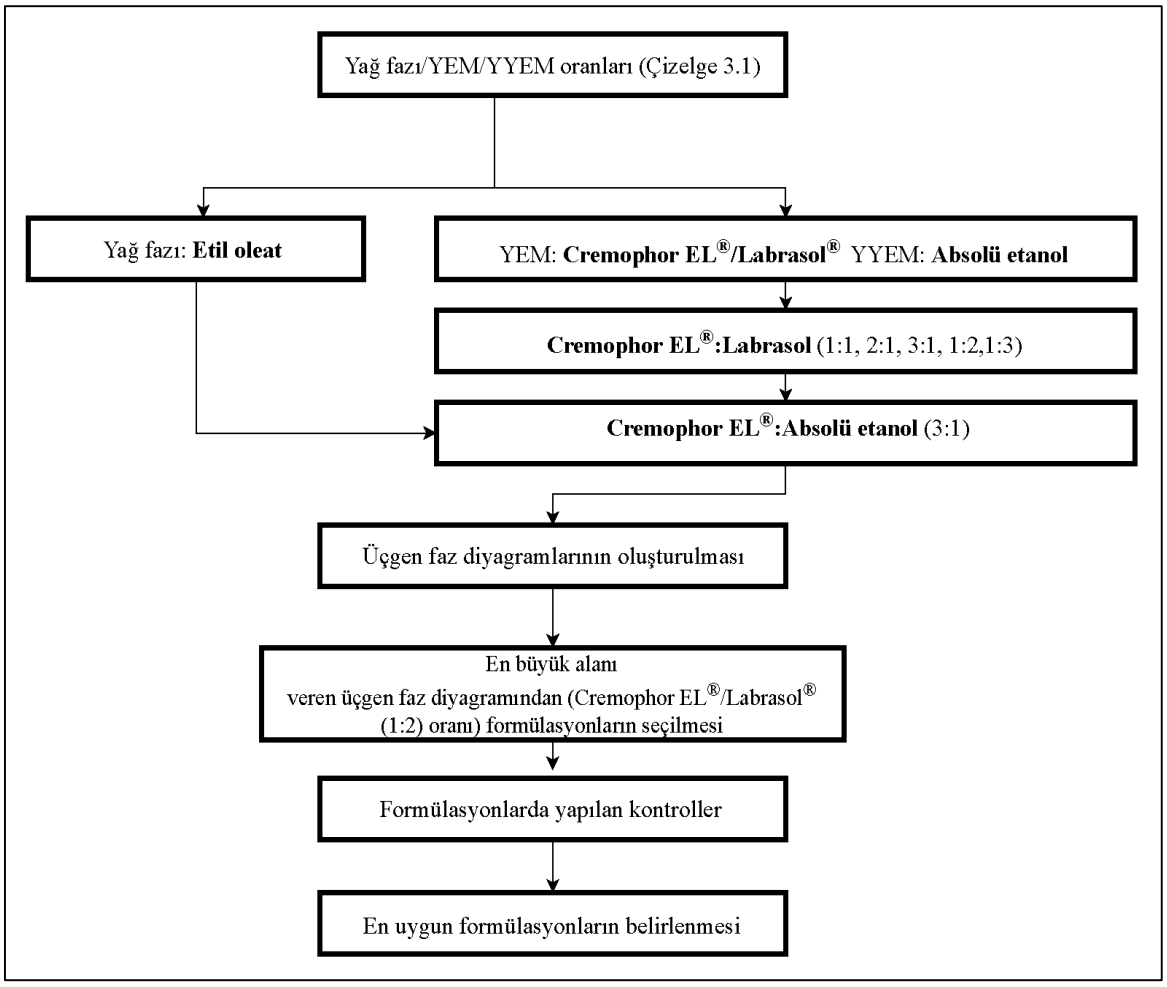
Optimum formülasyon için hedeflenen ürün profili Çizelge 3.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Hedeflenen ürün profili

Damlacık büyüklüğü	< 50 nm
Polidispersite indeksi	< 0,2

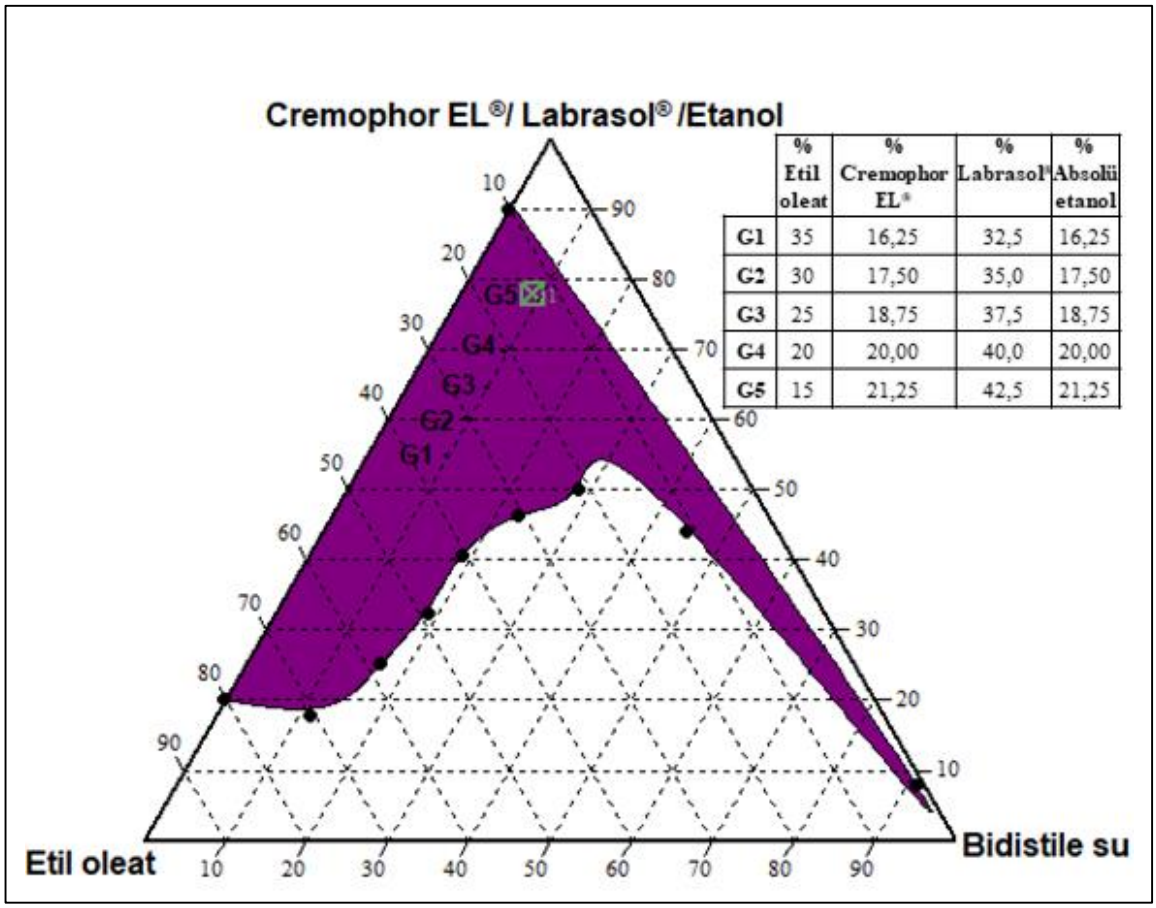
Cremophor EL® yüksek emülsifikasyon yeteneğine sahip bir yüzey etkin madde olarak formülasyonlarda küçük damlacık büyüklüğünü ve polidispersite indeksini sağlamada önemli bir role sahiptir. Ancak yüksek oranlarda Cremophor EL® toksisite problemlerine sebep olabileceği için formülasyonlarda Cremophor EL®'in oranını düşürmek için Cremophor EL® ve Labrasol® karışımının kullanıldığı formülasyonlar geliştirildi.

Önformülasyon Çalışmaları-4



Şekil 3.9. Etil oleat®/Cremophor EL®/Labrasol®/absolü etanol içeren SNEDDS'lerle yapılan önformülasyon çalışmalarının akış şeması

Şekil 3.9'da gösterildiği üzere yağ fazı olarak etil oleat, yüzey etkin madde olarak Cremophor EL® ve Labrasol® karışımı, yardımcı çözücü olarak absolü etanol içeren formülasyonlar geliştirildi. Yüzey etkin madde oranları Cremophor EL®/Labrasol® için 1:1, 2:1, 3:1, 1:2 ve 1:3 oranları çalışıldı. Cremophor EL®/Labrasol® (yüzey etkin madde) ve absolü etanol (yardımcı çözücü) için 3:1 oranı kullanıldı. Oluşan berrak çözeltiler bidistile su ile titre edildi. Çözeltilerde bulanıklık gözlendiği andaki bidistile su miktarları hesaplanarak CHEMIX® programında üçgen faz diyagramları oluşturuldu. Çizilen üçgen faz diyagramlarından en büyük alanı veren üçgen faz diyagramı (Şekil 3.10) üzerinde ağırlık merkezi Autocad® programı ile belirlenerek ağırlık merkezi etrafında seçilen noktalardaki formülasyonlar hazırlandı.

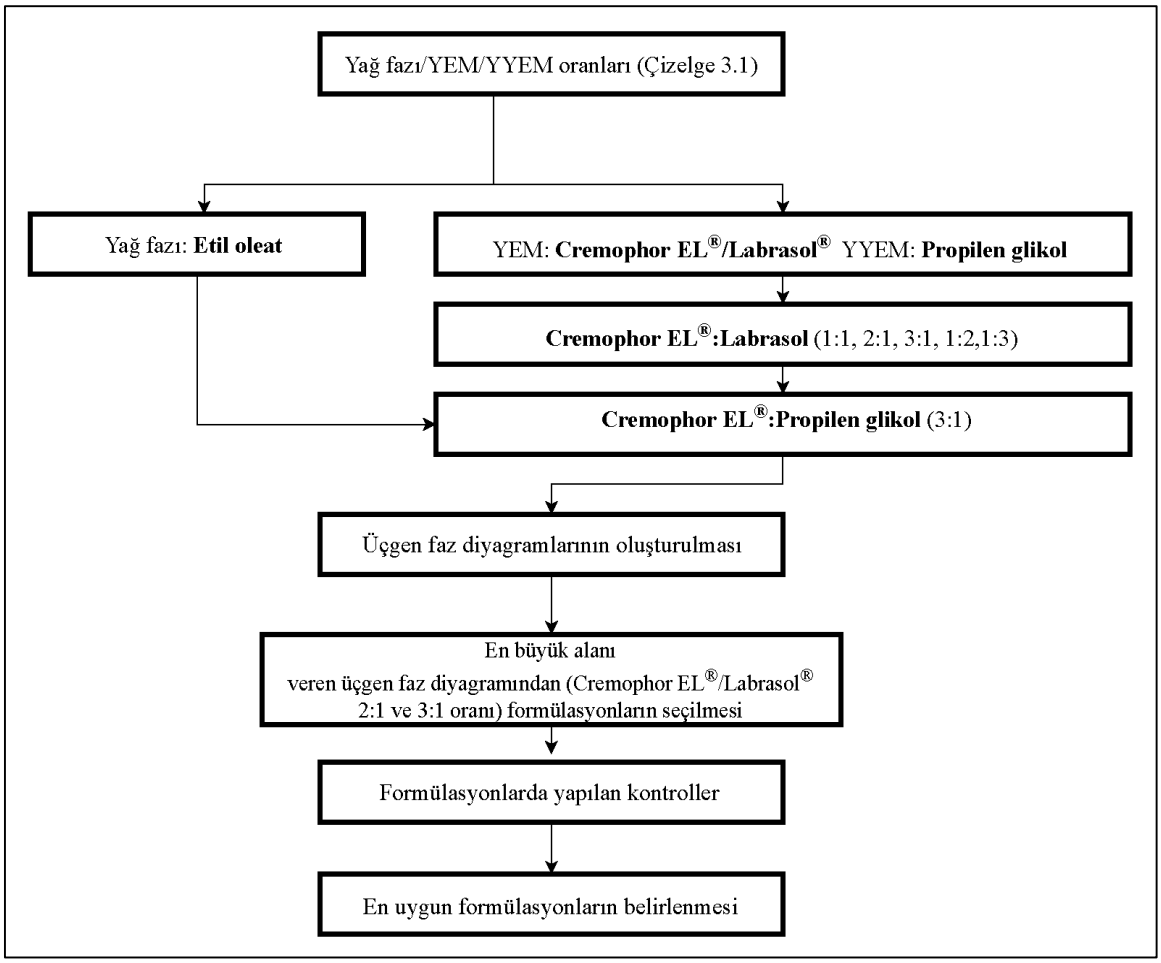


	% Etil oleat	% Cremophor EL®	% Labrasol®	% Absolü etanol
G1	35	16,25	32,5	16,25
G2	30	17,50	35,0	17,50
G3	25	18,75	37,5	18,75
G4	20	20,00	40,0	20,00
G5	15	21,25	42,5	21,25

Şekil 3.10. Etil oleat: Cremophor EL®/Labrasol® (1:2): Absolü etanol içeren formülasyonların üçgen faz diyagramı.

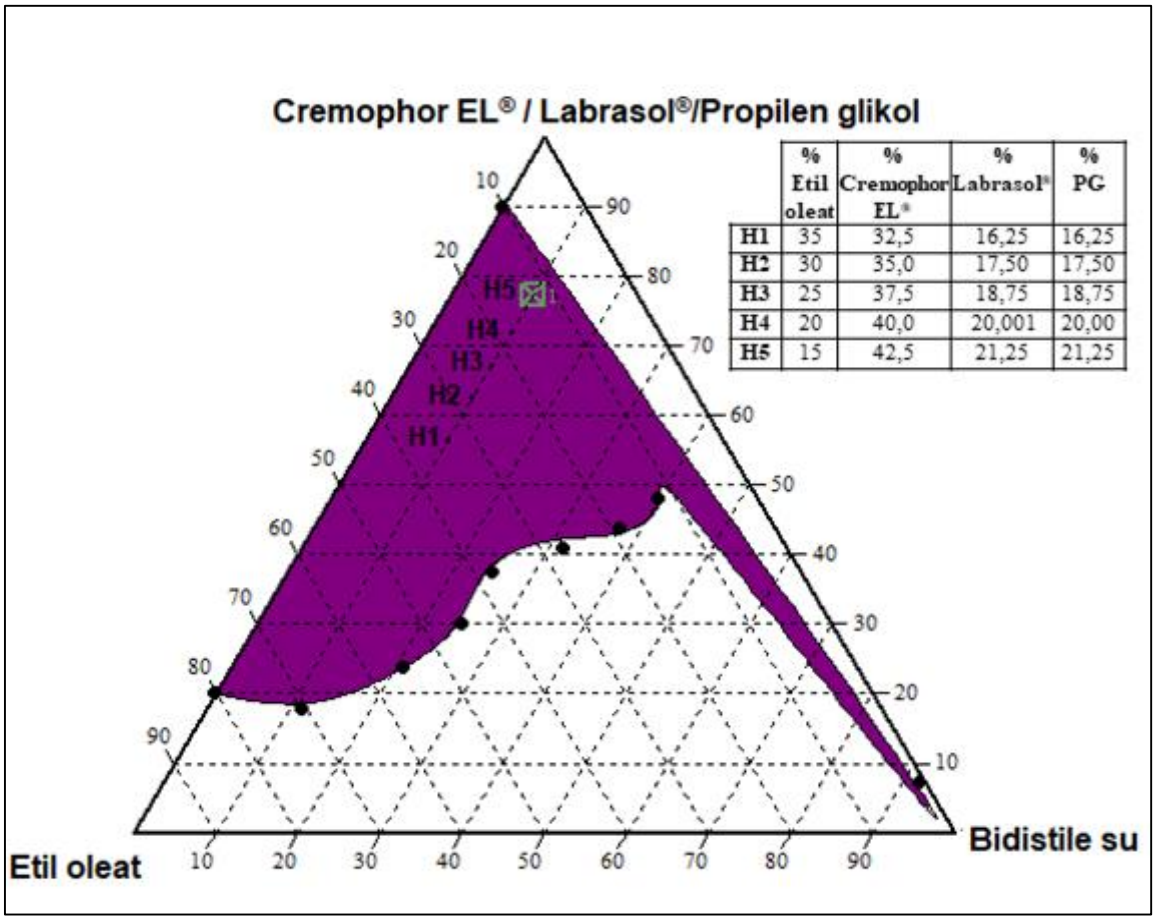
Hazırlanan formülasyonlar 5°C ± 3°C'de 28 gün süreyle bekletildi. Formülasyonlar USP30 NF 25'e göre 100 rpm'de manyetik karıştırıcı üzerinde 1:50 seyreltme oranında bidistile su ile seyreltildi. Bu formülasyonlar emülsifikasyon zamanı, damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel açısından değerlendirildi.

Önformülasyon Çalışmaları-5



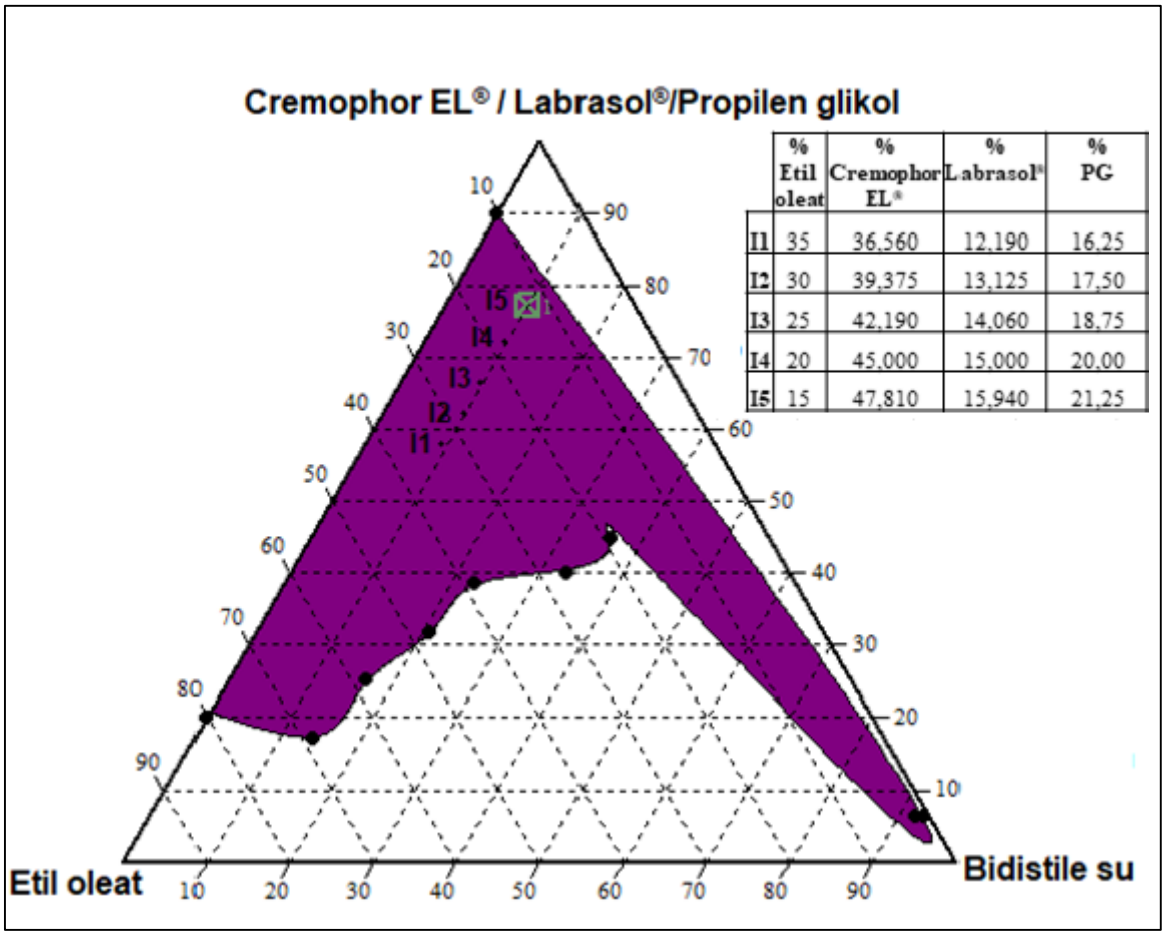
Şekil 3.11. Etil oleat®/Cremophor EL®/Labrasol®/propilen glikol içeren SNEDDS'lerle yapılan önformülasyon çalışmalarının akış şeması

Şekil 3.11'de gösterildiği üzere yağ fazı olarak etil oleat, yüzey etkin madde olarak Cremophor EL® ve Labrasol® karışımı, yardımcı çözücü olarak propilen glikol içeren formülasyonlar geliştirildi. Yüzey etkin madde olarak Cremophor EL®/Labrasol® için 1:1, 2:1, 3:1, 1:2 ve 1:3 oranları çalışıldı. Cremophor EL®/Labrasol® (yüzey etkin madde) ve propilen glikol (yardımcı çözücü) için 3:1 oranı kullanıldı. Oluşan berrak çözeltiler bidistile su ile titre edildi. Çözeltilerde bulanıklık gözlendiği andaki bidistile su miktarları hesaplanarak üçgen faz diyagramları oluşturuldu. Çizilen üçgen faz diyagramlarından en büyük alanı veren üçgen faz diyagramları (Şekil 3.12-3.13) üzerinde ağırlık merkezi Autocad® programı ile belirlenerek ağırlık merkezi etrafında seçilen noktalardaki formülasyonlar hazırlandı.



	% Etil oleat	% Cremophor EL®	% Labrasol®	% PG
H1	35	32,5	16,25	16,25
H2	30	35,0	17,50	17,50
H3	25	37,5	18,75	18,75
H4	20	40,0	20,001	20,00
H5	15	42,5	21,25	21,25

Şekil 3.12. Etil oleat: Cremophor EL®/Labrasol® (2:1): Propilen glikol içeren formülasyonların üçgen faz diyagramı

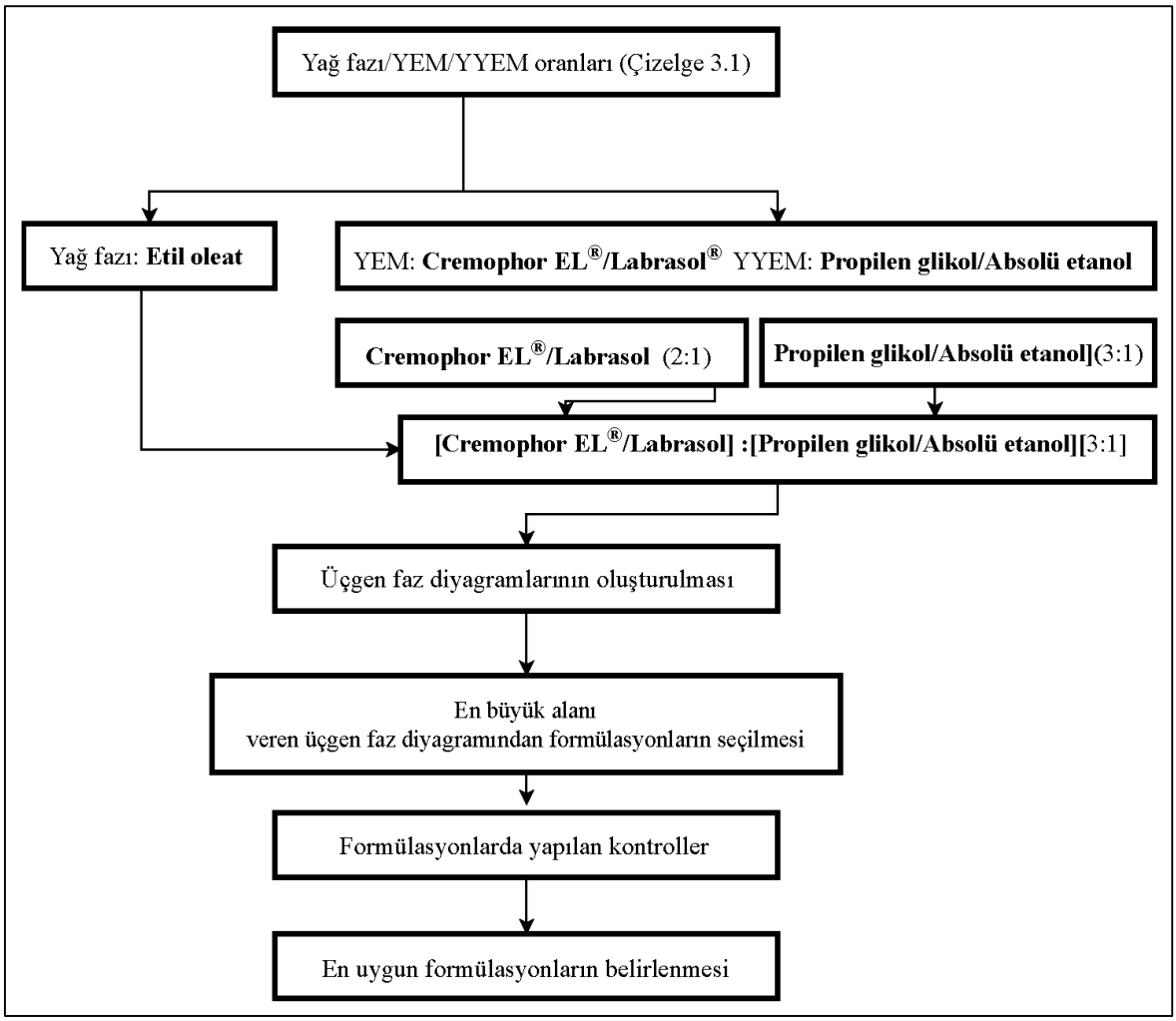


	% Etil oleat	% Cremophor EL®	% Labrasol®	% PG
I1	35	36,560	12,190	16,25
I2	30	39,375	13,125	17,50
I3	25	42,190	14,060	18,75
I4	20	45,000	15,000	20,00
I5	15	47,810	15,940	21,25

Şekil 3.13. Etil oleat: Cremophor EL®/Labrasol® (3:1): Propilen glikol içeren formülasyonların üçgen faz diyagramı

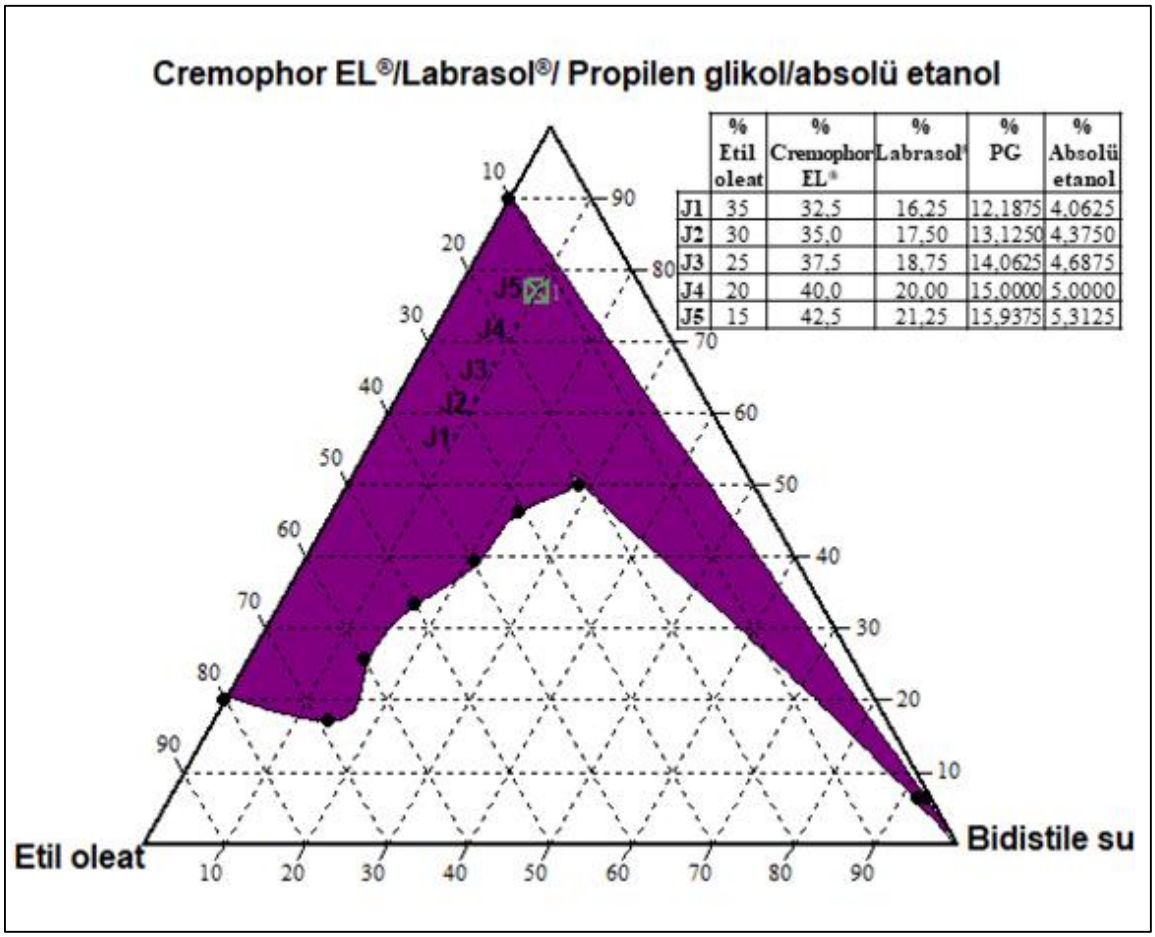
Hazırlanan formülasyonlar 5°C ± 3°C'de 28 gün süreyle bekletildi. Formülasyonlar USP30 NF 25'e göre 100 rpm'de manyetik karıştırıcı üzerinde 1:50 seyreltme oranında bidistile su ile seyreltildi. Bu formülasyonlar emülsifikasyon zamanı, damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel açısından değerlendirildi.

Önformülasyon Çalışmaları-6



Şekil 3.14. Etil oleat®/Cremophor EL®/Labrasol®/propilen glikol/absolü etanol içeren SNEDDS'lerle yapılan önformülasyon çalışmalarının akış şeması

Şekil 3.14'de gösterildiği üzere yağ fazı olarak etil oleat, yüzey etkin madde olarak Cremophor EL® ve Labrasol® karışımı, yardımcı çözücü olarak propilen glikol ve absolü etanol içeren formülasyonlar geliştirildi. Yüzey etkin madde oranları Cremophor EL®/Labrasol® için 2:1 oranı çalışıldı. Propilen glikol ve absolü etanol için 3:1 oranı kullanıldı. Oluşan berrak çözeltiler bidistile su ile titre edildi. Çözeltilerde bulanıklık gözlendiği andaki bidistile su miktarları hesaplanarak CHEMIX® programında üçgen faz diyagramları oluşturuldu. Çizilen üçgen faz diyagramlarından en büyük alanı veren üçgen faz diyagramı (Şekil 3.15) üzerinde ağırlık merkezi Autocad® programı ile belirlenerek ağırlık merkezi etrafında seçilen noktalardaki formülasyonlar hazırlandı.



	% Etil oleat	% Cremophor EL®	% Labrasol®	% PG	% Absolü etanol
J1	35	32,5	16,25	12,1875	4,0625
J2	30	35,0	17,50	13,1250	4,3750
J3	25	37,5	18,75	14,0625	4,6875
J4	20	40,0	20,00	15,0000	5,0000
J5	15	42,5	21,25	15,9375	5,3125

Şekil 3.15. Etil oleat: Cremophor EL®/Labrasol® (2:1): propilen glikol/absolü etanol (3:1) içeren formülasyonların üçgen faz diyagramı

Hazırlanan formülasyonlar 5°C ± 3°C'de 28 gün süreyle bekletildi. Formülasyonlar USP30, NF 25'e göre 100 rpm'de manyetik karıştırıcı üzerinde 1:50 seyreltme oranında bidistile su ile seyreltildi. Bu formülasyonlar emülsifikasyon zamanı, damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel açısından değerlendirildi.

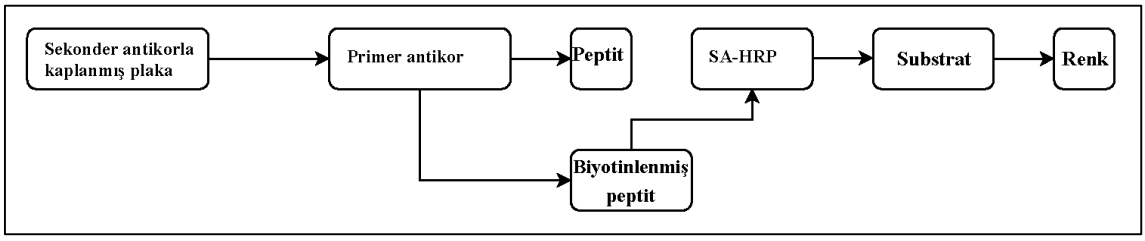
Önformülasyon çalışmalarında üçgen faz diyagramlarından seçilen; emülsifikasyon zamanı, damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi açısından 5°C ± 3°C'de 28 gün süreli stabilite çalışmaları sonucunda Bölüm 3.2.1'de anlatılan hedef ürün profiline (Çizelge 3.3) uygun bulunan formülasyonlar exendin-4 yüklenmek üzere seçildi.

3.2.2. ELISA yöntemi ile exendin-4'ün miktar tayini

Exendin-4'ün miktar tayini exendin-4 ELISA kitiyle (EK-070-94/ Phoenix Pharmaceuticals, CA) gerçekleştirildi. Bu kit, yarışmalı bir enzim immünotayin ilkesine dayanan spesifik bir peptitin (exendin-4) ve ilgili peptitlerin konsantrasyonunun ölçülmesi için tasarlanmıştır.

ELISA kitinin çalışma prensibi aşağıda verilmektedir:

Bu kitteki immünoplaka, spesifik olmayan bağlanma yerleri bloke edilmiş ikincil bir antikor ile önceden kaplanmıştır. İkincil antikor, birincil antikorun Fc fragmanına bağlanabilir. Bu birincil antikorun Fab fragmanı, standart peptit çözeltisinde ya da bilinmeyen numunede hem biyotinlenmiş peptit hem de hedef peptit tarafından yarışmalı bir şekilde bağlanmaktadır. Biyotinlenmiş peptit, substrat solüsyonunu katalize eden streptavidin-horseradish peroksidazı (SA-HRP) ile etkileşir. Ortaya çıkan sarı rengin yoğunluğu, biyotinlenmiş-peptit-SA-HRP kompleksinin miktarı ile doğru orantılıdır. Ancak hedef peptitin miktarı (standart peptit çözeltisi veya bilinmeyen numune) ile ters orantılıdır (Şekil 3.16) . Bu, birincil antikorla bağlanmak için biyotinlenmiş peptit ile hedef peptit arasındaki yarışmadan kaynaklanmaktadır. Standart bir eğri, bilinen çeşitli standart peptit konsantrasyonlarının (x) bir fonksiyonu olarak ölçülen optik dansiteyi (y) çizerek oluşturulabilir. Numunelerde bilinmeyen peptit konsantrasyonu, bu standart eğriyi temel alan ekstrapolasyon yoluyla belirlenebilir (Avrameas, 1992; Porstmann ve Kiessig, 1992).



Şekil 3.16. Exendin-4 ELISA kitinin (EK-070-94/ Phoenix Pharmaceuticals, CA) çalışma prensibi

Exendin-4 ELISA kitine ait validasyon parametreleri aşağıda verilmiştir.

Duyarlılık: 0,08 ng/mL
Doğrusallık: 0,08 – 0,86 ng/ml

Tayin limiti: 0-100 ng/mL

Test içi varyasyon: <%10

Testler arası varyasyon: <%15

Exendin-4 ELISA kitinin çalışma protokülü aşağıda özetlenmiştir:

Kuyucuk başına 50 µL standart, örnek ya da pozitif kontrol ve 25 µL primer antikor ve biyotinlenmiş peptit eklendi.

↓

Oda sıcaklığında (20-23 °C) 2 saat inkübe edildi.

↓

Herbir kuyucuk başına 350 µL 1x assay tamponu eklenerek immunoplaka 4 kez yıkandı.

↓

Herbir kuyucuk başına 100 µL SA-HRP çözeltisi eklendi.

↓

Oda sıcaklığında (20-23 ºC) 1 saat inkübe edildi.

↓

Herbir kuyucuk başına 350 µL 1x assay tamponu eklenerek immunoplaka 4 kez yıkandı.

↓

Herbir kuyucuk başına 100 µL substrat çözeltisi eklendi.

↓

Oda sıcaklığında (20-23 ºC) 1 saat inkübe edildi.

↓

Herbir kuyucuk başına 100 µL 2N HCI eklenerek reaksiyon başlatıldı.

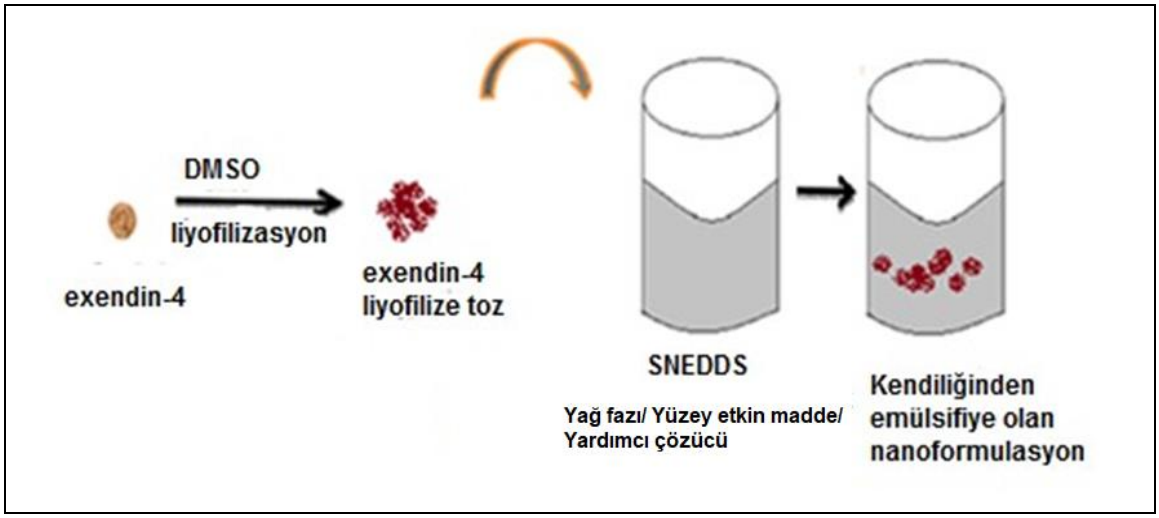
↓

İmmunoplaka mikroplaka okuyucuya yerleştirilerek kuyucuklarda oluşan sarı rengin optik yoğunluğu 450 nm'de ölçüldü ve gerekli hesaplamalar kit protokolünde belirtilen 4-5 parametrik regresyon kullanılarak XLSTAT® programında yapıldı. Hazırlanan standartlardan hareketle hiperbolik eğri çizildi.

3.2.3. Exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sistemlerin hazırlanması

Önformülasyon çalışmaları sonucu hedef profile uygun formülasyonlar seçildikten sonra, exendin-4 yüklü SNEDDS formülasyonları hazırlandı. SNEDDS'lerin hazırlanmasında (Şekil 3.17); exendin-4'ün 2,5 µg'lık flakonlara porsiyonlar halinde bölünmesi için önce 100 µg exendin-4 1 mL DMSO çözeltisinde (% 0,1) çözüldü, daha sonra 25 µL'lik hacimlerde liyofilize edildi. Liyofilize haldeki exendin-4 yağ fazı içerisinde dağıtıldı. Yüzey etkin madde ve yardımcı çözücüler 500 rpm'de karıştırıldı. Yüzey etkin madde/yardımcı çözücü

karışımının üzerine exendin-4 içeren yağ fazı damla damla ilave edilerek formülasyonlar hazırlandı. *İn vivo* çalışmalarda kullanılacak dozlarda exendin-4 2,5 µg ve kimostatin 0,125 ng (enzim inhibitörü olarak kullanıldığı etkin konsantrasyon) ilave ederek exendin-4/kimostatin içeren formülasyonlar da aynı şekilde hazırlandı.



Şekil 3.17. Exendin-4 yüklü kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sistemlerin hazırlanması

Önformülasyon çalışmaları sonucunda aşağıda belirlenen formülasyonlara exendin-4 yüklendi (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Önformülasyon çalışmaları sonucunda belirlenen formülasyonlar ve yardımcı madde oranları

Formülasyon	Yağ fazı (%)	Yüzey etkin madde (%)	Yardımcı Çözücü (%)
E2	Etil oleat %30	Cremophor EL® %52,5	Etanol %17,5
F (DoE)	Etil oleat %16,67	Cremophor EL® %62,5	Etanol %20,83
I5	Etil oleat %15	Cremophor EL® %47,81-Labrasol® %15,94	Propilen glikol %21,25
H5	Etil oleat %15	Cremophor EL® %42,5-Labrasol® %21,25	Propilen glikol %21,25
G5	Etil oleat %15	Cremophor EL® %21,25-Labrasol® %42,5	Etanol %21,25
J5	Etil oleat %15	Cremophor EL® %21,25-Labrasol® %42,5	Etanol %5,3125-Propilen glikol %15,9375

Önformülasyon çalışmaları sonucunda belirlenen %30,00 etil oleat, %52,50 Cremophor EL®, %17,50 absolü etanol içeren ***E2***; %16,67 etil oleat, %62,50 Cremophor EL®, % 20,83 absolü etanol içeren ***F***; %15,00 etil oleat, %21,25 Cremophor EL®, %42,5 Labrasol®, % 21,25 absolü etanol içeren ***G5***; %15,00 etil oleat, %42,5 Cremophor EL®, %21,25 Labrasol®, %21,25 propilen glikol içeren ***H5***; %15,00 etil oleat, %47,81 Cremophor EL®, %15,94 Labrasol®, % 1,25 propilen glikol içeren ***I5,*** %15,00 etil oleat, %42,5 Cremophor EL®, %21,25 Labrasol®, %15,94 propilen glikol, %5,31 absolü etanol içeren ***J5*** formülasyonlarına exendin-4 yüklendi.

En uygun formülasyonun seçimi için exendin-4 yükleme etkinliği exendin-4 ELISA kiti kullanılarak hesaplandı. Şekil 3.17'deki şemaya göre hazırlanan formülasyonlar 1:50 oranında bidistile suyla seyreltildi. Formülasyonlar 8.000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek ayrıldı. Üstteki berrak kısım alınarak yükleme etkinliği indirekt yöntemle belirlendi. Direkt yöntemde indirekt yöntemden farklı olarak santrifüjleme işlemi yapılmaksızın nanoemülsiyonun üzerine % 10'luk Triton-X ilave edilerek yağ damlacıkları parçalanması sağlandı. Miktar tayini için ELISA kitin protokolü uygulanarak standartlardan hareketle XLSTAT® programına göre 4 değişkenli lojistik regresyon kullanılarak hiperbolik eğri çizildi. Hiperbolik eğri eşitliğinden örneklerdeki exendin-4 konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.4. Exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sistemlerin karakterizasyon çalışmaları

Kendiliğinden emülsifiye olan sistemlerle ilgili güncel literatüre göre karakterizasyon parametreleri emülsifikasyon zamanı, damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel, türbidite, pH ve viskozite olarak belirlendi. Emülsifikasyon zamanı, damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde yapıldı. Viskozite, pH ve türbidite ölçüm çalışmaları aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

<u>Reolojik özellikler ve viskozite</u>

Exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'ler Bölüm 3.2.4'de anlatıldığı gibi hazırlandıktan sonra viskozite ölçümleri Brookfield DV-III Rheometer ile 25±0,1ºC'de sıcaklıkta gerçekleştirildi. Ölçüm için cihazın % dönme momenti (% torque) 10-100 arasında

olacak şekilde ayarlandı. Cihazın yazılım programının (Rheocalc V2.4) verdiği kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği çizildi. Grafiklerin eğiminden SNEDDS'lerin viskoziteleri (mPa.s) hesaplandı (n=3).

pH

Exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'ler Bölüm 3.2.4'de anlatıldığı gibi hazırlandıktan sonra formülasyonlar bidistile su ile 1:50 oranında seyreltildi. pH ölçümleri ISOLAB pH ölçüm cihazı kullanılarak gerçekleştirildi (n=3).

Türbidite (bulanıklık)

Exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'ler Bölüm 3.2.4'de anlatıldığı gibi hazırlandıktan sonra formülasyonlar bidistile su ile 1:50 oranında seyreltildi. Türbidite (bulanıklık) ölçümleri türbidimetre kullanılarak 0-200 NTU aralığında yapıldı (n=3).

Morfolojik görüntüleme

Formülasyonların morfolojik özelliklerinin incelenmesi için exendin-4 içermeyen formülasyon, exendin-4 yüklü formülasyon ve exendin-4/kimostatin yüklü formülasyon Ankara Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü'nde Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) FEI G2 S TWIN cihazı kullanılarak görüntülendi. TEM görüntüleme için bakır ızgara üzerine 1:50 oranında bidistile su ile seyreltilmiş formülasyondan 10 µL damlatıldı. Daha sonra üzerine %1 (a/h) fosfotungustik asit içeren çözeltiden 10 µL eklenerek boyandı ve oda sıcaklığında en az 5 dakika kurumaya bırakıldı. Görüntüler 100 kV'da alındı (Parmar ve diğerleri, 2012).

3.2.5. Kısa süreli fiziksel stabilite çalışmaları

Kısa süreli fiziksel stabilite çalışmaları 1 ay süreli olarak 5ºC ± 3ºC, 25°C ± 2°C/60% ± 5% bağıl nem ve 40ºC ± 5ºC/%75 ± %5 bağıl nemde yapıldı. Damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ölçümleri Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde türbidite, pH ve viskozite ölçümleri Bölüm 3.2.4.'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi (n=3).

3.2.6. Uzun süreli fiziksel stabilite çalışmaları

Uzun süreli fiziksel stabilite çalışmalarına kısa süreli stabilite çalışmalarına göre en uygun formülasyon olarak belirlenen exendin-4 ve exendin-4/kimostatin içeren H5 SNEDDS'ler ile devam edildi. Çalışmalar ICH kılavuzuna göre 12 ay süreli olarak 5ºC±3ºC ve 25°C ± 2°C/60% bağıl nemde yürütüldü (ICH Q1A (R2) Guideline, 2003). Exendin-4 ve exendin-4/kimostatin içeren H5 SNEDDS'ler Bölüm 3.2.3'te hazırlandı. Bu formülasyonlar için damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ölçümleri Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde türbidite, pH ve viskozite ölçümleri Bölüm 3.2.4.'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi (n=3).

3.2.7. *İn vitro* salım çalışmaları

In vitro salım çalışması, yüksek exendin-4 yükleme etkinliği bulunan H5 SNEDDS formülasyonuyla yapıldı. İlgili güncel literatür ışığında exendin-4'ün salım çalışmaları, USP palet yöntemiyle, 2 saat süreyle hem pH 1,2 (0,1 N HCI) hem de pH 6,8 fosfat tamponu kullanarak gerçekleştirildi (Shahba, Mohsin ve Alanazi, 2012). Salım ortamı hacmi 500 mL, sistem sıcaklığı 37°C±0,5 ve paletin dönme hızı 50 rpm olarak belirlendi. Exendin-4 yüklü SNEDDS'ler Bölüm 3.2.4'de anlatıldığı şekilde hazırlandı. Exendin-4 yükleme etkinliği dikkate alınarak 2,5 µg exendin-4 içeren 1200 µL (1 g) SNEDDS kapsüllere (Vcaps Plus®, 00el) dolduruldu. Kapsüller küçük batırıcılara (sinker) yerleştirilip pH 1,2 ve pH 6,8 tampon içeren 500 mL salım ortamlarına atılarak deney başlatıldı (Resim 3.1.) (n=3). 5., 15., 30., 60. ve 120. dakikalarda 1'er mL örnek alındı. Alınan örneklerin konsantrasyonları ELISA kitiyle hesaplanarak *in vitro* salım profilleri çizildi.



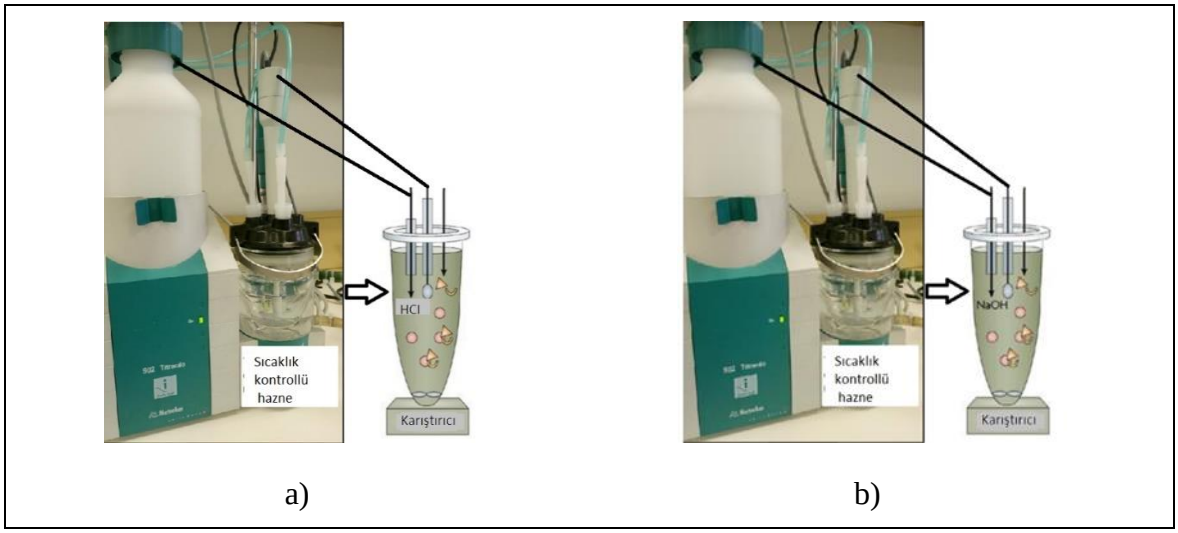
Resim 3.1. Kapsül içerisindeki formülasyonun *in vitro* salım çalışmaları

3.2.8. *In vitro* lipoliz çalışmaları[1]

Formülasyonun gastrik ortamda ve emilim sonrası lipolize uğrayıp uğramadığının anlaşılması için *in vitro* lipoliz çalışmaları yapıldı. Gastrik ortamda bulunan gastrik lipaz için Candida Antartica Lipase, intestinal ortamda lipoliz deneyi için pankreatin lipaz kullanıldı. Çalışma 37±0,5°C sıcaklıkta Metrohm 902 Titrando titrasyon cihazında (Resim 3.2) FaSGIF (açlık durumunu taklit eden mide ortamı) ve FaSSIF (açlık durumunu taklit eden bağırsak ortamı) biyouyumlu ortamları kullanılarak gerçekleştirildi. Gastrik lipoliz için 36 mL FaSGIF biyouyumlu ortamına lipolizi incelenecek bölüm 3.2.4'de anlatıldığı şekilde exendin-4 yükleme etkinliği dikkate alınarak 2,5 µg exendin-4 içeren 1200 µL (1 g) exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü H5 SNEDDS eklenerek pH'sı 0,1 N HCI ile 2'ye getirildi. Daha sonra enzim çözeltisi olarak 4 mL Candida Antartica Lipase çözeltisi eklenerek deney başlatıldı. 30., 60., ve 120.dklarda 3 mL örnek alınarak yerine taze ortam konuldu. Açığa çıkan exendin-4 ELISA kitiyle hesaplandı. Açlık ve tokluk ortamlarındaki SNEDDS'lerin lipolizlerini değerlendirmek amacıyla FASSIF ve FESSIF (tokluk durumunu taklit eden bağırsak ortamı) biyouyumlu ortamları kullanıldı (Ali ve diğerleri, 2010; Christophersen ve diğerleri, 2014; Thomas, Holm, Rades ve Müllertz, 2012). Lipoliz çalışması intestinal geçiş süresi göz önüne alınarak 4 saat olarak planlandı. 36 mL FASSIF/FESSIF biyouyumlu

[1] *In vitro* lipoliz çalışmaları Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda Metrohm 902 Titrando titrasyon cihazında yapıldı. Katkılarından dolayı Doç. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN'e teşekkür ediyoruz.

ortamına lipolizi incelenecek 1 g formülasyon eklenerek pH'sı 0,5 M NaOH ile 6,5'e getirildi. Daha sonra enzim çözeltisi olarak 4 mL pankreatin lipaz çözeltisi eklenerek deney başlatıldı. Deney süresi boyunca açığa çıkan yağ asitleri ortam pH'sını düşürdü. Sistem pH'sını 6,5'de tutmak için harcanan 0,5 M NaOH çözeltisi miktarı kaydedilerek incelenen örneğin lipolize uğrayıp uğramadığına karar verildi.



a) b)

Resim 3.2. *In vitro* a) gastrik lipoliz b) intestinal lipoliz

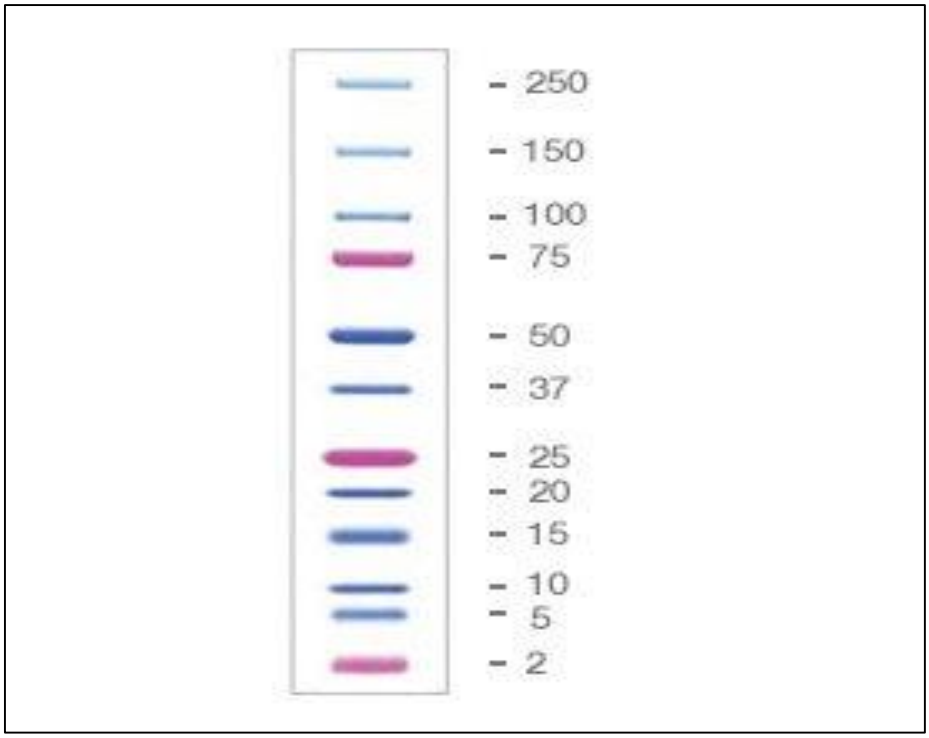
3.2.9. SDS-PAGE ile stabilite çalışmaları

Çalışmamızda exendin- 4'ün yapısal bütünlüğünde değişim olup olmadığının incelenmesi amacıyla protein moleküllerin yüklerine göre elektriksel alanda ayrılmaları temeline dayanan SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Çalışmada farklı molekül ağırlığına sahip proteinleri içeren moleküler ağırlık belirleyici (MWM) kullanılarak örneğin oluşturduğu bant ile MWM üzerindeki bantların karşılaştırılması ve exendin-4'ün (4,186 kDa) yapısında parçalanmanın olup olmadığının gözlenmesi planlandı.

Stabilite çalışmaları 0, 1, 2 ve 4. hafta bekletilen Bölüm 3.2.4'de anlatıldığı şekilde hazırlanan exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü H5 SNEDDS'lerle yapıldı. Exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü H5 SNEDDS 1:5 oranında bidistile su ile seyreltildi. Coomassie Brilliant Blue boyama yöntemiyle 200 ng-500 ng aralığında peptitler tayin edilmektedir. Bu amaçla SDS-PAGE'de kuyucuklara yüklenecek peptit miktarının 200 ng'nın altına düşmemesi için seyreltme oranı düşük tutuldu.

SDS-PAGE çalışması ile exendin-4'ün jelde ilerlemesi üzerinde yardımcı bileşenlerin etkisi de araştırıldı.

Moleküler ağırlık belirleyici olarak 2-250 kDa arasında molekül ağırlığına sahip bantları (Resim 3.3) içeren Precision Plus Protein™ Dual Xtra çözeltisi ve %16,5 Tris-tricine hazır jel kullanıldı.



Resim 3.3. Moleküler ağırlık belirleyici (Precision Plus Protein™ Dual Xtra mol wt 2-250 kDa) SDS-PAGE'de gözlenen bantları

SDS-PAGE çalışması aşağıdaki basamaklara göre gerçekleştirildi.

- %16,5 Tris-tricine jel koşturucu aparata takıldı.
- 0, 1, 2 ve 4. hafta 5°C ±3 °C'de bekletilen exendin-4 içeren SNEDDS (Ex-4-S) ve exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS (Ex-4-kS) alınan 80 µL örnek 80 µL numune tamponu* ile karıştırıldı. Bu karışımların herbirinden 20 µL jellere yüklendi.
- İlk kuyucuğa 10 µL moleküler ağırlık belirleyici eklendi.

- Hücrenin içine 125 mL, dışına 375 mL yükleme tamponu** eklenerek elektroforez işlemi başlatıldı. 120 V sabit voltajda 1,5 saatlik elektroforez sonunda numuneler bitiş çizgisine kadar sürüklendi.
- Jel, camların arasından çıkarıldı ve boyama çözeltisine*** konuldu.
- Bir saat boyunca bekletildikten sonra yıkama çözeltisine**** konularak jel 24 saat bekletildi.
- Yıkanan jelin fotoğrafı çekildi ve jeldeki bantlar molekül ağırlık belirleyicinin bantları ile karşılaştırıldı.

*Numune tamponu**

100 mM Tris-HCl, pH 6.8,
1% SDS,
4% 2-merkaptoetanol,
% 0,02 Brilliant Blue G
24% gliserol

*Yükleme tamponu***

Tris / Tricine / SDS tamponu (10x) (SIGMA –T1165) kullanımdan önce 1:10 oranında bidistile su seyreltildi.

*Boyama Çözeltisi****

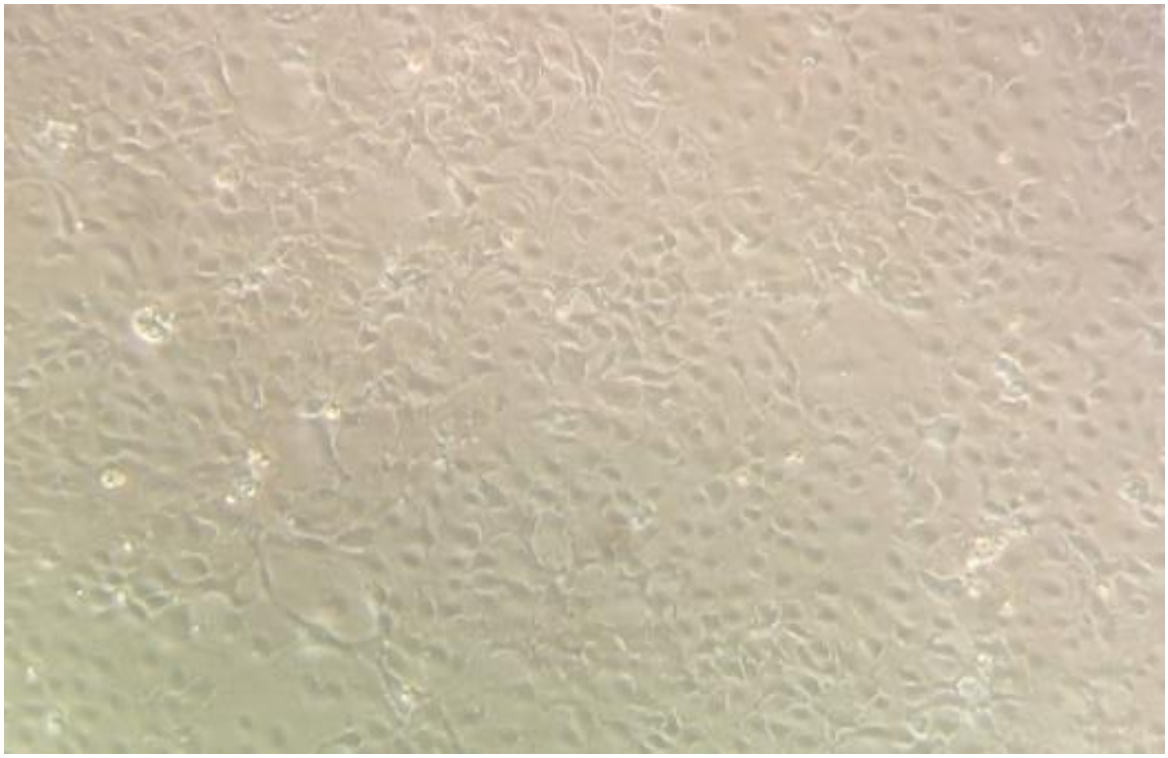
Coomassie Brillant Blue……0,0025g
%10 asetik asit çözeltisi…..…….100 mL

*Yıkama Çözeltisi*****

%10 asetik asit çözeltisi

3.2.10. Formülasyonların hücre canlılığına etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi

Hücre kültürü çalışmalarında insan epitelyal kolorektal adenokarsinoma hücreleri (Caco-2) kullanıldı (Resim 3.4). ((3-(4,5- dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) MTT yöntemi, canlı hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri sonucu sarı renkli MTT'in indirgenerek mor formazan kristaline dönüştürülmesi prensibine dayanmaktadır. MTT deneyi hücrelerin yaşama ortamı olan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içinde yapıldı. Testte Caco-2 hücrelerinin canlılıkları 24 saat izlendi. 96 kuyucuklu kültür kabına kuyucuk başına 20,000 hücre DMEM besiyeri içerisinde ekildi. Hücrelerin kültür kabı tabanına tutunmaları için 24 saat karbondioksitli CO_2'li etüvde inkübe edildi. 24 saat sonunda kuyucuklardaki besiyeri atıldıktan sonra 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL, 125 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL, 750 ng/mL, 1000 ng/mL konsantrasyonlarda exendin-4 çözeltisi, exendin-4 içermeyen formülasyonlar, 50 ng/mL exendin-4 yüklü H5 formülasyonu, 50 ng/mL exendin-4 ve 2,5 ng/mL kimostatin yüklü formülasyonlar içeren besiyeri eklendi. Exendin-4 içeren besiyeri ile hücreler 24 saat inkübe edildi. Kuyucuklara 13 µL MTT çözeltisi eklendi ve 2 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan süpernant atıldıktan sonra 100 µL hücre kültürü için DMSO eklenerek oluşan formazon kristalleri çözünür hale getirildi. Kuyucuklarda oluşan mor rengin optik yoğunluğu 570 nm'de mikroplaka okuyucuda ölçüldü. Bu değerlerden hareketle yüzde canlılık hesapları yapıldı (Bu, Narayanan, Dalrymple, Cheng ve Serajuddin, 2016).



Resim 3.4. Caco-2 hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (x10)

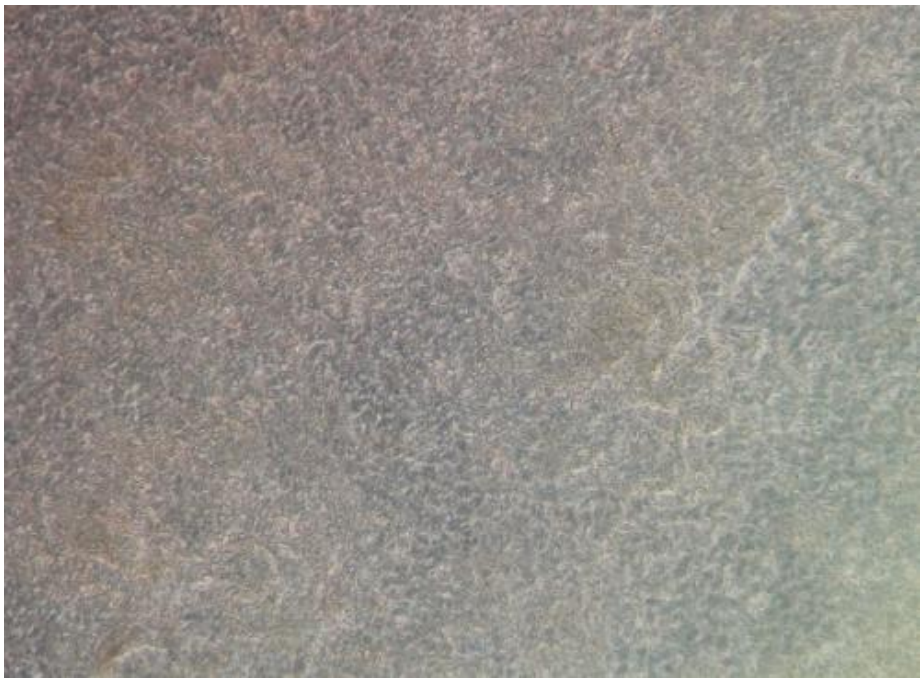
3.2.11. Hücrelerin bütünlüğünün değerlendirilmesi ve geçiş çalışmaları

Hücreler arası sıkı bağlantıların permeabilitesinin değerlendirilmesinde Trans Epitel Elektriksel Direnç (TEER) değeri ölçümü kullanılmaktadır (Chen ve diğerleri, 2013). Hücre bütünlüğü, transepitel elektriksel direncin ölçülmesiyle belirlendi. Bu amaçla; TEER ölçüm aleti kullanıldı. Caco-2 hücreleri 6 kuyucuklu Transwell kültür kabına kuyucuk başına 120.000 hücre DMEM besiyeri içerisinde ekildi (Resim 3.5). Caco-2 hücrelerinin olgunlaşıp tek tabaka olması için günaşırı besiyeri değişimi yapılarak 21 gün boyunca Transwell kültür kapları CO_2'li etüvde bekletildi. 21 gün sonunda kuyucukların ölçümü için elektrotlardan biri alıcı ortama, diğeri ise verici ortama daldırılarak TEER değeri ölçümü yapıldı (Resim 3.6). Exendin-4 yüklü H5 SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü H5 SNEDDS'ler 1:50 oranında bidistile su ile seyreltilerek exendin-4 konsantrasyonu 50 ng/mL olacak şekilde ayarlandı. Geçiş çalışmaları için 6 kuyucuklu plakanın (Transwell®) apikal ve bazolateral kısımlarındaki besiyerleri alınarak apikal kısma 1'er mL exendin-4 çözeltisi (50 ng/mL), exendin-4 yüklenmemiş SNEDDS, exendin-4 (50 ng/mL) yüklü formülasyonlar, exendin-4 (50 ng/mL) ve kimostatin (2,5 ng/mL) yüklü formülasyonlar; bazolateral kısmına ise 1'er

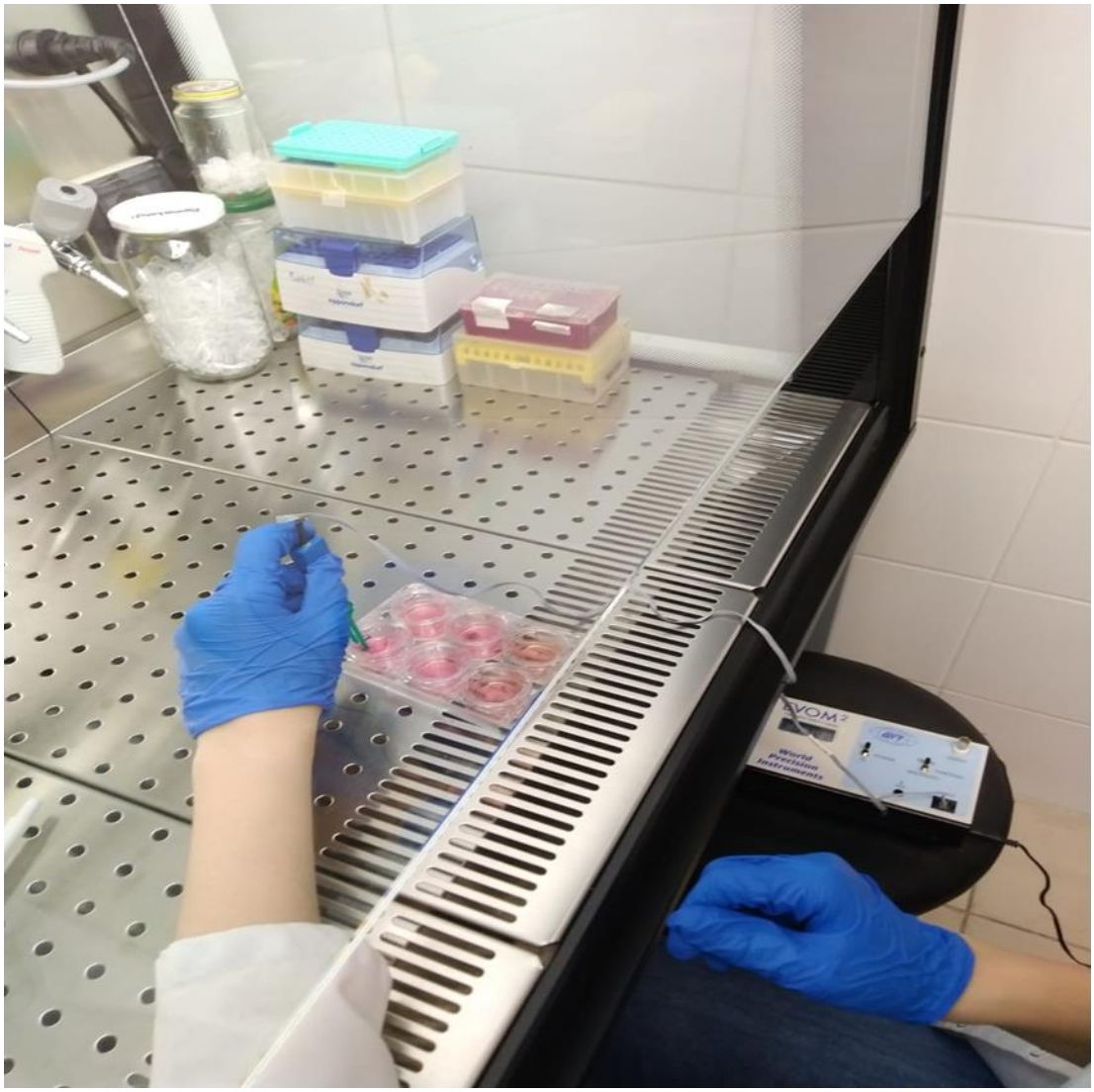
mL taze besiyeri eklendi (n=3). Apikal kısımdan bazolateral kısma doğru geçiş çalışması boyunca 30., 60., 120. ve 240. dakikalarda örnek alındı ve yerine taze besiyeri konuldu. Alınan örnekler exendin-4 ELISA kitiyle analiz edildi. Geçirgenlik katsayısı (P_{app}) "Eş. 3.1" ile hesaplandı (Wang ve diğerleri, 2014; Zhang ve diğerleri, 2012c).

$$k=P_{app} = (dQ / dt) \times (1 / A \times Co) \quad \text{(Eş. 3.1)}$$

P_{app}: Geçirgenlik katsayısı (cm/sn), (dQ / dt): Geçirgenlik hızı (ng/sn), A: membran alanı (4,67 cm^2), Co: Verici kompartmandaki konsantrasyon (ng/mL)



Resim 3.5. Tek tabaka oluşturan Caco-2 hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (x10)



Resim 3.6. TEER değeri ölçümü

3.2.12. *In vivo* çalışmalar

In vivo çalışma için Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (16.08.2017 tarihli Karar No: 16/109) etik kurul izni (EK 1) alındı. Sıçanların temin edilmesi, bakımı, beslenmesi ve deneysel çalışmaların Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEKAM)'da yapıldı.

Deney hayvanları

Çalışmada 2-2,5 aylık, 230-300 g ağırlığındaki Wistar albino ırkı erkek sıçanlar kullanıldı. Çalışma süresinde sıçanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsü olan, iyi havalandırılmış, %60 bağıl nem oranına ve 20- 24°C ortam sıcaklığına uygun havalandırma koşullarına sahip odalarda barındırıldı. Sıçanlara çalışma süresince sınırsız su ve formülasyon uygulmasından bir gece öncesine kadar standart sıçan yemi verildi.

Çalışma tasarımı

Diyabetik olmayan ve diyabetik sıçanlarda*;*

- ✓ Farmakokinetik çalışmalar
- ✓ Farmakodinamik çalışmalar gerçekleştirildi.

Deney hayvanlarında diyabet oluşturulması

İn vivo çalışmada diyabetik olmayan sıçan gruplarında 6 sıçan, diyabetik sıçan gruplarında 8 sıçan olmak toplam üzere sekiz deney grubunda 56 hayvan kullanıldı (Çizelge 3.4). Deney hayvanlarında diyabet oluşturmak için streptozotosin (STZ) kullanıldı. Diyabet oluşturulacak STZ dozunun belirlenmesi için ön çalışmalarda 3 hayvana sırasıyla STZ 0.1 M sitrat tamponunda 45-55-60 mg/kg dozda i.p uygulandı ve hayvanların bir hafta boyunca kanlar kuyruk veninden kan alınarak kan glikoz seviyeleri ölçüldü. Kan glikoz seviyeleri 200 mg/dL'den yüksek olan sıçanlar diyabetik kabul edildi ve çalışmalara diyabet oluşturmak için 55 mg/kg STZ dozuyla devam edildi.

Çizelge 3.5. *In vivo* deney tasarımında diyabetik olmayan ve diyabetik hayvan grupları

Deney Grupları	Diyabetik olmayan (n=6)	Diyabetik (n=8)	Uygulama yolu	Doz (µg/kg)
Exendin-4 çözeltisi (Byetta®)	✓	✓	Subkütan	10
Exendin-4 çözelti	✓	✓	Oral	10
Exendin-4 içeren SNEDDS	✓	✓	Oral	10
Exendin-4 ve kimostatin içeren SNEDDS	✓	✓	Oral	10

Deneylere başlamadan önce sıçanlar tartıldı. Exendin-4'ün subkütan formu Byetta®'nın terapötik kullanım dozu gözönünde bulundurularak ve SNEDDS'lerle karşılaştırılabilir plazma profili elde edebilmek amacıyla exendin-4 uygulama dozu olarak 10 µg/kg seçildi. 10 µg/kg dozda exendin-4 uygulamak için herbir hayvan başına verilmesi gereken exendin-4 çözeltisi, exendin-4 içeren SNEDDS, exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS ve Byetta® miktarı hesaplandı. Exendin-4 ve exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS'ler Bölüm 3.2.3'de anlatıldığı şekilde hazırlandı. *In vivo* çalışma tasarımında (Çizelge 3.3.) oral uygulama yapılan diyabetik ve diyabetik olmayan gruplara exendin-4 çözeltisi, exendin-4 içeren SNEDDS, exendin-4 ve kimostatin içeren SNEDDS intragastrik olarak gavaj yardımıyla verildi. Exendin-4 çözeltisinin ticari preparatı Byetta® ise diyabetik ve diyabetik olmayan sıçanlara subkütan olarak uygulandı. Sıçanların kuyrukları ksilol ile temizlendi. Uygulama öncesi (0.dk.), 15., 30., 60., 120., 180. ve 360. dakikalarda 0,2-0,5 mL kan örnekleri önceden heparin eklenmiş tüplere insülin enjektörü ile alındı (Resim 3.6). Kan örneklerinin alımı sırasında kan glikoz düzeyleri glukometre ile ölçüldü.



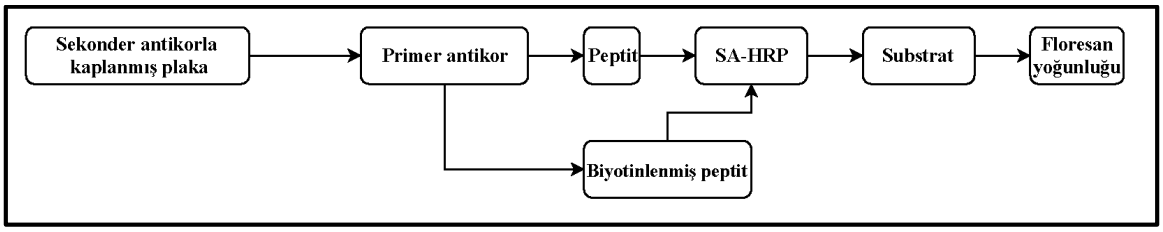
Resim 3.7. Sıçanlardan kan örneklerinin alınması

Deney hayvanlarından alınan kan örnekleri heparin eklenmiş santrifüj tüplerine alınarak 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı ve analize kadar -80 °C derin dondurucuda saklandı. Bu plazmalarda exendin-4 ve insülin seviyeleri ölçüldü. Farmakokinetik parametreler PKSolver programı yardımıyla hesaplandı. Bu program tüm gruplara ait, MRT (mean residence time), k_d (uzaklaşma hız sabiti), $t_{1/2}$ (yarılanma ömrü), AUC (eğri altında kalan alan), C_{maks} (maksimum kan konsantrasyonu) ve t_{maks} (maksimum kan konsantrasyonuna ulaşılan zaman) değerlerini vermektedir. Elde edilen farmakokinetik veriler, farmakodinamik çalışmalarla elde edilen veriler değerlendirildi.

Analiz yöntemi

Örneklerin analizinde ELISA kitleri kullanıldı. Plazma exendin-4 ve plazma insülin seviyelerinin ölçülmesinde sırasıyla florometrik exendin-4 ELISA kiti (FEK-070-94/Phoenix Pharmaceuticals-ABD) ve insülin ELISA kiti (CEA448Ra/Cloud –Clone Corp.-USA) kullanıldı. Exendin-4 ELISA kiti çalışma prensibi aşağıda özetlenmektedir.

Bu kit, yarışmalı bir enzim immünotayin ilkesine dayanan spesifik bir peptitin (exendin-4) ve ilgili peptitlerin konsantrasyonunun ölçülmesi için tasarlanmıştır. Bu kitteki immünoplaka, spesifik olmayan bağlanma yerleri bloke edilmiş ikincil bir antikor ile önceden kaplanmıştır. İkincil antikor, birincil antikorun Fc fragmanına bağlanabilir. Bu birincil antikorun Fab fragmanı, standart peptit çözeltisinde ya da bilinmeyen numunede hem biyotinlenmiş peptit hem de hedef peptit tarafından yarışmalı bir şekilde bağlanacaktır. Biyotinlenmiş peptit, substrat solüsyonunu katalize eden streptavidin-horseradish peroksidazı (SA-HRP) ile etkileşir. Elde edilen floresans yoğunluğu, biyotinlenmiş peptit-SA-HRP kompleksinin miktarı ile doğru orantılıdır, ancak hedeflenen peptitin (standart peptit çözeltisi veya bilinmeyen bir örnekte) miktarı ile ters orantılıdır (Şekil 3.18). Bu, birincil antikorla bağlanmak için biyotinlenmiş peptit ile hedef peptit arasındaki rekabetten kaynaklanmaktadır. Standart bir eğri bilinen çeşitli standart peptit konsantrasyonlarının (x) bir fonksiyonu olarak ölçülen optik dansiteyi (y) çizilerek oluşturulabilir. Numunelerde bilinmeyen peptit konsantrasyonu, bu standart eğriyi temel alan ekstrapolasyon yoluyla belirlenebilir (Avrameas, 1992; Porstmann ve Kiessig, 1992).



Şekil 3.18. Exendin-4 ELISA kitinin (FEK-070-94/Phoenix Pharmaceuticals-ABD) çalışma prensibi

ELISA kitine ait validasyon parametreleri aşağıda verilmiştir.

Duyarlılık: 11,2 pg/mL

Doğrusallık: 11,2 - 273 pg/mL

Tayin limiti: 0-10000 pg/mL

Test içi varyasyon: <%10

Testler arası varyasyon: <%15

ELISA kitinin protokülü aşağıda özetlenmiştir:

Kuyucuk başına 50 µL standart, örnek ya da pozitif kontrol ve 25 µL primer antikor eklendi.

↓

4 °C'de 16-24 saat inkübe edildi.

↓

Herbir kuyucuğa 25 µL biyotinlenmiş peptit eklendi. Oda sıcaklığında (20-23°C) 1,5 saat inkübe edildi.

↓

Herbir kuyucuk başına 350 µL 1x assay tamponu eklenerek immunoplaka 4 kez yıkandı.

↓

Herbir kuyucuk başına 100 µL SA-HRP çözeltisi eklendi. Oda sıcaklığında (20-23 °C) 1 saat inkübe edildi.

↓

Herbir kuyucuk başına 350 µL 1x assay tamponu eklenerek immunoplaka 4 kez yıkandı.

↓

Herbir kuyucuk başına 100 µL substrat solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında (20-23 °C) 1 saat inkübe edildi.

↓

Herbir kuyucuk başına 100 µL 2N HCI eklenerek reaksiyon başlatıldı. İmmunoplaka mikroplaka okuyucuya yerleştirilerek kuyucuklarda floresans yoğunluğu ölçüldü ve gerekli hesaplamalar yapıldı. Hazırlanan standartlardan hareketle hiperbolik eğri çizildi.

İnsülin ELISA kiti (CEA448Ra/Cloud –Clone Corp.-USA) çalışma prensibi aşağıda özetlenmektedir:

Bu kit, sıçan serumu, plazma, doku homojenatları, hücre lizatları, hücre kültürü süpernatantları ve diğer biyolojik sıvılarda *in vitro* kantitatif ölçüm için rekabetçi bir enzim inhibisyon immünotayin tekniğidir. İnsüline özgü bir monoklonal antikor, bir mikroplaka üzerine önceden kaplanmıştır. Biyotin işaretlenmiş insülin ve işaretlenmemiş insülin (standartlar veya örnekler) ve insüline özgü önceden kaplanmış antikor arasında rekabetçi bir inhibisyon reaksiyonu başlatılır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış konjugat yıkanır. Daha sonra, Horseradish Peroksidaza (HRP) konjuge edilmiş avidin, her bir kuyucuğa eklenir ve inkübe edilir. Bağlı HRP konjugatının miktarı, numunedeki insülin konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Substrat çözeltisinin eklenmesinden sonra, oluşan rengin yoğunluğu numunedeki insülin konsantrasyonuyla ters orantılıdır.

İnsülin ELISA kitine ait validasyon parametreleri aşağıda verilmiştir.

Kitin tayin limiti: 123.5-10,000 pg/mL.
Duyarlılık: Tespit edilebilen minimum insülin dozu, tipik olarak 50.2 pg / mL'den azdır.
Spesifiklik: İnsülin tespiti için yüksek hassasiyete ve mükemmel özgüllüğe sahiptir.
Kesinlik:
Test içi varyasyon: <%10
Testler arası varyasyon: <%12
Doğrusallık: Heparin plazma (n=5) için 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 seyreltme oranlarına göre sırasıyla %87-101 %78-92 %78-95 %88-104 bulunmuştur.

ELISA kitinin protokülü aşağıda özetlenmiştir:

Tüm reaktifler, örnekler ve standartlar hazırlandı.

↓

Her kuyuya 50 µL standart veya numune eklendi.

↓

Sonra hemen 50 µL hazırlanan tespit reaktifi A eklendi.

↓

Çalkalandı ve karıştırıldı. 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

↓

Kuyucuklardaki sıvı aspire edildi ve 3 kez kuyucuklar yıkandı.

↓

100µL hazırlanmış tespit reaktifi B eklendi ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.

↓

Kuyucuklardaki sıvı aspire edilir ve 5 kez kuyucuklar yıkandı.

↓

90µL substrat solüsyonu eklenir ve 37 °C'de 10-20 dakika inkübe edildi.

↓

50µL durdurma solüsyonu eklendi. İmmünoplaka 450 nm'de okundu.

↓

Bilinen standart insülin konsantrasyonlarının logaritmasına (y) karşı ölçülen optik dansitenin (x) grafiği çizilerek standart eğri oluşturuldu. Sonuçlardan hareketle yapılan % bağıl biyoyararlanım (% BBY) hesaplarında kullanılan eşitlik aşağıdaki "Eş. 3.2" de gösterildi.

$$\% \text{ BBY} = \frac{\text{AUC oral}}{\text{AUC sc}} \text{x} \frac{\text{Doz sc}}{\text{Doz oral}} \qquad (3.2)$$

3.2.13. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi

Sonuçlar; IBM® SPSS Statistics® V21 programı kullanılarak stabilite çalışmaları ve *in vivo* sonuçları için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile *in vitro* lipoliz çalışmaları için student

t-test ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Çizelgelerde ve grafiklerde sonuçlar ortalama (ort.), standart sapma (ss), %95 olasılıklı güven sınırı ($t_{0.05}$) şeklinde gösterildi.

4. BULGULAR

4.1. Önformülasyon Çalışmaları

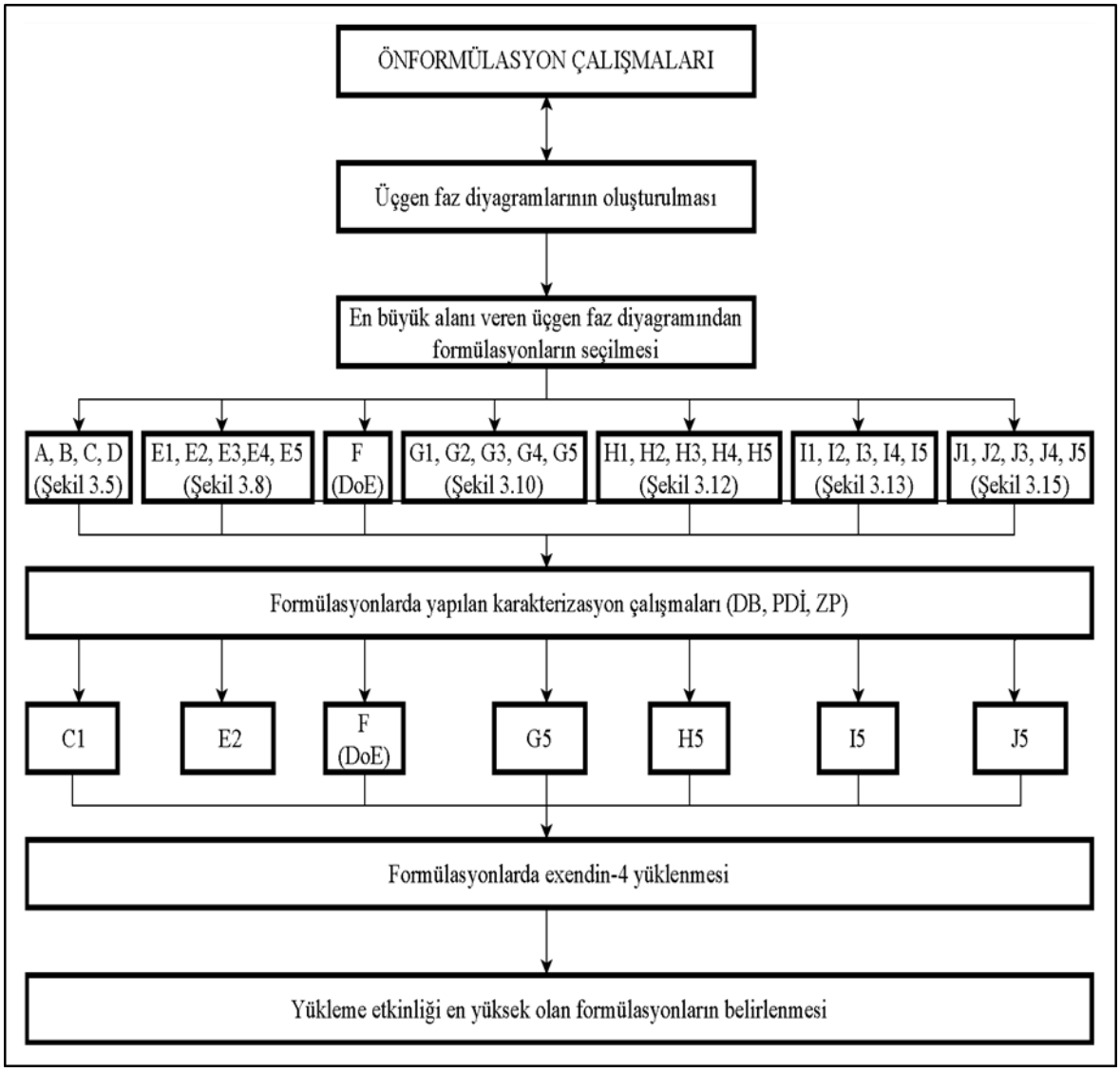
Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı üzere en uygun SNEDDS formülasyonlarına ulaşmak için öncelikle önformülasyon çalışmalarına ağırlık verildi. Uygun yardımcı maddelerin oranlarının belirlenmesinde üçgen faz diyagramlarından yararlanıldı. Önformülasyon çalışmaları kapsamında 55 adet üçgen faz diyagramı çizildi. Yağ fazı/yüzey etkin madde/ yardımcı çözücü içeren formülasyonlar ve bu formülasyonlara bidistile su eklendikten sonra oluşan berrak ve bulanık görünümdeki formülasyonlar Resim 4.1'de gösterilmiştir.



a) b)

Resim 4.1. (a) Yağ fazı/yüzey etkin madde/yardımcı çözücü içeren formülasyonlar (b) Formülasyonlara bidistile su eklendikten sonra oluşan berrak ve bulanık görünümdeki formülasyonlar

Önformülasyon çalışmalarına ait elde edilen sonuçların daha iyi anlaşılabilmesi için sistematik olarak yürütülen çalışmalar Şekil 4.1'de gösterilmiştir. En büyük berrak alanı veren üçgen faz diyagramlarından seçilen A, B, C, D, E1, E2, E3, E4, E5, F, G1, G2, G3, G4, G5, H1, H2, H3, H4, H5, I1, I2, I3, I4, I5, J1, J2, J3, J4, J5 formülasyonlarının yardımcı bileşenleri ve oranları sonuçların daha iyi anlaşılması için tekrardan Çizelge 4.1'de verilmiştir. Bu formülasyonlar için karakterizasyon çalışmaları yapıldı.



Şekil 4.1. Önformülasyon çalışmalarının akış şeması

Çizelge 4.1. Önformülasyon çalışmalarında üçgen faz diyagramından seçilen formülasyonlar ve oranları

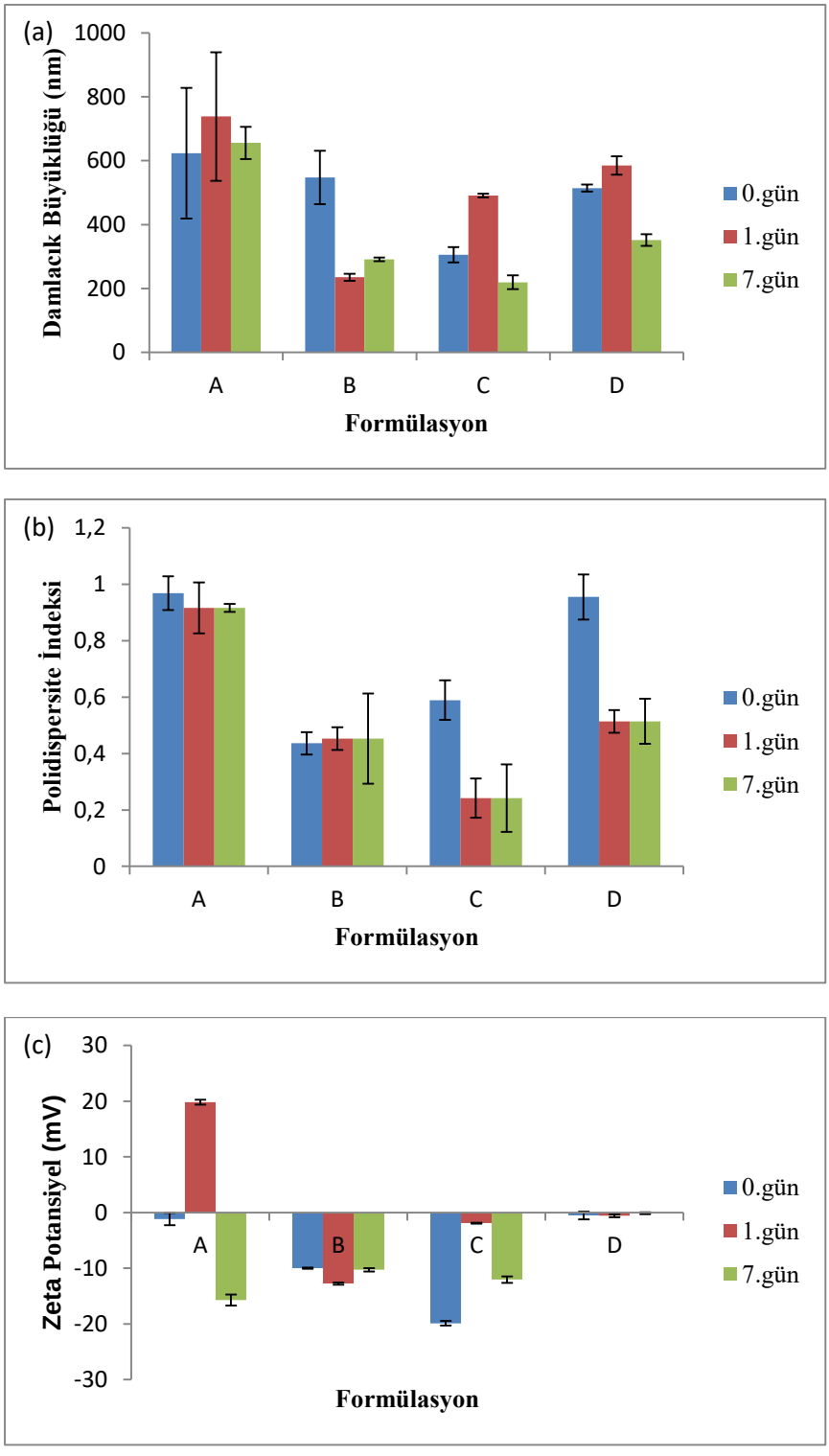
	Yardımcı Bileşenler				
Formülasyon	% Maisine	% Labrasol®	% Propilen glikol		
A	30,00	45,00	15,00		
B	25,00	60,00	15,00		
C	20,00	64,00	16,00		
C1	18,00	65,60	16,40		
C2	28,00	57,60	14,40		
D	15,00	68,00	17,00		
	% Etil oleat	% Cremophor EL®	% Absolü etanol		
F (DoE)	16,67	62,50	20,83		
E1	35,00	48,75	16,25		
E2	30,00	52,50	17,50		
E3	25,00	56,25	18,75		
E4	20,00	60,00	20,00		
E5	15,00	63,75	21,25		
	% Etil oleat	% Cremophor EL®	% Labrasol®	% Absolü etanol	
G1	35,00	16,25	32,5	16,25	
G2	30,00	17,50	35,0	17,50	
G3	25,00	18,75	37,5	18,75	
G4	20,00	20,00	40,0	20,00	
G5	15,00	21,25	42,5	21,25	
	% Etil oleat	% Cremophor EL®	% Labrasol®	% Propilen glikol	
H1	35,00	32,50	16,25	16,25	
H2	30,00	35,00	17,50	17,50	
H3	25,00	37,50	18,75	18,75	
H4	20,00	40,00	20,00	20,00	
H5	15,00	42,50	21,25	21,25	
I1	35,00	36,56	12,19	16,25	
I2	30,00	39,37	13,13	17,50	
I3	25,00	42,19	14,06	18,75	
I4	20,00	45,00	15,00	20,00	
I5	15,00	47,81	15,94	21,25	
	% Etil oleat	% Cremophor EL®	% Labrasol®	% Propilen glikol	% Absolü etanol
J1	35,00	32,50	16,25	12,19	4,06
J2	30,00	35,00	17,50	13,13	4,37
J3	25,00	37,50	18,75	14,06	4,69
J4	20,00	40,00	20,00	15,00	5,00
J5	15,00	42,50	21,25	15,94	5,31

1:50 oranında bidistile su ile seyreltilen *A, B, C, D* formülasyonlarının emülsifikasyon zamanları Çizelge 4.2'de görüldüğü üzere *A* ve *B* formülasyonlarının Grade C ve Grade D olmasından dolayı *A* ve *B* formülasyonlarıyla devam edilmedi. Bundan sonraki çalışmalarda *C* ve *D* formülasyonları esas alındı.

Formülasyonların DB, PDİ ve ZP ölçümleri Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. En uygun formülasyonun seçimi için önformülasyon çalışmaları damlacık büyüklükleri dikkate alınarak sistematik bir şekilde yürütüldü. Çizelge 4.2'de görüldüğü üzere kısa süreli yapılan stabilite çalışmasında ***C*** formülasyonunun DB'si, en küçük 500 nm'nin altında bulunduğu için çalışmaya ***C*** formülasyonuyla devam edildi. Ayrıca 0.,1 ve 7. günlerde ölçümler arasındaki değişikliklerin daha iyi anlaşılması için sütun grafiklerinde de Şekil 4.2'de de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. A, B, C, D formülasyonları için damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve emülsifikasyon zamanı sonuçları (n=3)

FORMÜLASYON	0. GÜN	1. GÜN	7 GÜN
	DAMLACIK BÜYÜKLÜĞÜ (nm) ±SS		
A	623,70 ± 204,90	738,60 ± 201,2	655,90 ± 50,60
B	547,90 ± 83,50	235,00 ± 11,00	291,20 ± 5,70
C	305,50 ± 24,10	490,80 ± 6,10	219,20 ± 21,30
D	514,20 ± 11,10	585,10 ± 29,20	351,40 ± 18,30
	POLİDİSPERSİTE İNDEKSİ ± SS		
A	0,97 ± 0,06	0,92 ± 0,09	0,79 ± 0,01
B	0,44 ± 0,04	0,45 ± 0,04	0,82 ± 0,16
C	0,59 ± 0,07	0,24 ± 0,07	0,50 ± 0,12
D	0,96 ± 0,08	0,51 ± 0,04	0,61 ±0,08
	ZETA POTANSİYEL (mV) ± SS		
A	-1,20 ± 1,10	19,83 ± 0,45	-15,73 ± 0,99
B	-9,99 ± 0,09	-12,77 ± 0,21	-10,29 ± 0,31
C	-19,90 ± 0,40	-1,92 ± 0,09	-12,06 ± 0,59
D	-0,54 ± 0,69	-0,59 ± 0,25	-0,14 ± 0,17
	EMÜLSİFİKASYON ZAMANI		
A	2 dkdan uzun/yağımsı görünüm (Grade D)		
B	2 dk/süt görünümü (Grade C)		
C	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)		
D	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)		



Şekil 4.2. A, B, C, D formülasyonları için a) damlacık büyüklüğü b) polidispersite indeksi c) zeta potansiyel sonuçları (n=3)

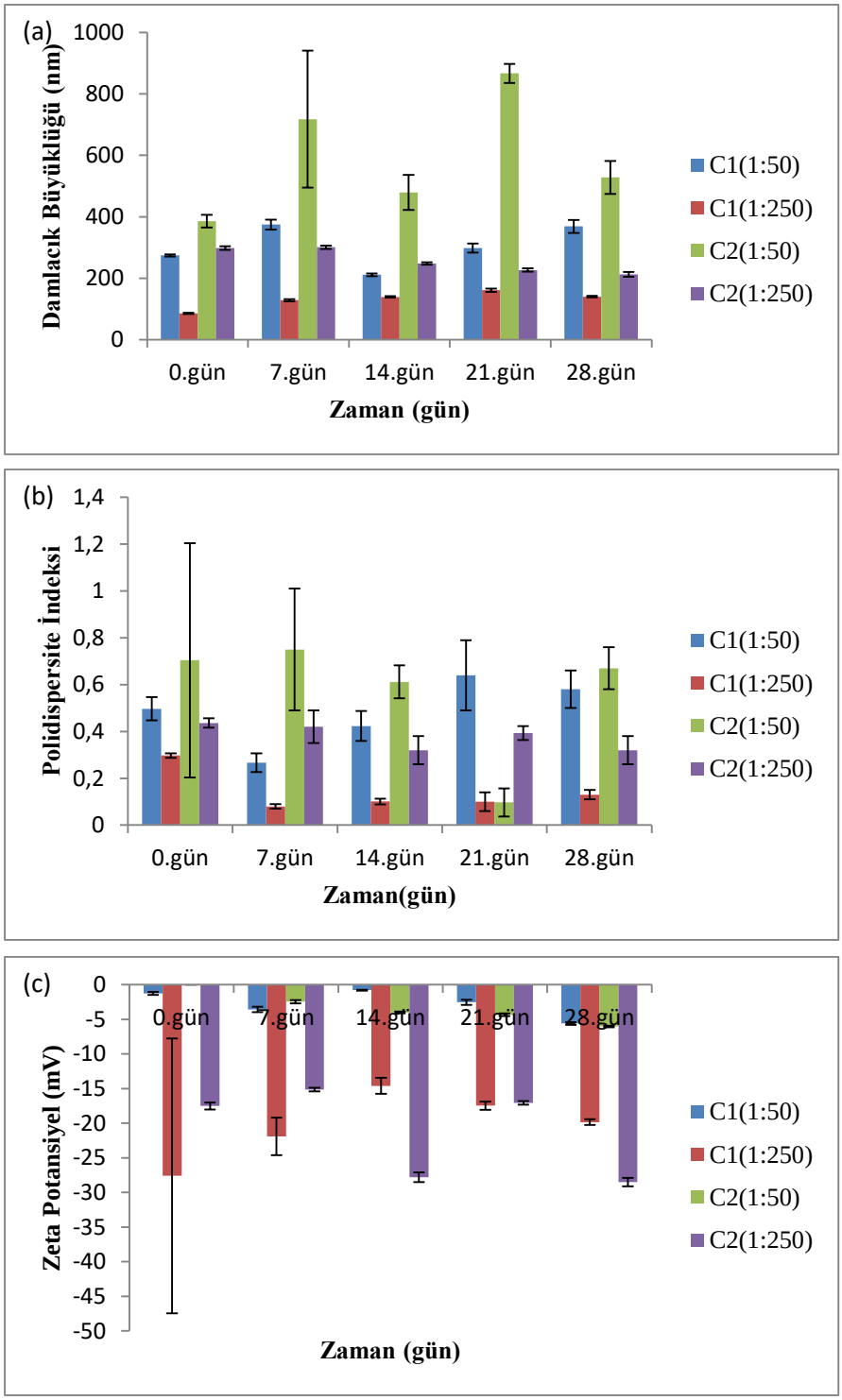
C formülasyonu emülsifikasyon zamanı, damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel parametreler bakımından incelendiğinde ***A***, ***B*** ve ***D*** formülasyonlarına göre en uygun olduğuna karar verildi. Üçgen faz diyagramında (Şekil 3.5) C noktası etrafından

seçilen bu ***C1*** ve ***C2*** formülasyonları (Çizelge 4.1) emülsifikasyon zamanı, damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel açısından değerlendirildi.

C1 ve ***C2*** formülasyonlarına bidistile su ile seyreltme oranının etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Formülasyonlar 1:50 (USP30 NF 25) ve 1:250 (1 g formülasyonunun bir bardak su ile alınması, FDA) oranlarında bidistile su ile seyreltildikten sonra damlacık büyüklükleri, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ve emülsifikasyon zamanı Çizelge 4.3'de verilmiştir. Ayrıca 0.,7., 14., 21. ve 28. günlerde ölçümlerdeki değişikliklerin daha iyi anlaşılması için sütun grafiklerinde Şekil 4.3'de de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. C1 (1:50), C1 (1:250), C2 (1:50), C2 (1:250) formülasyonlarının emülsifikasyon zamanları damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve emülsifikasyon zamanı sonuçları (n=3)

FORMÜLASYON	0. GÜN	7. GÜN	14. GÜN	21. GÜN	28.GÜN
	DAMLACIK BÜYÜKLÜĞÜ (nm) ±SS				
C1 (1:50)	274,00 ± 3,08	374,60 ± 16,10	211,00 ± 0,14	298,30 ± 14,60	368,67 ± 20,98
C1 (1:250)	85,44 ± 1,95	128,60 ± 3,40	139,00 ± 2,10	160,80± 5,45	139,97 ± 2,44
C2 (1:50)	385,86 ± 21,78	718,00 ± 223,00	479,00 ± 57,00	867,13± 31,90	528,13 ± 53,33
C2 (1:250)	298,17 ± 5,99	300,70 ± 5,30	247,90 ± 3,89	226,5 0 ± 5,82	212,30 ± 7,99
	POLİDİSPERSİTE İNDEKSİ ± SS				
C1 (1:50)	0,49 ± 0,05	0,27 ± 0,04	0,42 ± 0,06	0,64 ± 0,15	0,58 ± 0,08
C1 (1:250)	0,29 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,04	0,13 ± 0,02
C2 (1:50)	0,70 ± 0,05	0,75 ± 0,26	0,61 ± 0,07	0,09 ± 0,06	0,67 ± 0,09
C2 (1:250)	0,44 ± 0,02	0,42 ± 0,07	0,32 ± 0,06	0,39 ± 0,03	0,32 ± 0,06
	ZETA POTANSİYEL (mV) ± SS				
C1 (1:50)	-1,25 ± 0,21	-3,58 ± 0,39	-0,78 ± 0,06	-2,53 ± 0,36	-5,58 ± 0,19
C1 (1:250)	-27,60 ± 2,70	-21,90 ± 1,15	-14,60 ± 0,60	-17,47 ± 0,41	-19,83 ± 0,74
C2 (1:50)	0,11 ± 0,11	-2,44 ± 0,24	-3,98 ± 0,13	-4,33 ± 0,19	-6,02 ± 0,12
C2 (1:250)	-17,50 ± 0,50	-15,13 ± 0,25	-27,80 ± 0,70	-17,06 ± 0,25	-28,50 ± 0,60
	EMÜLSİFİKASYON ZAMANI				
C1 (1:50)	2 dkdan uzun/yağımsı görünüm (Grade D)				
C1 (1:250)	2 dk/süt görünümü (Grade C)				
C2 (1:50)	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)				
C2 (1:250)	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)				



Şekil 4.3. C1 ve C2 formülasyonlarının 1:50 ve 1:250 oranlarında (a) damlacık büyüklüğü (b) polidispersite indeksi (c) zeta potansiyel sonuçları (n=3)

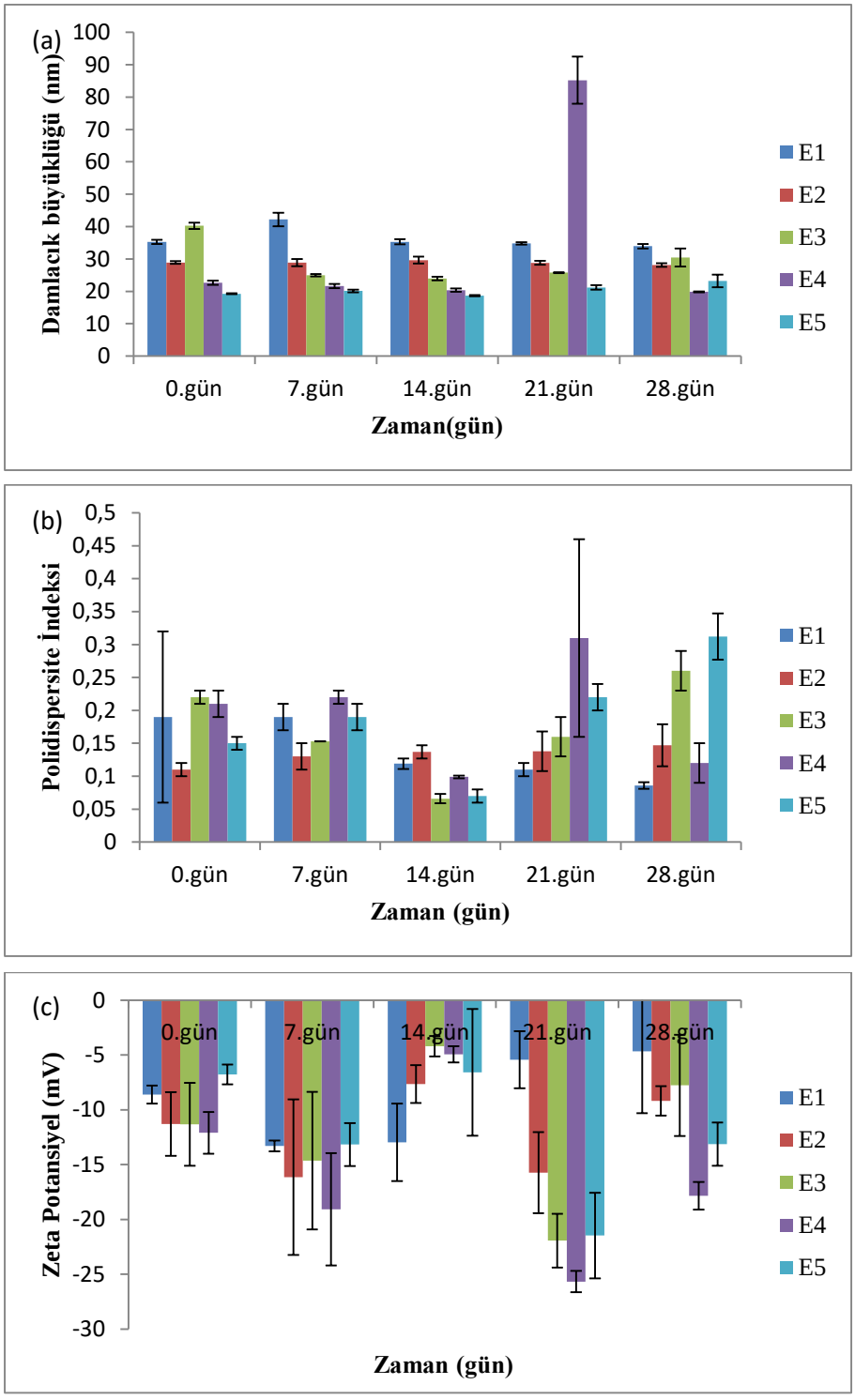
Bu sonuçlara gore %18 Maisine®, %65,60 Labrasol®, %16,40 propilen glikol içeren ***C1*** formülasyonu seçildi.

Bir diğer formülasyon için; Maisine® yağ fazı, Cremophor EL® yüzey etkin madde ve propilen glikol yardımcı çözücü olarak kullanılmış ancak çizilen üçgen faz diyagramlarında berrak alanların oldukça küçük olması ve Maisine®'nin Cremophor EL® ile stabil bir emülsiyon oluşturmaması nedeniyle bu formülasyonlardan vazgeçildi.

Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı gibi etil oleat yağ fazı, Cremophor EL® yüzey etkin madde ve absolü etanol yardımcı çözücü olarak kullanıldı ve Cremophor EL®: absolü etanol 3:1 içeren formülasyonlarla devam edilerek çizilen üçgen faz diyagramı (Şekil 3.8) en büyük berrak alanı verdi. Cremophor EL®: absolü etanol 3:1 oranında çizilen üçgen faz diyagramından seçilen ***E1***, ***E2***, ***E3***, ***E4*** ve ***E5*** formülasyonların 1:50 oranında bidistile su ile seyreltilmesi sonucu emülsifikasyon zamanı, damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli Çizelge 4.4'te verilmiştir. Ayrıca 0., 7., 14., 21. ve 28. günlerde ölçümler arası değişikliklerin daha iyi anlaşılması için sütun grafiklerinde Şekil 4.4'te de gösterilmektedir.

Çizelge 4.4. E1, E2, E3, E4 ve E5 formülasyonlarının emülsifikasyon zamanları damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve emülsifikasyon zamanı sonuçları (n=3)

FORMÜLASYON	0. GÜN	7. GÜN	14. GÜN	21. GÜN	28. GÜN
	DAMLACIK BÜYÜKLÜĞÜ (nm) ±SS				
E1	35,30 ± 0,64	42,20 ± 2,10	35,31 ± 0,81	34,81± 0,36	33,93 ± 0,69
E2	28,89 ± 0,44	28,90 ± 1,10	29,64 ± 1,05	28,8 ± 0,68	28,10 ± 0,53
E3	40,27 ± 0,98	24,99 ± 0,39	23,9 ± 0,54	25,77± 0,12	30,44 ± 2,78
E4	22,6 ± 0,69	21,65 ± 0,65	20,34 ± 0,51	85,2 ± 7,30	19,85 ± 0,13
E5	19,24 ± 0,15	20,10 ± 0,40	18,66 ± 0,16	21,20± 0,70	23,22 ± 1,97
	POLİDİSPERSİTE İNDEKSİ ± SS				
E1	0,19 ± 0,13	0,19 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01
E2	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,03	0,15 ± 0,03
E3	0,22 ± 0,01	0,15 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,26 ± 0,03
E4	0,21 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,31 ± 0,15	0,12 ± 0,03
E5	0,15 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,32 ± 0,04
	ZETA POTANSİYEL (mV) ± SS				
E1	-8,61 ± 0,82	-13,30 ± 0,50	-12,96 ± 3,53	-5,43 ± 2,61	-4,66 ± 5,63
E2	-11,30 ± 2,90	-16,14 ± 7,17	-7,65 ± 1,73	-15,73 ± 3,69	-9,18 ± 1,34
E3	-11,32 ± 3,79	-14,63 ± 6,28	-4,21 ± 0,93	-21,93 ± 2,46	-7,77 ± 4,62
E4	-12,10 ± 1,90	-19,07 ± 5,12	-4,95 ± 0,74	-25,67 ± 0,97	-17,83 ± 1,26
E5	-6,77 ± 0,90	-13,17 ± 1,96	-6,58 ± 5,78	-21,47 ± 3,91	-13,13 ± 1,98
	EMÜLSİFİKASYON ZAMANI				
E1	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)				
E2	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)				
E3	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)				
E4	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)				
E5	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)				



Şekil 4.4. E1, E2, E3, E4 ve E5 formülasyonlarının (a) damlacık büyüklüğü (b) polidispersite indeksi (c) zeta potansiyel sonuçları (n=3)

Etil oleat (yağ fazı), Cremophor EL® (yüzey etkin madde), absolü etanol (yardımcı çözücü) olarak kullanılan bu formülasyonlar için DB 20-100 nm, PDİ 0,1-0,2 ve ZP -4 ile -20 mV aralığında bulundu. Bu sonuçlara göre PDİ'nin 0,2'nin altında olması damlacıkların monodispers olduğunu gösterdi. ZP'nin düşük olmasının kullanılan yardımcı maddelerin

non iyonik olmasından kaynaklandığı ve kendiliğinden emülsifiye olan sistemlerin değerlendirilmesinde ZP'nin kritik bir parametre olmadığı düşünülmektedir. Sonuçlar istatiksel olarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırılmıştır. ***E2*** formülasyonu için 1 ay boyunca yapılan ölçümlerde DB ve PDİ sonuçları arasında anlamlı bir fark gözlenmediği bulundu ($p>0.05$). ***E2*** formülasyonunun bu formülasyonlar arasında en uygun formülasyon olduğu sonucuna varıldı.

Deney tasarımı (DoE)

Deney tasarımı (DoE) ile formülasyonların optimizasyonunda yardımcı madde olarak etil oleat miktarı (A) Cremophor EL®: absolü etanol (3:1) karışımı miktarı (B) kullanılarak hazırlanan ve Design Expert® Version 9.0.6 tarafından 3^2 Faktöriyel D-optimal deney tasarımı sonucunda yapılan 18 deneyin DB, PDİ, ZP sonuçları Çizelge 4.5'te, ANOVA sonuçları ise Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.5. 3^2 Faktöriyel D-optimal deney tasarımı sonucunda yapılan 18 deneyin sonuçları

3^2 Faktöriyel D-optimal Tasarım					
Bağımsız Değişkenler			Bağımlı Değişkenler		
Formülasyon	A (g)	B (g)	DB (nm) ± SS	PDİ ± SS	ZP (mV) ± SS
1	1,5	1,5	92,54±1,69	0,16±0,02	-3,14±0,38
2	0,5	2,5	20,79±0,04	0,09±0,01	-8,74±7,26
3	1	2,5	26,93±0,21	0,09±0,01	-3,48±6.61
4	1,5	2	55,84±0,42	0,21±0,02	-6,96±1,72
5	1	2	33,52±0,07	0,12±0,01	0,03±0,98
6	0,5	1,5	26,12±1,88	0,09±0,01	-1,83±0,66
7	1	1,5	48,66±0,32	0,18±0,02	-2,48±1,58
8	0,5	2	22,35±0,18	0,07±0,01	-7,41±0,63
9	1,5	2,5	49,99±0,39	0,23±0,01	-3,11±0,45
10	0,5	1,5	25,38±0,23	0,07±0,02	-2,11±2.77
11	1	1,5	57,62±0,27	0,22±0,02	-5,12±1,16
12	1,5	1,5	98,62±0,83	0,22±0,01	-4,08±0,19
13	0,5	2	22,27±0,26	0,14±0,01	-2,86±0,23
14	1	2	33,64±0,25	0,10±0,05	-2,14±2,77
15	1,5	2	57,83±0,36	0,18±0,01	-5,20±1,66
16	0,5	2,5	18,86±0,84	0,08±0,01	-18,80±8,3
17	1	2,5	29,39±0,19	0,11±0,01	-11,17±15,71
18	1,5	2,5	44,09±0,15	0,16±0,01	-4,02±2,97

Çizelge 4.6. Design Expert® Version 9.0.6 tarafından üretilen model denklemler için ANOVA sonuçları

	DB		PDİ		ZP	
Kaynak	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value
Model	69.51	< 0.0001	13.83	0.0004	4.93	0.0153
A- Yağ	137.00	< 0.0001	25.03	0.0002	1.71	0.2125
B-YEM/YYEM Karışımı	49.96	< 0.0001	2.62	0.1263	6.87	0.0201
AB	21.57	0.0004	-	-	6.20	0.0260

DB için Design Expert® Version 9.0.6 tarafından verilen model denklemi aşağıda verilmiştir.

DB= +42.47+21.93*A-13.24*B-10,65*AB

DB hem yağ (A) hem de yüzey etkin madde ve yardımcı çözücü karışımı (B) miktarından etkilenmiştir. Denkleme göre DB'yi küçültmek için yağ miktarı düşük, yüzey etkin madde ve yardımcı çözücü karışımı yüksek oranda kullanılmalıdır.

PDİ için Design Expert® Version 9.0.6 tarafından model denklemi aşağıda verilmiştir.

PDİ = +0,14+0,051*A-0.017*B

Yağ miktarı (A) ve yüzey etkin madde ve yardımcı çözücü karışımı (B) etkileşimleri anlamsız ($p>0.05$) bulundu. PDİ'nin küçük olması için yağ miktarı (A) düşük tutulmasının uygun olacağına karar verildi.

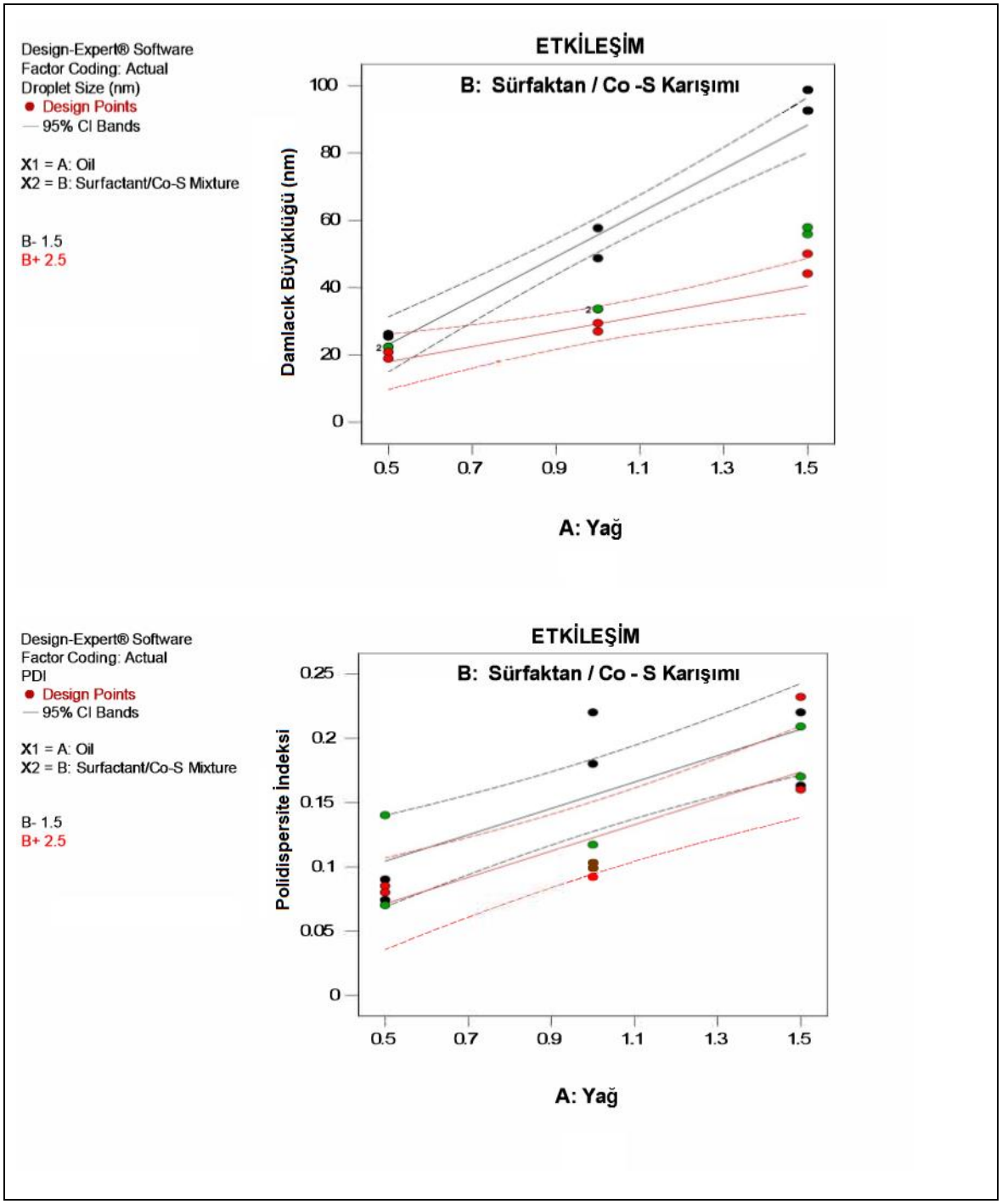
ZP için Design Expert® Version 9.0.6 tarafından verilen model denklemi aşağıda verilmiştir.

ZP= -5,14+1,27*A-2,55*B+2,96*AB

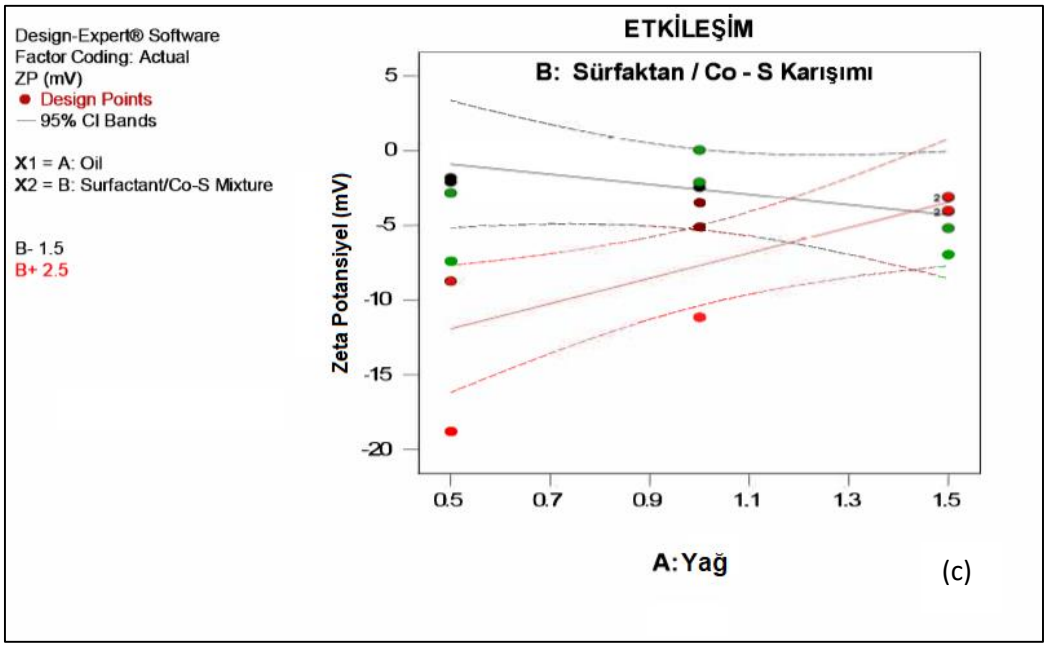
ZP hem yağ (A) hem de yüzey etkin madde ve yardımcı çözücü karışımı (B) miktarından etkilendi. Denkleme göre ZP'yi -30 mV değerine yaklaştırmak için yağ miktarı düşük, yüzey etkin madde ve yardımcı çözücü karışımı yüksek oranda kullanılmasına karar verildi.

DB, PDİ ve ZP için etkileşim grafikleri Şekil 4.5'te, yüzey-cevap grafikleri ise Şekil 4.6'da verilmiştir.

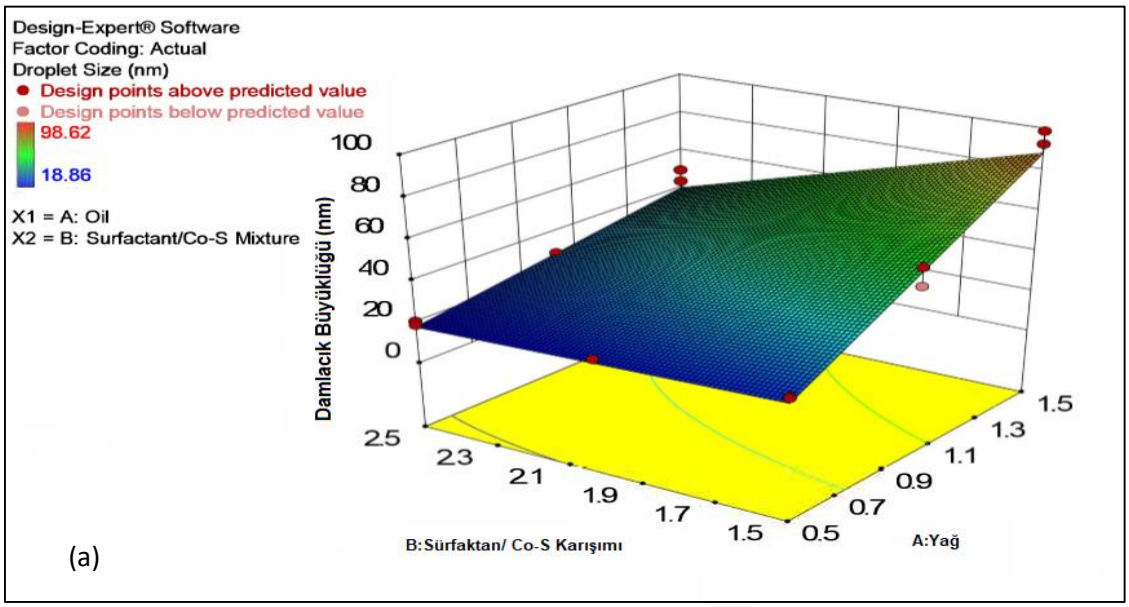
Optimizasyon sonuçları ve grafikler yorumlandığında DoE tarafından oluşturulmuş en uygun formülasyonda (F) yağ oranı %16,67, yüzey etkin madde-yardımcı yüzey etkin madde karışımı %83,33 kullanıldığında istenilen DB 20,42±0,09 nm, PDİ 0,08±0,01, ve ZP -12,5±7,8 mV bulundu.



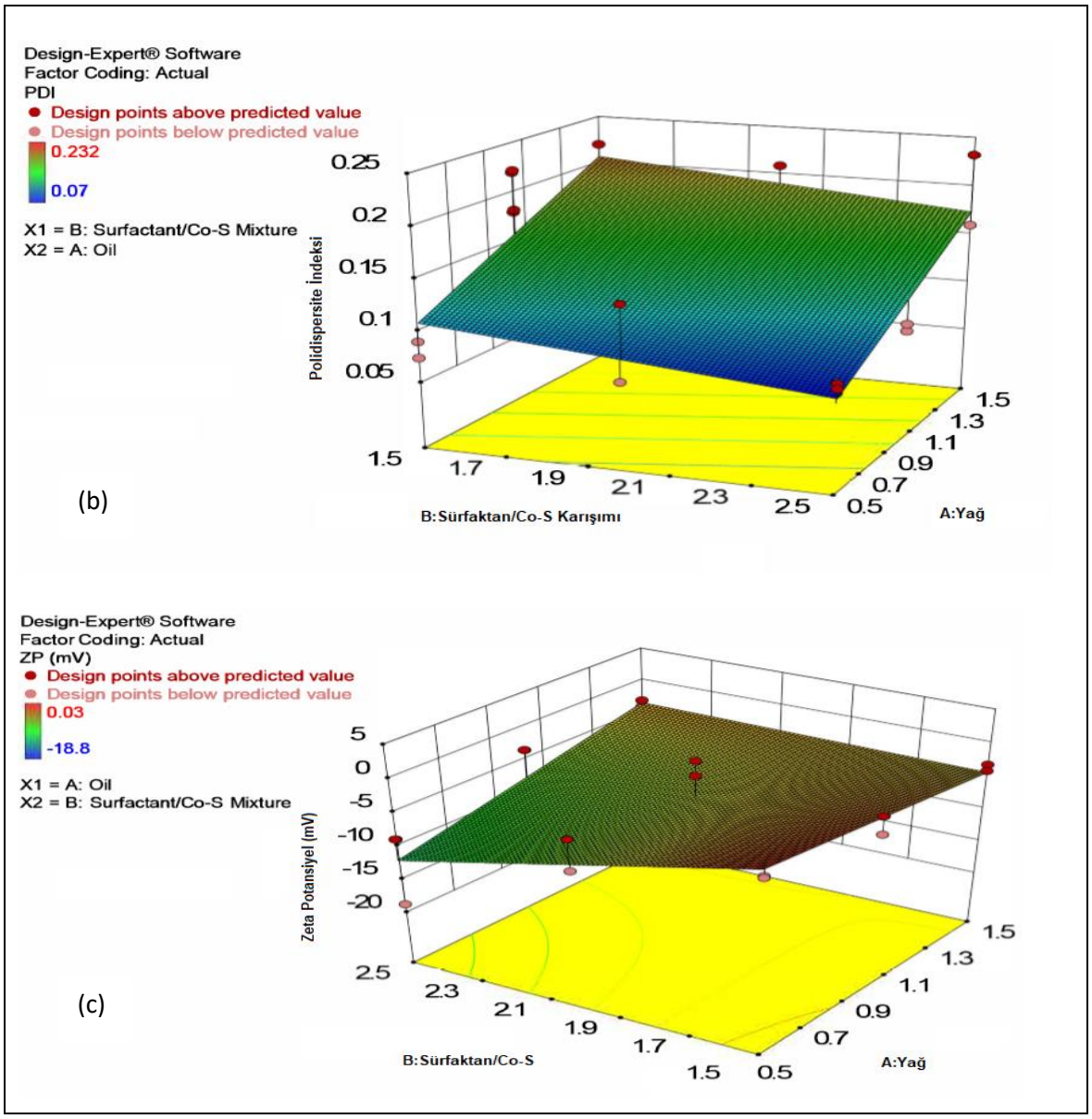
Şekil 4.5. (a) Damlacık büyüklüğü etkileşim grafikleri, (b) Polidispersite indeksi etkileşim grafikleri, (c) Zeta potansiyel etkileşim grafikleri



Şekil 4.5. (devam) (a) Damlacık büyüklüğü etkileşim grafikleri, (b) Polidispersite indeksi etkileşim grafikleri, (c) Zeta potansiyel etkileşim grafikleri



Şekil 4.6. (a) Damlacık büyüklüğü yüzey-cevap grafikleri, (b) Polidispersite indeksi yüzey-cevap grafikleri, (c) Zeta potansiyel yüzey-cevap grafikleri

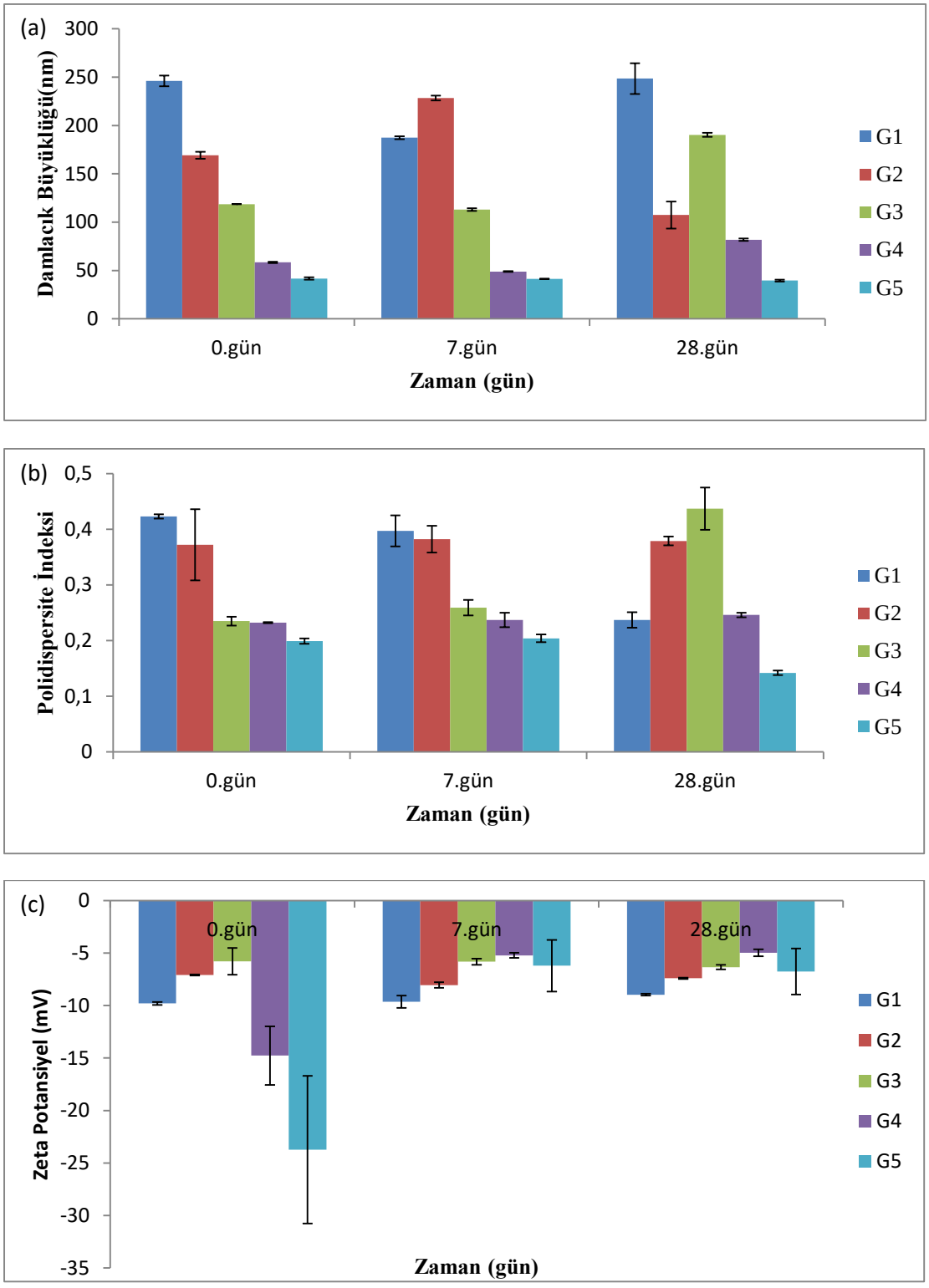


Şekil 4.6. (devam) (a) Damlacık büyüklüğü yüzey-cevap grafikleri, (b) Polidispersite indeksi yüzey-cevap grafikleri, (c) Zeta potansiyel yüzey-cevap grafikleri

Yağ fazı olarak etil oleat, yüzey etkin madde olarak Cremophor EL® ve Labrasol® karışımı, yardımcı çözücü olarak absolü etanol içeren formülasyonlarla çizilen üçgen faz diyagramlarında Cremophor EL®/Labrasol® (yüzey etkin madde) ve absolü etanol (yardımcı çözücü) için 3:1 oranı kullanıldı. En büyük alanı veren Cremophor EL®/Labrasol® (1:2) içeren üçgen faz diyagramından (Şekil 3.10) seçilen ***G1***, ***G2***, ***G3***, ***G4*** ve ***G5*** formülasyonlarının 1:50 oranında bidistile su ile seyreltilmesi sonucu emülsifikasyon zamanı, DB, PDİ ve ZP'leri Çizelge 4.7'de verilmiştir. Ayrıca 0., 7., ve 28. günlerde ölçümler arası değişikliklerin daha iyi anlaşılması nedeniyle sütun grafiklerinde Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. G1, G2, G3, G4 ve G5 formülasyonlarının emülsifikasyon zamanları damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve emülsifikasyon zamanı sonuçları (n=3)

FORMÜLASYON	0. GÜN	7. GÜN	28. GÜN
	DAMLACIK BÜYÜKLÜĞÜ (nm) ±SS		
G1	246,10 ± 5,60	187,43±1,54	248,51±15,94
G2	169,17±3,61	228,50±2,50	1073,48±1397,64
G3	118,67±0,08	113,03±1,41	190,33±2,01
G4	58,43±0,72	48,82±0,42	81,87±1,18
G5	41,72±1,17	41,31±0,23	39,64±0,99
	POLİDİSPERSİTE İNDEKSİ ± SS		
G1	0,42±0,01	0,39±0,03	0,24±0,01
G2	0,37±0,06	0,38±0,02	0,38±0,01
G3	0,24±0,01	0,26±0,01	0,44±0,04
G4	0,23±0,00	0,24±0,01	0,25±0,01
G5	0,19±0,01	0,20±0,01	0,14±0,01
	ZETA POTANSİYEL (mV) ± SS		
G1	-9,79±0,13	-9,64±0,59	-8,97±0,09
G2	-7,09±0,06	-8,05±0,27	-7,39±0,07
G3	-5,79±1,27	-5,82±0,29	-6,34±0,22
G4	-14,77±2,79	-5,21±0,24	-4,97±0,32
G5	-23,73±7,05	-6,20±2,45	-6,76±2,18
	EMÜLSİFİKASYON ZAMANI		
G1	1 dk’dan az/hafif bulanık (Grade B)		
G2	1 dk’dan az/hafif bulanık (Grade B)		
G3	1 dk’dan az/hafif bulanık (Grade B)		
G4	1 dk’dan az/hafif bulanık (Grade B)		
G5	1 dk’dan az/hafif bulanık (Grade B)		



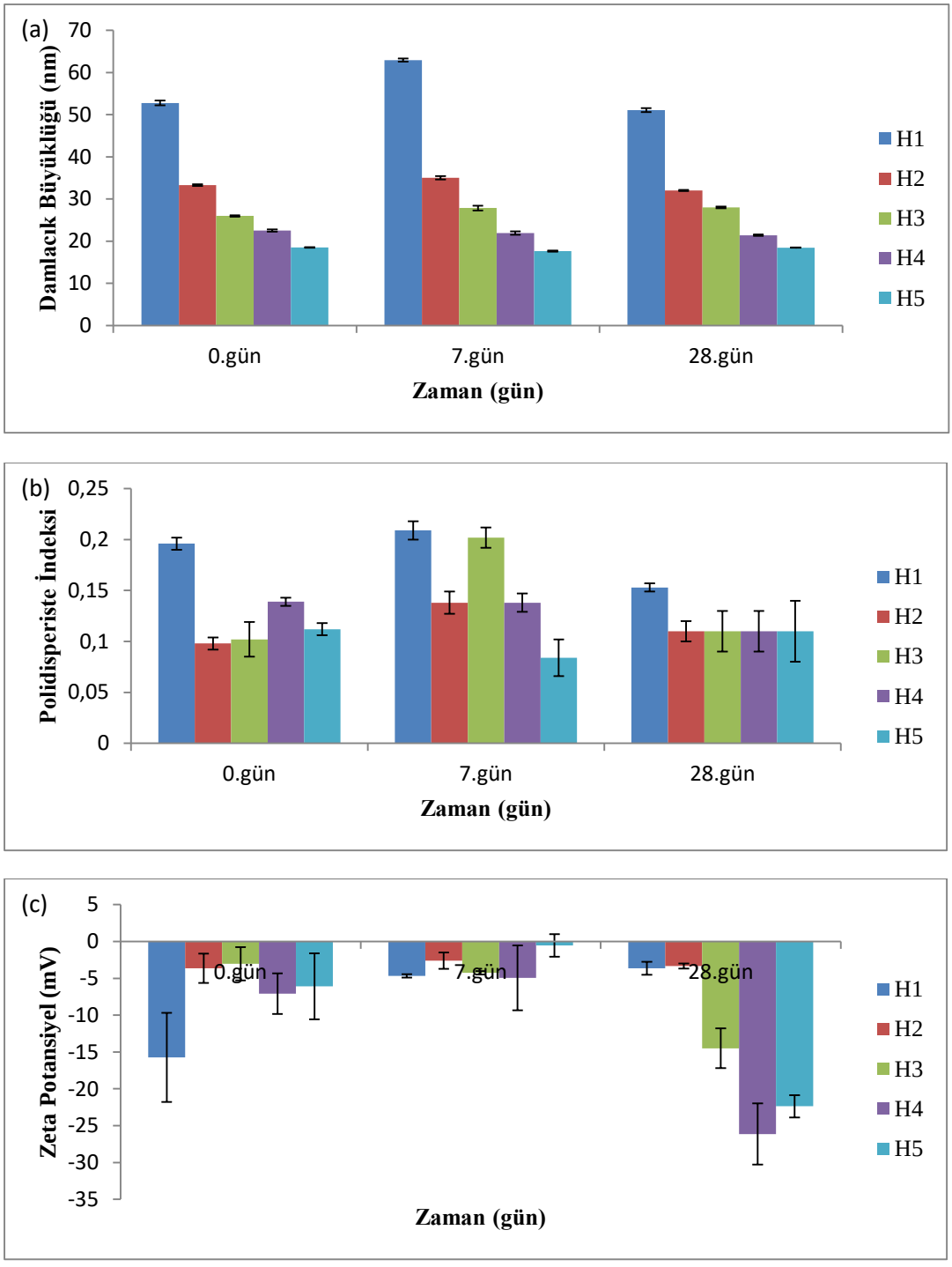
Şekil 4.7. G1, G2, G3, G4 ve G5 formülasyonları için a) damlacık büyüklüğü b) polidispersite indeksi c) zeta potansiyel sonuçları (n=3)

Yağ fazı olarak etil oleat, yüzey etkin madde olarak Cremophor EL® ve Labrasol® karışımı, yardımcı çözücü olarak propilen glikol içeren formülasyonlar hazırlanırken Cremophor EL®/Labrasol® ve propilen glikol için 3:1 oranı kullanıldı. En büyük berrak alanı veren 2:1

(Şekil 3.12) üçgen faz diyagramından formülasyonlar seçildi. Üçgen faz diyagramından Cremophor EL®/Labrasol® karışımını 2:1 oranında içeren ***H1***, ***H2***, ***H3***, ***H4*** ve ***H5*** formülasyonlarının 1:50 oranında bidistile su ile seyreltilmesi sonucu emülsifikasyon zamanı, DB, PDİ ve ZP'leri Çizelge 4.8'de verildi. Ayrıca 0., 7., ve 28. günlerde ölçümler arası değişikliklerin daha iyi anlaşılması için sütun grafiklerinde Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. H1, H2, H3, H4 ve H5 formülasyonlarının emülsifikasyon zamanları damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve emülsifikasyon zamanı sonuçları (n=3)

FORMÜLASYON	1. GÜN	7. GÜN	28. GÜN
	DAMLACIK BÜYÜKLÜĞÜ (nm) ±SS		
H1	52,79±0,56	62,96±0,35	51,07±0,47
H2	33,31±0,21	35,05±0,41	32,04±0,15
H3	25,99±0,16	27,86±0,58	28,01±0,19
H4	22,53±0,26	21,95±0,39	21,42±0,19
H5	18,52±0,08	17,65±0,14	18,47±0,05
	POLİDİSPERSİTE İNDEKSİ ± SS		
H1	0,19±0,01	0,21±0,01	0,15±0,00
H2	0,09±0,01	0,14±0,01	0,11±0,01
H3	0,10±0,02	0,20±0,01	0,11±0,02
H4	0,14±0,01	0,14±0,01	0,11±0,02
H5	0,11±0,01	0,08±0,02	0,11±0,03
	ZETA POTANSİYEL (mV) ± SS		
H1	-15,74±6,06	-4,66±0,23	-3,65±0,89
H2	-3,64±1,99	-2,62±1,11	-3,34±0,35
H3	-3,02±2,26	-4,25±0,21	-14,5±2,7
H4	-7,09±2,75	-4,94±4,40	-26,13±4,14
H5	-6,08±4,48	-0,55±1,53	-22,37±1,52
	EMÜLSİFİKASYON ZAMANI		
H1	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)		
H2	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)		
H3	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)		
H4	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)		
H5	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)		



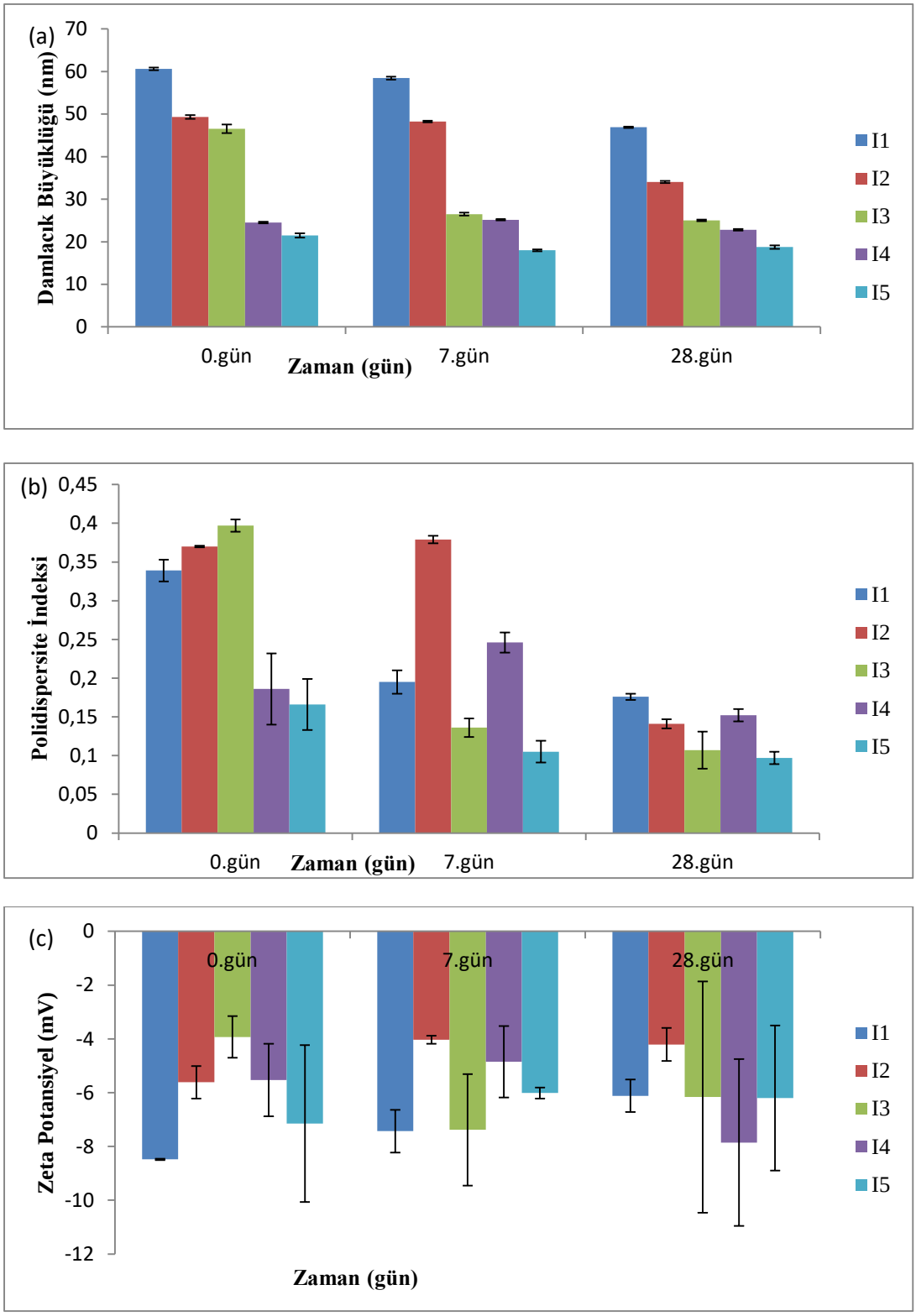
Şekil 4.8. H1, H2, H3, H4 ve H5 formülasyonları için (a) damlacık büyüklüğü (b) polidispersite indeksi (c) zeta potansiyel sonuçları (n=3)

Yağ fazı olarak etil oleat, yüzey etkin madde olarak Cremophor EL® ve Labrasol® karışımı, yardımcı çözücü olarak propilen glikol içeren formülasyonlar hazırlanırken Cremophor EL®/Labrasol® ve propilen glikol için 3:1 oranı kullanıldı. En büyük alanı veren 3:1 üçgen faz diyagramından (Şekil 3.13) formülasyonlar seçildi. Üçgen faz diyagramından Cremophor EL®/Labrasol® karışımını 3:1 oranında içeren ***I1***, ***I2***, ***I3***, ***I4*** ve ***I5*** 1:50 oranında

bidistile su ile seyreltilmesi sonucu emülsifikasyon zamanı, DB, PDİ ve ZP'leri Çizelge 4.9'da verilmiştir. Ayrıca 0., 7., ve 28. günlerde ölçümlerdeki değişikliklerin daha iyi anlaşılması nedeniyle sütun grafiklerinde Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. I1, I2, I3, I4 ve I5 formülasyonlarının emülsifikasyon zamanları damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve emülsifikasyon zamanı sonuçları (n=3)

FORMÜLASYON	1. GÜN	7. GÜN	28. GÜN
	DAMLACIK BÜYÜKLÜĞÜ (nm) ±SS		
I1	60,60±0,30	58,45±0,36	46,89±0,16
I2	49,34±0,44	48,24±0,17	34,03±0,24
I3	46,53±1,01	26,48±0,34	25,02±0,17
I4	24,52±0,18	25,17±0,18	22,80±0,20
I5	21,50±0,50	18,01±0,22	18,74±0,41
	POLİDİSPERSİTE İNDEKSİ ± SS		
I1	0,34±0,01	0,19±0,02	0,18±0,00
I2	0,37±0,00	0,38±0,01	0,14±0,01
I3	0,39±0,01	0,14±0,01	0,11±0,02
I4	0,19±0,05	0,25±0,01	0,15±0,01
I5	0,18±0,03	0,11±0,014	0,09±0,01
	ZETA POTANSİYEL (mV) ± SS		
I1	-8,48±0,03	-7,43±0,79	-6,12±0,60
I2	-5,61±0,60	-4,03±0,15	-4,21±0,61
I3	-3,93±0,77	-7,38±2,07	-6,16±4,30
I4	-5,53±1,35	-4,85±1,33	-7,85±3,11
I5	-7,15±2,92	-6,01±0,21	-6,20±2,70
	EMÜLSİFİKASYON ZAMANI		
I1	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)		
I2	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)		
I3	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)		
I4	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)		
I5	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)		



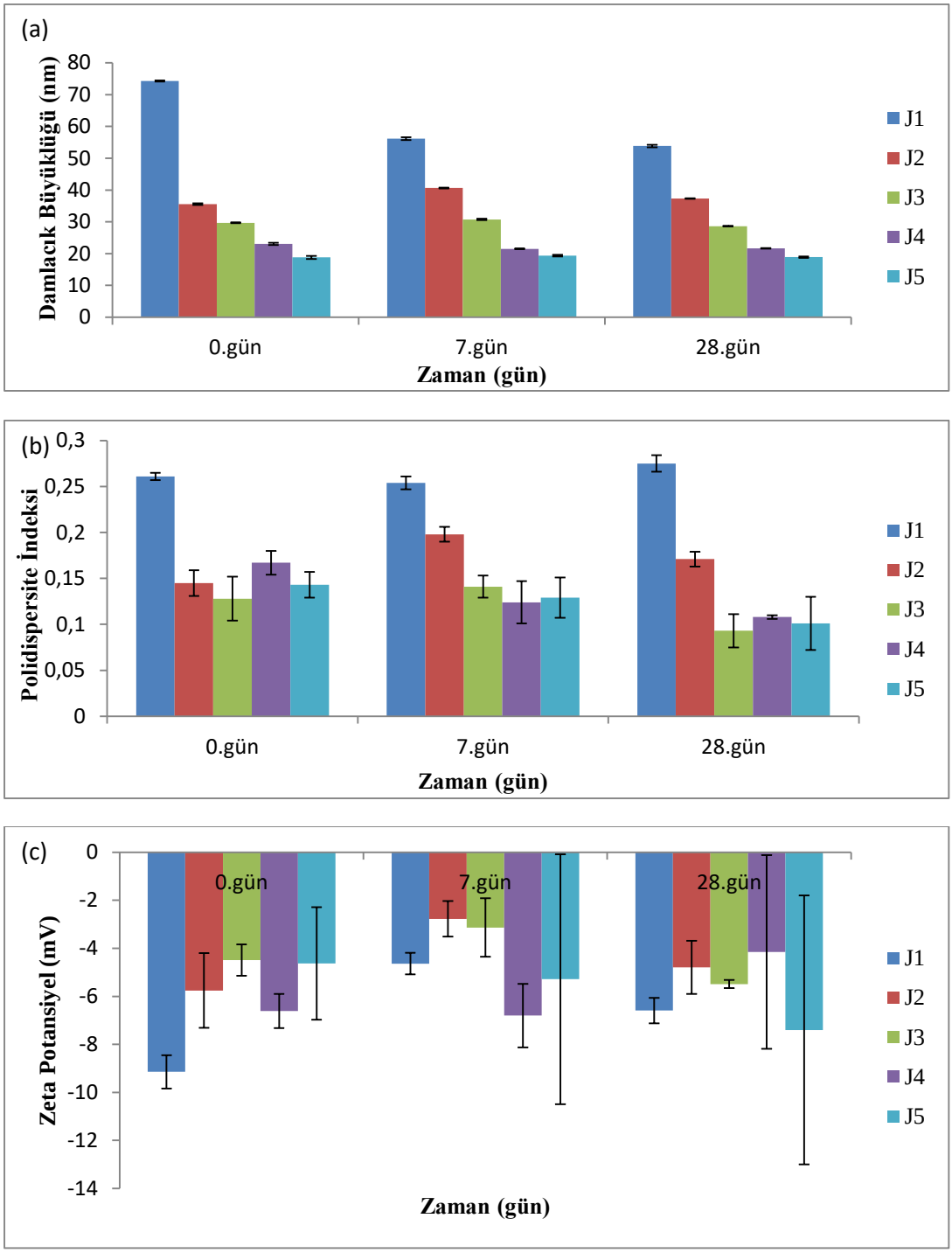
Şekil 4.9. I1, I2, I3, I4 ve I5 formülasyonları için (a) damlacık büyüklüğü (b) polidispersite indeksi (c) zeta potansiyel sonuçları (n=3)

Yağ fazı olarak etil oleat, yüzey etkin madde olarak Cremophor EL® ve Labrasol® karışımı, yardımcı çözücü olarak propilen glikol ve absolü içeren formülasyonlar hazırlanırken

Cremophor EL®/Labrasol® 2:1 ve propilen glikol/absolü etanol için 3:1 oranı kullanıldı. Üçgen faz diyagramından Cremophor seçilen ***J1***, ***J2***, ***J3***, ***J4*** ve ***J5*** formülasyonlarının 1:50 oranında bidistile su ile seyreltilmesi sonucu emülsifikasyon zamanı, DB, PDİ ve ZP'leri Çizelge 4.10'da verildi. Ayrıca 0., 7., ve 28. günlerde ölçümler arasındaki değişikliklerin daha iyi anlaşılması için sütun grafiklerinde Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. J1, J2, J3, J4 ve J5 formülasyonlarının emülsifikasyon zamanları damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve emülsifikasyon zamanı sonuçları (n=3)

FORMÜLASYON	1. GÜN	1. GÜN	28. GÜN
	DAMLACIK BÜYÜKLÜĞÜ (nm) ±SS		
J1	74,29 ± 0,15	56,16 ± 0,41	53,83 ± 0,40
J2	35,57 ± 0,26	40,64 ± 0,13	37,30 ± 0,10
J3	29,68 ± 0,13	30,74 ± 0,20	28,64 ± 0,07
J4	23,05 ± 0,32	21,51 ± 0,14	21,65 ± 0,08
J5	18,81 ± 0,48	19,39 ± 0,27	18,9 ± 0,2
	POLİDİSPERSİTE İNDEKSİ ± SS		
J1	0,26 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,28 ± 0,01
J2	0,15 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,17 ± 0,01
J3	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,09 ± 0,02
J4	0,17 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,00
J5	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,10 ± 0,03
	ZETA POTANSİYEL (mV) ± SS		
J1	-9,14 ± 0,69	-4,64 ± 0,45	-6,59 ± 0,53
J2	-5,76 ± 1,56	-2,77 ± 0,74	-4,79 ± 1,11
J3	-4,49 ± 0,65	-3,13 ± 1,22	-5,49 ± 0,17
J4	-6,61 ± 0,71	-6,80 ±1,32	-4,15 ± 4,03
J5	-4,63 ± 2,34	-5,29 ± 5,21	-7,40 ± 5,60
	EMÜLSİFİKASYON ZAMANI		
J1	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)		
J2	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)		
J3	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)		
J4	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)		
J5	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)		

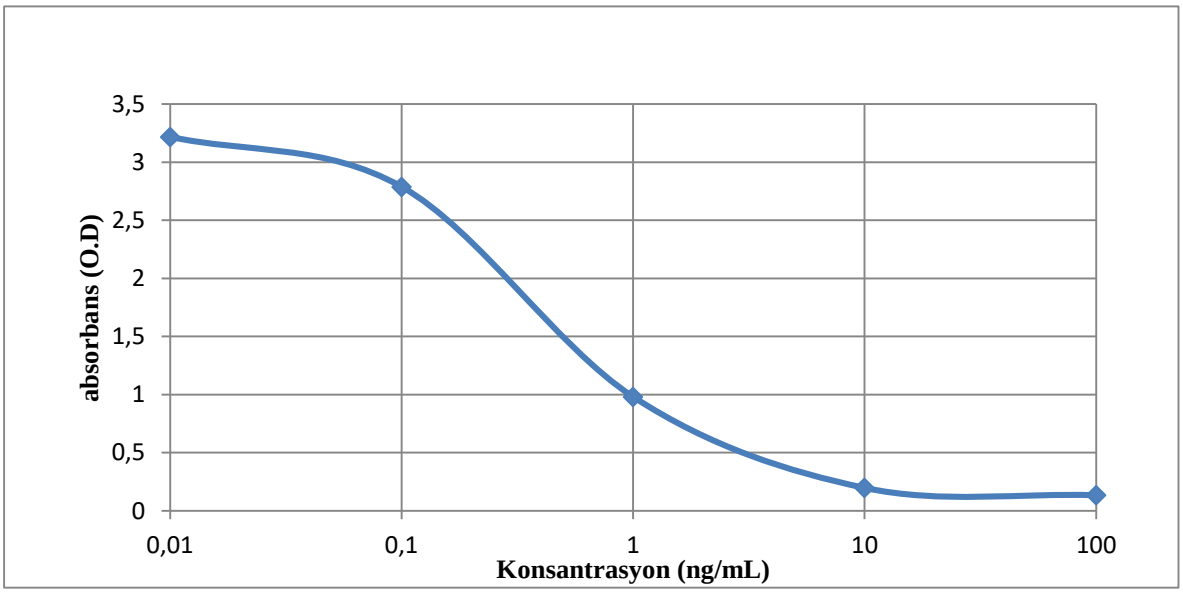


Şekil 4.10. J1, J2, J3, J4 ve J5 formülasyonları için (a) damlacık büyüklüğü (b) polidispersite indeksi (c) zeta potansiyel sonuçları (n=3)

4.2. ELISA Yöntemi ile Exendin-4'ün Miktar Tayini

Exendin-4'ün miktar tayini için Bölüm 3.2.2'de belirtildiği gibi analiz kitinin protokolü uygulanarak standartlardan hareketle 4 değişkenli lojistik regresyon kullanılarak hiperbolik eğri çizildi (Şekil 4.11). Hiperbolik eğrinin eşitliği "Eş.4.1" gösterildi. Protokoldeki validasyon çalışmaları genelde verilen standartlar esas alınarak yapıldı. Hiperbolik eğrinin eşitliğinden hareketle örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

$$y=\frac{3,250-0,125}{1+\left(\frac{(x)^{1,185}}{0,438}\right)}+0,125 \qquad (4.1)$$



Şekil 4.11. ELISA kitinin kalibrasyon eğrisi

4.3. Exendin-4 ve Exendin-4/Kimostatin Yüklü Kendiliğinden Nanoemülsifiye Olabilen Sistemlerin Karakterizasyon Çalışmaları

Önformülasyon çalışmalarında hazırlanan 27 formülasyonun 5°C ± 3°C koşullarında bekletilerek 28 gün süreli damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ölçüm sonuçları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile istatistik olarak değerlendirildi ve yükleme etkinliğinin araştırılması için bu ölçümler arasında damlacık büyüklüklerinde anlamlı farkın olmadığı ($p>0.05$) altı formülasyon seçildi (Çizelge 4.10).

C1 formülasyonu, yağ fazı olarak Maisine®'i %18, yüzey etkin madde olarak % Labrasol®'ü %65,6, yardımcı çözücü olarak propilen glikolü %16,4 oranlarında içermektedir. ***C1***

formülasyonunun 1 ay süreli damlacık büyüklüğü (274±3,08 nm) ve polidispersite indeksi (0,497±0,05) ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamakla beraber diğer altı formülasyona göre damlacık büyüklüğü ve polidispersitesi oldukça yüksek bulunduğu için ilerleyen deneyler için ***C1*** formülasyonundan vazgeçildi.

Yükleme etkinliğinin tayini:

İstatiksel analiz sonuçlarına göre seçilen 6 formülasyon için Bölüm 3.2.3'de belirtildiği gibi yapılan indirekt yükleme etkinliği tayini sonuçları Çizelge 4.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Yükleme etkinliği araştırılan formülasyonlar için yardımcı madde oranları ve yükleme etkinliği sonuçları

Formülasyon	Yağ fazı (%)	Yüzey etkin madde	Yardımcı Çözücü	% Yükleme Etkinliği
E2	Etil oleat %30	Cremophor EL® %52,5	Etanol %17,5	62,15
F (DoE)	Etil oleat %16,67	Cremophor EL® %62,5	Etanol %20,83	60,73
I5	Etil oleat %15	Cremophor EL® %47,81-Labrasol® %15,94	Propilen glikol %21,25	82,41
H5	Etil oleat %15	Cremophor EL® %42,5-Labrasol® %21,25	Propilen glikol %21,25	88,25
G5	Etil oleat %15	Cremophor EL® %21,25-Labrasol® %42,5	Etanol %21,25	74,09
J5	Etil oleat %15	Cremophor EL® %21,25-Labrasol® %42,5	Etanol %5,3125-Propilen glikol %15,9375	81,69

Bu sonuçlara göre %80 üzerinde yükleme etkinliğine sahip ***H5***, ***I5*** ve ***J5*** formülasyonları için yükleme etkinliğinin belirlenmesinde hem direkt hem indirekt yöntem kullanıldı. Direkt yöntemle yapılan yükleme etkinliğinde ***I5*** ve ***J5*** formülasyonlarında exendin-4 başlangıç konsantrasyonundan yüksek bulunduğu için Triton-X'in exendin-4'ü parçaladığı düşünüldü. ***H5*** formülasyonunda ise, direkt yöntemde yükleme etkinliği %82,4; indirekt yöntemde ise %88,25 bulundu. Tekrarlanan analiz sonucunda ***H5*** indirekt yöntemde yükleme etkinliği yine %88,25 olduğu tespit edildi.

Yukarıda anlatılan deneyler yapılarak elde edilen verilere göre ***H5***, ***I5*** ve ***J5*** formülasyonları için ayrıntılı karakterizasyon çalışmalarına devam edilmesine karar verildi. Bu formülasyonlar için 28 günlük stabilite çalışmaları yürütüldü. Bu formülasyonlar için emülsifikasyon zamanı, DB, PDI, ZP ölçümlerinin yanısıra Bölüm 3.1'de anlatıldığı üzere türbidite, viskozite ve pH yapıldı.

H5, ***I5*** ve ***J5*** formülasyonları için emülsifikasyon zamanı, DB, PDİ, ZP, türbidite, viskozite ve pH sonuçları Çizelge 4.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12. H5, I5 ve J5 formülasyonları için emülsifikasyon zamanı, damlacık büyüklüğü, zeta potansiyel, türbidite, viskozite ve pH sonuçları (n=3)

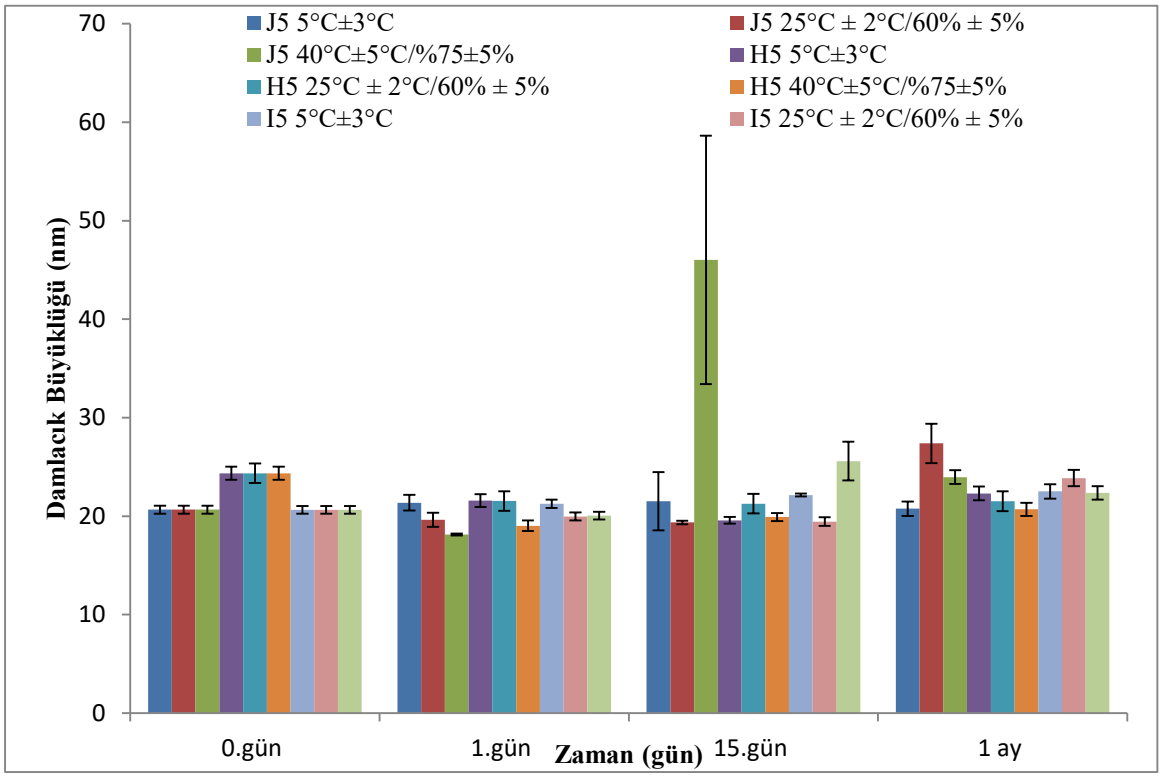
Formülasyon	Damlacık Büyüklüğü (nm) ± SS	Polidispersite İndeksi ± SS	Zeta Potansiyel (mV) ± SS	Viskozite (m.Pas) ± SS	pH ± SS	Türbidite (NTU) ± SS	Emülsifikasyon zamanı
H5	24,28±0,43	0,17±0,01	-1,28±3,61	67,28± 5,22	5,40 ±0,00	6,37± 0,00	Grade B 1 dk'dan az
J5	20,66±0,40	0,10±0,01	-5,99±0,43	65,63± 2,55	5,34 ±0,00	5,42± 0,00	Grade B 1 dk'dan az
I5	20,63±0,39	0,15±0,01	-0,93±4,31	65,24± 2,55	5,50 ±0,00	5,62± 0,00	Grade B 1 dk'dan az

4.4. Kısa Süreli Fiziksel Stabilite Çalışmaları

Kısa süreli fiziksel stabilite çalışmaları Bölüm 3.2.5'te belirtildiği üzere 1 ay süreli olarak 5ºC ± 3ºC, 25°C ± 2°C/60% ± 5% bağıl nem ve 40ºC ± 5ºC/%75 ± %5 bağıl nemde ***H5***, ***J5*** ve ***I5*** formülasyonlarıyla yapıldı. Kısa süreli stabilite çalışmaları sonucunda ***H5***, ***J5*** ve ***I5*** formülasyonlarının DB'leri Çizelge 4.13 ve Şekil 4.12'de, PDİ'leri Çizelge 4.14 ve Şekil 4.13'te, ZP'leri Çizelge 4.15 ve Şekil 4.14'te, türbiditeleri Çizelge 4.16 ve Şekil 4.15'te, pH''ları Çizelge 4.17 ve Şekil 4.16'da, viskozite sonuçları Çizelge 4.18 ve Şekil 4.17'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. J5, H5 ve I5 formülasyonlarının kısa süreli stabilite çalışmalarında damlacık büyüklüğü sonuçları (n=3)

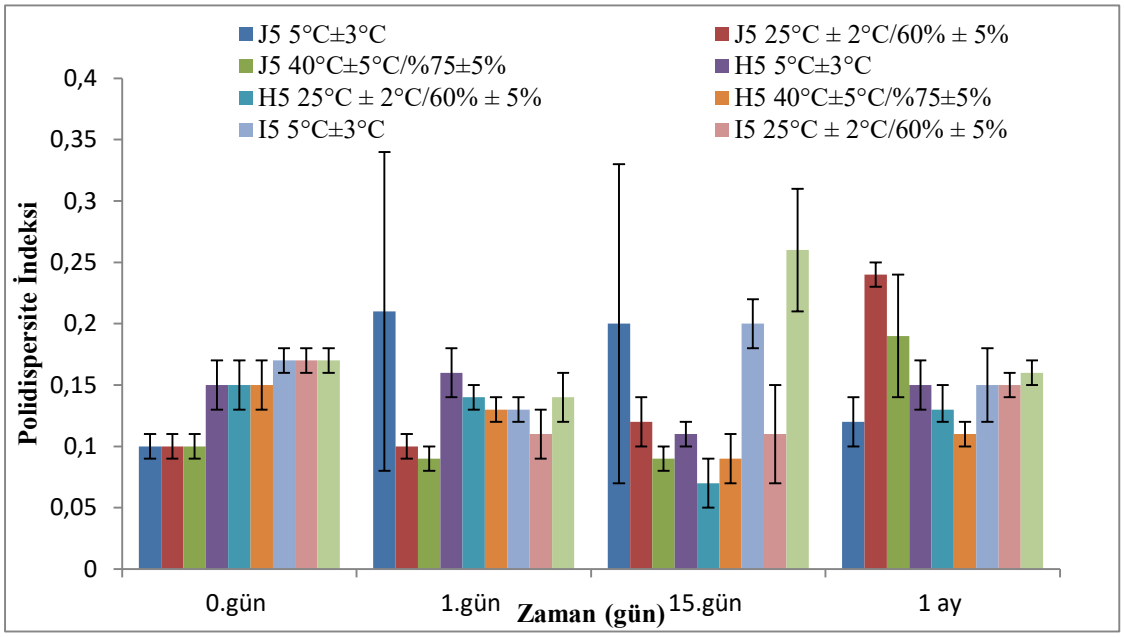
Gün	Damlacık Büyüklüğü (nm) ± SS								
	J5			H5			I5		
	5°C ± 3°C	25°/ 60% BN	40°C/ 75% BN	5°C ± 3°C	25°/ 60% BN	40°C/ 75% BN	5°C ± 3°C	25°C/ 60% BN	40°C/ 75% BN
0	20,66 ±0,40	20,66 ±0,40	20,66 ±0,40	24,36 ±0,67	24,36 ±0,67	24,36 ±0,67	20,63 ±0,39	20,63 ±0,39	20,63 ±0,39
1	21,37 ±0,81	19,63 ±0,71	18,14 ±0,11	21,58 ±0,64	21,54 ±0,59	19,02 ±0,54	21,25 ±0,42	19,97 ±0,41	20,04 ±0,39
15	21,51 ±2,96	19,37 ±0,18	46,03 ±12,69	19,58 ±0,35	21,27 ±0,39	19,92 ±0,41	22,14 ±0,15	19,45 ±0,45	25,59 ±1,97
30	20,76 ±0,73	27,39 ±2,01	23,97 ±0,69	22,3 ± 0,7	21,51 ±0,61	20,69 ±0,66	22,51 ±0,73	23,87 ±0,83	22,36 ± 0,69



Şekil 4.12. J5, H5 ve I5 formülasyonlarının kısa süreli stabilite çalışmalarında damlacık büyüklüğü sonuçları (n=3)

Çizelge 4.14. J5, H5 ve I5 formülasyonların kısa süreli stabilite çalışmalarında polidispersite indeksi sonuçları (n=3)

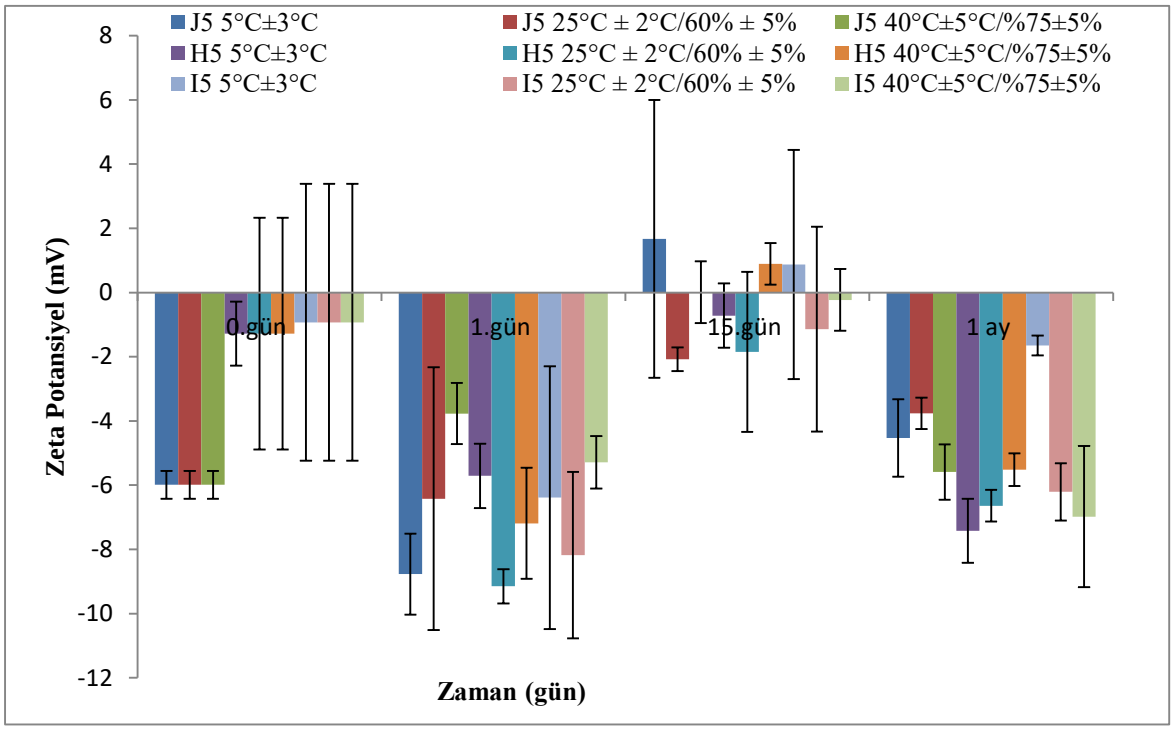
Polidispersite İndeksi ± SS									
	J5			H5			I5		
Gün	5°C ± 3°C	25°/ 60% BN	40°C/ 75% BN	5°C ± 3°C	25°/ 60% BN	40°C/ 75% BN	5°C ± 3°C	25°C/ 60% BN	40°C/ 75% BN
0	0,10 ±0,01	0,10 ±0,01	0,10 ±0,01	0,15 ±0,02	0,15 ±0,02	0,15 ±0,02	0,17 ±0,01	0,17 ±0,01	0,17 ±0,01
1	0,21 ±0,13	0,10 ±0,01	0,09 ±0,01	0,16 ±0,02	0,14 ±0,01	0,13 ±0,01	0,13 ±0,01	0,11 ±0,02	0,14 ±0,02
15	0,20 ±0,13	0,12 ±0,02	0,09 ±0,01	0,11 ±0,01	0,07 ±0,02	0,09 ±0,02	0,20 ±0,02	0,11 ±0,04	0,26 ±0,05
30	0,12 ±0,02	0,24 ±0,01	0,19 ±0,05	0,15 ±0,02	0,13 ±0,02	0,11 ±0,01	0,15 ±0,03	0,15 ±0,01	0,16 ±0,01



Şekil 4.13. J5, H5 ve I5 formülasyonların kısa süreli stabilite çalışmalarında polidispersite indeksi sonuçları (n=3)

Çizelge 4.15. J5, H5 ve I5 formülasyonlarının kısa süreli stabilite çalışmalarında zeta potansiyel sonuçları (n=3)

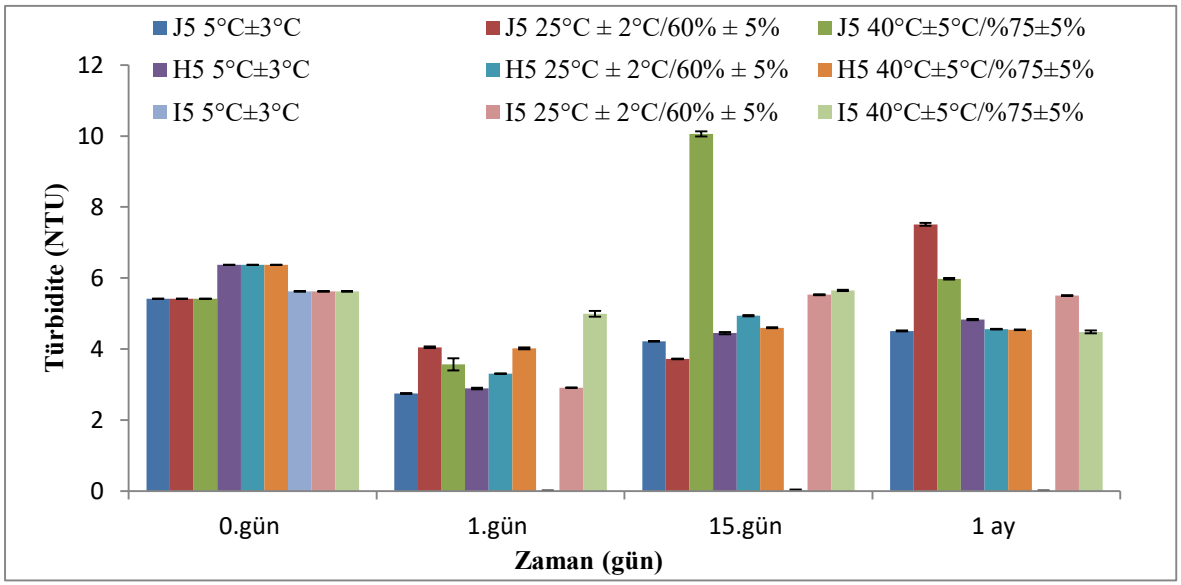
Zeta Potansiyel (mV) ± SS									
	J5			H5			I5		
Gün	5°C ± 3°C	25°/ 60% BN	40°C/ 75% BN	5°C ± 3°C	25°/ 60% BN	40°C/ 75% BN	5°C ± 3°C	25°C/ 60% BN	40°C/ 75% BN
0	-5,99 ±0,43	-5,99 ±0,43	-5,99 ±0,43	-1,28 ±3,61	-1,28 ±3,61	-1,28 ±3,61	-0,93 ±4,31	-0,93 ±4,31	-0,93 ±4,31
1	-8,77 ±1,26	-6,42 ±4,09	-3,77 ±0,95	-5,71 ±1,56	-9,15 ±0,53	-7,19 ±1,73	-6,39 ±4,09	-8,18 ±2,59	-5,29 ±0,82
15	1,67 ±4,33	-2,08 ±0,37	0,01 ±0,96	-0,72 ±3,59	-1,85 ±2,49	0,89 ±0,65	0,87 ±3,57	-1,14 ±3,19	-0,23 ±0,96
30	4,53 ±1,21	-3,76 ±0,49	-5,59 ±0,86	-7,42 ±2,15	-6,64 ±0,49	-5,52 ±0,51	-1,65 ±0,31	-6,21 ±0,89	-6,98 ±2,20



Şekil 4.14. J5, H5 ve I5 formülasyonlarının kısa süreli stabilite çalışmalarında zeta potansiyel sonuçları (n=3)

Çizelge 4.16. J5, H5 ve I5 formülasyonların kısa süreli stabilite çalışmalarında türbidite sonuçları (n=3)

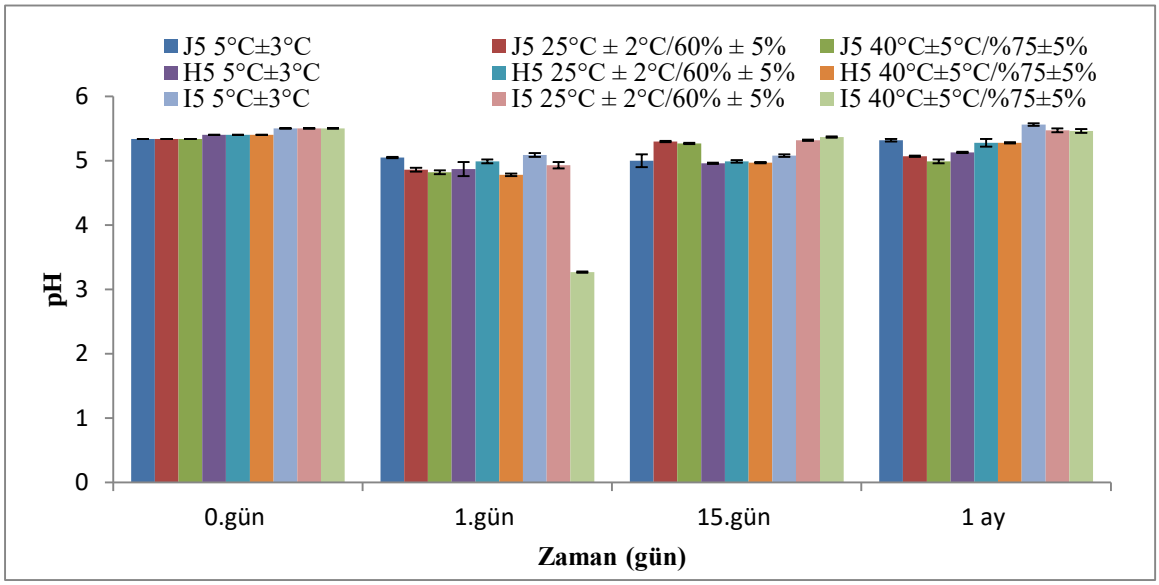
Türbidite (NTU) ± SS									
	J5			H5			I5		
Gün	5°C ± 3°C	25°/ 60% BN	40°C/ 75% BN	5°C ± 3°C	25°/ 60% BN	40°C/ 75% BN	5°C ± 3°C	25°C/ 60% BN	40°C/ 75% BN
0	5,42 ±0,00	5,42 ±0,00	5,42 ±0,00	6,37 ±0,00	6,37 ±0,00	6,37 ±0,00	5,62 ±0,00	5,62 ±0,00	5,62 ±0,00
1	2,75 ±0,01	4,05 ±0,02	3,57 ±0,17	2,89 ±0,02	3,31 ±0,01	4,02 ±0,03	2,79 ±0,01	2,91 ±0,01	4,99 ±0,08
15	4,22 ±0,01	3,72 ±0,01	10,06 ±0,07	4,45 ±0,03	4,94 ±0,02	4,60 ±0,01	3,42 ±0,02	5,53 ±0,01	5,65 ±0,02
30	4,51 ±0,01	7,51 ±0,04	5,98 ±0,02	4,83 ±0,02	4,56 ±0,01	4,54 ±0.01	4,25 ±0,01	5,51 ±0,01	4,48 ±0,04



Şekil 4.15. J5, H5 ve I5 formülasyonlarının kısa süreli stabilite çalışmalarında türbidite sonuçları (n=3)

Çizelge 4.17. J5, H5 ve I5 formülasyonların kısa süreli stabilite çalışmalarında pH sonuçları (n=3)

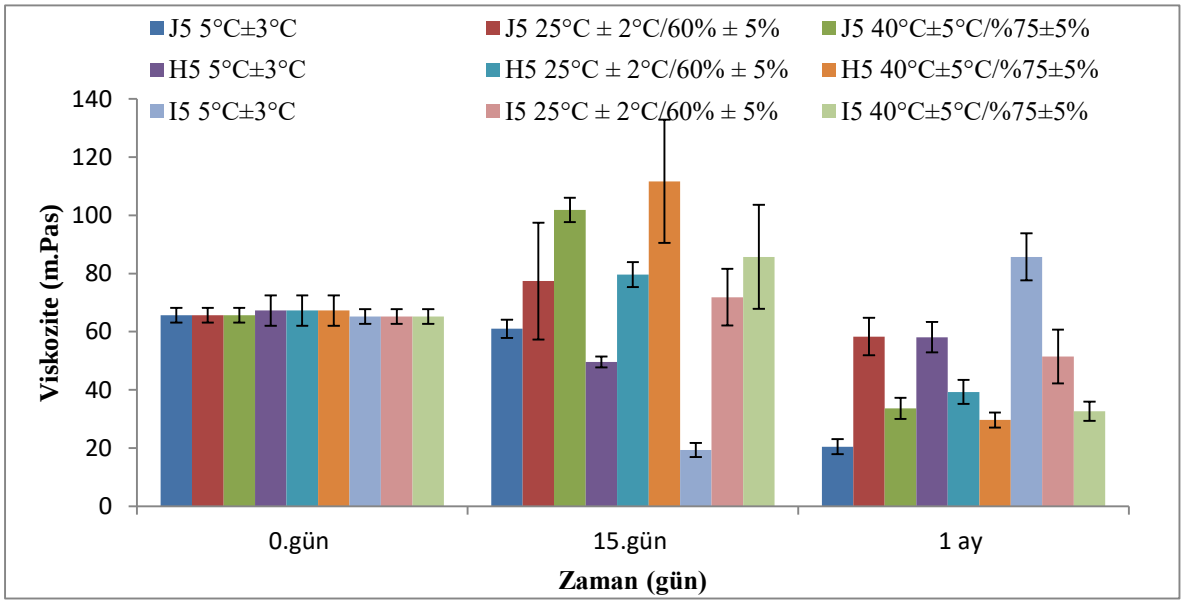
pH ± SS									
	J5			H5			I5		
Gün	5°C ± 3°C	25°/ 60% BN	40°C/ 75% BN	5°C ± 3°C	25°/ 60% BN	40°C/ 75% BN	5°C ± 3°C	25°C/ 60% BN	40°C/ 75% BN
0	5,34 ±0,00	5,34 ±0,00	5,34 ±0,00	5,40 ±0,00	5,40 ±0,00	5,40 ±0,00	5,50 ±0,00	5,50 ±0,00	5,50 ±0,00
1	5,05 ±0,01	4,86 ±0,03	4,82 ±0,03	4,87 ±0,11	4,99 ±0,03	4,78 ±0,02	5,09 ±0,03	4,93 ±0,05	3,27 ±0,01
15	5,00 ±0,10	5,30 ±0,01	5,27 ±0,01	4,96 ±0,01	4,99 ±0,02	4,97 ±0,01	5,08 ±0,02	5,32 ±0,01	5,37 ±0,01
30	5,32 ±0,02	5,07 ±0,01	4,99 ±0,03	5,13 ±0,01	5,28 ±0,06	5,28 ±0,01	5,56 ±0,02	5,47 ±0,03	5,46 ±0,03



Şekil 4.16. J5, H5 ve I5 formülasyonlarının kısa süreli stabilite çalışmalarında pH sonuçları (n=3)

Çizelge 4.18. J5, H5 ve I5 formülasyonlarının kısa süreli stabilite çalışmalarında viskozite sonuçları (n=3)

Viskozite (m.Pas) ± SS									
	J5			H5			I5		
Gün	5°C ± 3°C	25°/ 60% BN	40°C/ 75% BN	5°C ± 3°C	25°/ 60% BN	40°C/ 75% BN	5°C ± 3°C	25°C/ 60% BN	40°C/ 75% BN
0	65,63 ±2,55	65,63 ±2,55	65,63 ±2,55	67,28 ±5,22	67,28 ±5,22	67,28 ±5,22	65,24 ±2,55	65,24 ±2,55	65,24 ±2,55
15	63,98 ±3,13	77,37 ±20,06	101,86 ±4,18	49,59 ±1,91	79,60 ±4,26	111,68 ±21,16	19,35 ±2,42	71,85 ±9,71	85,71 ±17,89
30	20,49 ±2,60	58,31 ±6,45	33,68 ±3,62	58,08 ±5,23	39,30 ±4,12	29,65 ±2,55	85,71 ±8,11	51,45 ±9,26	32,65 ±3,34



Şekil 4.17. J5, H5 ve I5 formülasyonlarının kısa süreli stabilite çalışmalarında viskozite sonuçları (n=3)

En uygun exendin-4 yüklü SNEDDS formülasyonunun seçilmesi

Kısa süreli stabilite çalışmalarıyla DB, PDİ, ZP, viskozite, pH ve türbidite sonuçlarının tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucu 5°C±3°C ve 25°C ± 2°C/60% ± 5% bağıl nemde yapılan ölçümlerde anlamlı bir fark gözlenmeyen ***H5*** formülasyonu seçildi ($p>0.05$). ***H5*** formülasyonunda 40°C±5°C/%75±5% bağıl nemde yapılan ölçümlerde sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmesi sonucu uzun süreli stabilite çalışmalarına 5°C±3°C ve 25°C ± 2°C/60% ± 5% bağıl nemde devam edildi ($p<0.05$). Bundan sonra yapılan deneylerde ***H5*** formülasyonu kullanıldı. Exendin-4'ün oral

yoldan parçalanmasını önlemek amacıyla kimotripsin inhibitörü kimostatin formülasyona eklendi. Aşağıda exendin-4 yüklü H5 ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin birim formülleri verilmiştir:

Exendin-4 yüklü SNEDDS H5'in birim formülasyonu

Exendin-4……2,5 µg	Etkin madde
Etil oleat……...0,15 g	Yağ fazı
Cremophor EL®…….0,425 g	Yüzey etkin madde
Labrasol®…….0,2125 g	Yüzey etkin madde
Propilen glikol…….0,2125 g	Yardımcı çözücü

Exendin-4/ Kimostatin yüklü SNEDDS H5'in birim formülasyonu

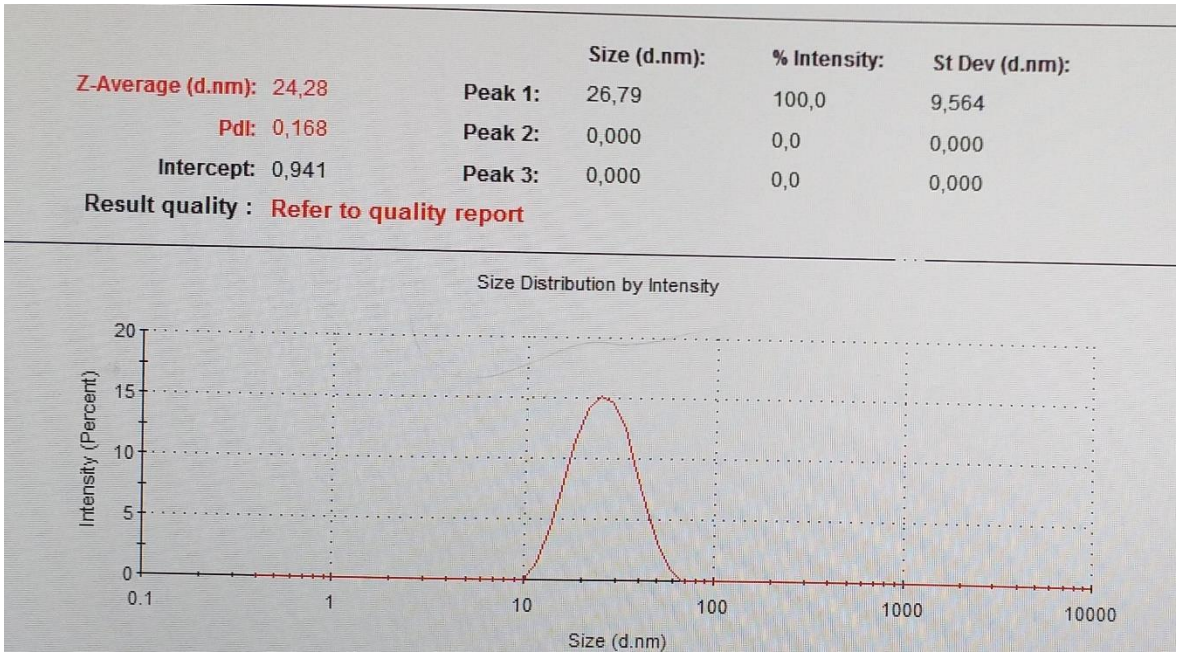
Exendin-4……2,5 µg	Etkin madde
Kimostatin……..0,125 ng	Enzim inhibitörü
Etil oleat……...0,15 g	Yağ fazı
Cremophor EL®…….0,425 g	Yüzey etkin madde
Labrasol®…….0,2125 g	Yüzey etkin madde
Propilen glikol…….0,2125 g	Yardımcı çözücü

Optimum exendin-4 yüklü SNEDDS formülasyonunun karakterizasyon çalışmalarına ait sonuçlar

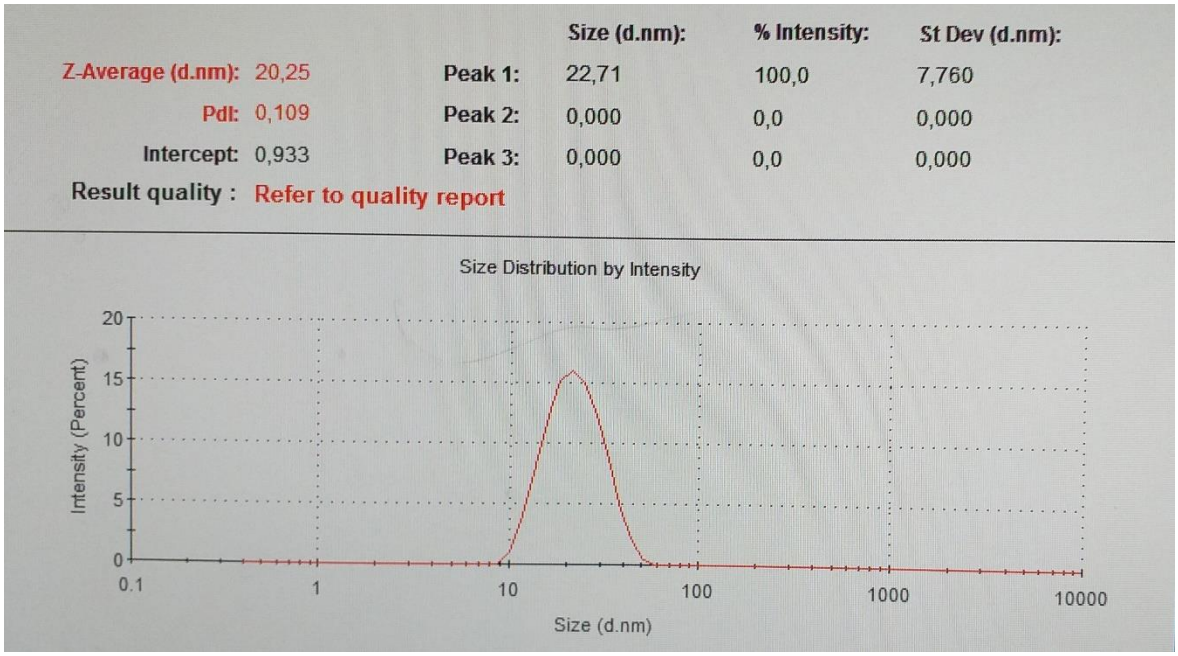
Exendin-4 yüklü ***H5*** formülasyonu ve exendin-4/kimostatin yüklü ***H5*** formülasyonu Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde yapılan emülsifikasyon zamanı, DB, PDİ, ZP ölçümlerine ait sonuçlar Çizelge 4.19'da ve Şekil 4.18- 4.19'da verilmiştir.

Çizelge 4.19. Exendin-4 yüklü H5 formülasyonu ve exendin-4/kimostatin yüklü H5 formülasyonu için emülsifikasyon zamanı, damlacık büyüklüğü, zeta potansiyel ve viskozite ölçümlerine ait sonuçlar (n=3)

FORMÜLASYON	DAMLACIK BÜYÜKLÜĞÜ (nm) ±SS
Exendin-4 yüklü H5 SNEDDS	24,28±0,43
Exendin-4/kimostatin yüklü H5 SNEDDS	20,25±0,35
	POLİDİSPERSİTE İNDEKSİ ± SS
Exendin-4 yüklü H5 SNEDDS	0,17 ± 0,01
Exendin-4/kimostatin yüklü H5 SNEDDS	0,11 ± 0,02
	ZETA POTANSİYEL (mV) ± SS
Exendin-4 yüklü H5 SNEDDS	-1,28 ± 3,61
Exendin-4/kimostatin yüklü H5 SNEDDS	-1,85 ± 2,49
	EMÜLSİFİKASYON ZAMANI
Exendin-4 yüklü H5 SNEDDS	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)
Exendin-4/kimostatin yüklü H5 SNEDDS	1 dk'dan az/hafif bulanık (Grade B)
	VİSKOZİTE (m.Pas) ± SS
Exendin-4 yüklü H5 SNEDDS	79,60 ± 3,30
Exendin-4/kimostatin yüklü H5 SNEDDS	100,02 ± 7,65

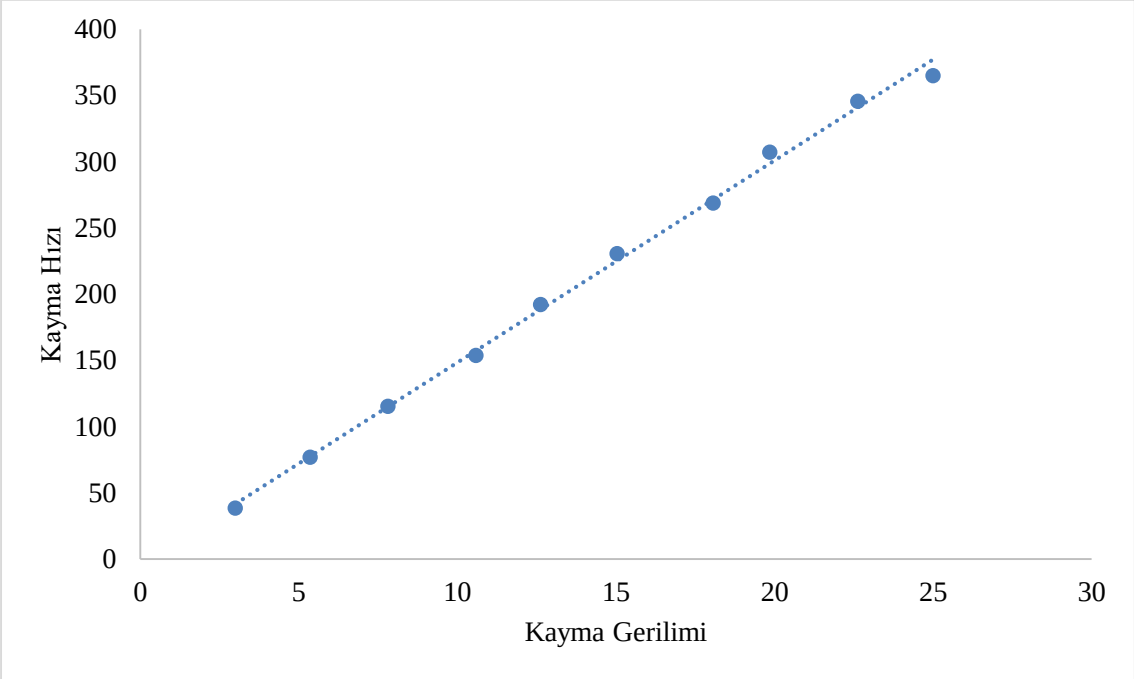


Şekil 4.18. Exendin-4 yüklü H5 formülasyonunun damlacık büyüklüğü grafiği

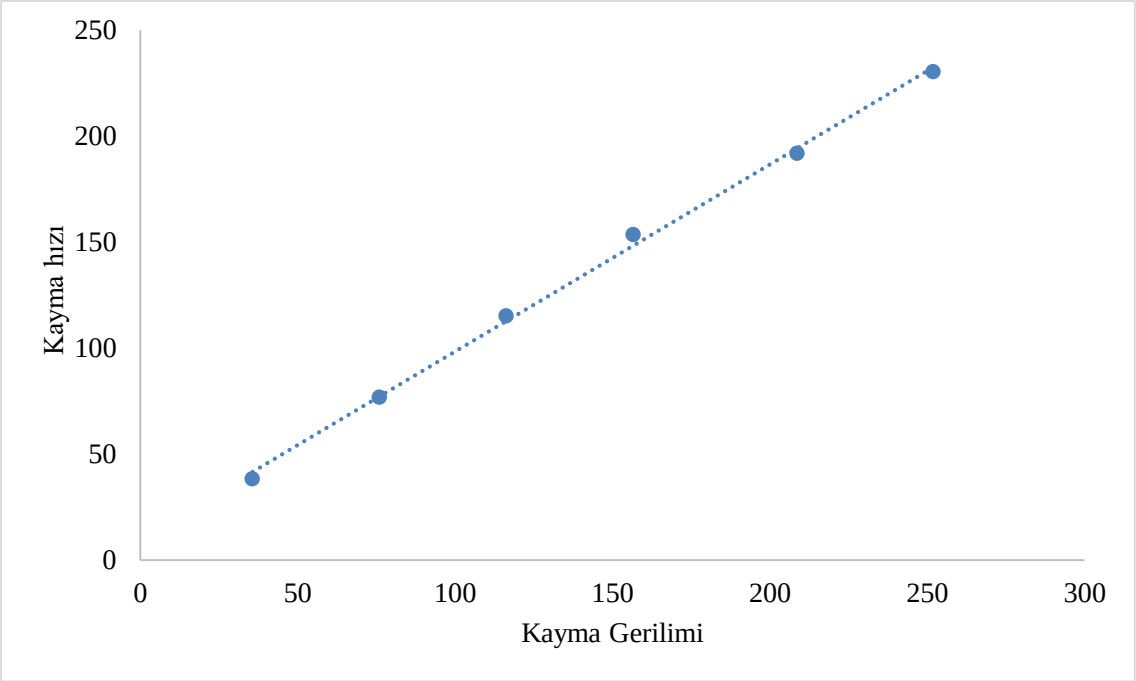


Şekil 4.19. Exendin-4/kimostatin yüklü H5 formülasyonunun damlacık büyüklüğü grafiği

Bölüm 3.2.4'de anlatıldığı şekilde yapılan reolojik çalışmalara ait reogramlarda exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü H5 formülasyonlarının kayma hızı ve kayma gerilimi arasındaki ilişki doğrusal bulundu (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21). Bu sonuçlara exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü H5 formülasyonunun Newtonian akış gösterdiği bulundu.



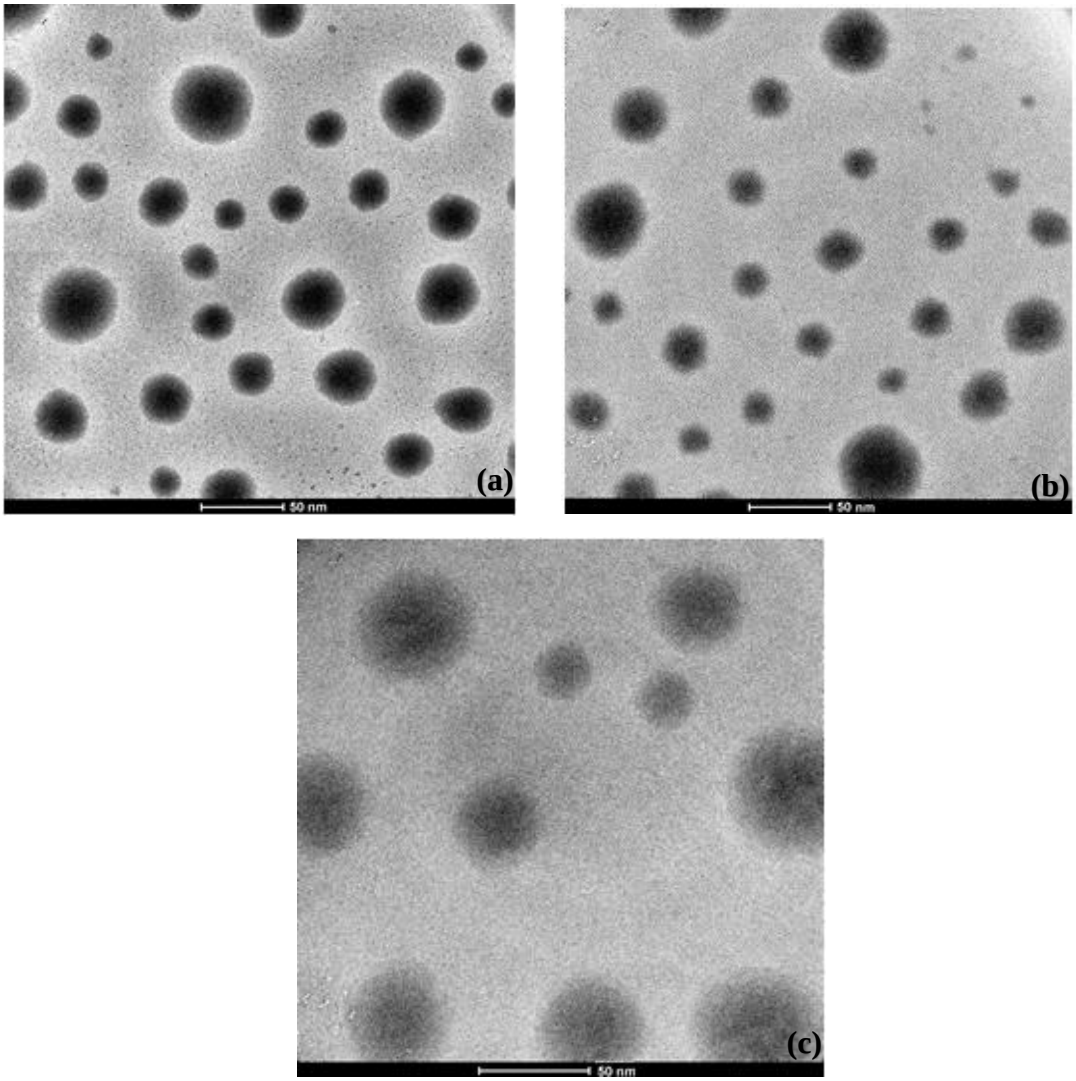
Şekil 4.20. Exendin-4 yüklü H5 formülasyonunun kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği



Şekil 4.21. Exendin-4/kimostatin yüklü H5 formülasyonunun kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği

Morfolojik özelliklerin Geçirimli Elektron Mikroskobuyla (TEM) görüntülenmesi

Optimum formülasyon olarak seçilen exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü H5 formülasyonları Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi 1:50 oranında seyreltildi ve Şekil 4.22'de gösterilen TEM görüntüleri alındı. Damlacıkların 50 nm'nin altında küresel şekilde olduğu tespit edildi.



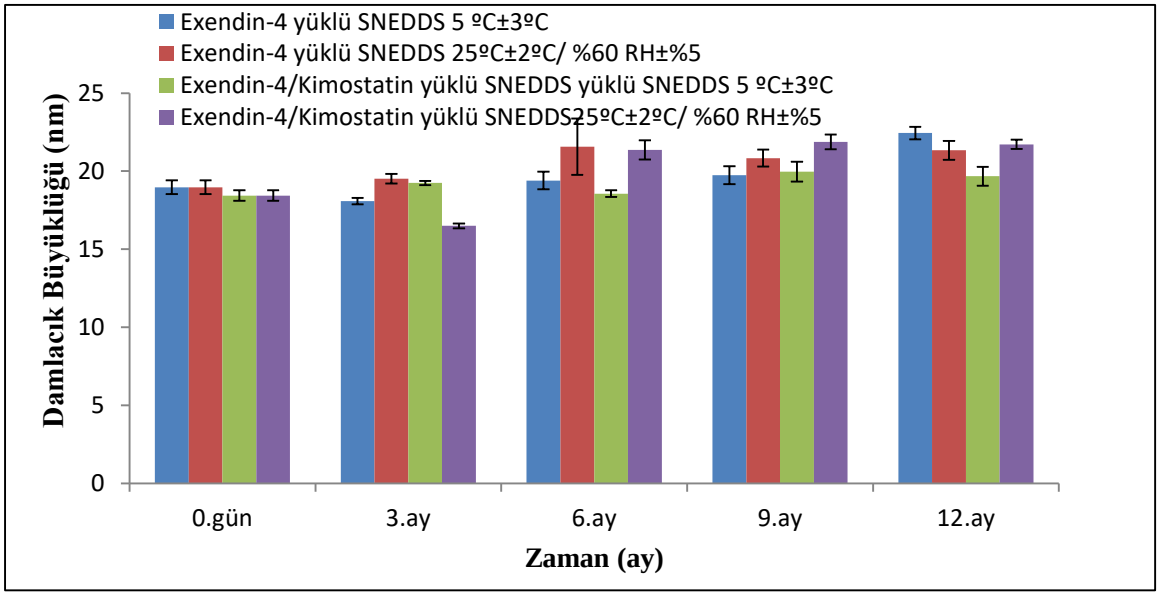
Resim 4.2. Formülasyonların TEM görüntüleri a) exendin-4 içermeyen formülasyon b) exendin-4 yüklü formülasyon c) exendin-4/kimostatin yüklü formülasyon

4.5. Uzun Süreli Fiziksel Stabilite Çalışmaları

Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı üzere uzun süreli fiziksel stabilite çalışmalarına exendin-4 ve exendin-4/kimostatin içeren H5 SNEDDS'ler ile devam edildi. Çalışmalar ICH kılavuzuna göre 12 ay süreli olarak 5ºC±3ºC ve 25°C ± 2°C/60% bağıl nemde yürütüldü (ICH Q1A (R2) Guideline, 2003). Exendin-4 yüklü ve exendin-4/kimostatin yüklü H5 formülasyonların 0., 3., 6., 9., ve 12. aylardaki DB'leri Çizelge 4.20 ve Şekil 4.22'de, PDİ'leri Çizelge 4.21 ve Şekil 4.23'te, ZP'leri Çizelge 4.22 ve Şekil 4.24'te, viskozite sonuçları Çizelge 4.23 ve Şekil 4.25'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.20. Exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin uzun süreli stabilite çalışmalarında damlacık büyüklüğü sonuçları (n=3)

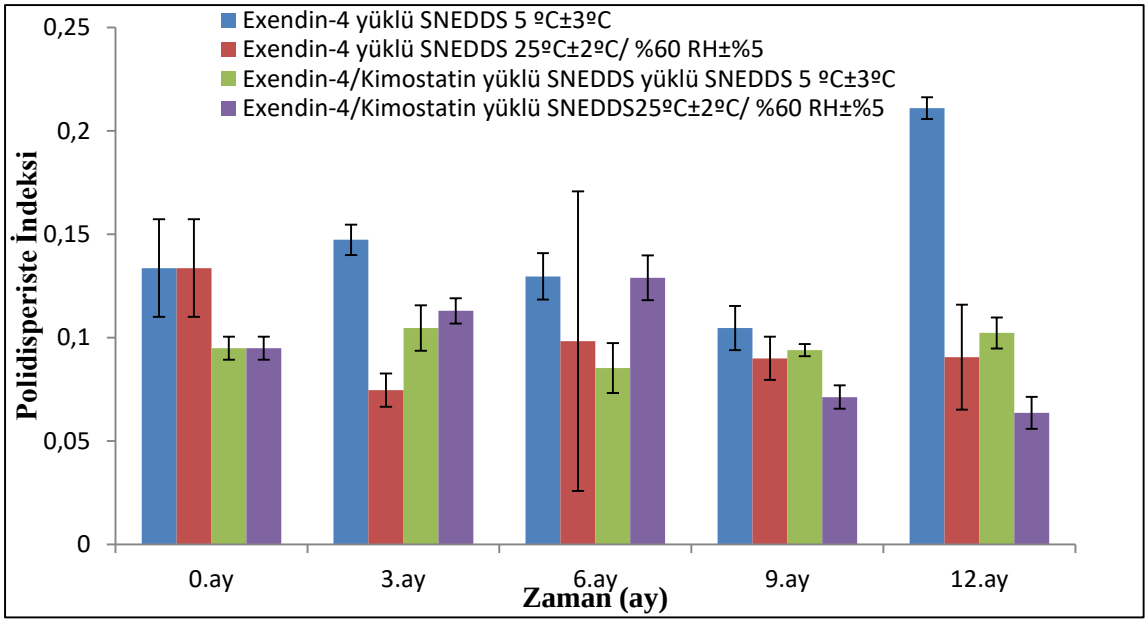
	Damlacık Büyüklüğü (nm)±SS			
	Exendin-4 yüklü SNEDDS		Exendin-4/Kimostatin yüklü SNEDDS	
Ay	5°C ± 3°C	25°± 2°C /%60 BN	5°C ± 3°C	25°± 2°C/%60 BN
0	18,97±0,43	24,28±0,43	18,47±0,35	20,25±0,35
3	18,08±0,21	19,51±0,31	19,25±0,13	16,49±0,16
6	19,39±0,56	21,57±1,79	18,56±0,21	21,36±0,61
9	19,74±0,58	20,84±0,54	19,97±0,64	21,88±0,47
12	22,44±0,39	21,34±0,60	19,67±0,60	21,72±0,29



Şekil 4.22. Exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin uzun süreli stabilite çalışmalarında damlacık büyüklüğü sonuçları (n=3)

Çizelge 4.21. Exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin uzun süreli stabilite çalışmalarında polidispersite indeksi sonuçları (n=3)

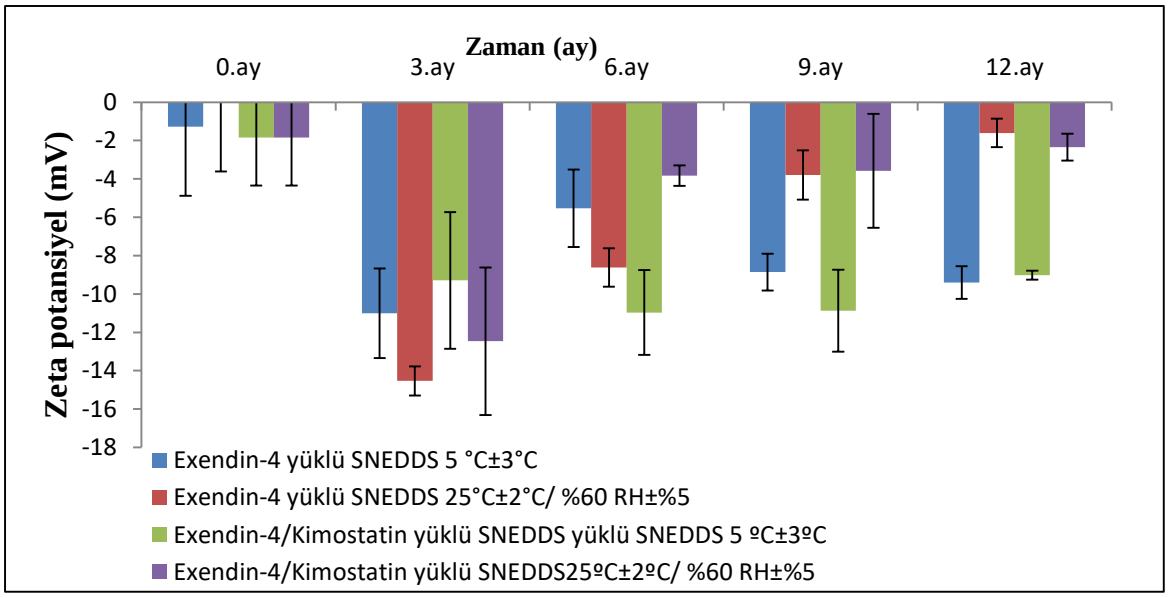
	Polidispersite İndeksi ±SS			
	Exendin-4 yüklü SNEDDS		Exendin-4/Kimostatin yüklü SNEDDS	
Ay	5°C ± 3°C	25°± 2°C /%60 BN	5°C ± 3°C	25°± 2°C /%60 BN
0	0,13±0,02	0,13±0,02	0,09±0,01	0,09 ± 0,01
3	0,15 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01
6	0,13 ± 0,01	0,09 ± 0,07	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,01
9	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,07 ± 0,01
12	0,21 ± 0,01	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,01



Şekil 4.23. Exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin uzun süreli stabilite çalışmalarında polidispersite indeksi sonuçları (n=3)

Çizelge 4.22. Exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin uzun süreli stabilite çalışmalarında zeta potansiyel sonuçları (n=3)

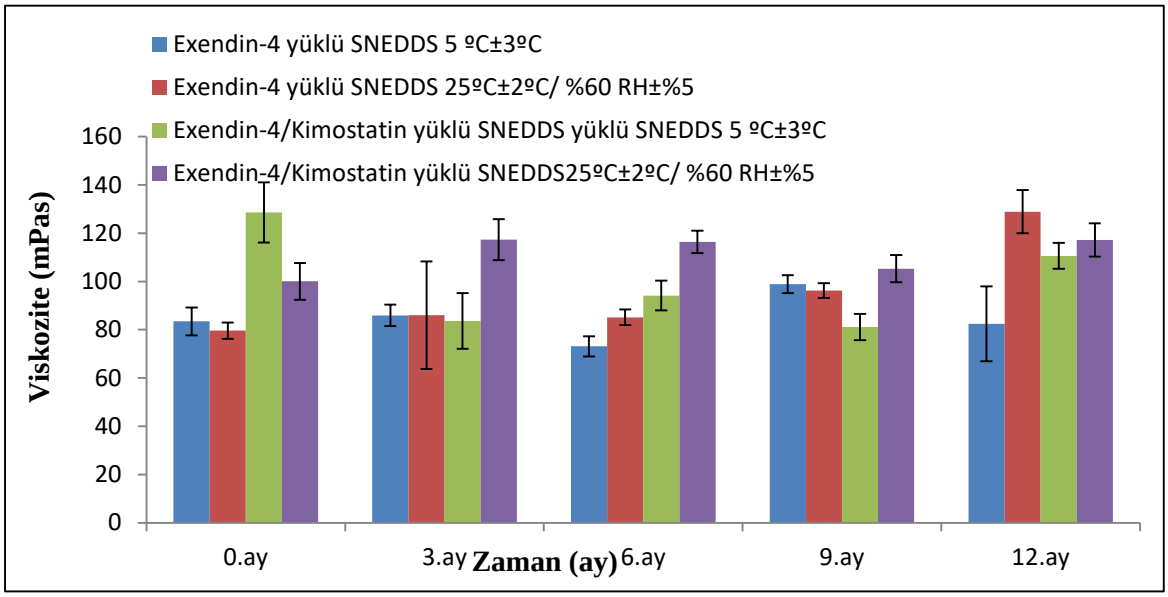
	Zeta Potansiyel ±SS			
	Exendin-4 yüklü SNEDDS		Exendin-4/Kimostatin yüklü SNEDDS	
Ay	5°C ± 3°C	25°± 2°C /%60 BN	5°C ± 3°C	25°± 2°C/%60 BN
0	-1,28 ± 3,61	-1,28 ± 3,61	-1,85 ± 2,49	-1,85 ± 2,49
3	-11,00 ± 2,34	-14,53 ± 0,76	-9,29 ± 3,56	-12,46 ± 3,84
6	-5,53 ± 2,02	-8,62 ± 1,01	-10,96 ± 2,21	-3,82 ± 0,53
9	-8,86 ± 0,95	-3,79 ± 1,29	-10,87 ± 2,14	-3,58 ± 2,97
12	-9,40 ± 0,85	-1,61 ± 0,74	-9,02 ± 0,23	-2,35 ± 0,70



Şekil 4.24. Exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin uzun süreli stabilite çalışmalarında zeta potansiyel sonuçları (n=3)

Çizelge 4.23. Exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin uzun süreli stabilite çalışmalarında viskozite sonuçları (n=3)

	Viskozite (m.Pas) ±SS			
	Exendin-4 yüklü SNEDDS		Exendin-4/Kimostatin yüklü SNEDDS	
Ay	5°C ± 3°C	25°± 2°C /%60 BN	5°C ± 3°C	25°± 2°C/%60 BN
0	83,46 ± 5,77	79,60 ± 3,30	128,62 ± 12,47	100,02 ± 7,65
3	85,95 ± 3,73	86,04 ± 3,03	83,64 ± 5,45	117,31 ± 5,68
6	73,12 ± 2,96	85,15 ± 3,57	94,14 ± 4,89	116,39 ± 3,48
9	98,94 ± 11,97	96,25 ± 19,49	81,07 ± 8,52	105,31 ± 18,24
12	82,47 ± 3,86	128,92 ± 20,46	110,61 ± 7,06	117,18 ± 20,32

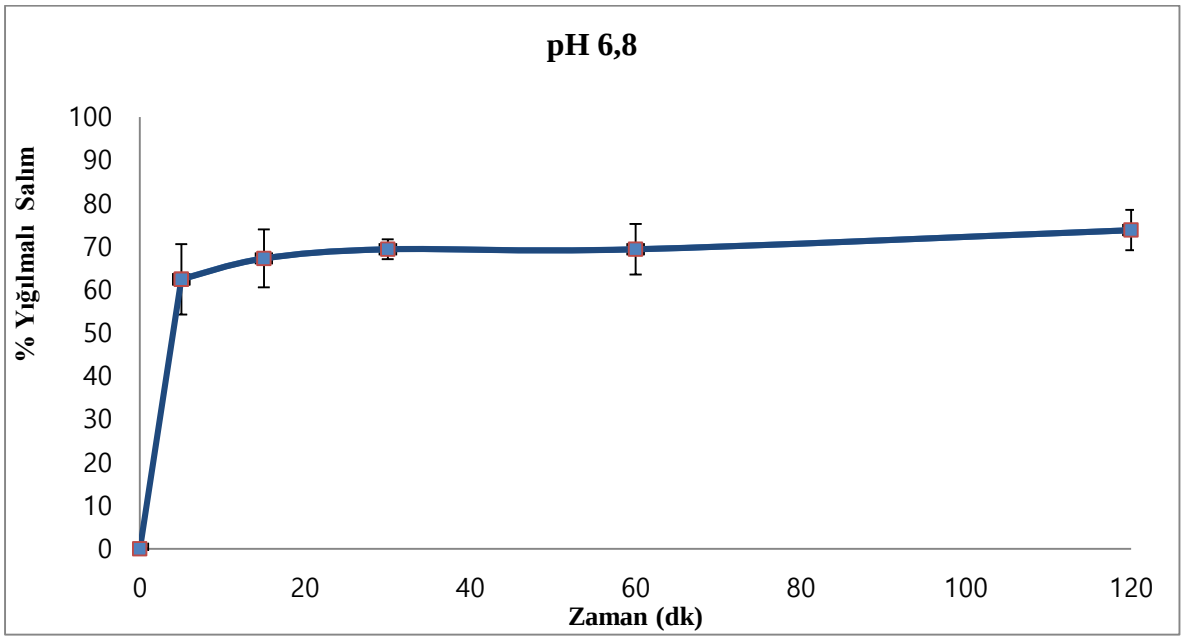


Şekil 4.25. Exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin uzun süreli stabilite çalışmalarında viskozite sonuçları (n=3)

Uzun süreli stabilite çalışmalarında exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin 0., 3., 6., 9. ve 12. aylardaki damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve viskozite sonuçlarının tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucu; 5°C ± 3°C ve 25°C ± 2°C/60% ± 5% bağıl nemde yapılan ölçümler arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). 0., 3., 6., 9. ve 12. aylarda yapılan reolojik çalışmalar formülasyonların akış özelliklerinin Newtonian akış tipine uyduğunu gösterdi.

4.6. *İn vitro* Salım Çalışmaları

İn vitro salım çalışmaları Bölüm 3.2.7'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Salım çalışmaları önce pH 1,2'de 2 saat, daha sonra da pH 6,8'de 2 saat olarak yapıldı. pH 1,2'de örnek alınan bazı noktalarda başlangıçta konulan exendin-4 konsantrasyonundan fazla konsantrasyonda exendin-4 ölçülmüş ve exendin-4'ün parçalandığı düşünülüp Bölüm 3.2.7. belirtilen lipoliz deneyleriyle bu varsayımın değerlendirilmesi düşünüldü. pH 6.8'de salım profili ve % yığılmalı salınan exendin-4'ün zamana karşı grafiği gösterilmektedir (Şekil 4.26).



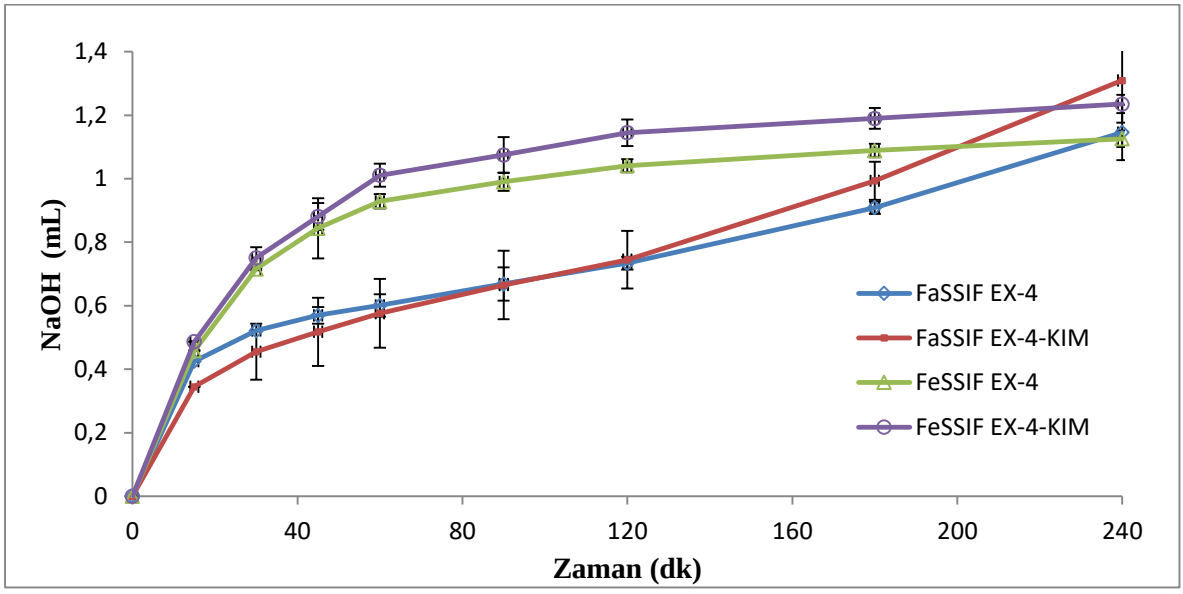
Şekil 4.26. Exendin-4 yüklü H5 formülasyonun pH 6,8'deki salım profili (n=3)

Şekil 4.26'da görüldüğü gibi pH 6,8'de yığılmalı salınan exendin-4 miktarı 2. saatin sonunda %73,79 olarak bulundu.

4.7. *İn vitro* Lipoliz Çalışmaları

İn vitro lipoliz çalışmaları Bölüm 3.2.8'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Gastrik lipoliz çalışmalarında alınan örneklerin konsantrasyonları ELISA kitiyle ölçüldü. 60.dk'da alınan örnek konsantrasyonu (93,75±0,028 ng/mL), başlangıç konsantrasyonundan (62.5 ng/mL) yüksek bulundu ve salım çalışmalarında düşünülen exendin-4'ün gastrik ortamda parçalandığı varsayımı güçlendi. Exendin-4 içeren formülasyonlar ve exendin-4/kimostatin içeren formülasyonların FaSSIF ve FeSSIF biyouyumlu ortamlarında lipolizi sırasında harcanan NaOH miktarı Şekil 4.27'de gösterilmektedir. Exendin-4 ve exendin-4/kimostatin içeren formülasyonlar için 4 saat boyunca NaOH harcandığı gözlendi.

Lipoliz çalışmaları sonuçlarına göre harcanan NaOH miktarları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde açlık ve tokluk ortamlarında hem exendin-4 içeren formülasyonlar hem de exendin-4/kimostatin içeren formülasyonlar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$).

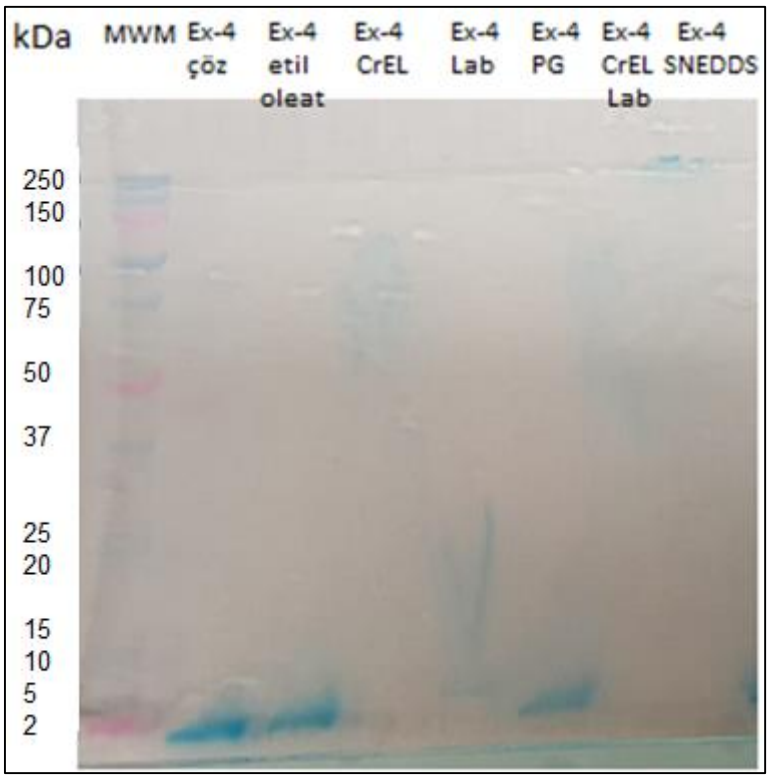


Şekil 4.27. Exendin-4 içeren formülasyonlar ve exendin-4/kimostatin içeren formülasyonların FaSSIF ve FeSSIF biyouyumlu ortamlarında lipolizi sırasında harcanan NaOH miktarı (n=3)

4.8. SDS-PAGE ile Stabilite Çalışmaları

SDS-PAGE çalışmaları Bölüm 3.2.9'da anlatıldığı üzere 0, 1, 2 ve 4. hafta bekletilen 1 g exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü H5 SNEDDS'lerle yapıldı. SDS-PAGE çalışmasında moleküler ağırlık belirleyici ve exendin-4 çözeltisinin jelde ilerlediği görüldü ancak exendin-4 içeren formülasyonların hiçbirinde exendin-4'ün jelde ilerlediği gözlenmedi.

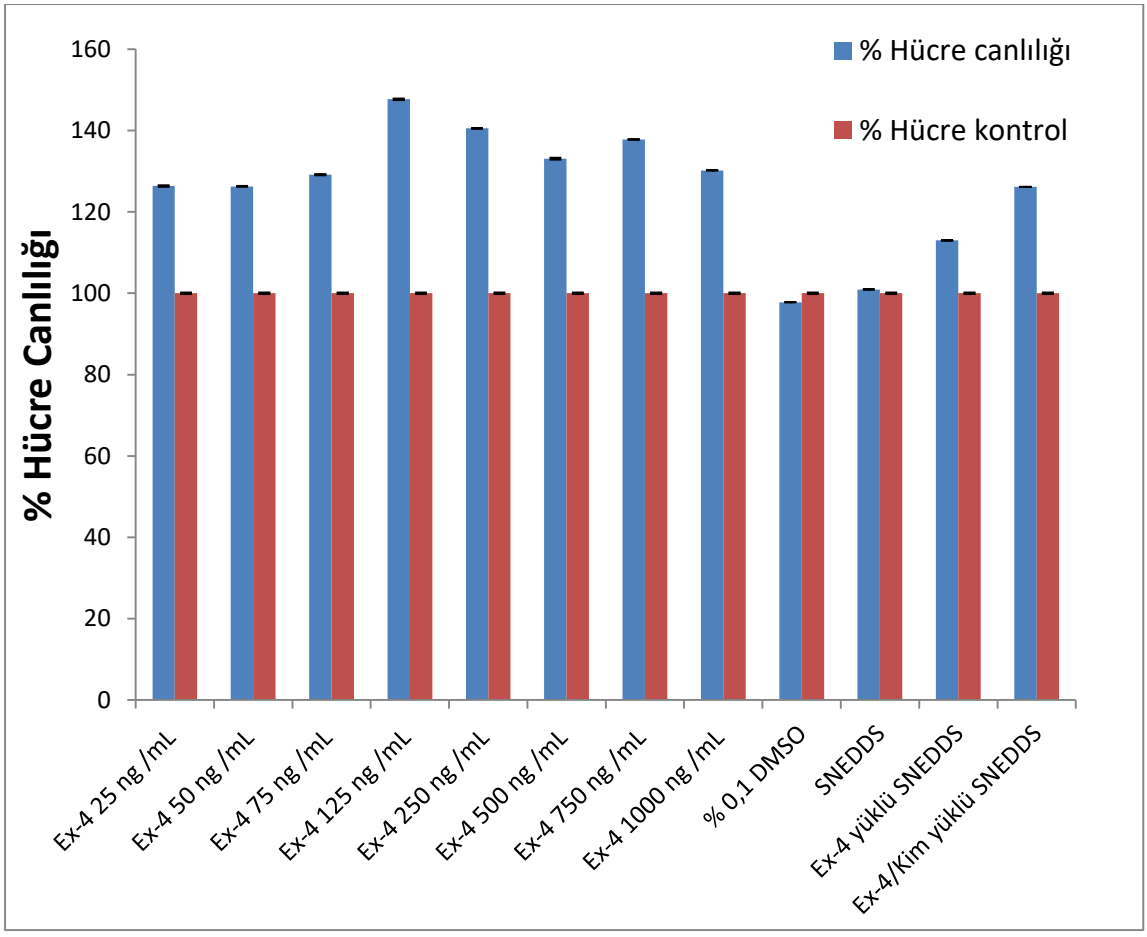
Bu durumun formülasyon bileşenlerinden kaynaklanabileceği düşünüldü ve SDS-PAGE çalışması Bölüm 3.2.9'da anlatılan işleme göre tekrarlanarak exendin-4 içeren formülasyon bileşenleri jele yüklendi. Şekil 4.28'de görüldüğü üzere exendin-4 çözeltisi, exendin-4'ün Cremophor EL® içermeyen formülasyon bileşenleriyle karışımı (Ex-4-etil oleat, Ex-4-Labrasol®, Ex-4- propilen glikol) uygulanan kuyucuklarda exendin-4'ün jelde ilerlediği, ancak exendin-4'ün Cremophor EL® içeren formülasyon bileşenleriyle karışımı (Ex-4-Cremophor EL®, Ex-4-Cremophor EL®/Labrasol®, Ex-4-SNEDDS) uygulanan kuyucuklarda exendin-4'ün jelde ilerlemediği gözlendi.



Şekil 4.28. Exendin-4 içeren formülasyon bileşenlerinin ayrı ayrı jele yüklenmesi

4.9. Formülasyonların Hücre Canlılığına Etkisinin MTT testi ile Değerlendirilmesi

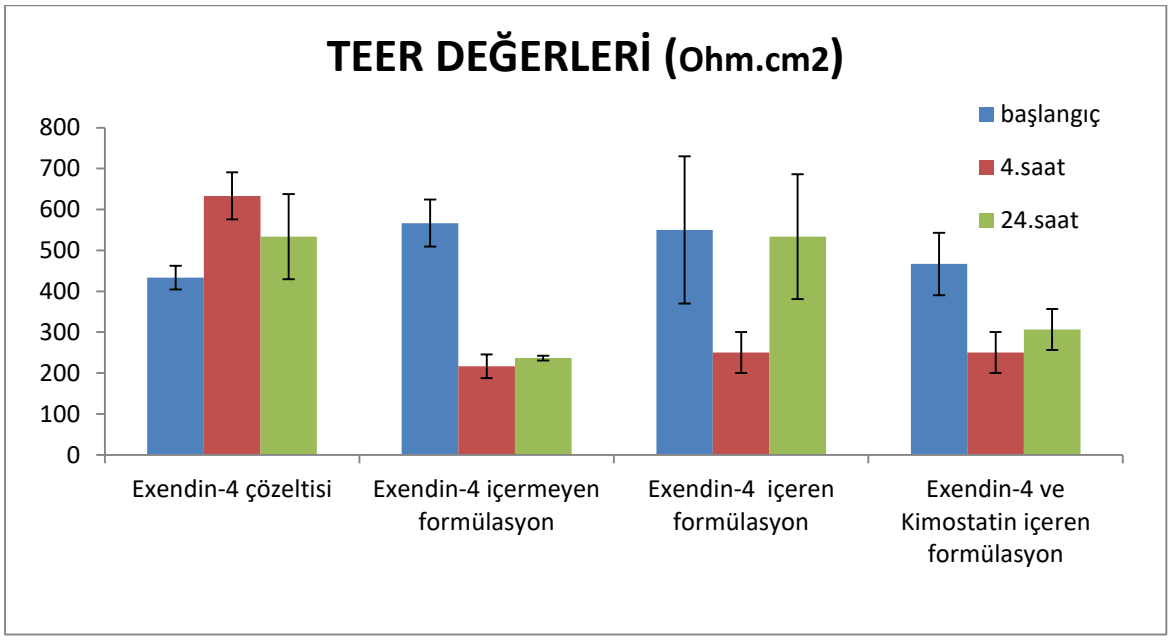
SNEDDS formülasyonlarının hücre canlılığına etkisi MTT testi ile Bölüm 3.2.10'da anlatıldığı gibi yapıldı. 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL, 125 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL, 750 ng/mL, 1000 ng/mL konsantrasyonlarda exendin-4 çözeltilerinin, exendin-4 içermeyen formülasyonun, 50 ng/mL exendin-4 yüklü formülasyonun, 50 ng/mL exendin-4 ve 2,5 ng/mL kimostatin yüklü formülasyonun 24. saat sonunda hücre canlılığına etkisi Şekil 4.29'da gösterilmektedir. 25-1000 ng/mL konsantrasyon aralığındaki exendin-4 çözeltilerinin, exendin-4 içermeyen formülasyonun, 50 ng/mL exendin-4 yüklü formülasyonun, 50 ng/mL exendin-4 ve 2,5 ng/mL kimostatin yüklü formülasyonun Caco-2 hücrelerine sitotoksik etkisi gözlenmedi.



Şekil 4.29. Exendin-4 çözeltilerinin, exendin-4 yüklenmemiş boş formülasyonun, 50 ng/mL exendin-4 yüklü formülasyonun, 50 ng/mL exendin-4 ve 2,5 ng/mL kimostatin yüklü formülasyonun hücre canlılığına etkisi

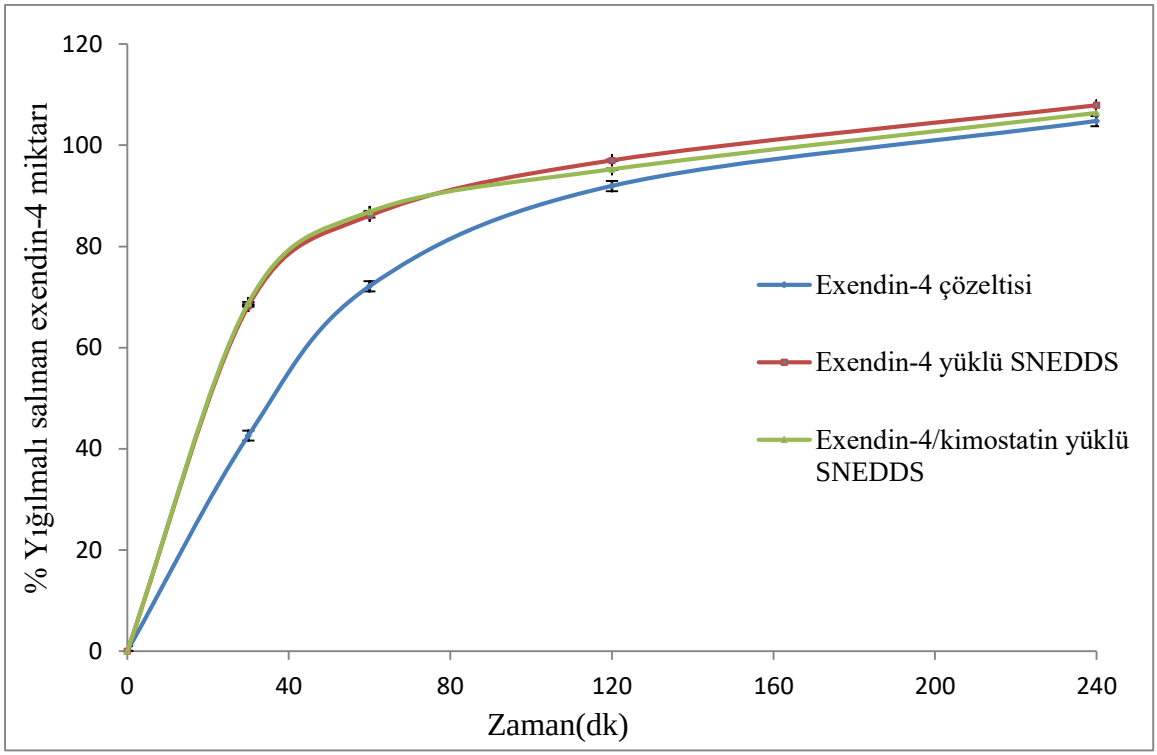
4.10. Hücrelerin Bütünlüğünün Değerlendirilmesi ve Geçiş Çalışmaları

Bölüm 3.2.11'de anlatıldığı gibi formülasyonların hücrelere uygulandıktan sonra hücrelerin bütünlüğüne etkisinin değerlendirilmesi ve intestinal geçiş çalışmaları yapıldı. Hücre tek tabakalarının TEER değerleri 21.günde 400-600 ohm.cm^2 aralığında bulundu. Hücre bütünlüğü değerlendirilmesi için deneyin başlangıcında, deneyin sonunda ve 24.saatin sonunda ölçülen TEER değerlerinin değişimi Şekil 4.30'da gösterilmektedir.



Şekil 4.30. Hücre bütünlüğü değerlendirilmesi için deneyin başlangıcında, deneyin sonunda ve 24. saatin sonunda ölçülen TEER değerleri (ohm.cm^2)

Formülasyonlar uygulandıktan 4.saatin sonunda TEER değerlerinin azaldığı görüldü. 24.saatin sonunda ise TEER değerleri 4.saate göre tekrar artış gösterdi. Sıkı bağlantıların geri dönüşümlü olarak açıldığı ve membran bütünlüğüne zarar vermediği bu sonuçlara göre anlaşılmaktadır. Geçiş çalışmaları süresince exendin-4 çözeltisinden, 50 ng/mL exendin-4 yüklü SNEDDS, 50 ng/mL exendin-4 ve 2,5 ng/mL kimostatin yüklü SNEDDS'den zamana karşı hücre tek tabasından geçen % yığılmalı exendin-4 miktarları ve permeabilite katsayıları (P_{app}) Şekil 4.31 ve Çizelge 4.24'te gösterilmektedir.



Şekil 4.31. Exendin-4 çözeltisi ve formülasyonlardan zamana karşı hücre tek tabasından geçen % yığılmalı exendin-4 miktarları

Exendin-4 yüklü ve exendin-4/kimostatin yüklü H5 formülasyonlarında exendin-4 çözeltisine göre permeabilite katsayısı (P_{app}) 2 kat daha yüksek bulundu.

Çizelge 4.24. Exendin-4 çözeltisi, exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin permeabilite değerleri

Deney Grupları	P_{app} x10^{-5} (cm/sn)
Exendin-4 çözeltisi	8,57±0,03
Exendin-4 yüklü SNEDDS	16,27±0,04
Exendin-4/Kimostatin yüklü SNEDDS	17,10±0,04

4.11. *İn Vivo* Çalışmalar

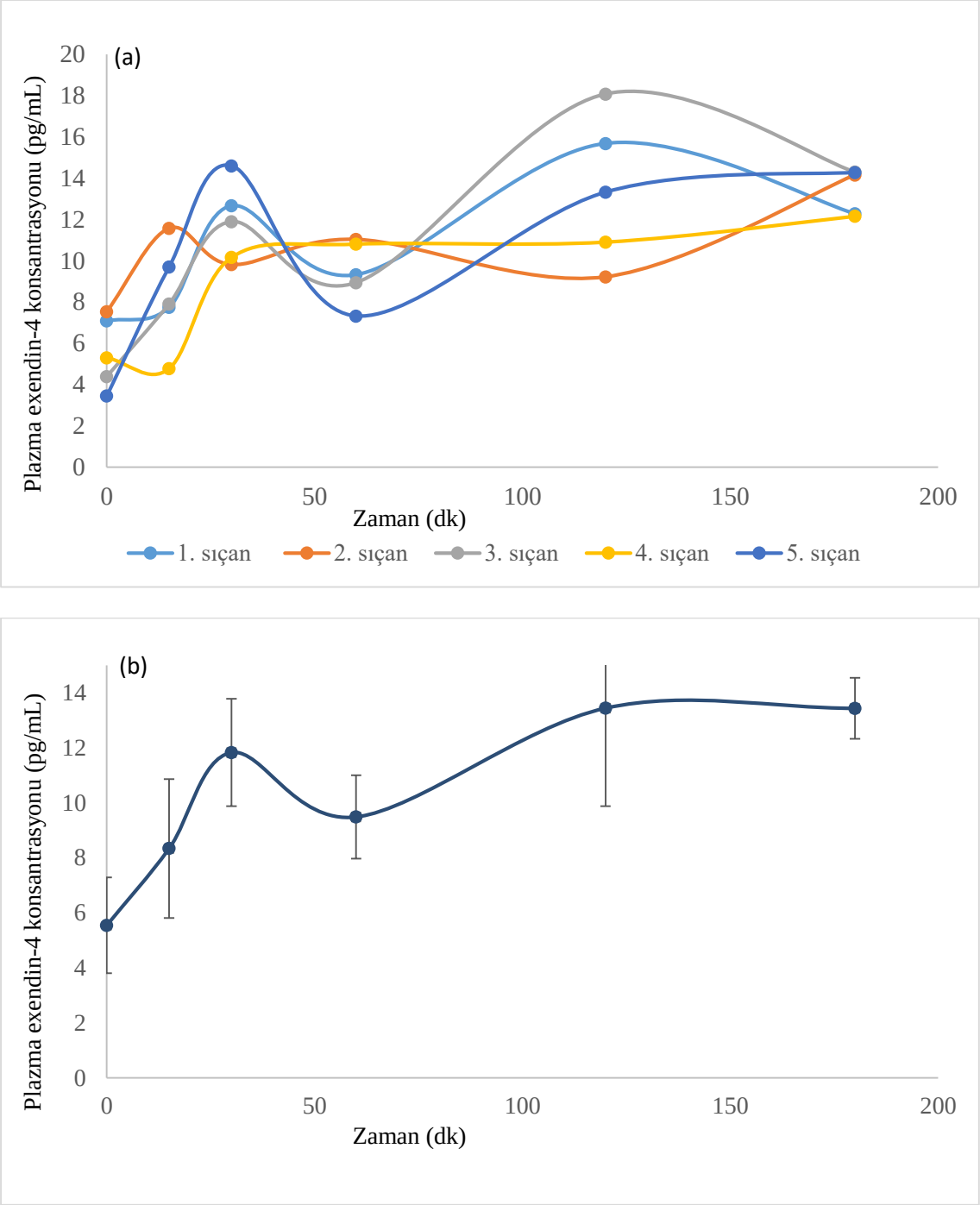
Farmakokinetik ve farmakodinamik olmak üzere iki bölümden oluşan *in vivo* çalışmalar Bölüm 3.2.12'de belirtildiği şekilde diyabetik olmayan ve streptozosinle diyabet oluşturulmuş sıçanlarda gerçekleştirildi. Geliştirilen SNEDDS formülasyonlarının kan glikoz ve plazma insülin seviyesi üzerine olan etkileri incelendi.

4.11.1. Farmakokinetik çalışmalar

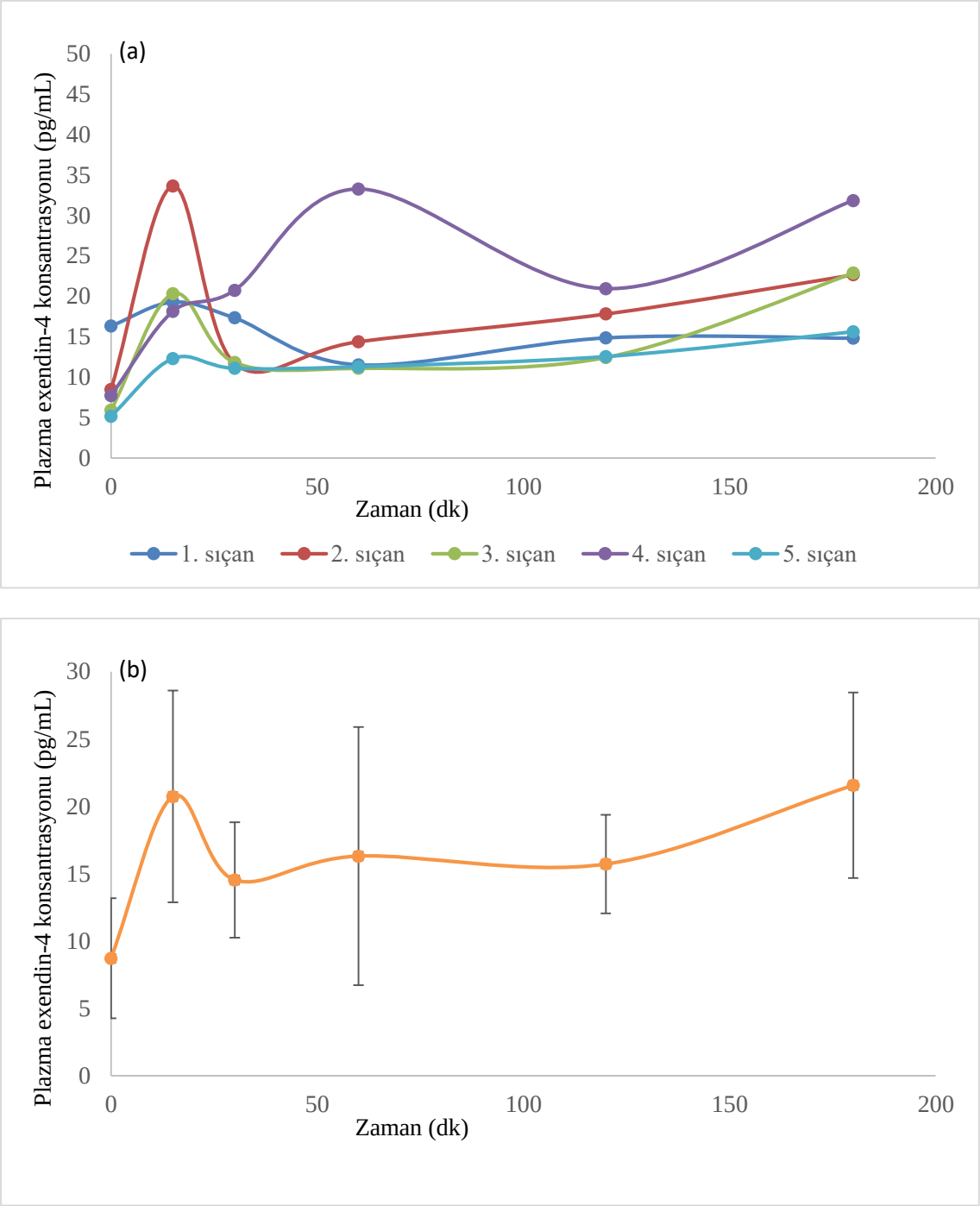
Bölüm 3.2.11'de belirtildiği şekilde *in vivo* farmakokinetik çalışmalar diyabetik olmayan ve diyabetik sıçanlarda yapıldı.

Diyabetik olmayan sıçanlarda farmakokinetik çalışmalar

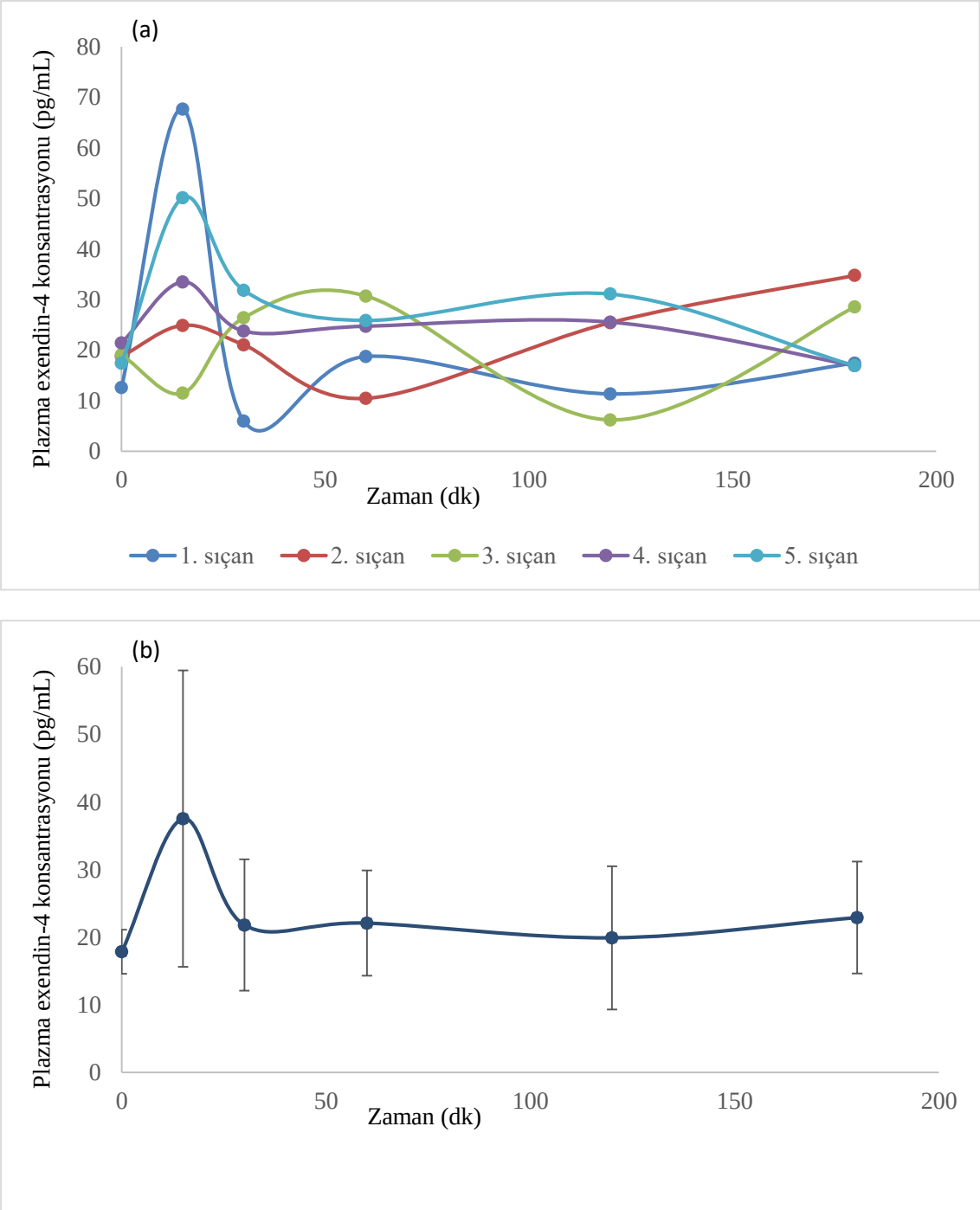
Çizelge 3.4'de verilen deney tasarımına göre exendin-4 çözeltisi (oral), Byetta® (sc), exendin-4 ve exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS (oral) uygulanan diyabetik olmayan sıçan gruplarından kan örnekleri alındı. Exendin-4 plazma konsantrasyonları ELISA kitiyle ölçüldü. Farmakokinetik çalışmalar esnasında deney gruplarında sıçan ölümlerinin gerçekleşmesine bağlı olarak sonuçlar herbir grupta n=5 olarak değerlendirildi. Exendin-4 çözelti (oral) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.32'de, exendin-4 SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen ve exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.33'te, exendin-4/kimostatin SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen ve exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.34'de, Byetta® (sc) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.35'te, diyabetik olmayan sıçanlarda tüm gruplara ait exendin-4 plazma konsantrasyon zaman profilleri Şekil 4.36'da gösterilmiştir.



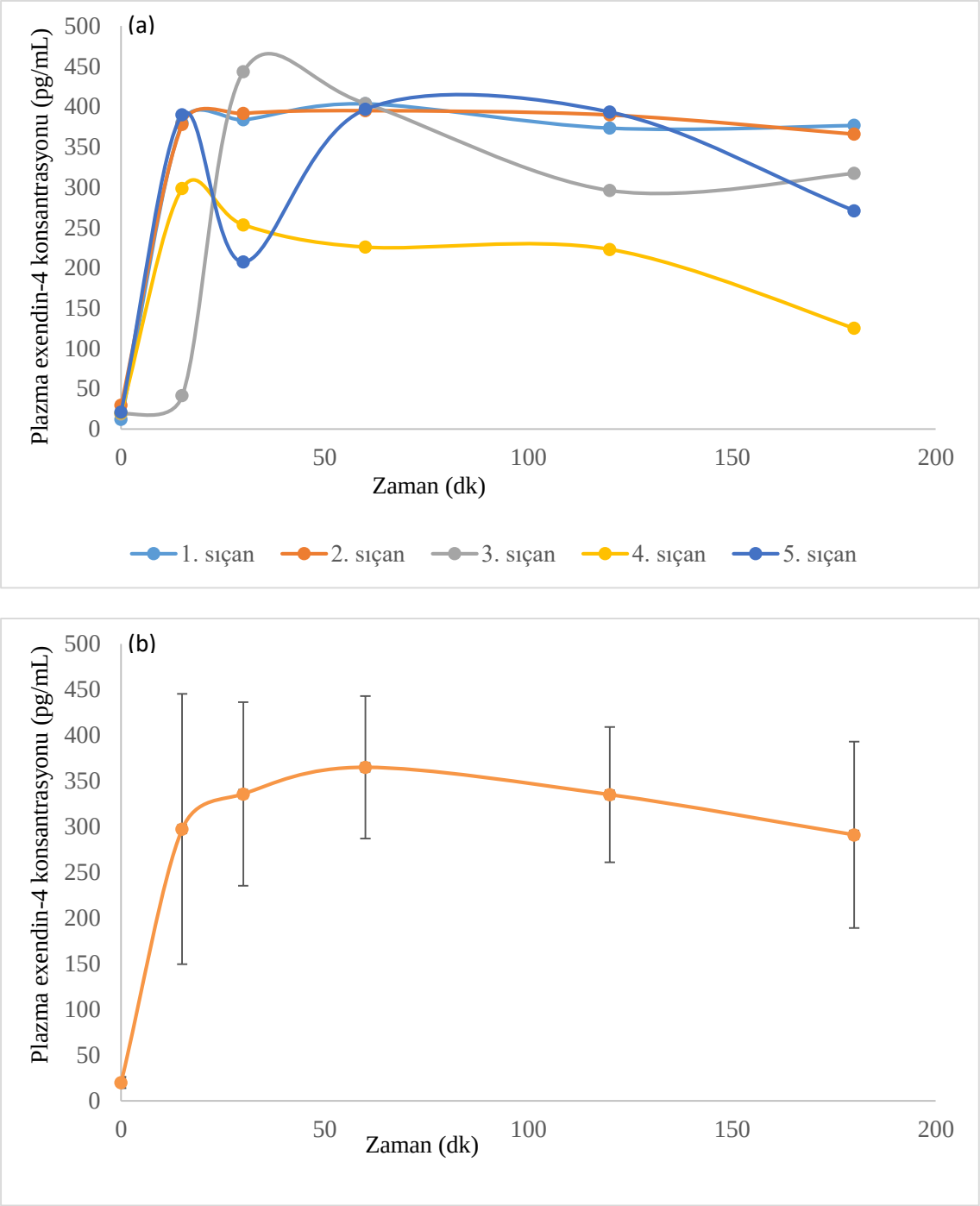
Şekil 4.32. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4 çözelti (oral) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



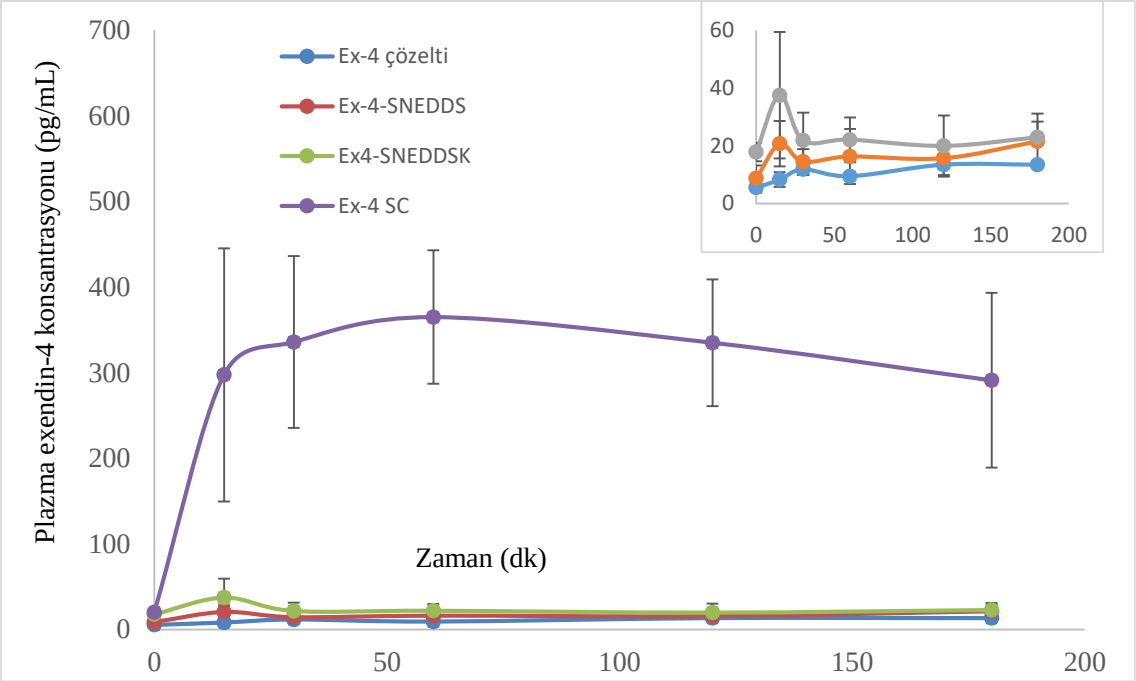
Şekil 4.33. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4 SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4 plazma konsantrasyon zaman profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



Şekil 4.34. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4/kimostatin SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



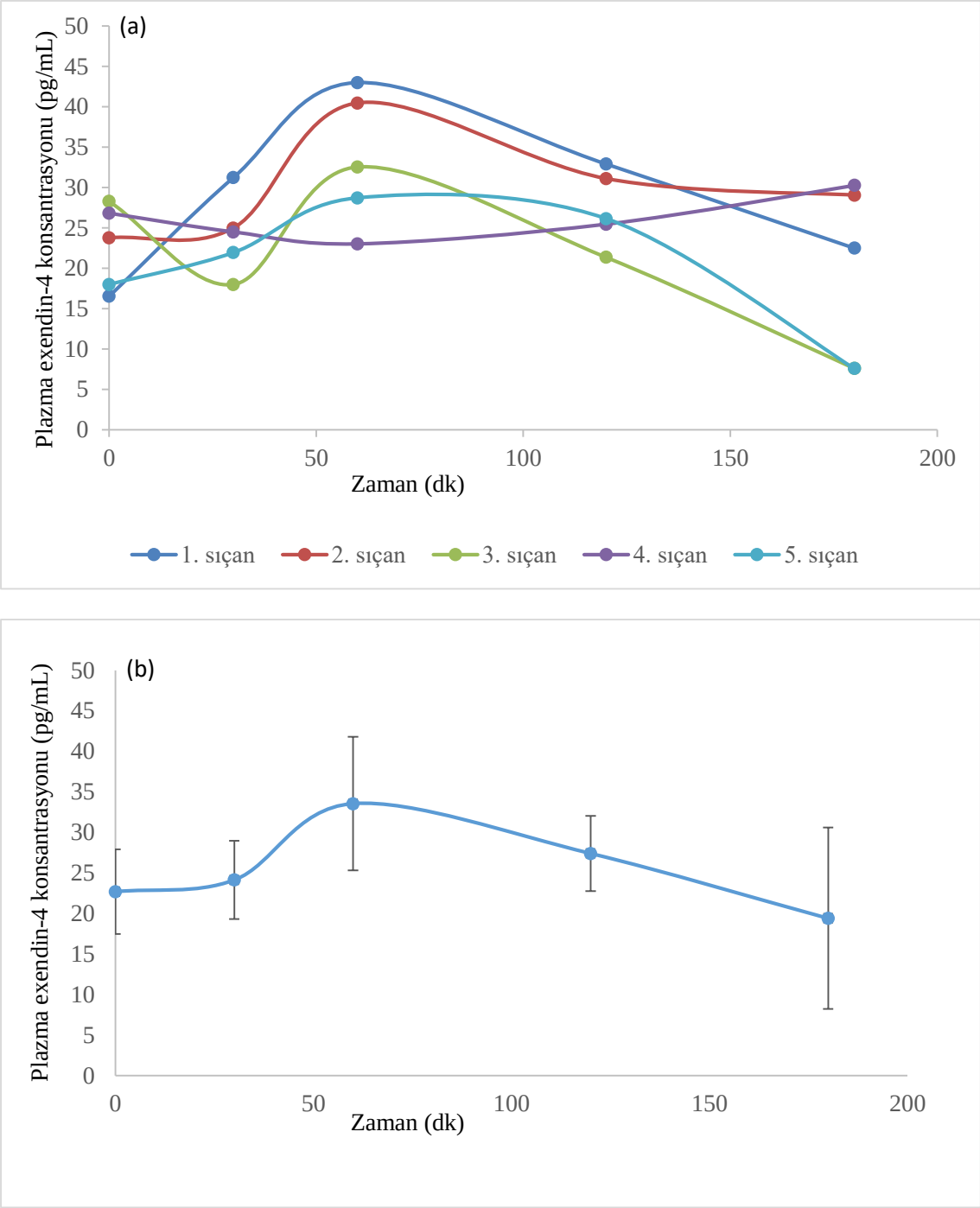
Şekil 4.35. Diyabetik olmayan sıçanlara Byetta® (sc) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



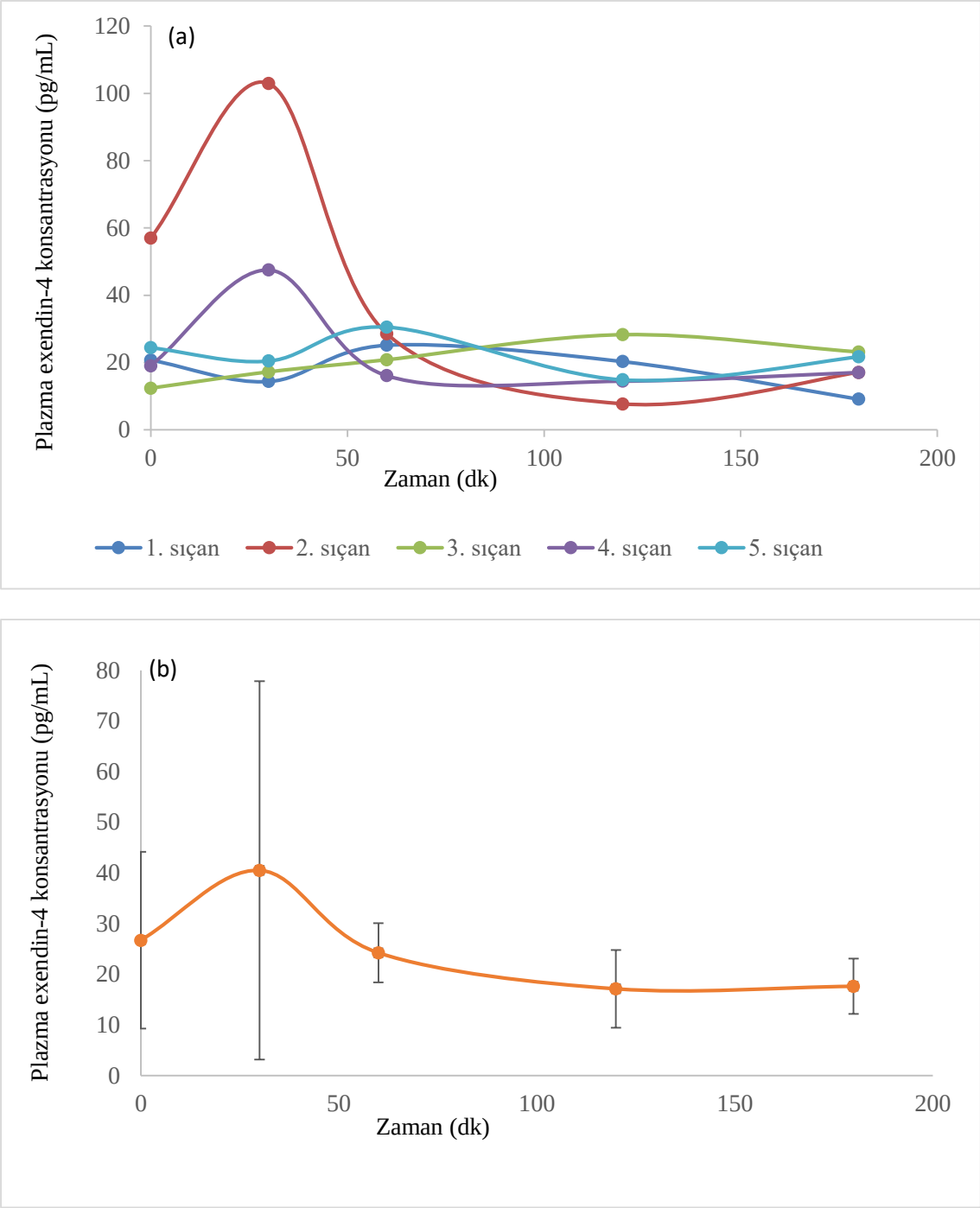
Şekil 4.36. Diyabetik olmayan sıçanlara ait exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profili

Diyabetik sıçanlarda farmakokinetik çalışmalar

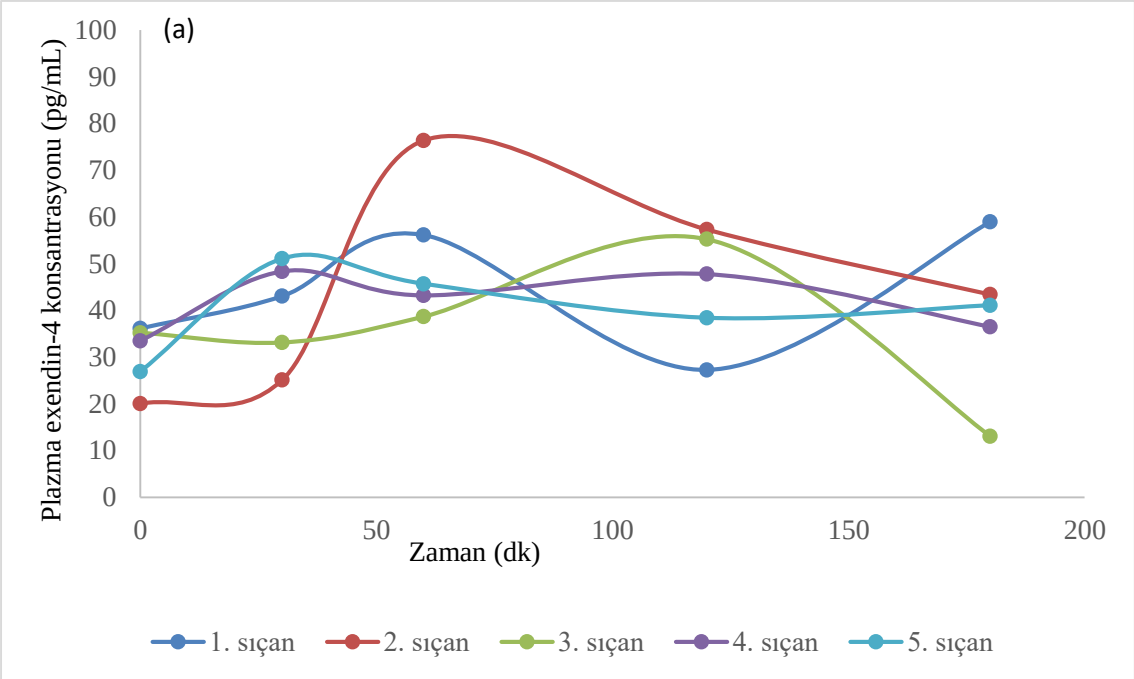
Çizelge 3.4'de verilen deney tasarımına göre exendin-4 çözeltisi (oral), Byetta® (sc), exendin-4 ve exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS (oral) uygulanan diyabetik sıçan gruplarından kan örnekleri alındı. Exendin-4 Plazma konsantrasyonları ELISA kitiyle ölçüldü. Farmakokinetik çalışmalar esnasında deney gruplarında sıçan ölümlerinin gerçekleşmesine bağlı olarak sonuçlar herbir grupta n=5 olarak değerlendirildi. Exendin-4 çözelti (oral) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.37'de, exendin-4 SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen ve plazma exendin-4-konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.38'de, exendin-4/kimostatin SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen ve exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.39'da, Byetta® (sc) uygulamasından sonra elde edilen plazma exendin-4 konsantrasyon-zaman profilleri Şekil 4.40'da, diyabetik olmayan sıçanlarda tüm gruplara ait exendin-4 plazma konsantrasyon zaman profilleri Şekil 4.41'de gösterilmiştir.

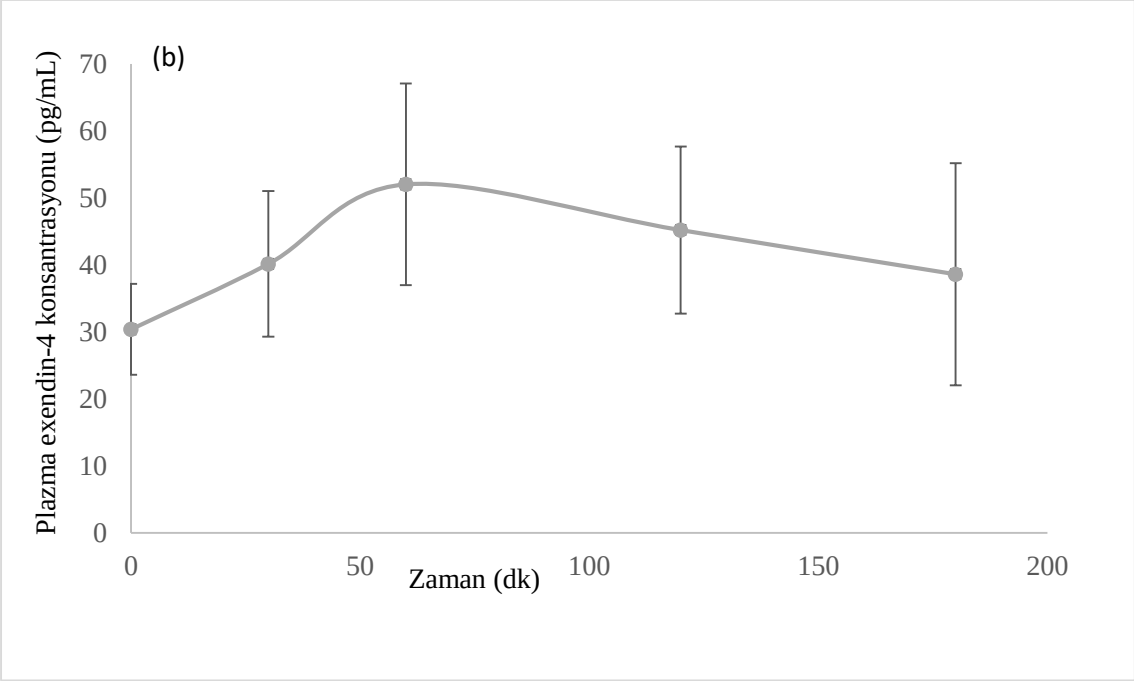


Şekil 4.37. Diyabetik sıçanlara exendin-4 çözelti (oral) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4 plazma konantrasyon zaman profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)

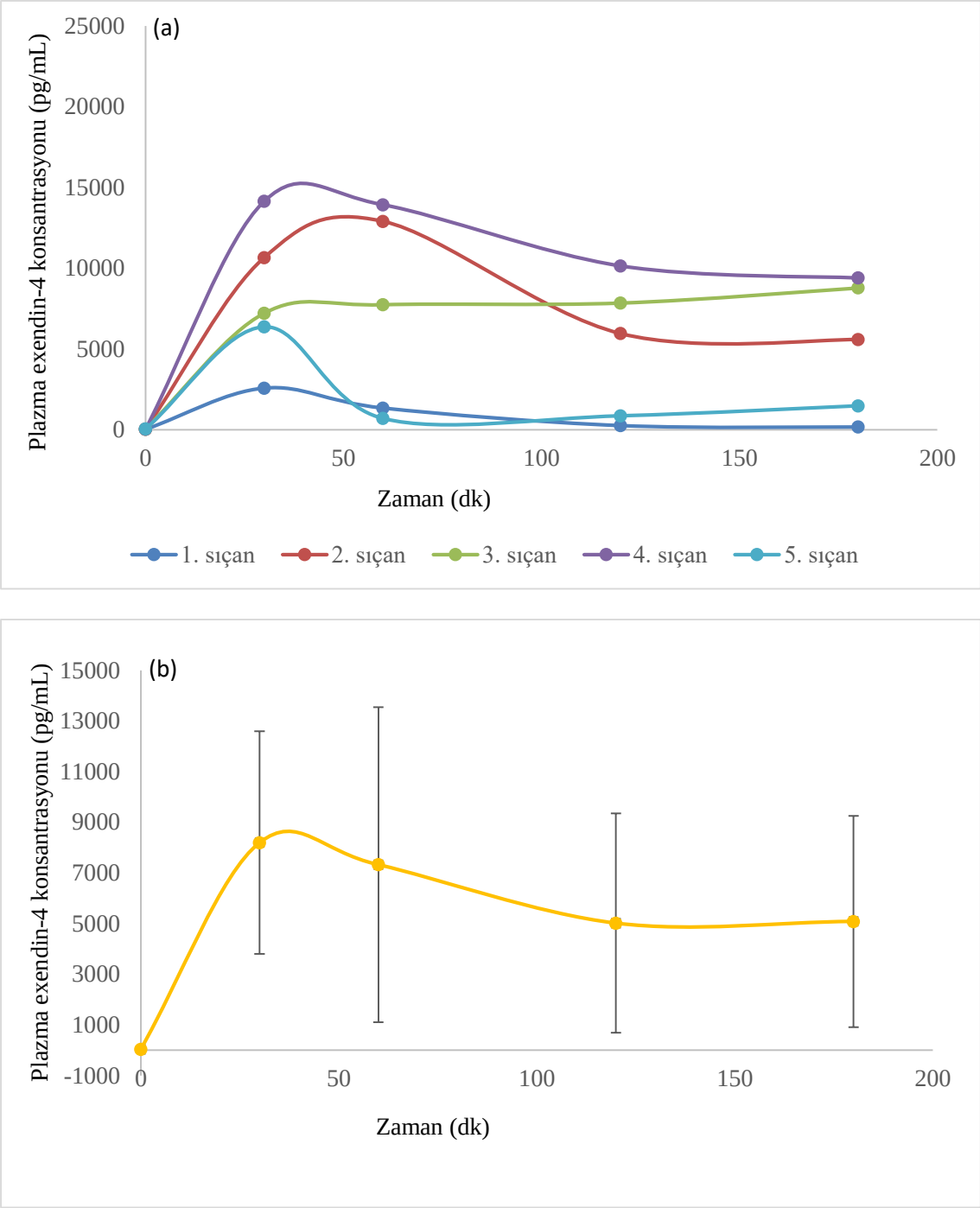


Şekil 4.38. Diyabetik sıçanlara exendin-4 SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)

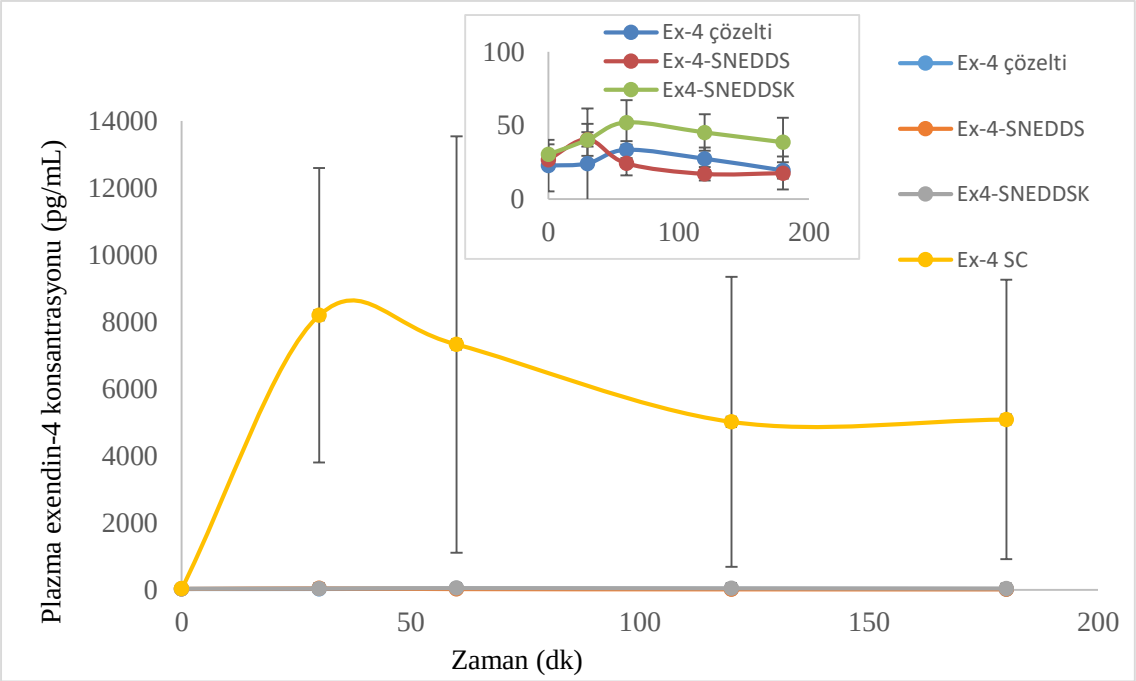




Şekil 4.39. Diyabetik sıçanlara exendin-4/kimostatin SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profilleri (a) her bir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



Şekil 4.40. Diyabetik sıçanlara Byetta® (sc) uygulamasından sonra elde edilen exendin-4-plazma konsantrasyon-zaman profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



Şekil 4.41. Diyabetik sıçanlara ait exendin-4 plazma konsantrasyon-zaman profili

Diyabetik olmayan ve diyabetik sıçanlarda exendin-4'ün farmakokinetik parametreleri Çizelge 4.25'de, % bağıl biyoyararlanım sonuçları ise Çizelge 4.26'da gösterilmiştir.

Diyabetik olmayan sıçanlarda exendin-4 SNEDDS formülasyonu exendin-4 çözeltisine kıyasla C_{maks} ve AUC_{0-3} değerlerini sırasıyla 1,9 kat ve 1,46 kat artırdığı bulundu. Exendin-4/kimostatin SNEDDS'in ise exendin-4 çözeltiye kıyasla C_{maks} ve AUC_{0-3} değerlerini sırasıyla 2,66 ve 2,3 kat artırdığı bulundu. Bölüm 3.2.12'de belirtildiği şekilde "Eş 3.2"ye göre hesaplanan Exendin-4 çözelti, exendin-4 SNEDDS ve exendin-4/kimostatin SNEDDS'in Byetta®'ya göre bağıl biyoyararlanımı ise sırasıyla %3,603±0,016, %5,272±0,076 ve %8,305±0,218 bulundu (Çizelge 4.26). ***Diyabetik sıçanlarda*** ise exendin-4 SNEDDS formülasyonu exendin-4 çözeltisine kıyasla C_{maks} ve AUC_{0-3} değerlerini sırasıyla 1,3 kat ve 0,8 kat artırdığı bulundu. Exendin-4/kimostatin SNEDDS'in ise exendin-4 çözeltiye kıyasla C_{maks} ve AUC_{0-3} değerlerini sırasıyla 1,59 ve 1,58 kat artırdığı bulundu. Diyabetik sıçanlara uygulanan exendin-4/kimostatin SNEDDS, oral uygulanan exendin-4'ü GİK'teki enzim etkisinden koruyarak hem C_{maks} hem de AUC_{0-3} değerlerinde exendin-4 SNEDDS uygulanan gruba göre artış sağlamıştır. Exendin-4 çözelti, exendin-4 SNEDDS ve exendin-4/kimostatin SNEDDS'in Byetta®'ya göre bağıl biyoyararlanımı ise sırasıyla %0,485±0,086, % 0,396±0,149 ve % 0,765±0,109 bulundu (Çizelge 4.26).

Çizelge 4.25. Diyabetik olmayan ve diyabetik sıçanlarda exendin-4'ün farmakokinetik parametreleri (ort ± ss) (n=5)

Deney Grupları		k_d (1/dk)	$t_{1/2}$ (dk)	t_{maks} (dk)	C_{maks} (pg/mL)	AUC $_{0-3}$ (pg.dk/mL)	MRT (dk)	Vd (mL)	CI (mL/ dk)
Diyabetik olmayan sıçanlar	Exendin-4 çözelti (oral)	*	*	126,0± 61,5	14,9± 2,2	2069,2± 196,7	*	*	*
	Exendin-4 SNEDDS (oral)	0,001± 0,000	1275,896± 889,979	90,000± 84,187	28,469± 6,859	3027,496± 905,490	1868,784±1302,721	1,081± 0,472	0,001± 0,001
	Exendin-4/kimostatin SNEDDS (oral)	0,004±0,001	494,666± 171,138	30,000± 18,371	39,713± 15,721	4769,279± 2602,870	627,458± 629,556	0,706±0,293	0,002± 0,001
	BYETTA® (sc)	0,002± 0,001	535,100± 476,502	45,000± 21,213	387,402± 53,532	57426,778± 11935,020	790,712± 682,463	0,064± 0,012	0,002± 0,001
Diyabetik sıçanlar	Exendin-4 çözelti (oral)	0,008±0,004	147,345± 95,708	60,000± 0,000	36,379± 5,755	4991,263± 658,006	202,503± 128,782	0,438±0,133	0,003± 0,001
	Exendin-4 SNEDDS (oral)	0,008±0,004	110,871± 89,154	67,500± 29,400	46,873± 29,083	4071,559± 1141,273	167,684± 120,526	0,575± 0,189	0,004± 0,002
	Exendin-4/kimostatin SNEDDS (oral)	0,004±0,004	287,039± 210,437	84,000± 65,038	58,028± 11,035	7875,541± 835,048	428,254± 294,736	0,388±0,129	0,001± 0,000
	BYETTA® (sc)	0,009±0,006	107,084± 73,063	66,000± 65,038	8956,080± 4741,779	1029364, 903± 762420, 174	177,251± 104,790	0,004± 0,003	*

*: Hesaplanamadı.

Çizelge 4.26. Diyabetik olmayan ve diyabetik sıçanlarda % bağıl biyoyararlanım sonuçları

% BAĞIL BİYOYARARLANIM	
Diyabetik olmayan sıçanlar (n=5)	
	Referans (Byetta®)
Test	
Çözelti	3,603±0,016
SNEDDS	5,272±0,076
SNEDDSK	8,305±0,218
Diyabetik sıçanlar (n=5)	
	Referans (Byetta®)
Test	
Çözelti	0,485±0,086
SNEDDS	0,396±0,149
SNEDDSK	0,765±0,109

4.11.2. Farmakodinamik Çalışmalar

Bölüm 3.2.12'de belirtildiği şekilde *in vivo* farmakodinamik çalışmalar diyabetik olmayan ve diyabetik sıçanlarda yapıldı.

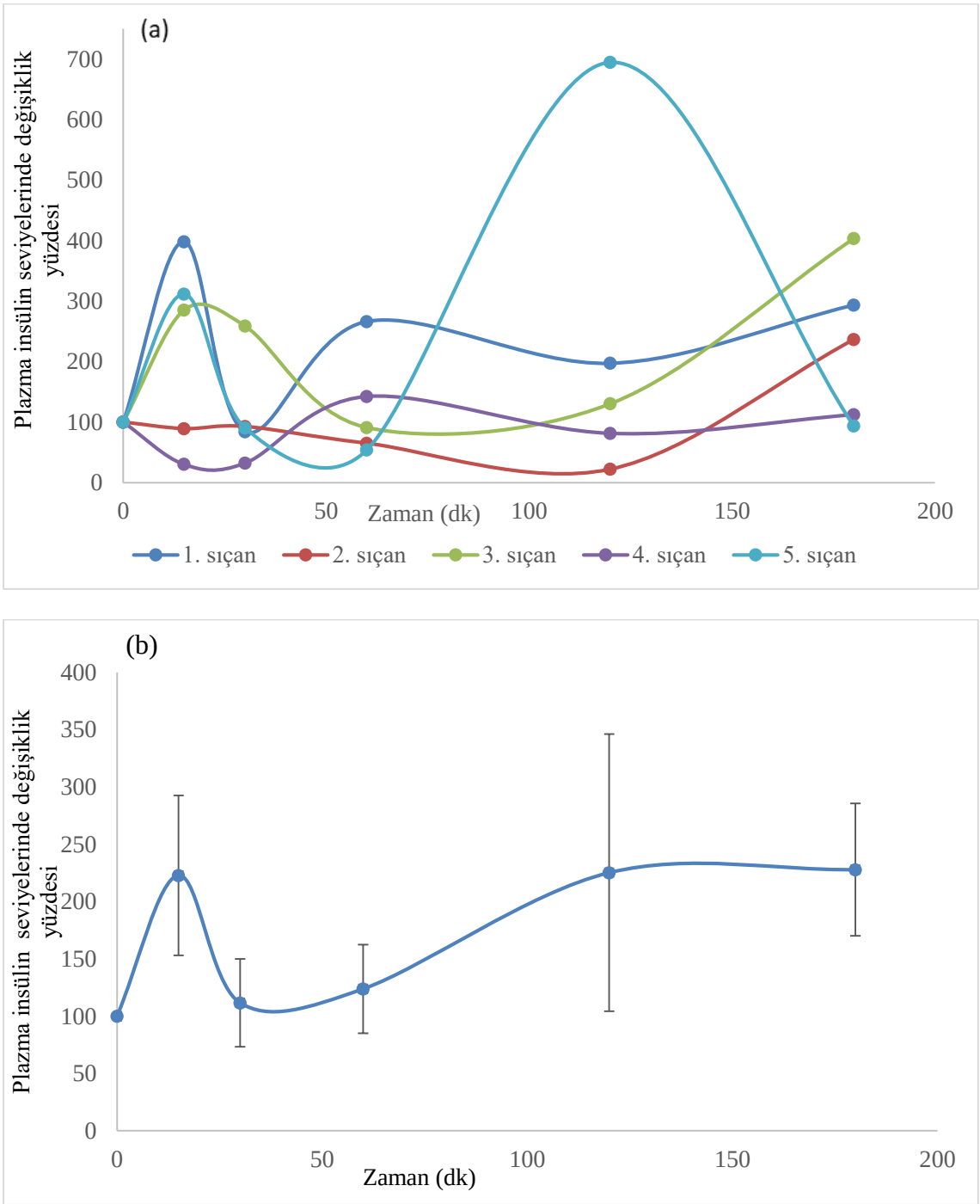
Diyabetik olmayan sıçanlarda farmakodinamik çalışmalar

Çizelge 3.4'de verilen deney tasarımına göre exendin-4 çözeltisi (oral), Byetta® (sc), exendin-4 ve exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS (oral) uygulanan diyabetik olmayan sıçan gruplarından kan örnekleri alındı. Farmakodinamik çalışmalar esnasında deney gruplarında sıçan ölümlerinin gerçekleşmesine bağlı olarak sonuçlar herbir grupta n=5 olarak değerlendirildi.

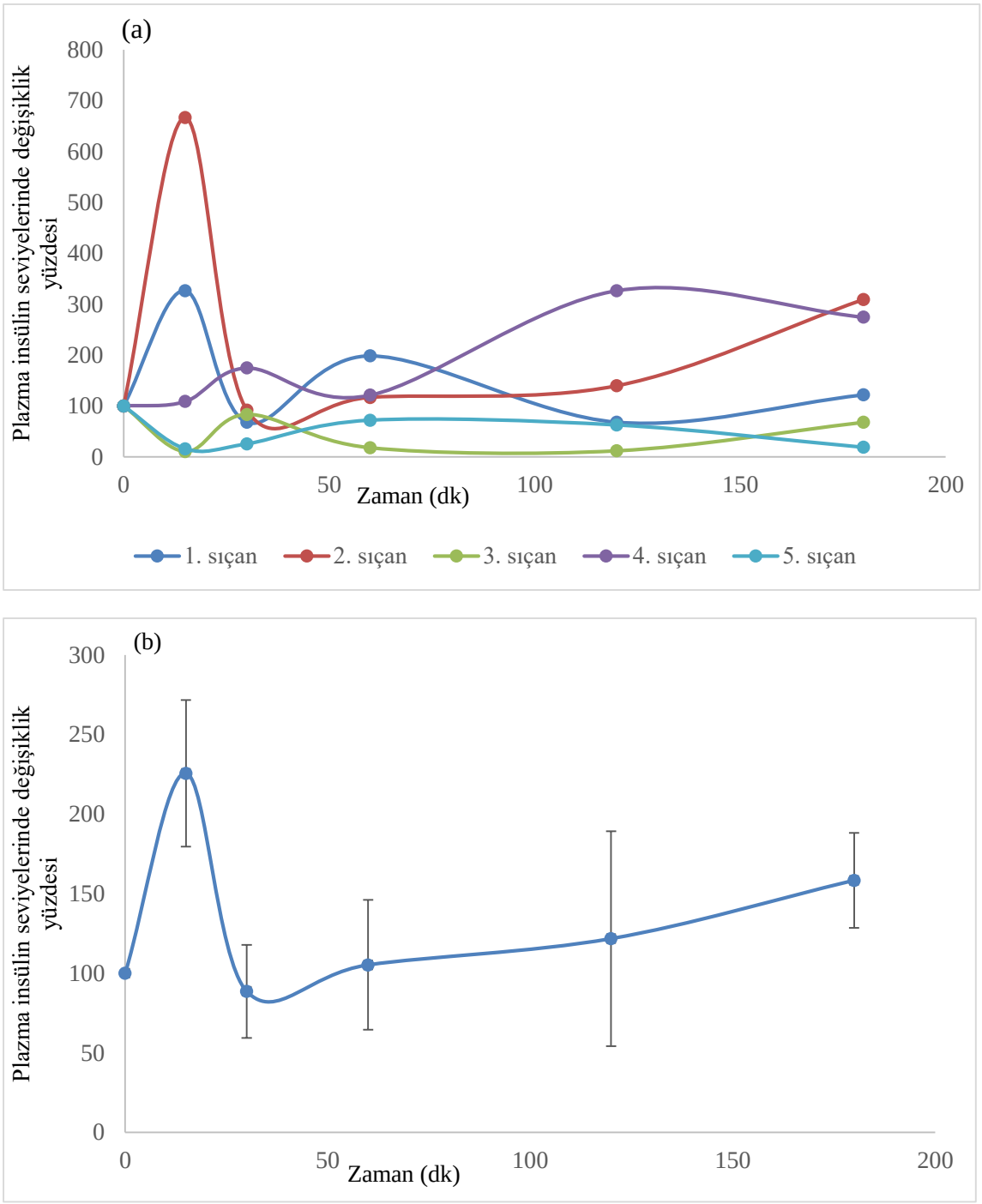
Diyabetik olmayan sıçanlarda plazma insülin seviyelerind değişiklik yüzdesi

Plazma insülin konsantrasyonları ELISA kitiyle ölçüldü. Exendin-4 çözelti (oral) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri Şekil 4.42'de, exendin-4 SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri Şekil 4.43'te, exendin-4/kimostatin SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen ve plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri Şekil 4.44'te, Byetta® (sc) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri Şekil 4.45'te, diyabetik olmayan sıçanlarda tüm

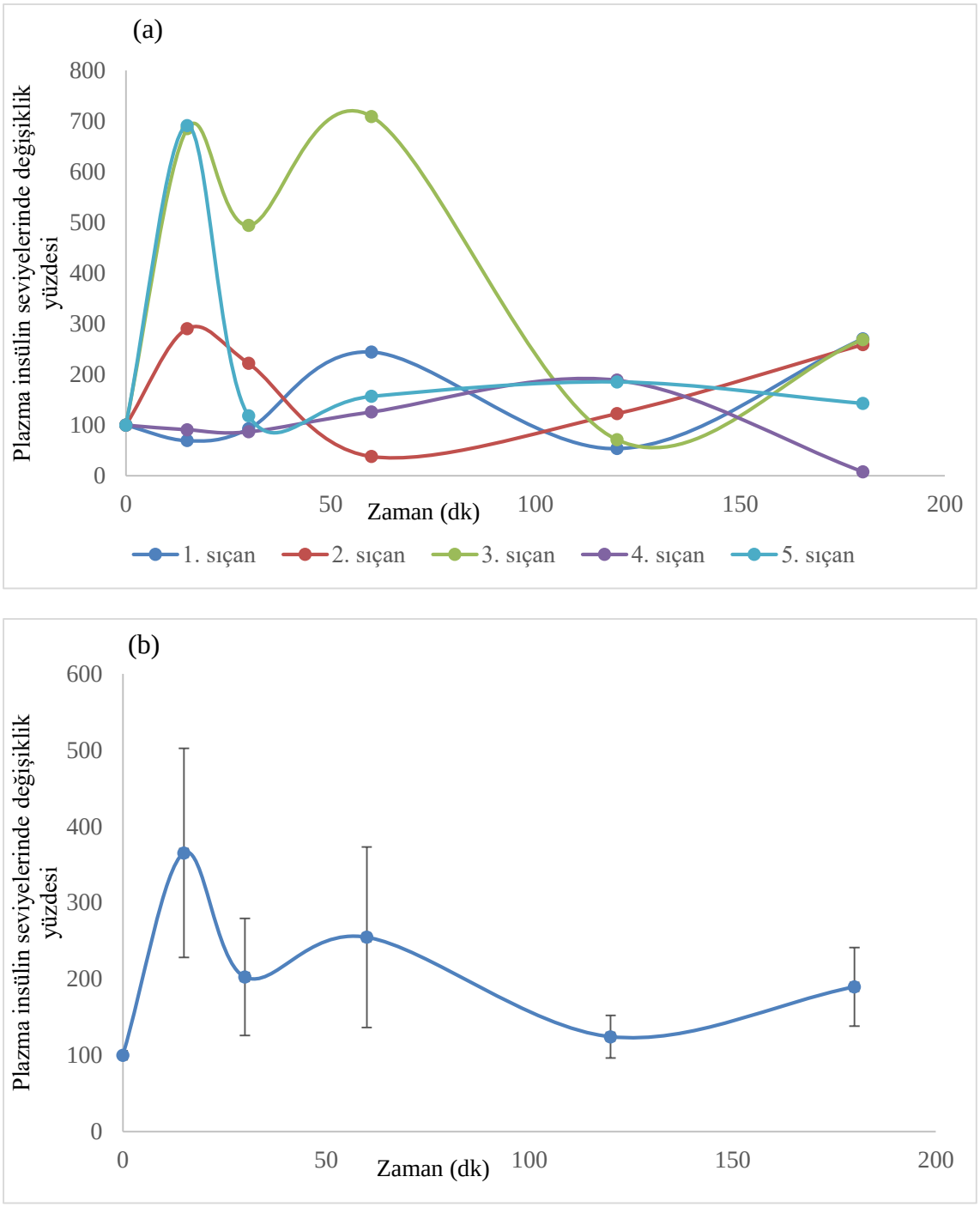
gruplara ait % plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri Şekil 4.46'da ve Çizelge 4.27'de gösterilmiştir.



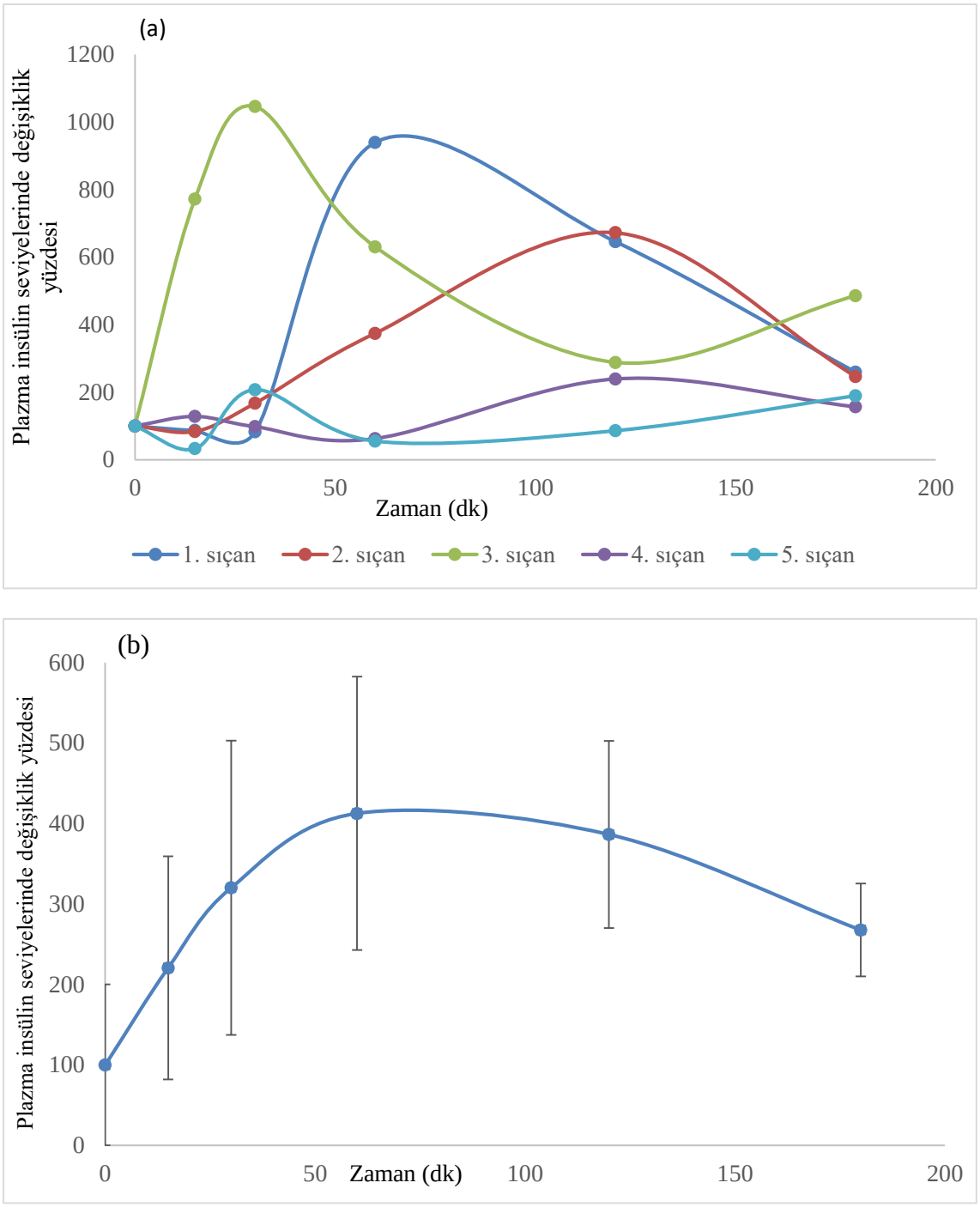
Şekil 4.42. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4 çözelti (oral) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



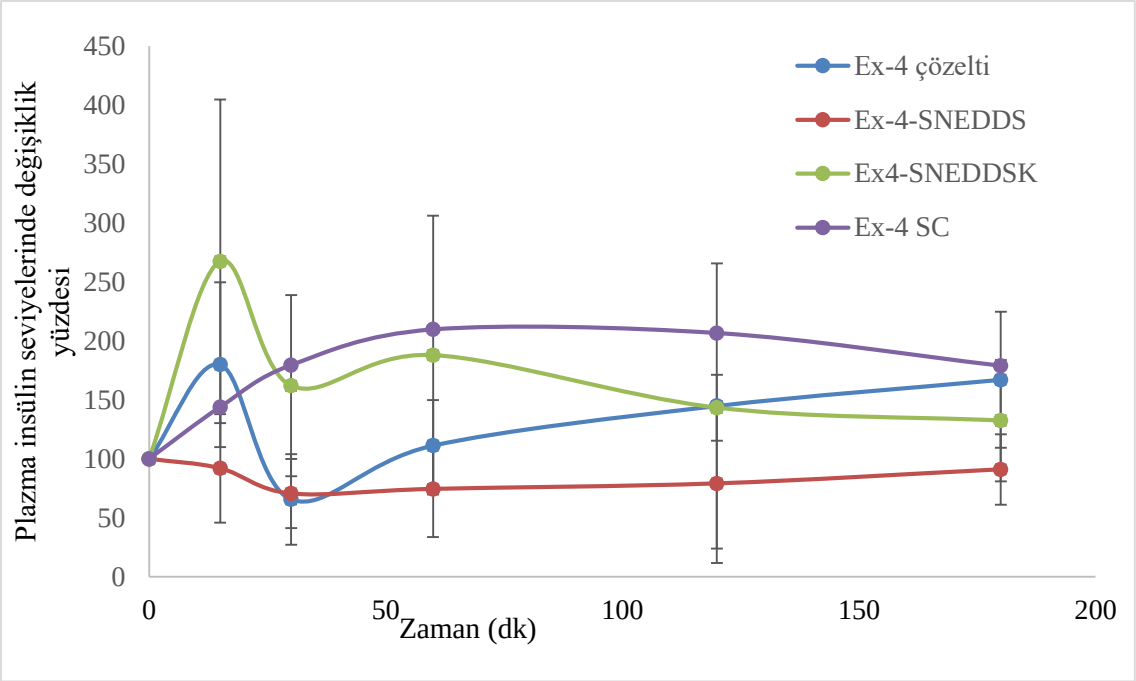
Şekil 4.43. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4 SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



Şekil 4.44. Diyabetik olmayan sıçanlara Exendin-4/kimostatin SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



Şekil 4.45. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4 çözelti (sc) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



Şekil 4.46. Diyabetik olmayan sıçanlara ait plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profili

Çizelge 4.27. Diyabetik olmayan sıçanlara ait plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi (ort±ss) (n=5)

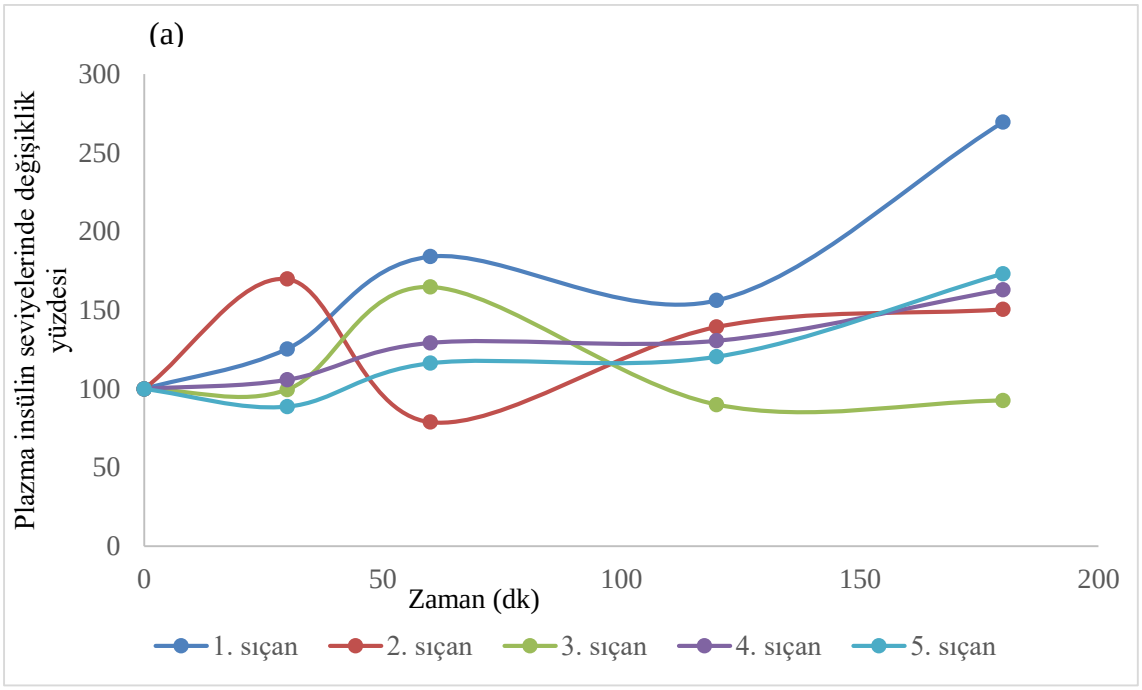
	Ex-4 çözelti	Ex-4-SNEDDS	Ex4-SNEDDSK	Byetta®
0	100,000 ±0,000	100,000 ±0,000	100,000 ±0,000	100,000 ±0,000
15	179,968±69,822	92,029±46,032	267,553±137,252	143,915±138,636
30	65,725±38,388	70,667±29,213	162,025±76,800	179,479±182,865
60	111,326±38,740	74,552±40,767	188,018±118,265	209,785±169,776
120	144,918±120,897	79,194±67,507	143,458±28,010	206,735±116,333
180	167,146±57,729	91,115±29,849	132,497±51,374	178,972±57,717

Diyabetik sıçanlarda farmakodinamik çalışmalar

Çizelge 3.4'de verilen deney tasarımına göre exendin-4 çözeltisi (oral), Byetta® (sc), exendin-4 ve exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS (oral) uygulanan diyabetik olmayan sıçan gruplarından kan örnekleri alındı. Farmakodinamik çalışmalar esnasında deney gruplarında sıçan ölümlerinin gerçekleşmesine bağlı olarak sonuçlar herbir grupta n=5 olarak değerlendirildi.

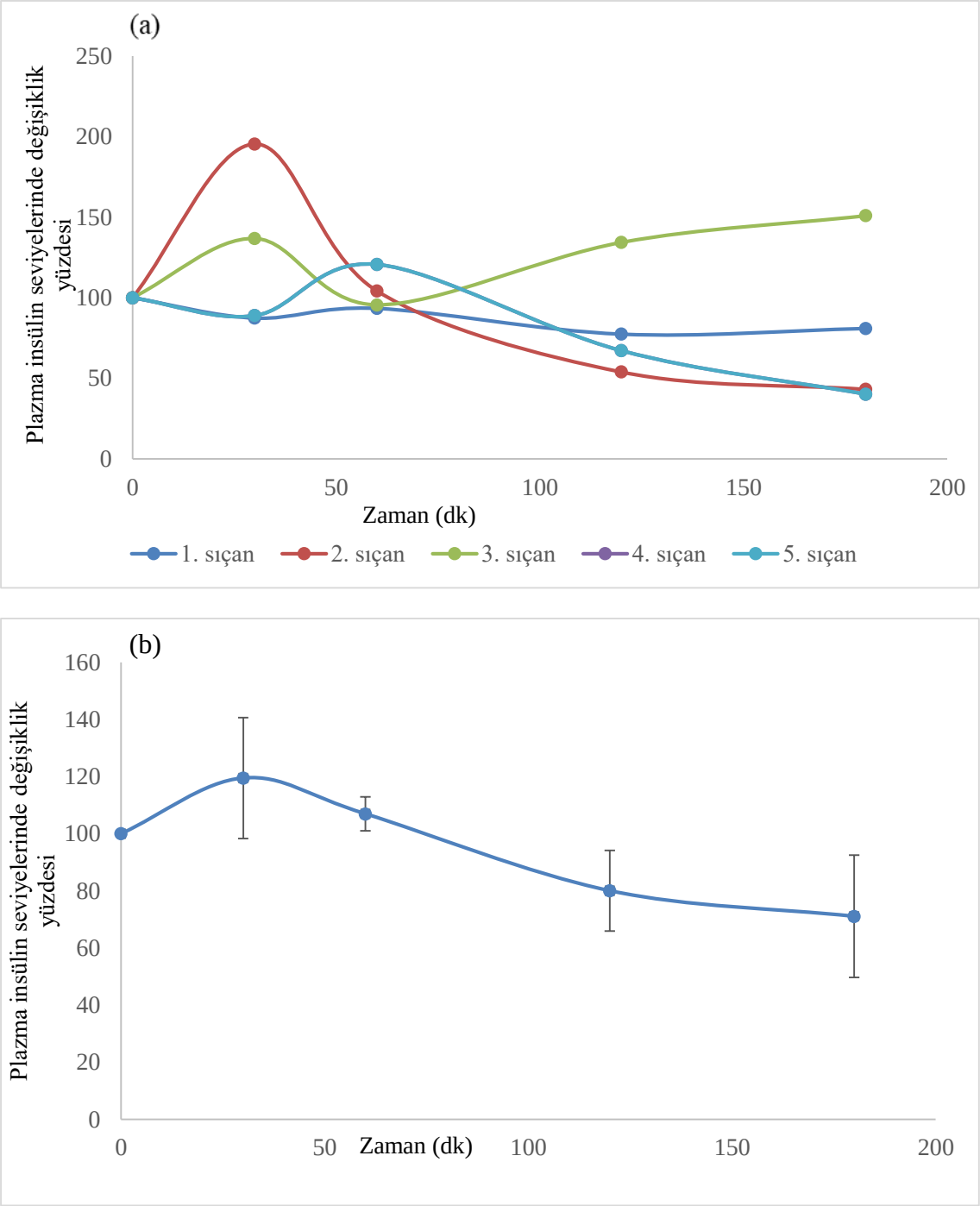
Diyabetik sıçanlarda plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi

Plazma insülin konsantrasyonları ELISA kitiyle ölçüldü. Exendin-4 çözelti (oral) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerindeki değişiklik yüzdesi profilleri Şekil 4.47'de, exendin-4 SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen ve plazma insülin seviyelerindeki değişiklik yüzdesi profilleri Şekil 4.48'de, exendin-4/kimostatin SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerindeki değişiklik yüzdesi Şekil 4.49'da, Byetta® (sc) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerindeki değişiklik yüzdesi profilleri Şekil 4.50'de, diyabetik sıçanlarda tüm gruplara ait plazma insülin seviyelerindeki değişiklik yüzdesi profilleri Şekil 4.51'de ve Çizelge 4.28'de gösterilmiştir.

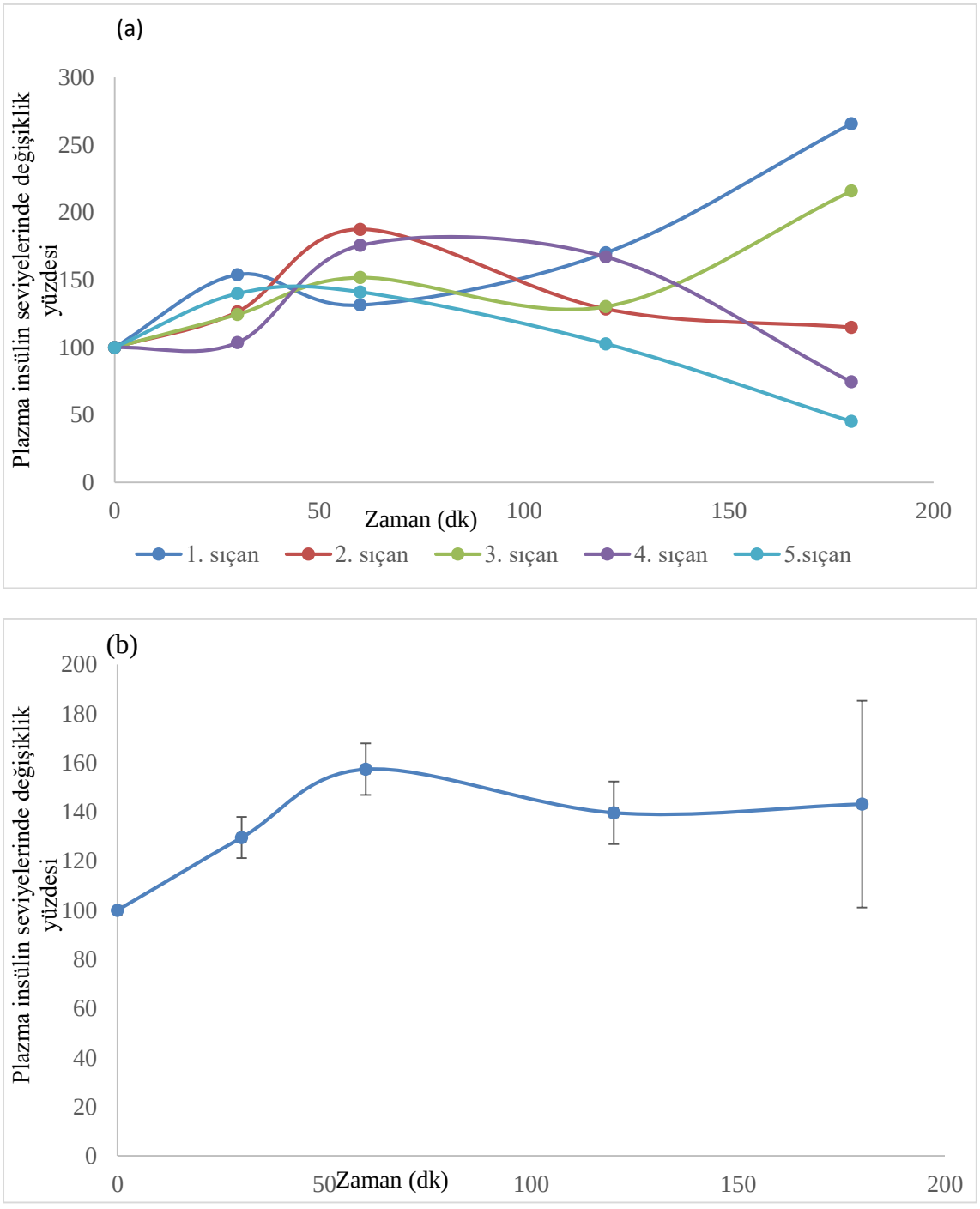




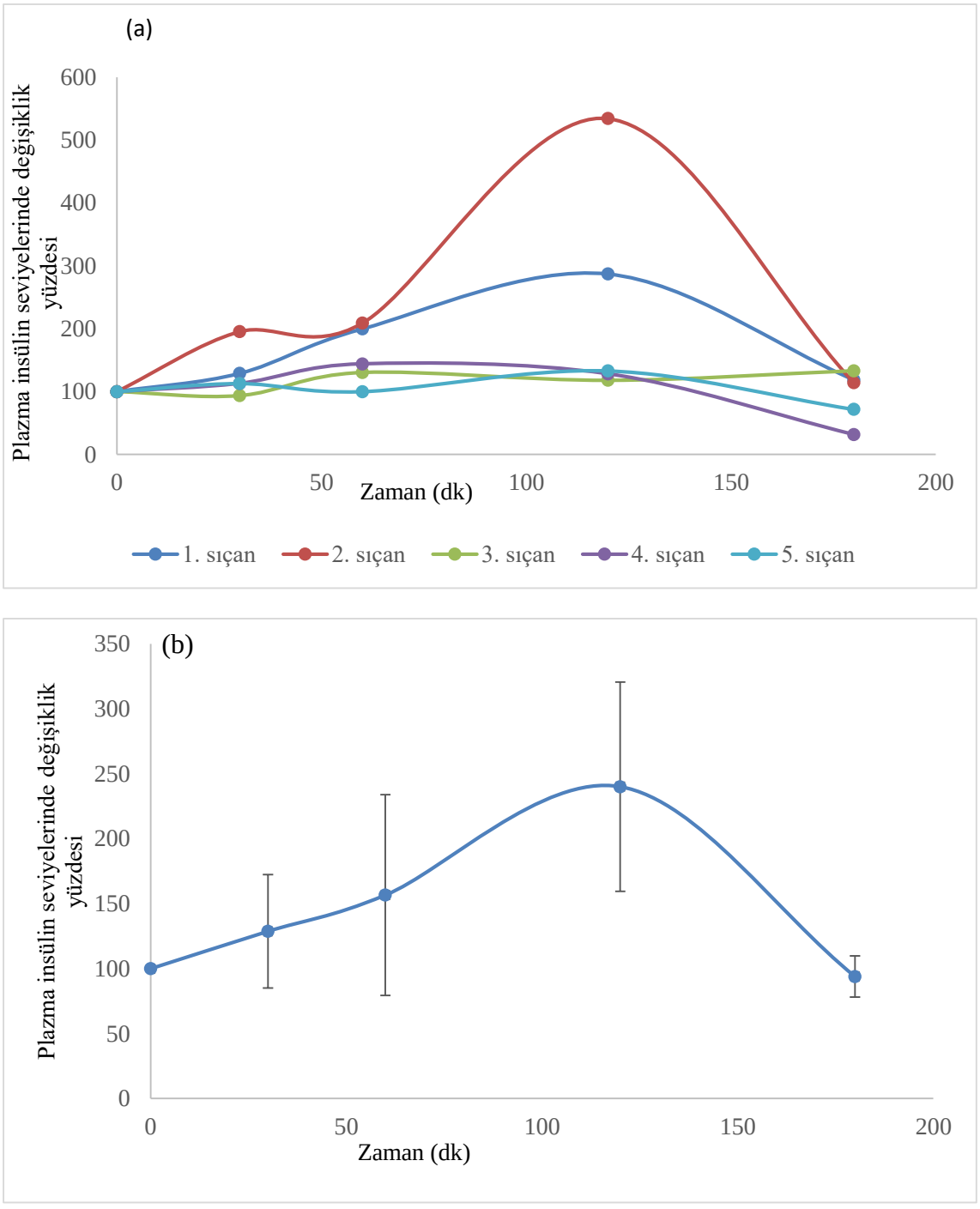
Şekil 4.47. Diyabetik sıçanlara exendin-4 çözelti (oral) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



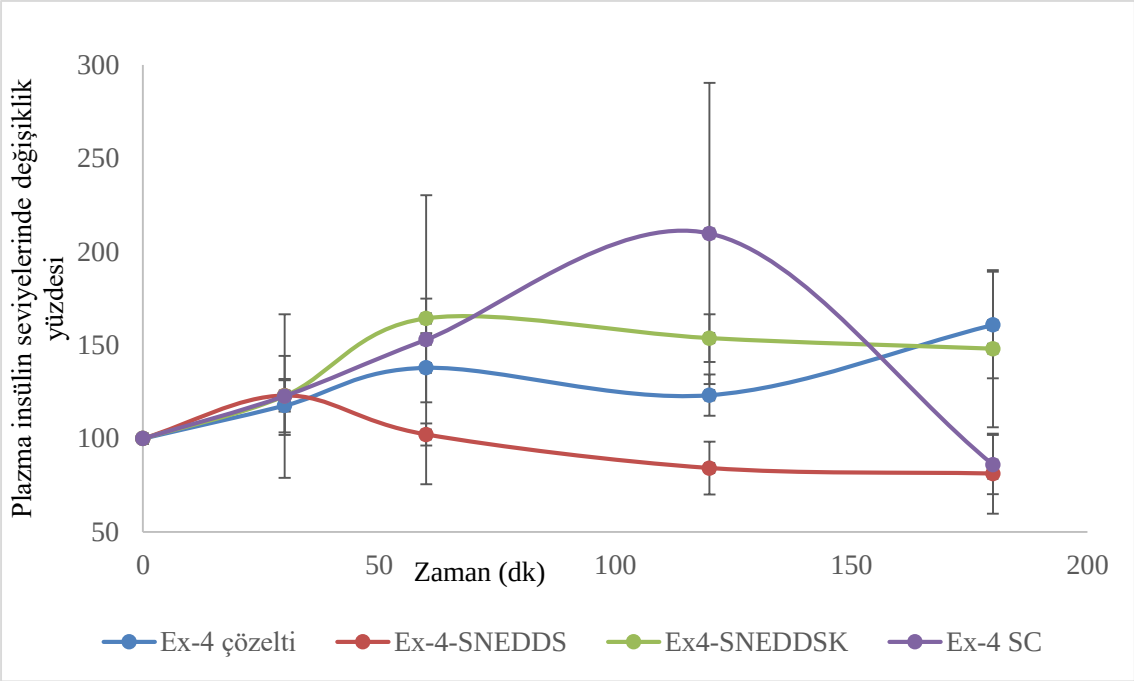
Şekil 4.48. Diyabetik sıçanlara exendin-4 SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



Şekil 4.49. Diyabetik sıçanlara exendin-4/kimostatin SNEDDS çözelti uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



Şekil 4.50. Diyabetik sıçanlara exendin-4 çözelti (sc) uygulamasından sonra elde edilen plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



Şekil 4.51. Diyabetik sıçanlara ait plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi

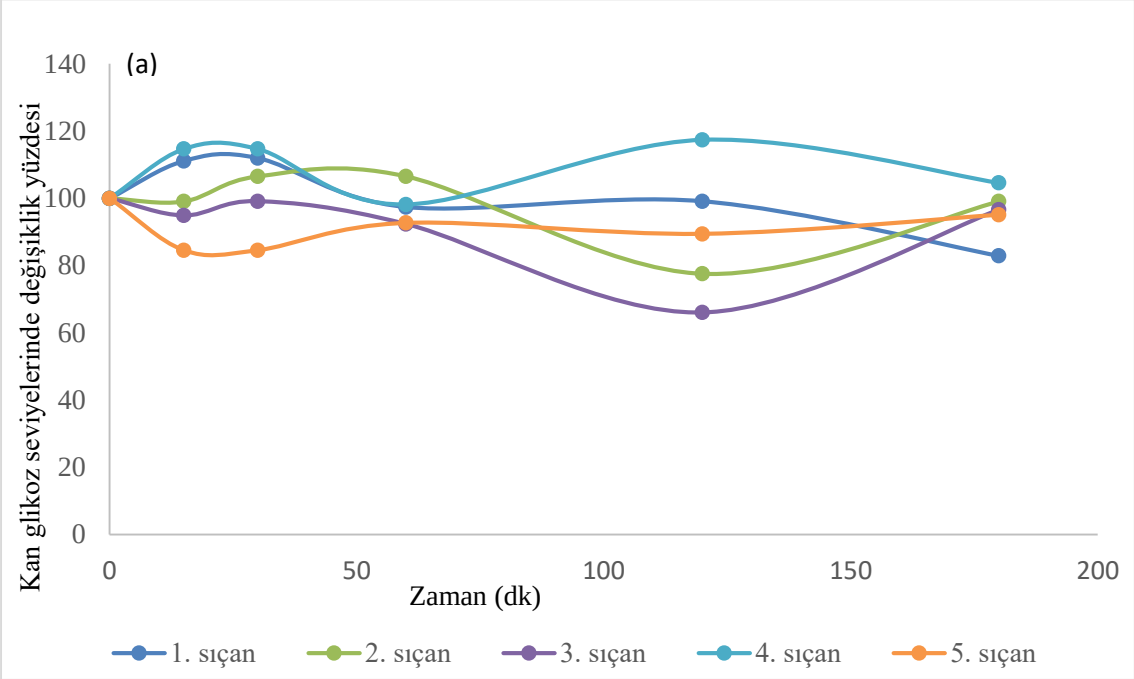
Çizelge 4.28. Diyabetik sıçanlara ait plazma insülin seviyelerinde değişiklik yüzdesi (ort±ss) (n=5)

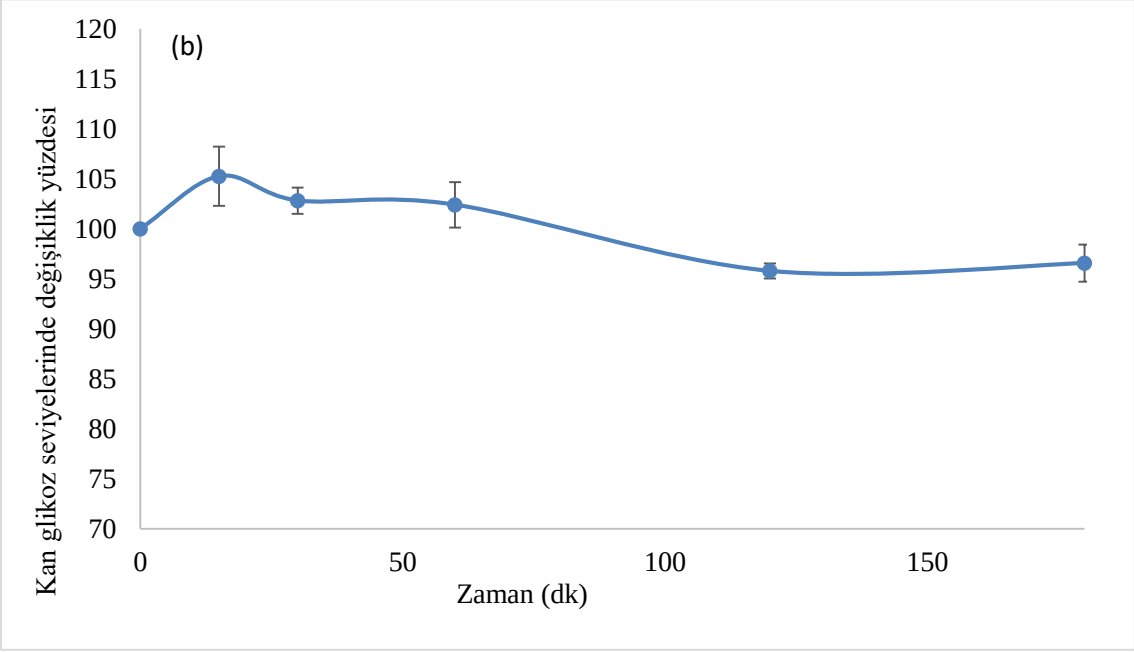
	Ex-4 çözelti	Ex-4-SNEDDS	Ex4-SNEDDSK	Byetta®
0	100,000 ±0,000	100,000 ±0,000	100,000 ±0,000	100,000 ±0,000
30	117,654±14,286	123,075±21,156	122,822±8,389	122,759±43,704
60	137,887±18,480	102,191±5,917	164,331±10,517	152,957±77,323
120	123,234±11,019	84,219±14,073	153,765±12,766	209,761±80,555
180	160,812±28,579	81,260±21,401	148,108±42,106	86,079±15,866

Diyabetik olmayan sıçanlarda plazma başlangıça göre ölçülen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi

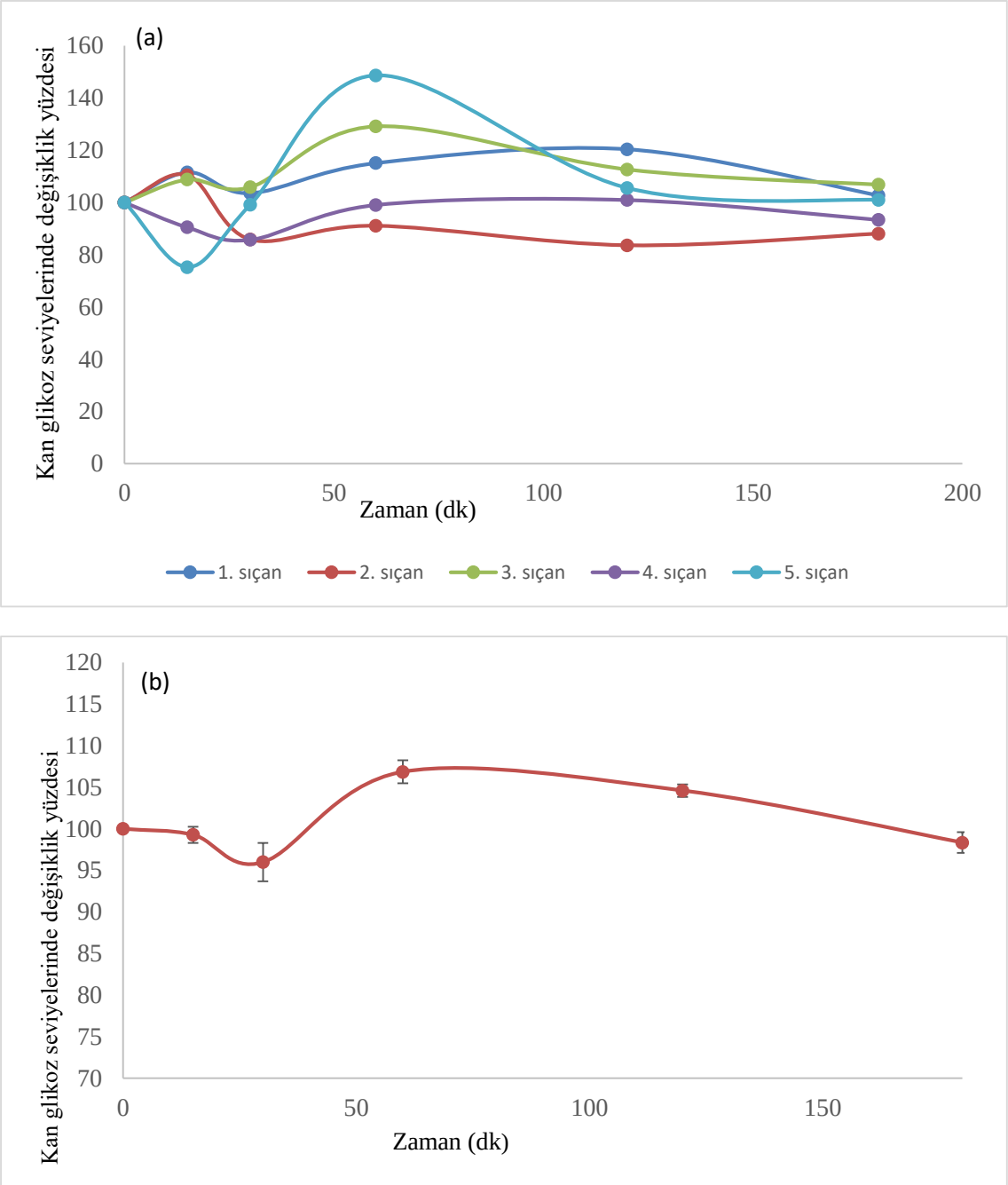
Kan örneklerinin alımı esnasında glukometre ile ölçülen kan glikoz seviyelerinden hareketle kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri çizildi. Exendin-4 çözelti (oral) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri Şekil 4.52'de, exendin-4 SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri Şekil 4.53'te, exendin-4/kimostatin SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri Şekil 4.54'de, Byetta® (sc) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri 4.55'de, diyabetik olmayan sıçanlarda tüm

gruplara ait kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri Şekil 4.56'da ve Çizelge 29'da gösterilmiştir.

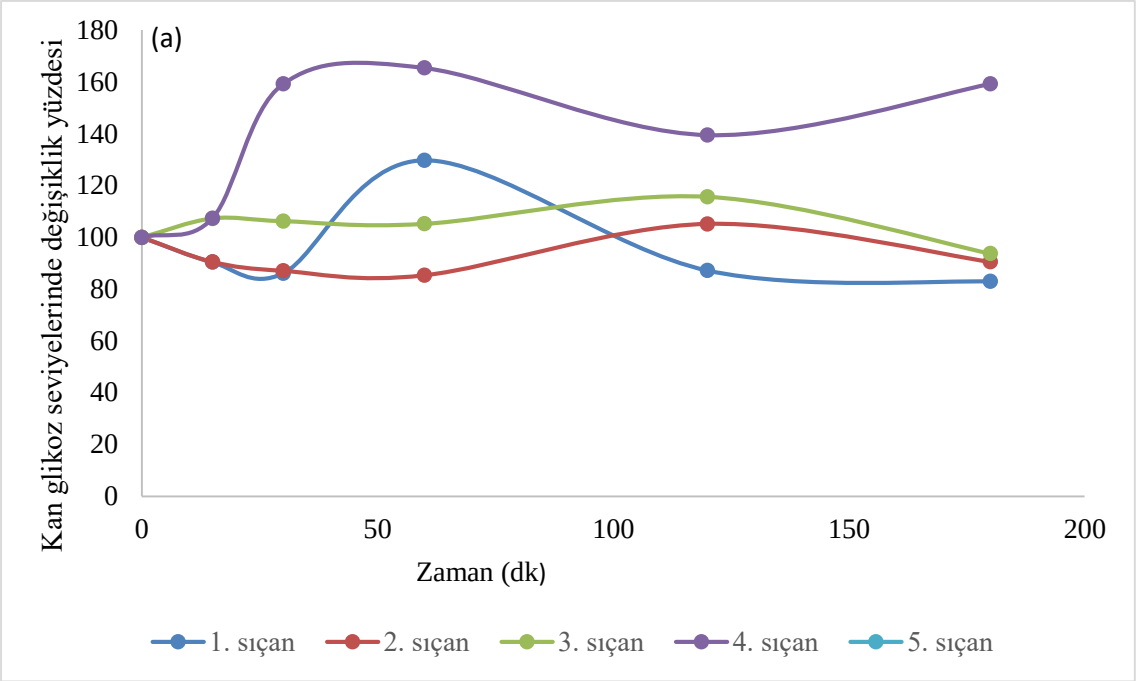


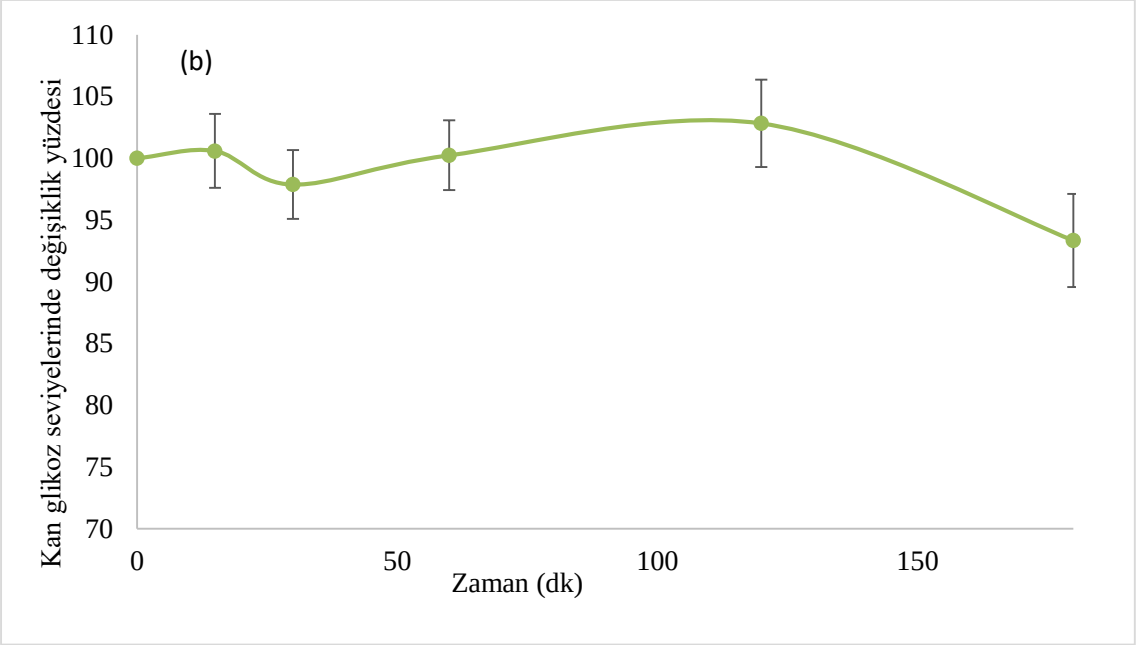


Şekil 4.52. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4 çözelti (oral) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)

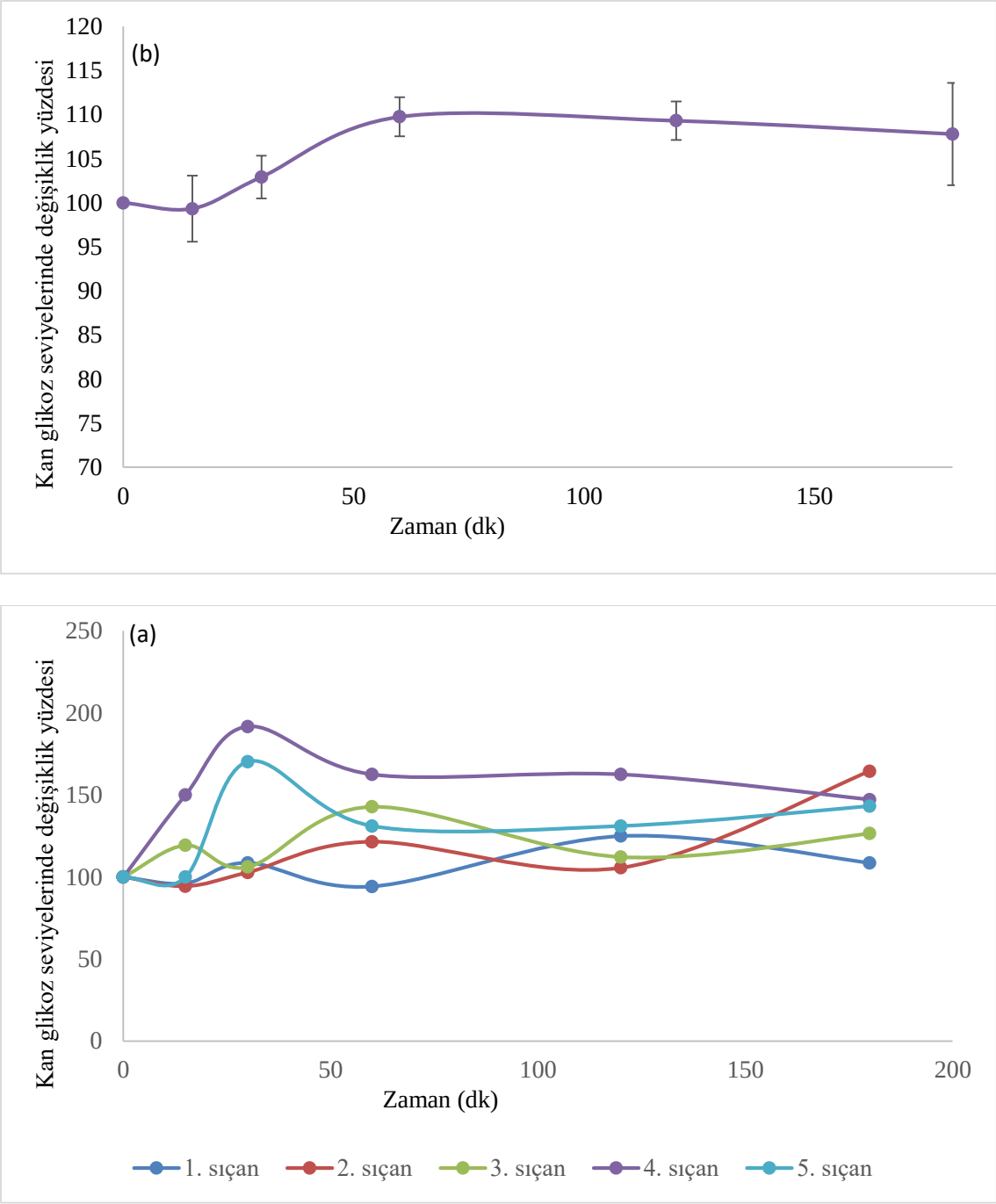


Şekil 4.53. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4 SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)

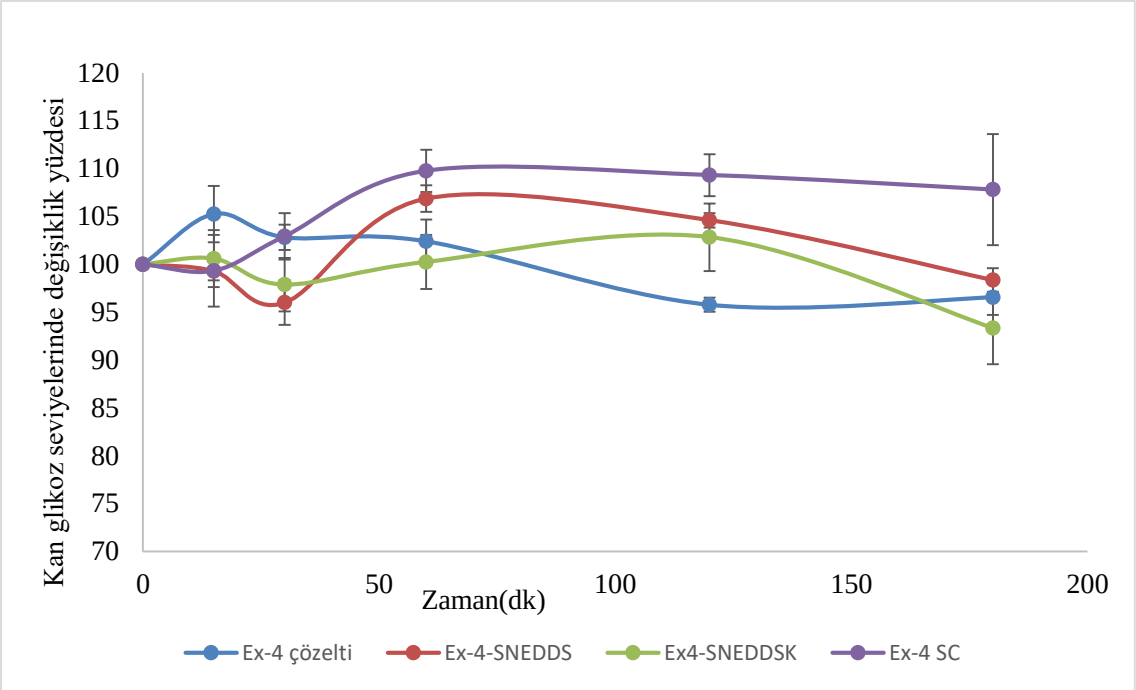




Şekil 4.54. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4/kimostatin SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



Şekil 4.55. Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4 çözelti (sc) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



Şekil 4.56. Diyabetik olmayan sıçanlara ait kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri

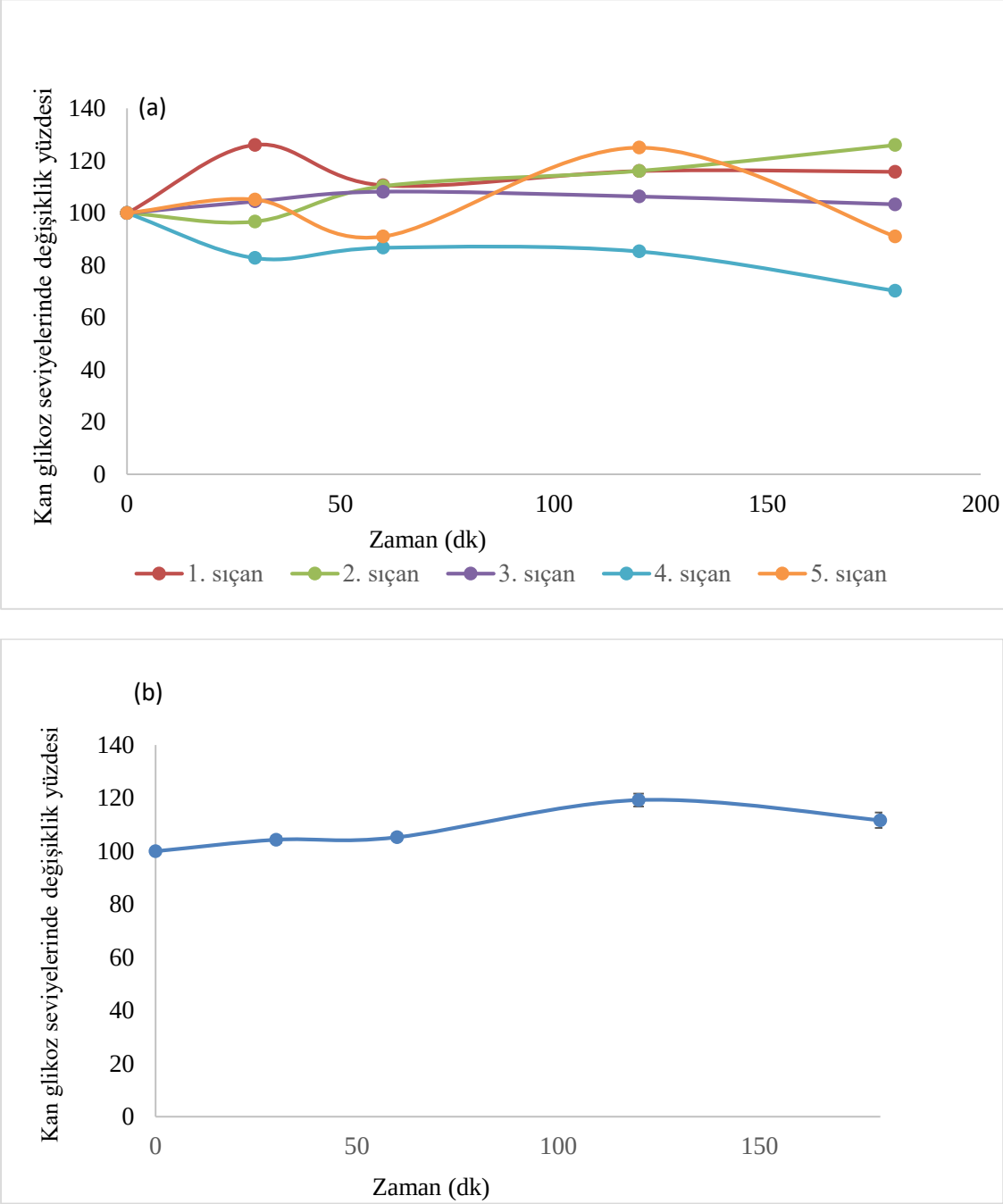
Çizelge 4.29. Diyabetik olmayan sıçanlara ait kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi (ort±ss) (n=5)

	Ex-4 çözelti	Ex-4-SNEDDS	Ex4-SNEDDSK	Byetta®
0	100,000 ±0,000	100,000 ±0,000	100,000 ±0,000	100,000 ±0,000
15	105,249±2,951	99,279±0,964	100,589±2,985	99,330±3,747
30	102,815±1,317	95,997±2,316	97,871±2,791	102,930±2,421
60	102,396±2,274	106,852±1,386	100,237±2,830	109,764±2,421
120	95,779±0,747	104,603±0,754	102,824±3,531	109,316±2,185
180	96,563±1,845	98,352±1,242	93,339±3,766	107,802±5,789

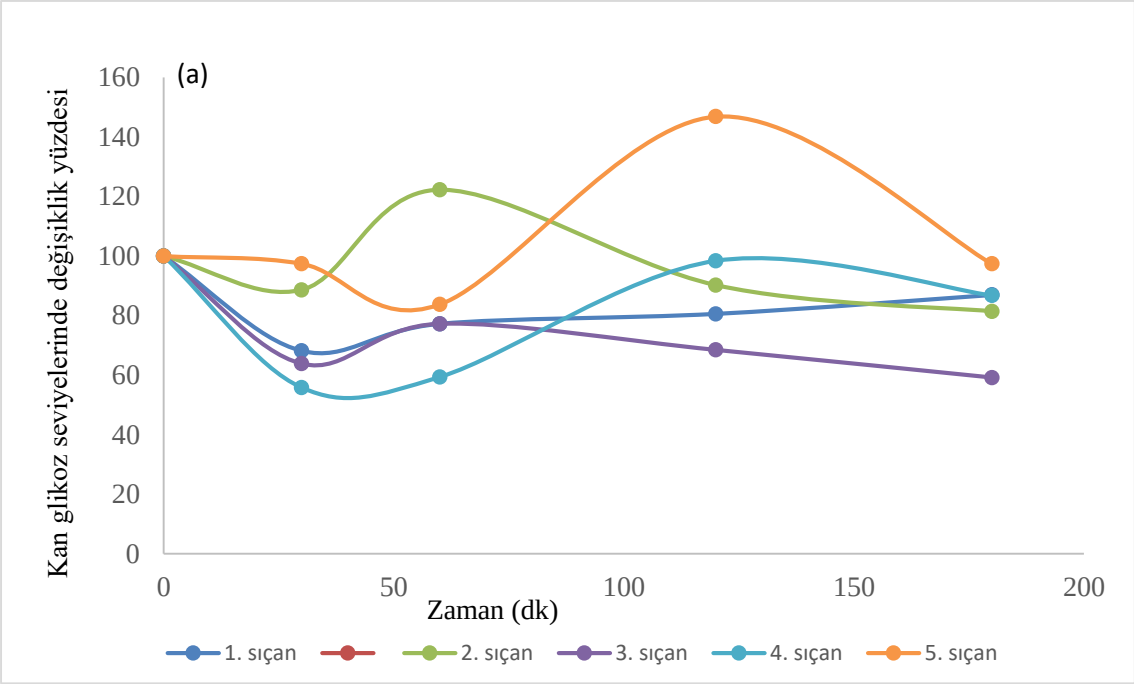
Diyabetik sıçanlarda plazma başlangıça göre ölçülen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi

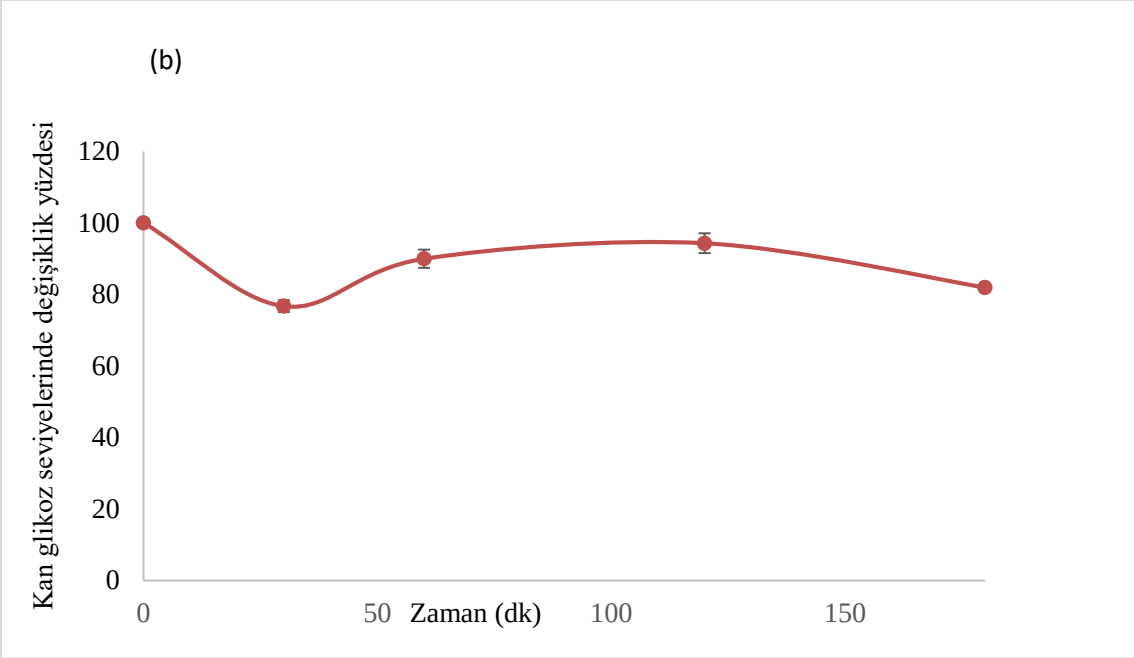
Kan örneklerinin alımı esnasında glukometre ile ölçülen kan glikoz seviyelerinden hareketle kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri çizildi. Diyabetik sıçanlara exendin-4 çözelti (oral) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi Şekil 4.57'de, exendin-4 SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi Şekil 4.58'de, exendin-4/kimostatin SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen ve kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi Şekil 4.59'da, Byetta® (sc) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik

yüzdesi Şekil 4.60'da, diyabetik sıçanlarda tüm gruplara ait kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri Şekil 4.61'de ve Çizelge 4.30'da gösterilmiştir.

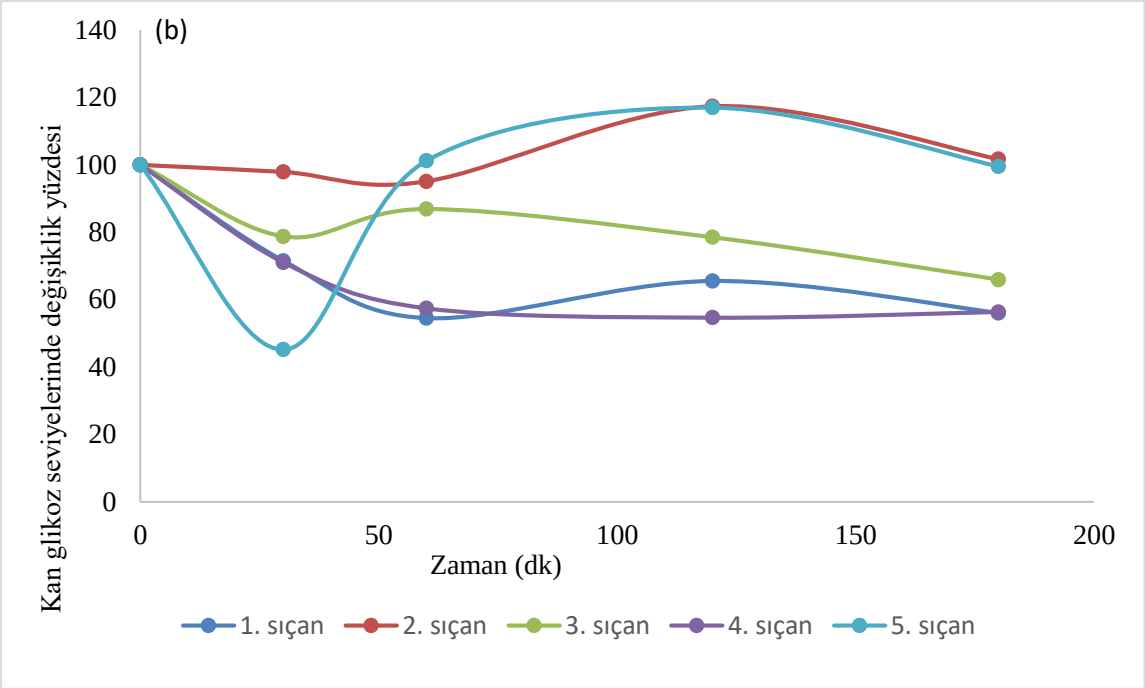


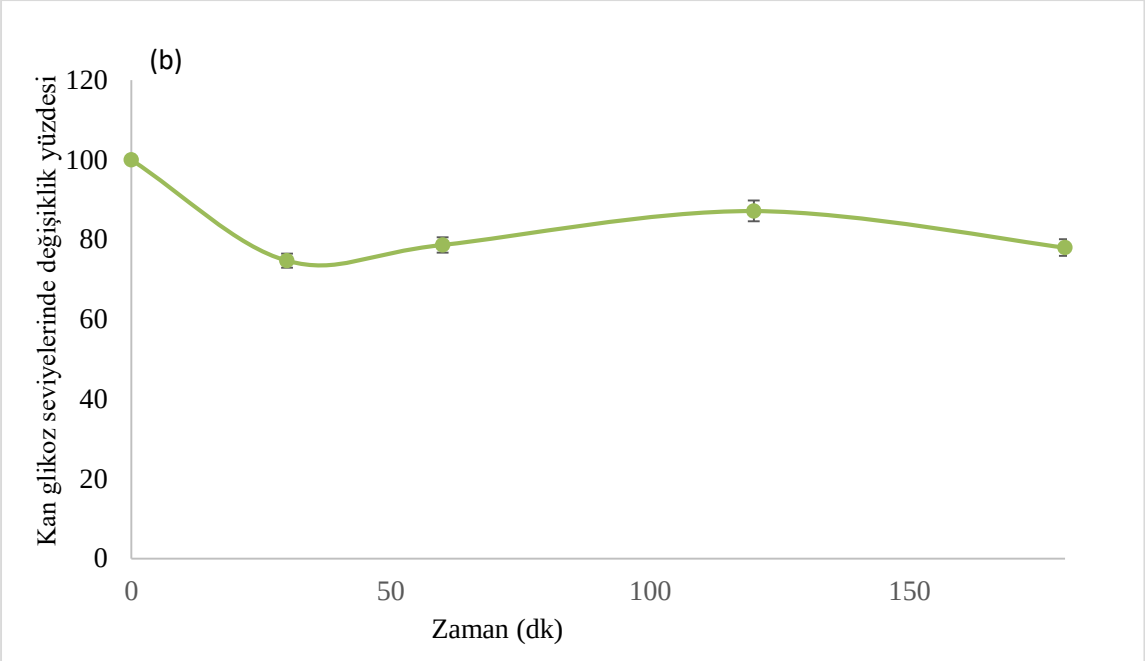
Şekil 4.57. Diyabetik sıçanlara exendin-4 çözelti (oral) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



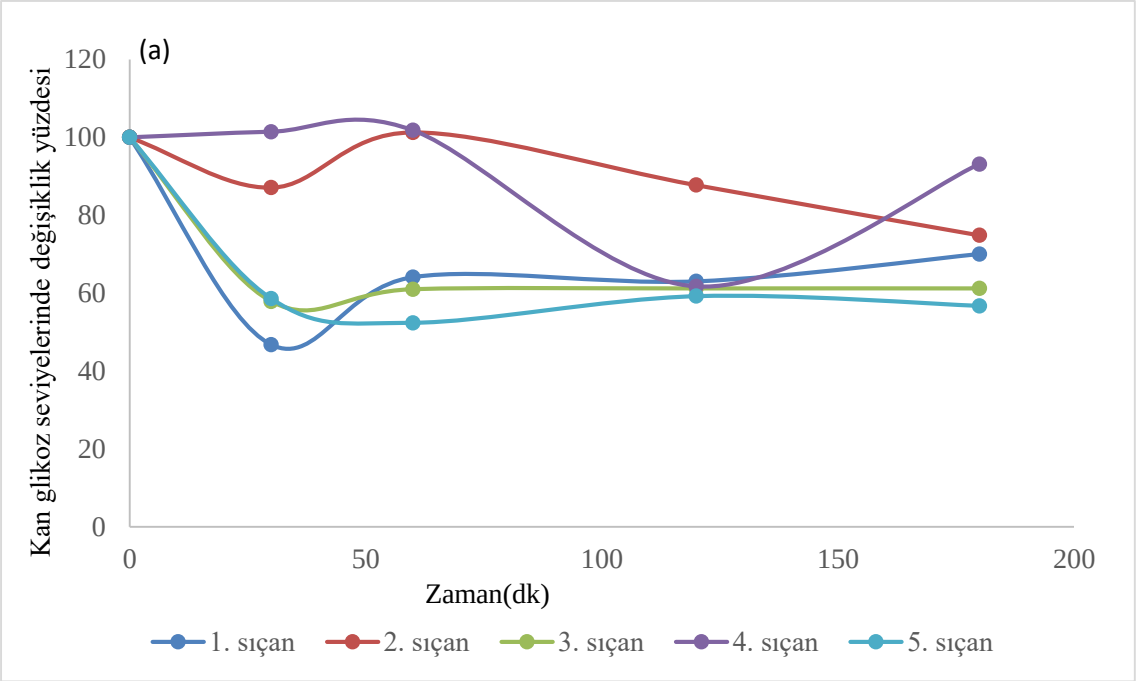


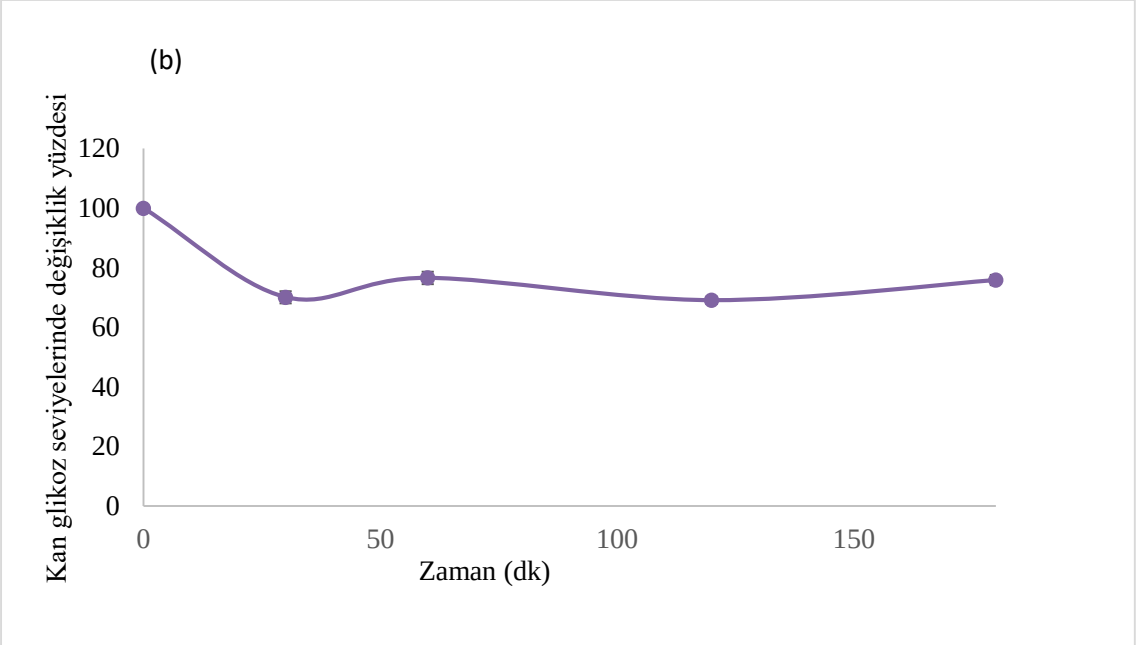
Şekil 4.58. Diyabetik sıçanlara exendin-4 SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



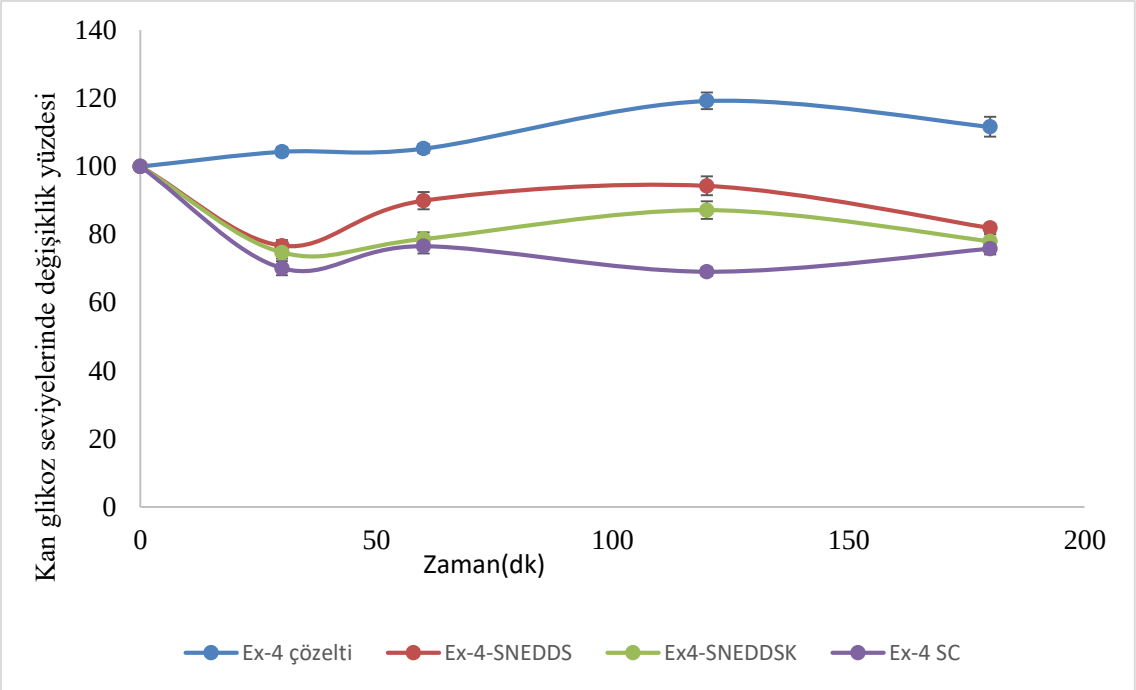


Şekil 4.59. Diyabetik sıçanlara exendin-4/kimostatin SNEDDS (oral) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)





Şekil 4.60. Diyabetik sıçanlara exendin-4 çözelti (sc) uygulamasından sonra elde edilen kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri (a) herbir sıçana ait profil (b) ortalama (n=5)



Şekil 4.61. Diyabetik sıçanlara ait kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi profilleri

Çizelge 4.30. Diyabetik sıçanlara ait kan glikoz seviyelerinde değişiklik yüzdesi (ort±ss) (n=5)

	Ex-4 çözelti	Ex-4-SNEDDS	Ex4-SNEDDSK	Byetta®
0	100,000 ±0,000	100,000 ±0,000	100,000 ±0,000	100,000 ±0,000
30	104,324±1,314	76,737±1,637	74,716±1,748	70,121±2,049
60	105,258±1,283	89,975±2,541	78,678±1,941	76,586±2,115
120	119,241±2,456	94,317±2,763	87,181±2,611	69,078±1,228
180	111,648±2,921	81,946±1,272	78,006±2,110	75,861±1,708

5. TARTIŞMA

Tez çalışmamızın temel amacı; Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan peptit yapılı bir molekül olan exendin-4'ün oral yoldan uygulanmak üzere SNEDDS formülasyonunun geliştirilmesi ve karakterizasyonunun incelenmesi, *in vitro*/*in vivo* olarak değerlendirilmesi olarak belirlenmiştir. Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan inkretin mimetikler sınıfında yer alan exendin-4, pankreas beta hücrelerinden insülin salgılanmasını sağlarken aynı zamanda glukagon salgılanmasını baskılayarak glikoz homeostazını düzenlemektedir (Egan, Clocquet ve Elahi, 2002). Exendin-4'ün Byetta® ismiyle subkütan olarak uygulanan ticari ürünü Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak exendin-4'ün herhangi bir oral ticari formu bulunmamaktadır.

Peptit/proteinlerin oral verilişinde kendiliğinden emülsifiye sistemlerin kullanılması yapılan çalışmalarda peptit/proteinlerin biyoyararlanımı artırdığı gösterilmiştir (Hintzen ve diğerleri, 2014; Leonaviciute ve diğerleri, 2017; Rao, Yajurvedi ve Shao, 2008; Sakloetsakun, Dünnhaupt, Barthelmes, Perera ve Bernkop-Schnürch, 2013; Zhang ve diğerleri, 2012). Tez kapsamında tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan peptit yapılı bir molekül olan exendin-4 ve exendin-4/kimostatinin oral yoldan uygulanmak üzere kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sistemleri geliştirilmiştir. Kimostatin exendin-4'ün oral yoldan parçalanmasını önlemek amacıyla kimotripsin inhibitörü olarak kullanılmıştır. Oral yoldan kullanılmak üzere geliştirilen bu formülasyonun bir yandan kullanım kolaylığı sağlaması açısından diyabet tedavisinde hasta uyuncunu artıracağı düşünülmektedir. Diğer yandan enjeksiyonluk preparatlar için zorunlu bir işlem olan sterilizasyon basamağı oral uygulama için gerekli değildir. Sterilizasyon işlemine gerek duyulmayan bir formülasyon özellikle peptit yapıdaki ilaçlar için önem taşımaktadır.

Bu tez kapsamında exendin-4'ün ve exendin-4/kimostatinin SNEDDS'ler elde edilerek karakterizasyon çalışmaları, *in vitro* salım çalışmaları, *in vitro* lipoliz çalışmaları, hücre kültürü çalışmaları ve *in vivo* farmakokinetik/farmakodinamik çalışmalar yapılmıştır.

Yapılan deneysel çalışmalar ile elde edilen sonuçlar aşağıda verilen bölümlerde ayrıntılı bir şekilde tartışılacaktır.

5.1. Önformülasyon Çalışmaları

SNEDDS'lerin hazırlanmasında kullanılan uygun yağ, yüzey etkin maddeler, yardımcı yüzey etkin maddeler/ yardımcı yüzey etkin maddelerin seçimi ve bunların formülasyondaki oranları SNEDDS'lerin damlacık büyüklüğü ve dağılımı, emülsifikasyon performansı, zeta potansiyel gibi fizikokimyasal özelliklerine ve stabilitesine önemli derecede etki etmektedir (Cherniakov, Domb ve Hoffman, 2015; Nardin ve Köllner, 2018). Önformülasyon çalışmaları Bölüm 4.1'de anlatıldığı üzere sistematik bir şekilde yürütülmüştür. Exendin-4 içermeyen formülasyonların hazırlanmasında farklı yağlar (etil oleat, Maisine®), yüzey etkin maddeler (Labrasol®, Cremophor EL®), yardımcı çözücüler (mutlak alkol, propilen glikol) kullanılmıştır. Literatürde exendin-4'ün nanokapsüllerin hazırlandığı çalışmalarda yağ fazı olarak kullanılan uzun zincirli yağ asitleri etil oleat ve Maisine® tez çalışmamızda SNEDDS'lerin yağ fazında kullanılmak üzere seçilmiştir (Houchin ve diğerleri, 2010; Lenherr ve diğerleri, 2015).

Literatürde uzun zincirli yağ asitlerinin orta zincirli ve kısa zincirli yağlara göre daha yavaş sindirildiği böylece gastrik ve intestinal ortamdaki enzimatik parçalanmadan daha az etkilendiği belirtilmiştir (Zupančič ve diğerleri, 2016a). Yüzey etkin madde olarak seçilen Cremophor EL® yüksek emülsifikasyon yeteneği ve non iyonik özellik gösterdiği, Labrasol® 'ün ise intestinal membrandaki sıkı bağlantıların açılmasını kolaylaştırdığı bu sayede intestinal absorpsiyonu artırdığı belirtilmektedir (Chavda ve Shah, 2017). Yardımcı çözücü olarak seçilen propilen glikol ve absolü etanolün ise yüzeylerarası filmin akışkanlığını artırdığı ve yüzey etkin maddelerin lokal iritasyonunu azalttığı belirtilmiştir (Gürsoy ve Çevik, 2011).

Exendin-4 içermeyen SNEDDS'ler için (% 10-80 a/a), yüzey etkin maddeler (% 6- 75 a/a) ve yardımcı çözücüler için (% 3-60 a/a) oranları kullanılmıştır. Bu oranlara göre 55 adet üçgen faz diyagramı çizilmiştir. En büyük berrak alanı veren üçgen faz diyagramlarından seçilen ***A, B, C, D, E1, E2, E3, E4, E5, F, G1, G2, G3, G4, G5, H1, H2, H3, H4, H5, I1, I2, I3, I4, I5, J1, J2, J3, J4, J5*** formülasyonlarının yardımcı bileşenleri ve oranları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Bu formülasyonlar arasından en uygun formülasyonun seçilmesi için karakterizasyon çalışmaları formülasyonların hazırlanmasından hemen sonra ve 5°C ± 3°C sıcaklıkta bekletilen formülasyonlarda yapılmıştır. Damlacık büyüklüğü, polidispersite

indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmayan formülasyonlar exendin-4 yüklenmek üzere seçilmiştir.

Önformülasyon-1 çalışmalarında; yağ fazı olarak Maisine®, yüzey etkin madde olarak Labrasol®, yardımcı çözücü olarak propilen glikolün kullanıldığı A, B, C, D formülasyonlarında yapılan karakterizasyon çalışmalarında damlacık büyüklüğü 257-504 nm; polidispersite indeksi 0,31-0,96 aralığında; zeta potansiyel -0.3 - 26.1 mV aralığında bulunmuştur. A, B, C, D formülasyonları arasından emülsifikasyon zamanı Grade B, damlacık büyüklüğü 305,50 ± 24,10 nm, polidispersite indeksi 0,59 ± 0,07 ve zeta potansiyeli -19,90 ± 0,40 mV bulunan %20 Maisine®, %64 Labrasol®, %16 propilen glikol içeren C formülasyonu seçilmiştir. C formülasyonu etrafında farklı oranlar seçilerek hazırlanan %18,00 Maisine®, %65,60 Labrasol®, %16,40 propilen glikol içeren C1 ve %28,00 Maisine®, %57,60 Labrasol®, %14,40 propilen glikol içeren C2 formülasyonları 1:50 ve 1:250 oranlarında bidistile su ile seyreltildikten sonra yapılan 0., 7., 14. ve 28. günlerdeki damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerlendirildiğinde sonuçlar arasında anlamlı bir fark gözlenmeyen C1 formülasyonu seçilmiştir ($p>0.05$).

Yağ fazı olarak Maisine®, yüzey etkin madde olarak Cremophor EL®, yardımcı çözücü olarak absolü etanolün kullanıldığı önformülasyon-2 çalışmalarında, üçgen faz diyagramlarında berrak alanların oldukça küçük olması ve Maisine®'nin Cremophor EL® ile stabil bir emülsiyon oluşturmaması nedeniyle bu formülasyonlardan vazgeçilmiştir. Yağ fazı olarak etil oleat, yüzey etkin madde olarak Cremophor EL®, yardımcı çözücü olarak absolü etanolün kullanıldığı önformülasyon-3 çalışmalarında, üçgen faz diyagramında (Şekil 3.8) en büyük berrak alanı veren ***E1, E2, E3, E4 ve E5*** formülasyonları için damlacık büyüklüğü 19,24 - 35,30 nm, polidispersite indeksi 0,1-0,2 ve zeta potansiyel -4 ile -20 mV aralığında bulunmuştur. Sonuçlar istatiksel olarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırılmıştır. Etil oleatı % 30,00, Cremophor EL®'i % 52,50, absolü etanolü %17,5 oranlarında içeren ***E2*** formülasyonu için 0., 7., 14., 21. ve 28. günlerde yapılan ölçümlerde damlacık büyüklüğü ve polidispersite indeksi sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Emülsifikasyon zamanı Grade B, damlacık büyüklüğü 28,89 ± 0,44 nm, polidispersite indeksi 0,11 ± 0,01 ve zeta potansiyeli -11,30 ± 2,90 mV bulunan ***E2*** formülasyonunun bu formülasyonlar arasında en uygun formülasyon olduğu sonucuna varılmıştır.

Yardımcı madde olarak etil oleat (yağ fazı), Cremophor EL® (yüzey etkin madde), absolü etanol (yardımcı çözücü) kullanılarak geliştirilen formülasyonların optimizasyonu için ayrıca deney tasarımı (DoE) yaklaşımı kullanılmıştır. Bağımsız değişkenler; yağ miktarı ve yüzey etkin madde/yardımcı çözücü miktarı olarak belirlenmiştir. Bağımlı değişkenler olarak damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel olarak belirlenmiştir. İstatistiksel tasarım için Design Expert® Version 9.0.6 kullanılmıştır. 3^2 (3 düzey, 2 faktör) rastgele deney düzeni 2 tekrarlı toplam 18 deney yapılmıştır. Deney sonuçlarına göre program tarafından bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenlere etkisinin yorumlanmasını sağlayan denklemler, etkileşim ve yüzey cevap grafikleri oluşturulmuştur. Denklemler, etkileşim ve yüzey cevap grafiklerine göre hedef ürün profiline (Çizelge 3.3) uygun damlacık büyüklüğü (<50 nm) ve polidispersite indeksi (<0,2) elde edilebilmesi için yağ miktarının düşük, yüzey etkin madde ve yardımcı çözücü karışımının yüksek oranda kullanılması gerekmektedir. DoE kullanılarak oluşturulmuş % 16,67 etil oleat: % 62,50 Cremophor EL®, %20,83 absolü etanol içeren optimum formülasyonda (F) damlacık büyüklüğü 20,42±0,09 nm, polidispersite indeksi 0,08±0,01 ve zeta potansiyel -12,5±7,8 mV bulunmuştur.

Formülasyonlarda yüzey etkin madde oranının artmasıyla damlacık boyutu küçülmektedir. Yüzey etkin maddeler amfifilik özellikleri sebebiyle yağ-su ara yüzeyinde stabil ve nanoboyutta yağ damlacıklarının oluşmasını sağlamaktadır (Gupta, Kesarla ve Omri, 2013). Önformülasyon Çalışmaları-4, önformülasyon çalışmaları-5, önformülasyon çalışmaları-6'da formülasyonlarda Cremophor EL®'in oranını düşürmek için Cremophor EL® ve Labrasol® karışımının kullanıldığı formülasyonlar geliştirilmiştir. Önformülasyon Çalışmaları-4'de yağ fazı olarak etil oleat, yüzey etkin maddeler Cremophor EL®/Labrasol® karışımı, yardımcı çözücü olarak absolü etanol kullanılmıştır. Üçgen faz diyagramında (Şekil 3.10) en büyük berrak alanı veren Cremophor EL®/Labrasol® (1:2) oranının kullanıldığı ***G1***, ***G2***, ***G3***, ***G4*** ve ***G5*** formülasyonları için damlacık büyüklüğü 41,72- 246,10 nm, polidispersite indeksi 0,19-0,42 ve zeta potansiyel -9,79 ile -23,73 mV aralığında bulunmuştur. ***G1***, ***G2***, ***G3***, ***G4*** ve ***G5*** formülasyonlarının 0., 7., ve 28. günlerdeki damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel sonuçları istatiksel olarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırılmıştır. Etil oleatı % 15,00, % Cremophor EL® 'i % 21,25, Labrasol®'ü % 42,5, absolü etanolü % 21,25 oranlarında içeren ***G5*** formülasyonu için 0., 7., ve 28. günlerdeki ölçümlerde damlacık büyüklüğü ve polidispersite indeksi sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Emülsifikasyon zamanı Grade B,

damlacık büyüklüğü 41,72±1,17 nm, polidispersite indeksi 0,19±0,01 ve zeta potansiyeli -23,73±7,05 mV bulunan ***G5*** formülasyonunun bu formülasyonlar arasında en uygun formülasyon olduğu sonucuna varılmıştır.

Önformülasyon çalışmaları-5'te, yağ fazı olarak etil oleat, yüzey etkin madde olarak Cremophor EL® ve Labrasol® karışımı, yardımcı çözücü olarak propilen glikol kullanılmıştır. Bu yardımcı bileşenlerle oluşturulan formülasyonlarda üçgen faz diyagramlarında en büyük berrak alanı Cremophor EL®/Labrasol® (2:1) ve Cremophor EL®/Labrasol® (3:1) oranının kullanıldığı Şekil 3.12 ve Şekil 3.13'deki üçen faz diyagramları vermiştir. Üçgen faz diyagramında (Şekil 3.12) en büyük berrak alanı veren Cremophor EL®/Labrasol® (2:1) oranının kullanıldığı ***H1***, ***H2***, ***H3***, ***H4*** ve ***H5*** formülasyonları için damlacık büyüklüğü 18,52- 52,79 nm, polidispersite indeksi 0,11-0,19 ve zeta potansiyel -6,08 ile -15,74 mV aralığında bulunmuştur. ***H1***, ***H2***, ***H3***, ***H4*** ve ***H5*** formülasyonlarının 0., 7., ve 28. günlerdeki damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel sonuçları istatistiksel olarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırılmıştır. Etil oleatı %15,00, Cremophor EL®'i %42,5, Labrasol®'ü %21,25, propilen glikolü %21,25 oranlarında içeren ***H5*** formülasyonu için 0., 7., ve 28. günlerdeki ölçümlerde damlacık büyüklüğü ve polidispersite indeksi sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Emülsifikasyon zamanı Grade B, damlacık büyüklüğü 18,52±0,08 nm, polidispersite indeksi 0,11±0,01ve zeta potansiyeli -6,08±4,48 mV bulunan ***H5*** formülasyonunun bu formülasyonlar arasında en uygun formülasyon olduğu sonucuna varılmıştır.

Üçgen faz diyagramında (Şekil 3.13) en büyük berrak alanı veren Cremophor EL®/Labrasol® (3:1) oranının kullanıldığı ***I1***, ***I2***, ***I3***, ***I4*** ve ***I5*** formülasyonları için damlacık büyüklüğü 21,50- 60,60 nm, polidispersite indeksi 0,18-0,34 ve zeta potansiyel -7,15 ile -8,48 mV aralığında bulunmuştur. ***I1***, ***I2***, ***I3***, ***I4*** ve ***I5*** formülasyonlarının 0., 7., ve 28. günlerdeki damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel sonuçları istatiksel olarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırılmıştır. Etil oleatı %15,00, Cremophor EL®'i %47,81, Labrasol®'ü %15,94, propilen glikolü %21,25 oranlarında içeren ***I5*** formülasyonu için 0., 7., ve 28. günlerdeki ölçümlerde damlacık büyüklüğü ve polidispersite indeksi sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Emülsifikasyon zamanı Grade B, damlacık büyüklüğü 21,50±0,50 nm, polidispersite indeksi 0,18±0,03 ve zeta potansiyeli

-7,15±2,92 mV bulunan ***I5*** formülasyonunun bu formülasyonlar arasında en uygun formülasyon olduğu sonucuna varılmıştır.

Önformülasyon çalışmaları-6'da, yağ fazı olarak etil oleat, yüzey etkin madde olarak Cremophor EL® ve Labrasol® karışımı, yardımcı çözücü olarak propilen glikol absolü etanol kullanılmıştır. Cremophor EL®/Labrasol® 2:1 ve propilen glikol/absolü etanol için 3:1 oranı kullanılmıştır. Üçgen faz diyagramında (Şekil 3.15) en büyük berrak alanı veren Cremophor EL®/Labrasol® (2:1) oranının kullanıldığı ***J1***, ***J2***, ***J3***, ***J4*** ve ***J5*** formülasyonları için damlacık büyüklüğü 18,81 - 74,29 nm, polidispersite indeksi 0,14 -0,26 ve zeta potansiyel -4,63 ile -9,14 mV aralığında bulunmuştur. ***J1***, ***J2***, ***J3***, ***J4*** ve ***J5*** formülasyonlarının 0., 7., ve 28. günlerdeki damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel sonuçları istatiksel olarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırılmıştır. Etil oleatı %15,00, Cremophor EL®'i %42,5, Labrasol®'ü %21,25, propilen glikolü %15,94, absolü etanolü %5,31 oranlarında içeren ***J5*** formülasyonu için 0., 7., ve 28. günlerdeki ölçümlerde damlacık büyüklüğü ve polidispersite indeksi sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Emülsifikasyon zamanı Grade B, damlacık büyüklüğü 18,81 ± 0,48 nm, polidispersite indeksi 0,14 ± 0,01ve zeta potansiyeli -4,63 ± 2,34 mV bulunan ***J5*** formülasyonunun bu formülasyonlar arasında en uygun formülasyon olduğu sonucuna varılmıştır.

Önformülasyon çalışmaları sonucunda hedef ürün profiline uygun bulunan E2, F, G5, H5, I5 ve J5 formülasyonları exendin-4 yüklenmek üzere seçilmiştir. ***C1*** formülasyonu diğer altı formülasyona göre damlacık büyüklüğü ve polidispersitesi oldukça yüksek bulunduğu için ilerleyen deneyler için ***C1*** formülasyonundan vazgeçilmiştir. ***E2, F, G5, H5, I5 ve J5*** formülasyonlarının seçilmesinde damlacık büyüklüğünün 50 nm'nin altında olması ve polidispersite indeksinin 0,2'nin altında olması, 1 dakikadan az sürede emülsifiye olmaları, berrak nanoemülsiyon oluşturmaları ve 28 gün boyunca stabil olmaları etkili olmuştur. Zeta potansiyellerinin düşük olmasının kullanılan yardımcı maddelerin non iyonik olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, yapılan kapsamlı önformülasyon çalışmalarından en uygun SNEDDS formulasyonunun %15,00 etil oleat, %42,5 Cremophor EL®, %21,25 Labrasol® ve %21,25 propilen glikol içeren ***H5*** formülasyonu olduğuna karar verilmiştir.

5.2. ELISA Yöntemi İle Exendin-4'ün Miktar Tayini

Bölüm 4.2'de anlatıldığı üzere exendin-4'ün formülasyonlardaki yükleme etkinliğinin değerlendirilmesi için kolorimetrik ölçüm esasına dayanan exendin-4 ELISA kitiyle (EK-070-94/ Phoenix Pharmaceuticals, CA) miktar tayini gerçekleştirilmiştir. *In vivo* çalışmalarda ise plazma exendin-4 ve plazma insülin seviyelerinin ölçülmesinde sırasıyla fluorometrik ölçüm esasına dayanan exendin-4 ELISA kiti (FEK-070-94/Phoenix Pharmaceuticals) ve insülin ELISA kiti (CEA448Ra/Cloud–Clone Corp.) kullanılmıştır. Bu kitler, yarışmalı bir enzim immünotayin ilkesine dayanmaktadır ve exendin-4'ün konsantrasyonunun ölçülmesi için tasarlanmıştır. ELISA yöntemi, numunede katı faz ekstraksiyonu gibi ön işlem prosedürüne gerek duyulmaksızın hassas ve doğru bir ölçüm sağlamaktadır (Pinho ve diğerleri, 2019). Literatürde exendin-4'ün miktar tayini için ELISA yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır Phoenix Pharmaceuticals tarafından üretilen exendin-4 ELISA kiti analizlerde literatürde en çok tercih edilen kit olduğu için exendin-4'ün miktar tayininde, *in vivo* farmakokinetik/farmakodinamik analizlerde bu kit tercih edilmiştir (Kwak ve diğerleri, 2009; Qi, Wu, Yang, Ma ve Su, 2014; Wang ve diğerleri, 2016).

5.3. Exendin-4 ve Exendin-4/Kimostatin Yüklü Kendiliğinden Nanoemülsifiye Olabilen Sistemlerin Karakterizasyon Çalışmaları

Önformülasyon çalışmaları sonucunda seçilen ***E2, F, G5, H5, I5 J5*** formülasyonlarına exendin-4 yüklenmiştir. İndirekt yöntemle yapılan yükleme etkinliklerinin sonuçlarına göre ***E2*** formülasyonu için yükleme etkinliği %62,15; ***F*** formülasyonu için %60,73; ***G5*** formülasyonu için %74,09; ***H5*** formülasyonu için %88,25; ***I5*** formülasyonu için %82,41, ***J5*** formülasyonu için %81,69 bulunmuştur. ***H5***, ***I5*** ve ***J5*** formülasyonları için ayrıntılı olarak yapılan karakterizasyon çalışması sonuçlarına göre Exendin-4 yüklü ***I5*** formülasyonu için formülasyonunun damlacık büyüklüğü 20,63±0,39 nm, polidispersitesi indeksi 0,17±0,01, zeta potansiyeli -0,93±4,31 mV, viskozitesi 65,24±2,55 m.Pas, pH'sı 5,50±0,00, türbiditesi 5,62±0,00 bulunmuştur. Emülsifikasyon zamanı 1 dakikanın altında ve formülasyon hafif bulanık olarak Grade B olarak sınıflandırılmıştır. Exendin-4 yüklü ***J5*** formülasyonu için damlacık büyüklüğü 20,66±0,40 nm, polidispersitesi indeksi 0,10±0,01, zeta potansiyeli -5,99±0,43 mV, viskozitesi 67,28±5,22 m.Pas, pH'sı 5,34±0,00, türbiditesi 5,42±0,00 bulunmuştur. Emülsifikasyon zamanı 1 dakikanın altında ve formülasyon hafif bulanık olarak Grade B olarak sınıflandırılmıştır.

Exendin-4 yüklü ***H5*** formülasyonunun damlacık büyüklüğü 24,28±0,43 nm, polidispersite indeksi 0,17 ± 0,01, zeta potansiyeli -1,28±3,61 mV, viskozitesi 79,60±3,30 m.Pas, pH'sı 5,40±0,00, türbiditesi 6,37±0,00 bulunmuştur. Karakterizasyon parametreleri birbirine oldukça yakın bulunan ***H5***, ***I5*** ve ***J5*** formülasyonları arasından seçim yapabilmek için 5°C±3°C, 25°C ± 2°C/60% ± 5% bağıl nemde yapılan ölçümlerde kısa süreli stabilite çalışması sonucu karakterizasyon parametrelerinde 1 ay boyunca istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmayan ve exendin-4 yükleme etkinliği %88,25±0,00 bulunan exendin-4 yüklü ***H5*** formülasyonu seçilmiştir ($p>0.05$). Exendin-4 yüklü ***H5*** SNEDDS formülasyonuna kimotripsin inhibitörü kimostatin eklenmiştir. Exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS formülasyonunun damlacık büyüklüğü 20,25±0,35 nm, polidispersitesi indeksi 0,11 ± 0,02, zeta potansiyeli -1,85 ± 2,49 mV, viskozitesi 100,02±7,65 m.Pas bulunmuştur. Emülsifikasyon zamanı 1 dakikanın altında ve formülasyon hafif bulanık, Grade B olarak sınıflandırılmıştır. Formülasyonlarda damlacık büyüklüğünün küçülmesinin yüzey alanı artışına bağlı olarak oral absorpsiyonda artış sağladığı gösterilmiştir (Kumar, Sharma ve Kamble, 2010). Polidispersite indeksinin 0,2'den küçük olması damlacıkların monodispers olduğunu göstermiştir. Zeta potansiyelin düşük olmasının kullanılan yardımcı maddelerin non iyonik olmasından kaynaklandığı ve kendiliğinden emülsifiye olan sistemlerin değerlendirilmesinde zeta potansiyel kritik bir parametre olarak kabul edilmemektedir (Cherniakov ve diğerleri, 2015). Reolojik çalışmalarda exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin Newtonian akış özelliği gösterdiği bulunmuştur.

Literatürlerde SNEDDS'lerin morfolojik görüntülenmesinde TEM kullanılmaktadır (Parmar, Patel ve Sheth, 2015; Wu ve diğerleri, 2015). Exendin-4 içermeyen SNEDDS'ler, exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin (Şekil 4.16) TEM'de görülen 50 nm'nin altındaki damlacık büyüklüğü Malvern Zeta Sizer ile yapılan damlacık büyüklüğü ölçüm sonuçlarını doğrulamaktadır.

5.4. Kısa Süreli Fiziksel Stabilite Çalışmaları

Kısa süreli stabilite çalışmaları exendin-4 yüklü en uygun SNEDDS'in seçilmesi amacıyla yapılmıştır. Kısa süreli fiziksel stabilite çalışmaları 1 ay süreli olarak 5ºC ± 3ºC, 25°C ± 2°C/60% ± 5% bağıl nem ve 40ºC ± 5ºC/%75 ± %5 bağıl nemde yapılmıştır. Kısa süreli stabilite çalışmaları sonucunda H5, J5 ve I5 formülasyonlarının damlacık büyüklüğü (Çizelge 4.13), polidispersite indeksi (Çizelge 4.14), zeta potansiyelleri (Çizelge 4.15),

türbidite (Çizelge 4.16), pH (Çizelge 4.17) ve viskozite (Çizelge 4.18) sonuçları değerlendirilmiştir. Kısa süreli stabilite çalışmalarıyla damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel, viskozite, pH ve türbidite sonuçlarının tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucu 5°C±3°C ve 25°C ± 2°C/60% ± 5% bağıl nemde yapılan ölçümlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmayan H5 formülasyonu seçilmiştir ($p>0.05$). H5 formülasyonunda 40°C±5°C/%75±5% bağıl nemde yapılan ölçümlerde sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunması nedeniyle uzun süreli stabilite çalışmalarına 5°C±3°C ve 25°C ± 2°C/60% ± 5% bağıl nemde devam edilmesi planlanmıştır ($p<0.05$).

5.5. Uzun Süreli Fiziksel Stabilite Çalışmaları

Uzun süreli fiziksel stabilite çalışmalarına exendin-4 ve exendin-4/kimostatin içeren H5 SNEDDS'ler ile devam edilmiştir. Çalışmalar ICH kılavuzuna göre 12 ay süreli olarak 5ºC±3ºC ve 25°C ± 2°C/60% bağıl nemde yürütülmüştür (ICH Q1A (R2) Guideline, 2003). Uzun süreli stabilite çalışmalarında exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin 0., 3., 6., 9. ve 12. aylardaki damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve viskozite sonuçları değerlendirilmiştir (Çizelge 4.20-4.23). Uzun süreli stabilite çalışmalarında exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin 0., 3., 6., 9. ve 12. aylardaki damlacık büyüklüğü (Çizelge 4.20), polidispersite indeksi (Çizelge 4.21), zeta potansiyel (Çizelge 4.22) ve viskozite (Çizelge 4.23) sonuçlarının tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucu 5°C ± 3°C ve 25°C ± 2°C/60% ± 5% bağıl nemde yapılan ölçümler arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). 0., 3., 6., 9. ve 12. aylarda yapılan reolojik çalışmalar formülasyonların akış özelliklerinin Newtonian akış tipi gösterdiği ve bu sonuçların 12 ay süresince saklama koşullarında değişmediği görülmüştür.

5.6. *İn Vitro* Salım Ve Lipoliz Çalışmaları

İn vitro salım çalışmaları, USP palet yöntemiyle önce pH 1,2'de (0,1 N HCI) 2 saat, daha sonra da pH 6,8'de fosfat tamponu kullanarak 2 saat süreyle yapılmıştır. Exendin-4 yüklü ***H5*** SNEDDS'lerde yapılan salım çalışmasında pH 1,2'de örnek alınan bazı noktalarda başlangıçta konulan exendin-4 konsantrasyonundan fazla konsantrasyonda exendin-4 ölçülmüş ve exendin-4'ün parçalandığı düşünülmüştür. Bu nedenle, lipoliz çalışmasıyla bu

varsayımın da değerlendirilmesi planlanmıştır. Nitekim biyouyumlu mide ortamında yapılan gastrik lipoliz çalışmasında 60.dk'da alınan örnek konsantrasyonu (93,75±0,028 ng/mL), başlangıç konsantrasyonundan (62,5 ng/mL) yüksek bulunmuş ve salım çalışmalarında düşünülen exendin-4'ün gastrik ortamda parçalandığı varsayımı güçlenmiştir.

Exendin-4'ün parçalanmasını engellemek amacıyla kullanılan proteaz inhibitörü kimostatin yüklü formülasyonlarda da aynı durum gözlenmiştir. Ancak exendin-4'ün gastrointestinal stabilitesinin pH 1,2-8 aralığında incelendiği bir çalışmada peptit miktarı 4.saatin sonunda pH 1,2, 4, 6 ve 8'de %95'in üzerinde gözlenmiştir. Ayrıca peptitin en fazla kimotripsin enzimiyle parçalandığı sonucuna varılmıştır (Sun ve diğerleri, 2016). Formülasyonda kimotripsin inhibitörü kimostatin kullanılarak doğru bir seçim yapıldığı söylenebilir.

Literatürde peptit yüklü kendiliğinden emülsifiye sistemlerde bazı salım çalışmalarının sadece pH 6,8'de yapıldığı görülmüştür (Hintzen ve diğerleri, 2014; Leonaviciute ve diğerleri, 2017; Zupančič, Partenhauser, Lam, Rohrer ve Bernkop-Schnürch, 2016b). Exendin-4 yüklü ***H5*** SNEDDS'lerde pH 6,8'de yığılmalı salınan exendin-4 2. saatin sonunda %73,79 bulunmuştur (Şekil 4.26). İntestinal lipoliz çalışmalarında 2.saatin sonunda hem exendin-4 yüklü formülasyonda hem de exendin-4 ve kimostatin içeren formülasyonların lipolizinde NaOH miktarının harcanmaya devam etmesi sebebiyle etil oleatın yavaş sindirilmesine bağlı olarak formülasyondan exendin-4'ün yavaş salındığı düşünülebilir.

Peptit yapılı enoksapirinin kendiliğinden emülsifiye sistemi hazırlandığı bir çalışmada pH 6,8'de enoksapirin salımı 6. saatin sonunda % 100'e ulaşmıştır. Başka bir çalışmada peptit yapılı bir molekül leuprolid oleatın farklı tipte yağ içeren kendiliğinden emülsifiye sistemleri hazırlanmıştır. Etil oleatın yağ fazı olarak kullanıldığı formülasyondan pH 6,8'de 3.saatin sonunda exendin-4'ün %80'i salınmıştır (Hintzen ve diğerleri, 2014; Leonaviciute ve diğerleri, 2017; Zupančič, Partenhauser, Lam, Rohrer ve Bernkop-Schnürch, 2016b.) Sonuçlarımız literatürle uyumlu bulunmuştur.

Bernkop-Schnürch ve Jalil 2018'de yayınladıkları çalışmalarında kendiliğinden emülsifiye sistemlerinde yapılan salım çalışmalarını değerlendirmişlerdir. Örnek al-ayır (sample and separate) yönteminde salım ortamından yağ damlacıklarını ayırmanın zor olmasının salım profilini etkileyeceğini bildirmişlerdir. Öte yandan diyaliz membran yönteminde peptit

membranı aşarak salım ortamına geçerken yağ damlacıklarının membranda kalıp salım ortamına geçememesiyle bu zorluğun aşılabileceğini belirtmişlerdir. Ancak diyaliz yönteminde, difüzyon membran yüzey alanıyla sınırlı olduğundan sink koşulların sağlanamaması gibi bir problemin ortaya çıkabileceğini düşünmüşlerdir. Böylece kendiliğinden emülsifiye sistemlerde yapılan salım çalışmalarında yöntemlerin tamamen güvenilir bir salım profili veremeyeceğini ve bu nedenle alternatif yöntemlerin üzerinde çalışılabileceğini düşünmüşlerdir (Bernkop-Schnürch ve Jalil, 2018). Bu amaçla, tez çalışmasında *in vivo* çözünme profilini daha iyi tahmin edebilmek için, GİK ortamı daha iyi taklit eden açlık ve tokluk ortamları kullanılarak *in vitro* lipoliz çalışması yapılmıştır. İntestinal lipoliz çalışmalarında SNEDDS'lerin lipolizlerini değerlendirmek amacıyla açlık bağırsak ortamını ortamını taklit etmek amacıyla FASSIF ve tokluk taklit etmek amacıyla da FESSIF biyouyumlu ortamları kullanılmıştır. Bu ortamlar safra tuzları ve fosfolipitler içermektedir (Markopoulos, Andreas, Vertzoni, Dressman ve Reppas, 2015).

İntestinal lipoliz çalışmalarında exendin-4 içeren SNEDDS'ler hem de exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS'ler için 4 saat boyunca NaOH harcandığı gözlenmiştir (Şekil 4.19). Bu durumun uzun zincirli etil oleatın yavaş sindirilmesine bağlı olduğu düşünülebilir. Etil oleatın yavaş sindirilen uzun zincirli bir yağ asidi olduğu yapılan *in vitro* lipoliz çalışmalarında gösterilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2014). Lipoliz çalışmaları sonuçlarına göre harcanan NaOH miktarları istatistiksel değerlendirildiğinde açlık ve tokluk ortamlarında hem exendin-4 içeren SNEDDS'ler hem de exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS'ler arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

5.7. SDS-PAGE İle Stabilite Çalışmaları

SDS-PAGE çalışmaları Bölüm 4.8'de anlatıldığı üzere 0, 1, 2 ve 4. hafta 5°C±3°C bekletilen 1 g exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü H5 SNEDDS'lerle yapılmıştır. SDS-PAGE yönteminde peptitlerin ilerleme hızları molekül ağırlıklarıyla belirlenmektedir. Molekül ağırlığı bilinmeyen örnek, molekül ağırlığı bilinen çeşitli peptitleri içeren moleküler ağırlık belirleyici ile birlikte aynı jel üzerinde yanyana ceplere uygulanır ve ayrı hatlarda elektroforetik olarak ayrılır. SDS ile muamele olan peptit/protein yapıları (ikinci, üçüncü, dördüncü) bozularak peptit primer yapı halinde negatif yüklü bir hale gelir. Molekül ağırlığına ve yüküne bağlı olarak moleküller katottan anota doğru ilerlemektedir. Molekül ağırlığı büyük olan moleküllerin jel üzerinde ilerlemeleri zor olur ve jelin daha üst

kısımlarında bulunurlar, molekül ağırlığı küçük olan moleküllerse jelin alt kısımlarında bulunurlar. Exendin-4'ün molekül ağırlığı 4,186 kDa 'dur. Trisin-SDS-PAGE jel sistemi, 1-100 kDa aralığındaki küçük molekül ağırlıklı peptitlerin ilerlemesinde kullanıldığı için çalışmamızda trisin-SDS-PAGE jel sistemi kullanılmıştır (Schagger ve von Jagow, 1987).

SDS-PAGE çalışmasında moleküler ağırlık belirleyici ve exendin-4 çözeltisinin jelde ilerlediği görülmüş ancak exendin-4 içeren formülasyonların hiçbirinde exendin-4 jelde ilerleme kaydetmemiştir. Bu durumun formülasyon bileşenlerinden kaynaklanabileceği düşünülmüş ve çalışması exendin-4 içeren formülasyon bileşenleri jele yüklenerek SDS-PAGE çalışması tekrarlanmıştır. Şekil 4.28'de görüldüğü üzere exendin-4 çözeltisi, exendin-4'ün Cremophor EL® içermeyen formülasyon bileşenleriyle karışımı (Ex-4-etil oleat, Ex-4-Labrasol®, Ex-4- propilen glikol) uygulanan kuyucuklarda exendin-4'ün jelde ilerlediği, ancak exendin-4'ün Cremophor EL® içeren formülasyon bileşenleriyle karışımı (Ex-4-Cremophor EL®, Ex-4-Cremophor EL®/Labrasol®, Ex-4-SNEDDS) uygulanan kuyucuklarda exendin-4'ün jelde ilerlemediği gözlenmiştir.

Lamaisakul ve diğerlerinin yaptığı çalışmada yüzey etkin madde olarak Cremophor EL® içeren BSA yüklü mikroemülsiyon formülasyonu hazırlamışlardır. BSA'nın mikroemülsiyon içerisinde yapısal bütünlüğünü koruyup korumadığının değerlendirilmesi amacıyla SDS-PAGE çalışması yaplmıştır. BSA içeren mikroemülsiyon jeldeki kuyucuklara yüklenmeden önce 1:100 oranında seyreltilmiştir. (Lamaisakul, Tantituvanont, Lipipun ve Ritthidej, 2019).

Tez çalışmamızda ise Bölüm 3.2.8'de anlatıldığı üzere Coomassie Brilliant Blue boyama yöntemiyle 200 ng-500 ng aralığında peptitler tayin edilebildiğinden kuyucuklara yüklenecek exendin-4 miktarının 200 ng'nın altına düşmemesi için seyreltme oranı 1:5 olarak belirlenmiştir. Bu seyreltme oranında viskoz yapısını koruyan nanoemülsiyonun exendin-4'ün jelde ilerlemesini engellediği düşünülmektedir. Formülasyonlarda Cremophor EL® oranı diğer bileşenlere göre fazla olduğundan SNEDDS formülasyonlarında da jelde exendin-4'ün ilerleyemeyişinin bu sebebe bağlı olabileceği düşünülmektedir.

5.8. Formülasyonların Hücre Canlılığına Etkisinin MTT Testi İle Değerlendirilmesi

Hücre kültürü çalışmalarında intestinal permeabilitenin değerlendirilmesi amacıyla Caco-2 hücreleri kullanılmıştır. Caco-2 hücreleriyle yapılan intestinal permeabilite çalışmaları intestinal bariyerlerden absorpsiyonun tahmin edilmesinde kullanılmaktadır (Larregieu ve Benet, 2013). Permeabilite çalışmalarından önce exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü H5 SNEDDS'lerin Caco-2 hücrelerinin canlılığına etkisi MTT testi ile incelenmiştir. Exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü H5 SNEDDS'leri 1:50 oranında seyreltiğimiz için Caco-2 hücrelerine uygulanan exendin-4 konsantrasyonu 50 ng/mL'dir. Bölüm 4.9'da anlatıldığı üzere exendin-4'ün 25-1000 ng/mL konsantrasyon aralığındaki exendin-4 çözeltilerinin, exendin-4 içermeyen SNEDDS, 50 ng/mL exendin-4 yüklü SNEDDS, 50 ng/mL exendin-4 ve 2,5 ng/mL kimostatin yüklü SNEDDS'in Caco-2 hücrelerine sitotoksik etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.29).

Sha ve diğerleri yaptıkları çalışmada Labrasol® ve Cremophor EL® içeren pozitif ve negatif yüklü kendiliğinden mikroemülsifiye olan sistemlerin (SMEDDS) seyreltme oranlarının Caco-2 hücre hattındaki hücre canlılığına etkisini araştırmışlardır. Negatif yüklü SMEDDS'in 1:50 ila 1: 2000 seyreltme oranlarında, pozitif yüklü SMEDDS'in ise 1:250 ila 1:2000 seyreltme oranlarında hücrelere uygulandıklarında Caco-2 hücrelerinde hücre canlılığa etkisini anlamlı derecede değiştirmediği sonucuna varmışlardır ($p>0,05$). SMEDDS'lerin seyreltilmeleri sonucu Cremophor EL® ve Labrasol® konsantrasyonlarının sırasıyla %2 ve %1'in altında olduğu konsantrasyonlarda hücre canlılığının anlamlı derecede azalmadığını belirtmişlerdir. Tez çalışmamızda kullandığımız exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü yüklü H5 SNEDDS'ler 1:50 oranında seyreltildiğinde %1 oranında Cremophor EL® ve 0.5% oranında Labrasol® içermektedir. Caco-2 hücrelerinin canlılığına etkisi literatürle uyumlu bulunmuştur (Sha, Yan, Wu, Li ve Fang, 2005).

5.9. Hücrelerin Bütünlüğünün Değerlendirilmesi ve Geçiş Çalışmaları

TEER değeri Caco-2 hücrelerinin elektrik direncinin ölçümünde kullanılan hücre tek tabakalarının bütünlüğünün ve geçirgenliğinin doğrulanması için çok hassas ve güvenilir bir yöntemdir (Srinivasan ve diğerleri, 2015). Caco-2 hücreleriyle yapılan intestinal permeabilite çalışmasına hücre tek tabakasının oluştuğu ve TEER değerleri 400 ohm.cm^2'ye ulaştığı 21.günde başlanmıştır (Artursson, Palm ve Luthman, 2001). Deney başlangıcında,

deneyin sonunda ve deneyden 24 saat sonra yapılan TEER ölçümlerinde formülasyonların uygulandığı hücrelerde deneyin sonucunda sıkı bağlantıların açılması sonucu TEER değerlerinin azaldığı, deneyden sonra 24.saatte yapılan ölçümlerde TEER değerlerinin 4.saatteki değerlere göre arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.30). Sıkı bağlantıların geri dönüşümlü olarak açıldığı ve membran bütünlüğünde kalıcı bir zarar oluşmadığı söylenebilir. Geçiş çalışmalarında exendin-4 çözeltisinin, exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerde exendin-4'ün hücre tek tabakasından geçişi 30.dk'da sırasıyla %42,61, %68,24 ve %68,79 bulunmuştur. 4.saatin sonunda tüm kuyucuklarda apikalden bazolaterala geçiş tamamlanmıştır (Şekil 4.31).

Permeabilite katsayısı (P_{app}) exendin-4 yüklü ve exendin-4/kimostatin yüklü H5 formülasyonlarında exendin-4 çözeltisine göre yaklaşık 2 kat daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.24). Formülasyonda bulunan yüzey etkin maddelerin hücre membranındaki lipit çift tabakasına penetrasyonuyla sıkı bağlantıları açarak permeabiliteyi artırdığı bilinmektedir. Ayrıca formülasyonun küçük damlacık büyüklüğüne sahip olması sebebiyle difüzyonu artırdığı söylenebilir (Balakrishnan ve diğerleri, 2009).

Exendin-4'ün farklı konsantrasyonlarının (0,3, 1, 3 ve 9 µg/mL) Caco-2 hücrelerinden permeabilitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, exendin-4'ün konsantrasyonu arttıkça P_{app} değerinin azaldığını belirtilmiştir. P_{app} değeri 0,3 µg/mL exendin-4 uygulanan hücrelerde $7,8x10^{-6}$ cm/sn bulunmuştur. Ayrıca, exendin-4'ün taşınmasının doza bağlı olmadığını bildirmişlerdir. Exendin-4 için doyurulabilir taşıma mekanizmasının mevcut olabileceğini ve bu da apikalden bazolaterale daha yüksek konsantrasyonda peptit taşınmasını önlendiğini düşünmüşlerdir. Bazı yüzey etkin maddelerin exendin-4'ün hücreden geçişini kolaylaştıracağını öne süren çalışmalar mevcuttur (Gupta, Doshi ve Mitragotri, 2013).

Çalışmamızda 50 ng /mL exendin-4 çözeltisi uygulanan hücrelerde P_{app} değeri $8,57x10^{-5}$ cm/sn, exendin-4 yüklü SNEDDS'lerde 16,27±0,04 cm/sn ve exendin-4 / kimostatin yüklü SNEDDS'lerde 17,10±0,04 cm/sn bulunmuştur. Literatürde etkin maddelerin Papp değerleri $< 1 \times 10^{-6}$ cm/sn ise düşük permeabilite özelliği gösterdiği, P_{app} değerleri $>10 \times 10^{-6}$ 'cm/sn'den büyükse etkin maddelerin yüksek permeabilite özelliği gösterdiği belirtilmiştir (Yee, 1997). Exendin-4 50 ng/mL konsantrasyonda yüksek permeabilite göstermektedir. Ancak hem exendin-4 yüklü SNEDDS hem de exendin-4 / kimostatin yüklü SNEDDS'nin

P_{app}'si exendin-4 çözeltisinden daha yüksek bulunması SNEDDS'lerin exendin-4'ün permeabilitesini artırdığını göstermiştir.

5.10. *İn Vivo* Çalışmalar

Tez çalışmamızda kullanılan exendin-4 pankreatik GLP-1 reseptörlerine yüksek afiniteyle bağlanarak antidiyabetik etki gösteren peptit yapısında bir moleküldür. Exendin-4'ün subkütan formu Byetta® pankreastaki beta hücrelerinden insülin sekresyonunu artırırken aynı zamanda glukagon sekresyonunu baskılamaktadır. Bu sayede exendin-4, kan glikoz konsantrasyonunu düzenlemekte etkin bir rol oynamaktadır (Gao ve Jusko, 2012). Exendin-4'ün hızlı etkili Byetta® ve uzun etkili Bydureon® (exendin-4 içeren PLGA mikropartikülleri) formları subkütan olarak uygulamaktadır. Ancak exendin-4'ün herhangi bir oral ticari formu henüz bulunmamaktadır. Literatürde exendin-4'ün oral biyoyararlanımını artırmak amacıyla polimerik nanotaşıyıcı sistemler kullanılmıştır (Ahn ve diğerleri, 2013; Chuang ve diğerleri, 2013; Nguyen ve diğerleri, 2011; Oh ve diğerleri, 2014; Soudry-Kochavi, Naraykin, Nassar ve Benita, 2015).

Tez çalışmamızda exendin-4'ün biyoyararlanımını artırmak amacıyla, exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü kendiliğinden emülsifiye sistemler üzerinde çalışılmıştır. Kimostatin, formülasyonlara kimotripsin inhibitörü olarak exendin-4'ün enzimatik parçalanmasını engellemek amacıyla eklenmiştir. SNEDDS'ler GİK'te nanoboyutta damlacıklar oluşturarak peptit/proteinlerin intestinal permeabilitesini ve oral biyoyararlanımı artırmaktadır (Hintzen ve diğerleri, 2014). Ayrıca SNEDDS'lerin birey içi/bireylerarası değişkenliğin ve yiyecek etkisinin azaltılması gibi birçok üstünlüğü bulunmaktadır (AboulFotouh, Allam, El-Badry ve El-Sayed, 2018). SNEDDS'lerin peptit/proteinlerin biyoyararlanımını arttırmasında üç mekanizma etkili olmaktadır. SNEDDS'lerin GİK'te lipolizi sonucu oluşan lipoliz ürünleri (karışık miseller) peptitin çözünürlüğünü artırmakta ve emilim için sulu difüzyon katmanı boyunca taşımaktadır. GİK'te oluşan nanoboyuttaki damlacıklar içerisindeki peptit/proteinler, parasellüler/ transsellüler yolaklar yoluyla veya Peyer plaklarında bulunan M hücreleri yoluyla taşınmaktadır. Ayrıca şilomikron oluşumuyla peptit yapılı molekülün lenfatik sistem tarafından alınması, hepatik ilk geçiş etkisini azalttığı için peptit/proteinlerin biyoyararlanımını arttırmaya yardımcı olmaktadır (Kollipara ve Gandhi, 2014; Singh ve diğerleri, 2017).

SNEDDS'lerin ana bileşenleri olarak kullanılan yağların, yüzey etkin maddelerin, yardımcı yüzey etkin maddelerin seçimi oral biyoyararlanımını artırmada önem taşımaktadır. SNEDDS'lerde kullanılan uzun zincirli yağ asitleri şilomikron oluşumunu sağlayarak lipit içerisindeki etkin maddenin lenfatik yolla sistemik dolaşıma katılmasını desteklemektedir. Tez çalışmamızda SNEDDS'i oluşturan yağ olarak kullandığımız etil oleatın lenfatik transportu artırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Griffin ve O'driscoll, 2006; Xing ve diğerleri, 2016). SNEDDS'lerde kullanılan yüzey etkin maddeler ve yardımcı yüzey etkin maddeler, hem peptit/proteinin çözünürlüğünü artırmaktadır hem de yağ/su arayüzeyinin akışkanlığını artırarak transsellüler taşınmayı ve sıkı bağlantıları açarak parasellüler taşınmayı sağlamaktadır (Rani, Rana, Saraogi, Kumar ve Gupta, 2019). Tez çalışmamızda kullandığımız Cremophor EL® ve Labrasol®'ün sıkı bağlantılarını açarak intestinal permeabiliteyi artırdığı belirtilmiştir (Chavda ve Shah, 2017).

İn vivo çalışmalar Bölüm 4.11'de belirtildiği üzere farmakokinetik ve farmakodinamik çalışmalar şeklinde, diyabetik olmayan ve streptozosinle diyabet oluşturulmuş sıçanlarda gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmamızda geliştirdiğimiz oral yoldan uygulanmak üzere hazırlanan exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin içerdiği exendin-4'ün farmakokinetik parametreleri, farmakodinamik parametreler olan kan glikoz ve plazma insülin seviyesi üzerine olan etkileri ve biyoyararlanımları, oral yolla verilen exendin-4 çözeltisi ve ticari ürün olan Byetta® ile karşılaştırılmıştır. Çalışmamızı diyabetik olmayan sıçanlarda da gerçekleştirmemizin sebebi exendin-4'ün sağlıklı hayvanlarda exendin-4 plazma konsantrasyonlarını incelemek, bu konsantrasyonların sağlıklı hayvanlarda da kan glikoz ve plazma insülin seviyesi üzerine olan olası etkileri incelemektir.

5.10.1. Farmakokinetik çalışmalar

Farmakokinetik çalışmalar Bölüm 3.2.12'de belirtildiği şekilde exendin-4 çözeltisi (oral), Byetta® (sc), exendin-4 ve exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS (oral) uygulanan diyabetik olmayan ve streptozosinle diyabet oluşturulmuş sıçanlarda gerçekleştirilmiştir. Alınan kan örneklerinin ELISA kitiyle analizi sonucunda plazma exendin-4 konsantrasyonu zaman profilleri çizilmiştir (Şekil 4.32-4.41). Farmakokinetik çalışmalar esnasında deney gruplarında sıçan ölümlerinin gerçekleşmesine bağlı olarak sonuçlar her bir grupta n=5 olarak değerlendirilmiştir. Plazma exendin-4 konsantrasyonundan hareketle PKSolver®

programı kullanılarak t_{maks}, $t_{1/2}$, C_{maks}, AUC_{0-3} farmakokinetik parametreleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.24).

Farmakokinetik çalışmada temel amacımız geliştirilen exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin oral yoldan exendin-4 verilmesinde emilimin hız ve derecesinin değerlendirilmesidir. Bu amaçla geliştirilen exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin farmakokinetik parametreleri exendin-4 çözeltisi (oral) ve ticari ürün olan Byetta® ile karşılaştırılmış ve biyoyararlanımları değerlendirilmiştir. Exendin-4'ün subkütan formu Byetta® doğrusal farmakokinetik göstermektedir. Byetta® 2,5 µg veya 5 µg subkütan olarak uygulandığında C_{maks} 56 pg/mL ve 85 pg/mL, AUC 159 pg.saat/mL ve 340 pg.saat/mL bulunmuştur (McCormack, 2014). SNEDDS'lerle karşılaştırılabilir bir profil elde edebilmek için Byetta® dozu 2,5 µg olarak planlanmıştır. Bunun için de yaklaşık 250-300 g ağırlığında olan sıçanlara 10 µg/kg dozda exendin-4 (oral çözelti, SNEDDS, SNEDDSK, Byetta®) verilmiştir.

Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4 çözeltisi oral yoldan uygulandığında Çizelge 4.24'de görüldüğü gibi t_{maks} değeri 126,0±61,5 dk, C_{maks} değeri 14,9±2,2 pg/mL, AUC_{0-3} değeri 2069,2±196,7 pg.dk/mL, exendin-4 SNEDDS oral yoldan uygulandığında t_{maks} değeri 90,0±84,2 dk, yarılanma ömrü 1275,9±889,9 dk, C_{maks} değeri 28,5±6,9 pg/mL, AUC_{0-3} değeri 3027,5±905,5 pg.dk/mL, exendin-4/kimostatin SNEDDS oral yoldan uygulandığında t_{maks} değeri 30,0±18,4 dk, $t_{1/2}$ 494,7±171,1 dk, C_{maks} değeri 39,7±15,7 pg/mL, AUC_{0-3} değeri 4769,3±2602,9 pg.dk/mL, Byetta® subkütan uygulandığında t_{maks} değeri 45,0±21,2 dk, $t_{1/2}$ 535,1±476,5 dk, C_{maks} değeri 387,4±53,5 pg/mL, AUC_{0-3} değeri 57426,8±11935,0 pg.dk/mL olarak hesaplanmıştır. Diyabetik olmayan sıçanlarda exendin-4 çözelti (oral) uygulanan gruplardaki k_d, $t_{1/2,}$ MRT ve Cl değerleri exendin-4'ün plazma profillerindeki uzak bölgenin yeterince tanımlanamamasından dolayı PKSolver® programı tarafından hesaplanamamıştır. Biyoyararlanım değerlendirmelerinde emilim hızının göstergesi olan C_{maks} değerleri ve emilim oranının göstergesi olan AUC değerleri ele alınmıştır.

Bu sonuçlara göre diyabetik olmayan sıçanlarda exendin-4 SNEDDS formülasyonu exendin-4 çözeltisine kıyasla C_{maks} ve AUC_{0-3} değerlerini sırasıyla 1,9 kat ve 1,46 kat artırmıştır. Exendin-4 çözelti ve exendin-4 SNEDDS uygulanan gruplarının AUC_{0-3} değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Exendin-4/kimostatin SNEDDS ise exendin-4 çözeltiye kıyasla C_{maks} ve AUC_{0-3} değerlerini sırasıyla

2,66 ve 2,3 kat artırmıştır. Exendin-4 çözelti ve exendin-4/kimostatin SNEDDS uygulanan gruplarının AUC_{0-3} değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Formülasyona kimostatin ilavesi, oral uygulanan exendin-4'ü GİK'teki enzim etkisinden koruyarak hem C_{maks} hem de AUC_{0-3} değerlerinde exendin-4 SNEDDS uygulanan gruba göre artış sağlamıştır. Exendin-4 çözelti, exendin-4 SNEDDS ve exendin-4/kimostatin SNEDDS'in Byetta®'ya göre bağıl biyoyararlanımı ise sırasıyla %3,603±0,016, %5,272±0,076 ve %8,305±0,218 bulunmuştur (Çizelge 4.26).

Diyabetik sıçanlara exendin-4 çözeltisi oral yoldan uygulandığında t_{maks} değeri 60,0±0,0 dk, $t_{1/2}$ 147,4±95,7 dk, C_{maks} değeri 36,4±5,8 pg/mL, AUC_{0-3} değeri 4991,3±658,1 pg.dk/mL, exendin-4 SNEDDS oral yoldan uygulandığında t_{maks} değeri 67,5±29,4 dk, $t_{1/2}$ 110,9±89,2 dk, C_{maks} değeri 46,9±29,08 pg/mL, AUC_{0-3} değeri 4071,6±1141,3 pg.dk/mL, exendin-4/kimostatin SNEDDS oral yoldan uygulandığında t_{maks} değeri 84,0±65,0 dakika, $t_{1/2}$ 287,1±210,5 dk, C_{maks} değeri 58,1±11,1 pg/mL, AUC_{0-3} değeri 7875,5±835,1 pg.dk/mL, Byetta® sc uygulandığında t_{maks} değeri 66,0±65,03 dk, $t_{1/2}$ 107,1±73,1 dk, C_{maks} değeri 8956,1±4741,8 pg/mL, AUC_{0-3} değeri 1029364,0±762420,2 pg.dk/mL olarak hesaplanmıştır.

Bu sonuçlara göre diyabetik sıçanlarda exendin-4 SNEDDS exendin-4 çözeltisine kıyasla C_{maks} ve AUC_{0-3} değerlerini sırasıyla 1,3 kat ve 0,8 kat artırmıştır. Exendin-4 çözelti ve exendin-4 SNEDDS uygulanan gruplarının AUC_{0-3} değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Exendin-4/kimostatin SNEDDS ise exendin-4 çözeltiye kıyasla Cmaks ve AUC_{0-3} değerlerini sırasıyla 1,59 ve 1,58 kat artırmıştır. Exendin-4 çözelti ve exendin-4/kimostatin SNEDDS uygulanan gruplarının AUC0-3 değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Diyabetik sıçanlara uygulanan exendin-4/kimostatin SNEDDS, oral uygulanan exendin-4'ü GİK'teki enzim etkisinden koruyarak hem C_{maks} hem de AUC_{0-3} değerlerinde exendin-4 SNEDDS uygulanan gruba göre artış sağlamıştır. Exendin-4 çözelti, exendin-4 SNEDDS ve exendin-4/kimostatin SNEDDS'in Byetta®'ya göre bağıl biyoyararlanımı ise sırasıyla %0,485±0,086, % 0,396±0,149 ve % 0,765±0,109 bulunmuştur (Çizelge 4.26).

Exendin-4'ün 50 pg/mL plazma konsantrasyonda glikoz homeostazını düzenlediği belirtilmiştir (Knop, Brønden ve Vilsbøll, 2017). Diyabetik olmayan grupta exendin-4, çözeltisi, exendin-4 SNEDDS ve exendin-4/kimostatin SNEDDS uygulaması sonucu

exendin-4 plazma doruk konsantrasyonu değerleri 50 pg/mL'nin altında bulunmuştur. Diyabetik grupta, exendin-4 düzeylerinin uygulanan bütün formülasyonlarda diyabetik olmayan gruba göre daha yüksek plazma konsantrasyonunun elde edilmesinin, artmış kan glikoz düzeyi karşısında insülin salımını indüklemek üzere salınan endojen exendin-4 düzeyine bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Byetta® 5 µg veya 10 µg dozda uygulandığında AUC değerlerinde yaklaşık % 20 – 60, C_{maks} değerlerinde ise % 30-60 bireyler arası değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir (EMA, 2006). Çalışmamızda Byetta® 2,5 µg uygulandığında diyabetik sıçanlarda C_{maks} ve AUC_{0-3} değerlerinde sırasıyla %52 ve %74 oranında sıçanlar arasında değişkenlik gösterdiği bulunmuştur. Exendin-4 SNEDDS'de ise C_{maks} ve AUC_{0-3} değerlerinde sıçanlar arasında değişkenlik sırasıyla %62 ve %28 bulunmuştur. Exendin-4/kimostatin SNEDDS'de ise C_{maks} ve AUC_{0-3} değerlerinde sıçanlar arasında değişkenlik nispeten azalmış olup sırasıyla %19 ve %10 bulunmuştur. Exendin-4/kimostatin SNEDDS'in, Byetta®'ya göre bireylerarası değişkenliği azalttığı görülmektedir.

5.10.2. Farmakodinamik çalışmalar

Exendin-4 ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin sıçanlara oral yoldan uygulanması sonucu kan glikoz ve insülin seviyesi üzerine olan etkilerinin incelenmesi farmakodinamik analiz olarak değerlendirilmektedir. Farmakodinamik çalışmalar Bölüm 3.2.12'de belirtildiği şekilde exendin-4 çözeltisi (oral), Byetta® (sc), exendin-4 ve exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS (oral) uygulanan diyabetik olmayan ve streptozosinle diyabet oluşturulmuş sıçanlarda gerçekleştirilmiştir. Alınan kan örneklerinden plazma insülin konsantrasyonları insülin ELISA kitiyle hesaplanarak plazma insülin konsantrasyon-zaman profilleri elde edilmiştir (Şekil 4.42-4.51). Ayrıca plazma kan glikoz konsantrasyonları kan glikoz ölçüm cihazıyla ölçülerek % kan glikoz seviyeleri (başlangıça göre) elde edilmiştir (Şekil 4.52-4.61). Farmakodinamik çalışmalar esnasında deney gruplarında sıçan ölümlerinin gerçekleşmesine bağlı olarak sonuçlar her bir grupta n=5 olarak değerlendirilmiştir.

Diyabetik olmayan sıçanların tüm deney gruplarında exendin-4 plazma kan konsantrasyonuna paralel şekilde ilk 60.dakikada plazma insülin seviyelerinde artış

gözlenmiştir. Ancak Byetta® (sc) uygulanan grupta 2.saate kadar insülin seviyelerinde artış gözlenmiştir.

Diyabetik sıçanlarda exendin-4/kimostatin SNEDDS ve Byetta® (sc) uygulanan grupta kan konsantrasyonuna paralel şekilde ilk 60.dakikada plazma insülin seviyelerinde belirgin bir artış gözlenmiştir. Ancak exendin-4 çözeltisi ve exendin-4 SNEDDS uygulanan grupta insülin seviyelerinde belirgin bir artış gözlenmemiştir.

Diyabetik olmayan sıçanlara exendin-4 çözeltisi (oral), Byetta® (sc), exendin-4 ve exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS (oral) uygulandığında sıçanlarda kan glikoz seviyelerinde başlangıca göre düşüş gözlenmememiştir. Bu durum exendin-4'ün minimum etkin konsantrasyonu olan 50 pg/mL'ye diyabetik olmayan grupta Byetta® haricinde hiçbir formülasyonla ulaşılamamış olmasıyla açıklanabilir.

Diyabetik sıçanlarda ise 30.dakikada kan glikoz seviyelerindeki başlangıca göre düşüş exendin-4 SNEDDS (oral), exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS (oral), Byetta® (sc) uygulanan gruplarda sırasıyla %23, %25, %29 bulunmuştur. 60., 120. ve 180. dakikalarda tüm gruplarda 30.dk'daki kan glikoz seviyelerine göre artış gözlense de hiçbir grupta kan glikoz seviyelerinde başlangıç değerine dönüş gözlenmemiştir. Bu durumun hayvanlarda kuyruktan kan alınmasına bağlı korku, acı hissi ve açlık koşullarından dolayı gelişen stres hiperglisemisine bağlı olarak kan glikoz seviyelerinde artışlar olabileceğini göstermektedir (Rau ve diğerleri, 2017). 180. dakikada exendin-4 SNEDDS (oral), exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS (oral), Byetta® (sc) uygulanan gruplarda kan glikoz seviyelerindeki başlangıca göre düşüş sırasıyla %18, %22, %24 bulunmuştur. Exendin-4 çözeltisi (oral) uygulanan grupta ise diyabetik sıçanlarda hiçbir zaman noktasında kan glikoz seviyelerinde başlangıca göre düşüş gözlenmemiştir.

Exendin-4, insülin ve diğer antidiyabetik ajanların aksine hipoglisemiye yol açmaksızın kan glikoz seviyelerini düzenlemekte ve bu sayede endojen insüline karşı bozulmuş biyolojik yanıt olarak tanımlanan insülin direnci oluşumunu da önlemektedir (Chakraborti, 2010). Byetta®'nın diyabetik olmayan sıçanlarda örnek alınan tüm noktalarda plazma exendin-4 konsantrasyonları 50 pg/mL'nin üzerinde olmasına rağmen kan glikoz seviyelerinde belirgin bir düşüşe neden olmaması exendin-4'ün kan glikoz seviyesinin normal olduğu durumlarda endojen insülin sekresyonunu kontrol altına almasıyla ve hipoglisemiye yol açmamasıyla

açıklanabilir. Sonuç olarak, exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS'lerle, Byetta® (sc) uygulamaya yakın bir farmakodinamik cevap elde edildiği gösterilmiştir. Tez çalışmamızda exendin-4 yüklü SNEDDS'in hazırlanmasında uzun zincirli yağ asidi olan etil oleatın intestinal lipazlarla daha yavaş sindirildiği *in vitro* lipoliz çalışmalarıyla gösterilmiştir. Bu sayede SNEDDS'in GİK'teki sulu ortamda oluşturduğu nanoboyuttaki yağ damlacıkları içerisindeki exendin-4'ü GİK koşullarından koruduğu, ayrıca formülasyona eklenen kimostatinin enzimatik parçalanmaya karşı da ek koruma sağlayarak glikoz seviyesinde daha fazla bir düşüşe neden olduğu düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan peptit yapılı bir molekül olan exendin-4'ün oral yoldan uygulanmak üzere SNEDDS formülasyonunun geliştirilmesi ve karakterizasyonunun incelenmesi, *in vitro*/*in vivo* olarak değerlendirilmesi amaçlanan tez çalışmamızda aşağıda belirtilen sonuçlar elde edilmiştir:

Kapsamlı ve sistematik olarak yürütülen önformülasyon çalışmaları ile aşağıda belirtilen en uygun SNEDDS formülasyonları seçilmiştir:

- ✓ E2 formülasyonu: %30,00 etil oleat, %52,50 Cremophor EL®, %17,50 absolü etanol
- ✓ F formülasyonu: %16,67 etil oleat, %62,50 Cremophor EL®, %20,83 absolü etanol
- ✓ G5 formülasyonu: %15,00 etil oleat, %21,25 Cremophor EL®, %42,5 Labrasol®, %21,25 absolü etanol
- ✓ H5 formülasyonu: %15,00 etil oleat, %42,5 Cremophor EL®, %21,25 Labrasol®, %21,25 propilen glikol
- ✓ I5 formülasyonu: %15,00 etil oleat, %47,81 Cremophor EL®, %15,94 Labrasol®, % 21,25 propilen glikol
- ✓ J5 formülasyonu: %15,00 etil oleat: %42,5 Cremophor EL®, %21,25 Labrasol®, % 15,94 propilen glikol, %5,31 absolü etanol

Ayrıca deney tasarımı (DoE) yaklaşımı kullanılarak hedef ürün profili, damlacık büyüklüğünün 50 nm'nin altında, polidispersite indeksinin 0,2'nin altında ve emülsifikasyon süresinin 1 dakikadan az olmak üzere belirlenmiştir.

Seçilen formülasyonların yükleme etkinlikleri ***H5*** için %88,25, ***I5*** için %82,41 ve ***J5*** için %81,69 olarak saptanmıştır. Bu formülasyonlar için ayrıntılı olarak yapılan karakterizasyon çalışmaları ve 1 ay süreli olarak 5ºC ± 3ºC, 25°C ± 2°C/60% ± 5% bağıl nem ve 40ºC ± 5ºC/%75 ± %5 bağıl nemde yapılan kısa süreli fiziksel stabilite çalışmaları sonucu karakterizasyon parametrelerinde 1 ay boyunca istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmayan exendin-4 yüklü ***H5*** formülasyonu seçilmiştir ($p>0.05$).

Exendin-4 yüklü ***H5*** formülasyonunun 50 mL bidistile su ile seyreltilmesi sonucu damlacık büyüklüğü 24,28±0,43 nm, polidispersite indeksi 0,17 ± 0,01, zeta potansiyeli -1,28±3,61

mV, viskozitesi 79,60±3,30 m.Pas, pH'sı 5,40±0,00, türbiditesi 6,37±0,00 bulunmuştur. Exendin-4 yüklü H5 SNEDDS formülasyonuna kimotripsin inhibitörü kimostatin eklenmiştir. Exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS formülasyonunun 50 mL bidistile su ile seyreltilmesi sonucu damlacık büyüklüğü 20,25±0,35 nm, polidispersitesi indeksi 0,11 ± 0,02, zeta potansiyeli -1,85 ± 2,49 mV, viskozitesi 100,02±7,65 m.Pas ve Newtonian akış özelliği gösterdiği bulunmuştur.

Uzun süreli fiziksel stabilite çalışmalarında exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin 0., 3., 6., 9. ve 12. aylardaki damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve viskozite sonuçları açısından değerlendirildiğinde 12 ay boyunca stabil olduğu bulunmuştur.

In vitro salım çalışmaları sonucunda exendin-4 yüklü ***H5*** SNEDDS'de pH 6,8'de yığılmalı salınan exendin-4 2. saatin sonunda %73,79 bulunmuştur.

Lipoliz çalışmaları sonuçlarına göre sindirilen yağ miktarıyla orantılı olarak artan harcanan NaOH miktarları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde açlık ve tokluk ortamlarında hem exendin-4 içeren SNEDDS'ler hem de exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS'ler arasında anlamlı bir farklılık gözlenmediği ve etil oleatın yavaş sindirildiği bulunmuştur ($p<0.05$).

Caco-2 hücreleriyle yapılan sitotoksisite çalışması sonucunda, exendin-4 yüklü SNEDDS ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'lerin Caco-2 hücrelerine sitotoksik etki göstermediği bulunmuştur.

Caco-2 hücreleriyle yapılan intestinal permeabilite çalışması sonucunda exendin-4 yüklü ve exendin-4/kimostatin yüklü SNEDDS'nin P_{app}'si exendin-4 çözeltisinden 2 kat daha yüksek bulunmasıyla SNEDDS'lerin exendin-4'ün permeabilitesini artırdığı gösterilmiştir. *In vivo* farmakokinetik çalışmalarda diyabetik olmayan sıçanlarda exendin-4/kimostatin SNEDDS, exendin-4 çözeltisine kıyasla C_{maks} ve AUC_{0-3} değerlerini sırasıyla 2,66 ve 2,3 kat artırmıştır. Diyabetik sıçanlarda ise exendin-4/kimostatin SNEDDS exendin-4 çözeltisine kıyasla C_{maks} ve AUC_{0-3} değerlerini sırasıyla 1,59 ve 1,58 kat artırmıştır. Ayrıca exendin-4/kimostatin SNEDDS'in, Byetta®'ya göre bireyler arası değişkenliği azalttığı saptanmıştır. *In vivo* farmakodinamik çalışmalarda exendin-4/kimostatin SNEDDS uygulanan diyabetik olmayan sıçanlarda exendin-4 plazma kan konsantrasyonuna paralel şekilde ilk 60. dakikada plazma

insülin seviyelerinde artış gözlenmiştir. Diyabetik sıçanlarda exendin-4/kimostatin SNEDDS ve Byetta® (sc) uygulanan grupta kan konsantrasyonuna paralel şekilde ilk 60. dakikada plazma insülin seviyelerinde belirgin bir artış gözlenmiştir. Ancak exendin-4 çözeltisi ve exendin-4 SNEDDS uygulanan grupta insülin seviyelerinde belirgin bir artış gözlenmemiştir.

Diyabetik olmayan sıçanlara hiçbir gruptaki sıçanlarda kan glikoz seviyelerindeki başlangıca göre düşüş gözlenmezken diyabetik sıçanlarda ise 30.dakikada kan glikoz seviyelerindeki başlangıca göre düşüş exendin-4 SNEDDS (oral), exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS (oral), Byetta® (sc) uygulanan gruplarda sırasıyla %23, %25, %29 bulunmuştur. Exendin-4 çözelti (oral) uygulanan grupta ise diyabetik sıçanlarda hiçbir zaman noktasında kan glikoz seviyelerinde başlangıca göre düşüş gözlenmemiştir.

Exendin-4/kimostatin içeren SNEDDS'lerle, Byetta® (sc) uygulamaya yakın bir farmakodinamik cevap elde edildiği, SNEDDS'in exendin-4'ü koruduğu, kimostatinin enzimatik parçalanmaya karşı da ek koruma sağlayarak glikoz seviyesinde daha fazla bir düşüşe neden olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, tez çalışmamızda exendin-4'ün oral yoldan uygulanmak üzere kendiliğinden nanoemülsifiye olan sistemleri başarıyla geliştirilmiştir. *İn vitro*/*in vivo* çalışmalar sonucunda peptit/proteinlerin oral biyoyararlanımını artırmada SNEDDS formülasyonlarının ve enzim inhibitörleriyle kombinasyon halinde kullanımlarının ümit verici olduğu düşünülmektedir. Geliştirilen SNEDDS formülasyonunun Tip 2 diyabet tedavisinde oral yoldan uygulanmak üzere ticari bir ürün olarak geliştirilmesi için daha fazla deney hayvanıyla açlık/tokluk biyoyararlanım çalışmalarının ve gerekli klinik çalışmalarının yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

AboulFotouh, K., Allam, A.A., El-Badry, M., and El-Sayed, A.M. (2018). Role of self-emulsifying drug delivery systems in optimizing the oral delivery of hydrophilic macromolecules and reducing interindividual variability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 167, 82-92.

Aguirre, T.A., Teijeiro-Osorio, D., Rosa, M., Coulter, I., Alonso, M., and Brayden, D. (2016). Current status of selected oral peptide technologies in advanced preclinical development and in clinical trials. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 106, 223-241.

Ahn, S., Lee, I.H., Lee, E., Kim, H., Kim, Y.C., and Jon, S. (2013). Oral delivery of an anti-diabetic peptide drug via conjugation and complexation with low molecular weight chitosan. *Journal of Controlled Release*, 170(2), 226-232.

Ali, H., Siddiqui, A., and Nazzal, S. (2010). The effect of media composition, pH, and formulation excipients on the in vitro lipolysis of self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS). *Journal of Dispersion Science and Technology*, 31(2), 226-232.

Antunes, F., Andrade, F., Ferreira, D., Morck Nielsen, H., and Sarmento, B. (2013). Models to predict intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins. *Current Drug Metabolism*, 14(1), 4-20.

Arslan, Ş.A., and Tirnaksiz, F. (2013). Self-Emulsifying Drug Delivery Systems. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(1), 55-64.

Artursson, P., Neuhoff, S., and Matsson, P. (2007). Passive permeability and active transport models for the prediction of oral absorption. In J.B. Taylor and D.J. Trigle (Eds.), *Comprehensive medicinal chemistry II*. Oxford: Elsevier Science and Technology, 259-278.

Avrameas, S. (1992). Amplification systems in immunoenzymatic techniques. *Journal of Immunological Methods*, 150(1-2), 23-32.

Bachhav, Y.G., and Kalia, Y.N. (2011). Development and validation of a rapid high-performance liquid chromatography method for the quantification of exenatide. *Biomedical Chromatography*, 25(7), 838-842.

Bai, J. (1995). Colonic delivery of peptide and protein drugs: consideration of intracellular proteolytic enzymes. *STP Pharma Sciences*, 5(1), 30-35.

Bain, S.C., and Stephens, J.W. (2008). Exenatide and pancreatitis: an update. *Expert Opinion on Drug Safety*, 7(6), 643-644.

Balakrishnan, P., Lee, B.J., Oh, D.H., Kim, J.O., Lee, Y.I., Kim, D.D., Jee, J.P., Lee, Y.B., Woo, J.S., Yong, C.S., and Choi, H.G. (2009). Enhanced oral bioavailability of Coenzyme Q10 by self-emulsifying drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 374(1-2), 66-72.

Banga, A.K. (2015). *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems* (Third Edition), Florida: CRC Press Taylor & Francis Group, 37-42.

Bektaş, D. (2019). *Tenofovir içeren lipit kaynaklı kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı nano sistemlerin geliştirilmesi ve in vitro – in vivo değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 24-35.

Bernkop-Schnürch, A. and Jalil, A. (2018). Do drug release studies from SEDDS make any sense? *Journal of Controlled Release*, 271, 55-59.

Bhansali, A., Maji, D., Rao, P., Banerjee, S., and Kumar, H. (2010). Historical overview of incretin based therapies. *Supplement to JAPI*, 58, 12-13.

Bu, P., Narayanan, S., Dalrymple, D., Cheng, X., and Serajuddin, A.T. (2016). Cytotoxicity assessment of lipid-based self-emulsifying drug delivery system with Caco-2 cell model: Cremophor EL as the surfactant. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91, 162-171.

Carrière, F. (2016). Impact of gastrointestinal lipolysis on oral lipid-based formulations and bioavailability of lipophilic drugs. *Biochimie*, 125, 297-305.

Chakraborti, C. (2010). Exenatide: A new promising antidiabetic agent. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(1), 1.

Chavda, V.P., and Shah, D. (2017). Self-emulsifying delivery systems: one step ahead in improving solubility of poorly soluble drugs. In A. M. Grumezescu, and A. Ficai (Eds.), *Nanostructures for Cancer Therapy*. Oxford: Elsevier, 653-718.

Catnach, S., Fairclough, P., and Hammond, S. (1994). Intestinal absorption of peptide drugs: advances in our understanding and clinical implications. *Gut*, 35(4), 441.

Charman, S.A., Charman, W.N., Rogge, M.C., Wilson, T.D., Dutko, F.J., and Pouton, C.W. (1992). Self-emulsifying drug delivery systems: formulation and biopharmaceutic evaluation of an investigational lipophilic compound. *Pharmaceutical Research*, 9(1), 87-93.

Charman, W., and Stella, V. (1991). Transport of lipophilic molecules by the intestinal lymphatic system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 7(1), 1-14.

Chen, Y.E., and Drucker, D.J. (1997). Tissue-specific expression of unique mRNAs that encode proglucagon-derived peptides or exendin 4 in the lizard. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(7), 4108-4115.

Cherniakov, I., Domb, A.J., and Hoffman, A. (2015). Self-nano-emulsifying drug delivery systems: an update of the biopharmaceutical aspects. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12(7), 1121-1133.

Chin, J., Mahmud, K.F., Kim, S.E., Park, K., and Byun, Y. (2012). Insight of current technologies for oral delivery of proteins and peptides. *Drug Discovery Today: Technologies*, 9(2), 105-112.

Chintalapudi, R., Murthy, T., Lakshmi, K.R., and Manohar, G.G. (2015). Formulation, optimization, and evaluation of self-emulsifying drug delivery systems of nevirapine. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 5(4), 205.

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.

Christophersen, P.C., Christiansen, M.L., Holm, R., Kristensen, J., Jacobsen, J., Abrahamsson, B., and Müllertz, A. (2014). Fed and fasted state gastro-intestinal in vitro lipolysis: in vitro in vivo relations of a conventional tablet, a SNEDDS and a solidified SNEDDS. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57, 232-239.

Chuang, E.Y., Nguyen, G.T.H., Su, F.Y., Lin, K.J., Chen, C.T., Mi, F.L., Yen, T.C., Juang, J.H., and Sung, H.W. (2013). Combination therapy via oral co-administration of insulin-and exendin-4-loaded nanoparticles to treat type 2 diabetic rats undergoing OGTT. *Biomaterials*, 34(32), 7994-8001.

Cilek, A., Celebi, N., Tırnaksız, 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.

Constantinides, P.P. (1995). Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharmaceutical Research*, 12(11), 1561-1572.

Das, S.S., Singh, A., Kar, S., Ghosh, R., Pal, M., Fatima, M., Singh, N., and Singh, S.K. (2019). Application of QbD Framework for Development of Self-Emulsifying Drug Delivery Systems. In S. Beg and S. Hasnain (Eds.), *Pharmaceutical Quality by Design* (First edition). London: Academic Press, Elsevier, 297-350.

Demir, Ö., Aksu, B., ve Özsoy, Y. (2017). İlaç Formülasyonu Geliştirilmesinde Deney Tasarımı (DoE) Seçimi ve Kullanımı. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21(2), 216-227.

Deutel, B., Greindl, M., Thaurer, M., and Bernkop-Schnürch, A. (2007). Novel insulin thiomer nanoparticles: in vivo evaluation of an oral drug delivery system. *Biomacromolecules*, 9(1), 278-285.

Durna, Z. (2002). Diyabetin Sınıflandırılması ve Tanı Kriterleri. S. Erdoğan. (Editör). *Diyabet Hemşireliği*. İstanbul: Yüce Reklam, Yayın, Dağıtım AŞ, 11-19.

Egan, J.M., Clocquet, A.R., and Elahi, D. (2002). The insulinotropic effect of acute exendin-4 administered to humans: comparison of nondiabetic state to type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(3), 1282-1290.

Fosgerau, K., and Hoffmann, T. (2015). Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*, 20(1), 122-128.

Frey, C.F., Zhou, H., Harvey, D.J., and White, R.H. (2006). The incidence and case-fatality rates of acute biliary, alcoholic, and idiopathic pancreatitis in California, 1994-2001. *Pancreas*, 33(4), 336-344.

Gao, W., and Jusko, W.J. (2012). Target-mediated pharmacokinetic and pharmacodynamic model of exendin-4 in rats, monkeys, and humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(5), 990-997.

Gedulin, B.R., Smith, P.A., Jodka, C.M., Chen, K., Bhavsar, S., Nielsen, L.L., Parkes, D.G., and Young, A.A. (2008). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of exenatide following alternate routes of administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 356(1-2), 231-238.

Gershanik, T., and Benita, S. (2000). Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 179-188.

Gibson, L. (2007). Lipid-Based Excipients for Oral Drug Delivery. In D.J. Hauss (Eds.), *Oral Lipid-Based Formulations: Enhancing the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs* (First edition). New York: Informa Healthcare, CRC Press, 33-62.

Goodarzi, F., and Zendehboudi, S. (2019). A comprehensive review on emulsions and emulsion stability in chemical and energy industries. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 97(1), 281-309.

Graaff, V.D. (1986). Anatomy and physiology of the gastrointestinal tract. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 5(1), 11-16.

Griffin, B.T., and O'driscoll, C.M. (2006). A comparison of intestinal lymphatic transport and systemic bioavailability of saquinavir from three lipid-based formulations in the anaesthetised rat model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(7), 917-925.

Grover, G.N., and Maynard, H.D. (2010). Protein–polymer conjugates: synthetic approaches by controlled radical polymerizations and interesting applications. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(6), 818-827.

Gupta, S., Kesarla, R., and Omri, A. (2013). Formulation strategies to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs with special emphasis on self-emulsifying systems. *ISRN Pharmaceutics*, 2013, 848043.

Gupta, V., Doshi, N., and Mitragotri, S. (2013). Permeation of insulin, calcitonin and exenatide across Caco-2 monolayers: measurement using a rapid, 3-day system. *PloS One*, 8(2), 57136.

Gursoy, R.N., and Benita, S. (2004). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58(3), 173-182.

Gürsoy, R.N. ve Çevik, Ö. (2011). Kendiliğinden Emülsifiye Olabilen İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Farmasötik Alanda Uygulamaları. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 31(2), 151-170.

Hamman, J.H., Enslin, G.M., and Kotzé, A.F. (2005). Oral delivery of peptide drugs. *Bio Drugs*, 19(3), 165-177.

Herman, S., Hooftman, G., and Schacht, E. (1995). Poly (ethylene glycol) with reactive endgroups: I. Modification of proteins. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 10(2), 145-187.

Hintzen, F., Perera, G., Hauptstein, S., Müller, C., Laffleur, F., and Bernkop-Schnürch, A. (2014). In vivo evaluation of an oral self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for leuprorelin. *International Journal of Pharmaceutics*, 472(1-2), 20-26.

Ibraheem, D., Elaissari, A., and Fessi, H. (2014). Administration strategies for proteins and peptides. *International Journal of Pharmaceutics*, 477(1-2), 578-589.

International Diabetes Federation. (2019). *IDF Diabetes Atlas* (9th edition). Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 32-76.

İnternet: EMA, European Medicines Agency. (2003). ICH Topic Q 1 A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5_en.pdf, Son Erişim Tarihi: 09.02.2020.

İnternet: EMA, European Medicines Agency. (2006). Byetta: EPAR-Scientific Discussion, 1-27. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/byetta-epar-scientific-discussion_en.pdf, Son Erişim Tarihi: 09.02.2020.

İnternet: Houchin, M.L., Robin, H. L., Qi, H., Ohertman, G., Jennings, R. N., Coleman, S.H. (2010).WIPO, World Intellectual Property Organization. URL: https://patentimages.storage.googleapis.com/95/02/fb/5fe190f6c5d6ff/WO2010028257A1.pdf, Son Erişim Tarihi: 02.03.2020

İnternet: Lenherr, G., Csaba, N., Thwala, L., Zhıgao, N., Alonso, M.J. (2015). WIPO, World Intellectual Property Organization. URL: https://patentimages.storage.googleapis.com/1c/4e/9b/4226fd1f662cc4/WO2015189387A1.pdf, Son Erişim Tarihi: 02.03.2020

Jackson, M.J. (1987). Drug transport across gastrointestinal epithelial. In L.R. Johnson (Eds.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (Second edition). New York: Rave Press, 1597–1621.

Jin, C.H., Chae, S.Y., Son, S., Kim, T.H., Um, K.A., Youn, Y.S., Lee, S., and Lee, K.C. (2009). A new orally available glucagon-like peptide-1 receptor agonist, biotinylated exendin-4, displays improved hypoglycemic effects in db/db mice. *Journal of Controlled Release*, 133(3), 172-177.

Karakucuk, A., Celebi, N., and Teksin, Z.S. (2016). Preparation of ritonavir nanosuspensions by microfluidization using polymeric stabilizers: I. A Design of Experiment approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95, 111-121.

Katzung, B.G. (2017). *Basic and clinical pharmacology* (Fourteenth edition). New York: Mc Graw-Hill, 87-92.

Kayaalp, S.O. ve Gürlek, A. (Editörler). (2009). *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji* (Onikinci Baskı), Ankara: Pelikan Yayınevi, 1039-1077.

Khalid, N., Sarfraz, M., Arafat, M., Akhtar, M., Löbenberg, R., and Rehman, N.U. (2018). Nano-sized droplets of self-emulsifying system for enhancing oral bioavailability of chemotherapeutic agent VP-16 in rats: A nano lipid carrier for BCS class IV drugs. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 398-408.

Khan, F., Islam, M., Roni, M.A., and Jalil, R.U. (2012). Systematic development of self-emulsifying drug delivery systems of atorvastatin with improved bioavailability potential. *Scientia Pharmaceutica*, 80(4), 1027-1044.

Kim, J.Y., Lee, H., Oh, K.S., Kweon, S., Jeon, O.-c., Byun, Y., Kim, K., Kwon, I.C., Kim, S.Y., and Yuk, S.H. (2013). Multilayer nanoparticles for sustained delivery of exenatide to treat type 2 diabetes mellitus. *Biomaterials*, 34(33), 8444-8449.

Knop, F.K., Brønden, A., and Vilsbøll, T. (2017). Exenatide: pharmacokinetics, clinical use, and future directions. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 18(6), 555-571.

Kohli, K., Chopra, S., Dhar, D., Arora, S., and Khar, R.K. (2010). Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability. *Drug Discovery Today*, 15(21-22), 958-965.

Kollipara, S., and Gandhi, R.K. (2014). Pharmacokinetic aspects and in vitro–in vivo correlation potential for lipid-based formulations. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4(5), 333-349.

Kommuru, T., Gurley, B., Khan, M., and Reddy, I. (2001). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment. *International Journal of Pharmaceutics*, 212(2), 233-246.

Kompella, U.B., and Lee, V.H. (2001). Delivery systems for penetration enhancement of peptide and protein drugs: design considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 211-245.

Krstić, M., Medarević, Đ., Đuriš, J., and Ibrić, S. (2018). Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) and self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) as lipid nanocarriers for improving dissolution rate and bioavailability of poorly soluble drugs. In A.M. Grumezescu (Eds.) *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting*. Cambridge: William Andrew Aplied Science Publishers, Elsevier, 473-508.

Kumar, A., Sharma, S., and Kamble, R. (2010). Self emulsifying drug delivery system (SEDDS): Future aspects. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(4), 7-13.

Kwak, H.-H., Shim, W.-S., Hwang, S., Son, M.-K., Kim, Y.-J., Kim, T.-H., Yoon, Z.-H., Youn, H.-J., Lee, G.-I., and Kang, S.-H. (2009). Pharmacokinetics and efficacy of a biweekly dosage formulation of exenatide in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *Pharmaceutical Research*, 26(11), 2504-2512.

Lakkireddy, H.R., Urmann, M., Besenius, M., Werner, U., Haack, T., Brun, P., Alié, J., Illel, B., Hortala, L., and Vogel, R. (2016). Oral delivery of diabetes peptides - Comparing standard formulations incorporating functional excipients and nanotechnologies in the translational context. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 106, 196-222.

Lamaisakul, S., Tantituvanont, A., Lipipun, V., and Ritthidej, G. (2019). Development of novel cationic microemulsion as parenteral adjuvant for influenza vaccine. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20, 58.

Larregieu, C.A., and Benet, L.Z. (2013). Drug discovery and regulatory considerations for improving in silico and in vitro predictions that use Caco-2 as a surrogate for human intestinal permeability measurements. *The AAPS Journal*, 15(2), 483-497.

Larsen, A.T., Sassene, P., and Müllertz, A. (2011). In vitro lipolysis models as a tool for the characterization of oral lipid and surfactant based drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 417(1-2), 245-255.

Lee, V.H. (1990). Protease inhibitors and penetration enhancers as approaches to modify peptide absorption. *Journal of Controlled Release*, 13(2-3), 213-223.

Leonaviciute, G., Adamovic, N.T., Lam, H.T., Rohrer, J., Partenhauser, A., and Bernkop-Schnürch, A. (2017). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS): proof-of-concept how to make them mucoadhesive. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 112, 51-57.

Lewis, G.A. (2002). Optimization methods. In J. Swarbrick and J.C. Boylan (Eds.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (Second edition). New York: Marcel Dekker, 1922-1937.

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, X., Qi, J., Xie, Y., Zhang, X., Hu, S., Xu, Y., Lu, Y., and Wu, W. (2013). Nanoemulsions coated with alginate/chitosan as oral insulin delivery systems: preparation, characterization, and hypoglycemic effect in rats. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 23.

Li, Y., Clark, K.A., and Tan, Z. (2018). Methods for engineering therapeutic peptides. *Chinese Chemical Letters*, 29(7), 1074-1078.

Malone, J., Trautmann, M., Wilhelm, K., Taylor, K., and Kendall, D.M. (2009). Exenatide once weekly for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(3), 359-367.

Markopoulos, C., Andreas, C.J., Vertzoni, M., Dressman, J., and Reppas, C. (2015). In-vitro simulation of luminal conditions for evaluation of performance of oral drug products: choosing the appropriate test media. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93, 173-182.

McCormack, P.L. (2014). Exenatide twice daily: a review of its use in the management of patients with type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, 74(3), 325-351.

Mehta, K., Borade, G., and Bendre, G.R.A.A. (2011). Self-Emulsifying Drug Delivery System: Formulation And Evaluation. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(4), 398-412.

Ménard, S., Lebreton, C., Schumann, M., Matysiak-Budnik, T., Dugave, C., Bouhnik, Y., Malamut, G., Cellier, C., Allez, M., and Crenn, P. (2012). Paracellular versus transcellular intestinal permeability to gliadin peptides in active celiac disease. *The American Journal of Pathology*, 180(2), 608-615.

Morçöl, T., Nagappan, P., Nerenbaum, L., Mitchell, A., and Bell, S. (2004). Calcium phosphate-PEG-insulin-casein (CAPIC) particles as oral delivery systems for insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, 277(1-2), 91-97.

Mrsny, R.J. (2012). Oral drug delivery research in Europe. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 247-253.

Mu, H., Holm, R., and Müllertz, A. (2013). Lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 453(1), 215-224.

Nardin, I., and Köllner, S. (2018). Successful development of oral SEDDS: screening of excipients from the industrial point of view. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 142, 128-140.

Nguyen, H.N., Wey, S.P., Juang, J.H., Sonaje, K., Ho, Y.C., Chuang, E.Y., Hsu, C.W., Yen, T.C., Lin, K.J., and Sung, H.W. (2011). The glucose-lowering potential of exendin-4 orally delivered via a pH-sensitive nanoparticle vehicle and effects on subsequent insulin secretion in vivo. *Biomaterials*, 32(10), 2673-2682.

Oda, H., and Takeichi, M. (2011). Structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. *The Journal of Cell Biology*, 193(7), 1137-1146.

Oh, K.S., Kim, J.Y., Yoon, B.D., Lee, M., Kim, H., Kim, M., Seo, J.H., and Yuk, S.H. (2014). Sol–gel transition of nanoparticles/polymer mixtures for sustained delivery of exenatide to treat type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88(3), 664-669.

Öner, F. (2002). Kontrollü Salım Sistemlerinin Biyoteknoloji Alanında Uygulamaları. In A.Z. Gürsoy (Editör), *Kontrollü Salım Sistemleri*. İstanbul. Aktif Matbaa ve Reklam Hizmetleri San. Tic. Ltd. Şti, 317-331.

Park, K., Kwon, I.C., and Park, K. (2011). Oral protein delivery: Current status and future prospect. *Reactive and Functional Polymers*, 71(3), 280-287.

Parmar, B., Patel, U., Bhimani, B., Sanghavi, K., Patel, G., and Daslaniya, D. (2012). SMEDDS: A dominant dosage form which improve bioavailability. *American Journal of Pharmtech Research*, 2(4), 54-72.

Parmar, K., Patel, J., and Sheth, N. (2015). Self nano-emulsifying drug delivery system for Embelin: Design, characterization and in-vitro studies. *Asian Journal of Pharmaceutical Science*s, 10(5), 396-404.

Pinho, A., Fortuna, A., Falcão, A., Santos, A., Seiça, R., Estevens, C., Veiga, F., and Ribeiro, A. (2019). Comparison of ELISA and HPLC-MS methods for the determination of exenatide in biological and biotechnology-based formulation matrices. *Journal of pharmaceutical analysis*, 9(3), 143-155.

Porstmann, T., and Kiessig, S. (1992). Enzyme immunoassay techniques an overview. *Journal of Immunological Methods*, 150(1-2), 5-21.

Porter, C.J., Pouton, C.W., Cuine, J.F., and Charman, W.N. (2008). Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(6), 673-691.

Pouton, C.W. (1997). Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 25(1), 47-58.

Pouton, C.W. (2006). Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(3-4), 278-287.

Pouton, C.W., and Porter, C.J. (2008). Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(6), 625-637.

Qi, F., Wu, J., Yang, T., Ma, G., and Su, Z. (2014). Mechanistic studies for monodisperse exenatide-loaded PLGA microspheres prepared by different methods based on SPG membrane emulsification. *Acta Biomaterialia*, 10(10), 4247-4256.

Rahman, M.A., Hussain, A., Hussain, M.S., Mirza, M.A., and Iqbal, Z. (2013). Role of excipients in successful development of self-emulsifying/microemulsifying drug delivery system (SEDDS/SMEDDS). *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(1), 1-19.

Rani, S., Rana, R., Saraogi, G.K., Kumar, V., and Gupta, U. (2019). Self-emulsifying oral lipid drug delivery systems: Advances and challenges. *AAPS PharmSciTech*, 20(3), 129.

Rao, S.V.R., Yajurvedi, K., and Shao, J. (2008). Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of protein drugs: III. In vivo oral absorption study. *International Journal of Pharmaceutics*, 362(1-2), 16-19.

Rau, C.-S., Wu, S.-C., Chen, Y.-C., Chien, P.-C., Hsieh, H.-Y., Kuo, P.-J., and Hsieh, C.-H. (2017). Stress-induced hyperglycemia in diabetes: a cross-sectional analysis to explore the definition based on the trauma registry data. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(12), 1527.

Ratnaparkhi, M.P., Chaudhari, S.P., and Pandya, V.A. (2011). Peptides and proteins in pharmaceuticals. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 3(2), 1-9.

Rekha, M., and Sharma, C.P. (2013). Oral delivery of therapeutic protein/peptide for diabetes–future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*, 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 Pharmaceutics*, 447(1-2), 75-93.

Repassy, G., and Lapis, K. (1979). Ultrastructural characteristics, secretory and phagocytotic activity of Paneth cells. *Acta Morphologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 27(1-2), 21-24.

Sakai, K., Yoshimori, T., Obata, K., and Maeda, H. (2010). Design of self-microemulsifying drug delivery systems using a high-throughput formulation screening system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 36(10), 1245-1252.

Sakloetsakun, D., Dünnhaupt, S., Barthelmes, J., Perera, G., and Bernkop-Schnürch, A. (2013). Combining two technologies: Multifunctional polymers and self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral insulin administration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 363-372.

Satman, İ., İmamoğlu, Ş., Yılmaz, C., Akalın, S., Salman, S., ve Dinççağ, N. (Editörler). (2013). *Diabetes Mellitus ve komplikasyonlarının tanı, tedavi ve izlem kılavuzu* (Altıncı baskı). Ankara: Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği [TEMD], 15-254.

Schagger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166, 368-379.

Scott Swenson, E., and Curatolo, W. (1992). Means to enhance penetration: (2) Intestinal permeability enhancement for proteins, peptides and other polar drugs: mechanisms and potential toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 8(1), 39-92.

Sha, X., Yan, G., Wu, Y., Li, J., and Fang, X. (2005). Effect of self-microemulsifying drug delivery systems containing Labrasol on tight junctions in Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24(5), 477-486.

Shafiq, S., Shakeel, F., Talegaonkar, S., Ahmad, F.J., Khar, R.K., and Ali, M. (2007). Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66(2), 227-243.

Shah, N., Carvajal, M., Patel, C., Infeld, M., and Malick, A. (1994). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) with polyglycolyzed glycerides for improving in vitro dissolution and oral absorption of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 106(1), 15-23.

Shah, N.H., Phuapradit, W., Zhang, Y.-E., Ahmed, H., and Malick, A.W. (2007). Lipid-based isotropic solutions: design considerations. In D.J. Hauss (Eds.), *Oral Lipid-Based Formulations: Enhancing the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs* (First edition). New York: Informa Healtycare, CRC Press, 151-170.

Shahba, A.A.-W., Mohsin, K., and Alanazi, F.K. (2012). Novel self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of cinnarizine: design, optimization, and in-vitro assessment. *AAPS PharmSciTech*, 13(3), 967-977.

Shaji, J., and Patole, V. (2008). Protein and peptide drug delivery: oral approaches. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70(3), 269.

Shakweh, M., Ponchel, G., and Fattal, E. (2004). Particle uptake by Peyer's patches: a pathway for drug and vaccine delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 1(1), 141-163.

Sharma, V.K., Koka, A., Yadav, J., Sharma, A.K., and Keservani, R.K. (2016). Self-Micro Emulsifying Drug Delivery Systems: A Strategy to Improve Oral Bioavailability. *Ars Pharmaceutica*, 57(3), 97-109.

Singh, B., Kumar, R., and Ahuja, N. (2005). Optimizing drug delivery systems using systematic "design of experiments." Part I: fundamental aspects. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 22(1), 27-105.

Soudry-Kochavi, L., Naraykin, N., Nassar, T., and Benita, S. (2015). Improved oral absorption of exenatide using an original nanoencapsulation and microencapsulation approach. *Journal of Controlled Release*, 217, 202-210.

Srinivasan, B., Kolli, A.R., Esch, M.B., Abaci, H.E., Shuler, M.L., and Hickman, J.J. (2015). TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *Journal of Laboratory Automation*, 20(2), 107-126.

Swenson, E.S., Milisen, W.B., and Curatolo, W. (1994). Intestinal permeability enhancement: efficacy, acute local toxicity, and reversibility. *Pharmaceutical Research*, 11(8), 1132-1142.

Sun, Y., Wang, M., Sun, B., Li, F., Liu, S., Zhang, Y., Zhou, Y., Chen, Y., and Kong, W. (2016). An investigation into the gastrointestinal stability of exenatide in the presence of pure enzymes, everted intestinal rings and intestinal homogenates. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 39(1), 42-48.

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.

Thanki, K., Gangwal, R.P., Sangamwar, A.T., and Jain, S. (2013). Oral delivery of anticancer drugs: challenges and opportunities. *Journal of Controlled Release*, 170(1), 15-40.

Thomas, N., Holm, R., Rades, T., and Müllertz, A. (2012). Characterising lipid lipolysis and its implication in lipid-based formulation development. *The AAPS Journal*, 14(4), 860-871.

Tortora, G.J. and Derrickson, B.H. (Eds.). (1996). *Principles of anatomy and physiology* (Eighth edition). New York: John Wiley & Sons, 799-840

Türkiye Diyabet Vakfı [TÜRKDİAB]. (2011). *Diyabet tanı ve tedavi rehberi* (İkinci Baskı). Türkiye: Pasifik Reklam ve Tanıtım Hizmetleri, 14-45.

Türkiye Diyabet Vakfı [TÜRKDİAB]. (2017). *Diyabet tanı ve tedavi rehberi* (Yedinci Baskı). Türkiye: Pasifik Reklam ve Tanıtım Hizmetleri, 14-45.

Türkyılmaz, A. (1998). *Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)'nün gastrointestinal sistem ülserlerindeki etkisinin incelenmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 160-172.

Ujhelyi, Z., Vecsernyés, M., Fehér, P., Kósa, D., Arany, P., Nemes, D., Sinka, D., Vasvári, G., Fenyvesi, F., and Váradi, J. (2018). Physico-chemical characterization of self-emulsifying drug delivery systems. *Drug Discovery Today: Technologies*, 27, 81-86.

Ükinç, K., Gürlek, A., ve Umsan, A. (2007). Yeni Antidiyabetik İlaçlar. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38(3), 113-120.

Wakerly, M.G., Pouton, C.W., Meakin, B.J., and Morton, F.S. (1986). Self-emulsification of vegetable oil-nonionic surfactant mixtures: a proposed mechanism of action. *ACS Symposium Series*, 311, 242-255.

Wang, M., Zhang, Y., Sun, B., Sun, Y., Gong, X., Wu, Y., Zhang, X., Kong, W., and Chen, Y. (2014). Permeability of exendin-4-loaded chitosan nanoparticles across MDCK cell monolayers and rat small intestine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(5), 740-747.

Wang, Y., Sun, T., Zhang, Y., Chaurasiya, B., Huang, L., Liu, X., Tu, J., Xiong, Y., and Sun, C. (2016). Exenatide loaded PLGA microspheres for long-acting antidiabetic therapy: preparation, characterization, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *RSC Advances*, 6(44), 37452-37462.

Washington, C. (1990). The stability of intravenous fat emulsions in total parenteral nutrition mixtures. *International Journal of Pharmaceutics*, 66(1-3), 1-21.

Wu, L., Qiao, Y., Wang, L., Guo, J., Wang, G., He, W., Yin, L., and Zhao, J. (2015). A self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for a novel medicative compound against depression: a preparation and bioavailability study in rats. *AAPS PharmSciTech*, 16(5), 1051-1058.

Wu, Z.M., Ling, L., Zhou, L.Y., Guo, X.D., Jiang, W., Qian, Y., Luo, K.Q., and Zhang, L.J. (2012a). Novel preparation of PLGA/HP55 nanoparticles for oral insulin delivery. *Nanoscale Research Letters*, 7(1), 299.

Wu, Z.M., Zhou, L., Guo, X.D., Jiang, W., Ling, L., Qian, Y., Luo, K.Q., and Zhang, L.J. (2012b). HP55-coated capsule containing PLGA/RS nanoparticles for oral delivery of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, 425(1-2), 1-8.

Xue, X., Cao, M., Ren, L., Qian, Y., and Chen, G. (2018). Preparation and optimization of rivaroxaban by self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for enhanced oral bioavailability and no food effect. *AAPS PharmSciTech*, 19(4), 1847-1859.

Xing, Q., Song, J., You, X., Xu, D., Wang, K., Song, J., Guo, Q., Li, P., Wu, C., and Hu, H. (2016). Microemulsions containing long-chain oil ethyl oleate improve the oral bioavailability of piroxicam by increasing drug solubility and lymphatic transportation simultaneously. *International Journal of Pharmaceutics*, 511(2), 709-718.

Yee, S. (1997). In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth. *Pharmaceutical Research*, 14(6), 763-766.

Yetkin, G. (2002). *Transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF-alfa)'nın değişik formülasyonlarının geliştirilmesi, in vitro ve in vivo değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 100-122.

Yun, Y., Cho, Y.W., and Park, K. (2013). Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(6), 822-832.

Zanchetta, B., Chaud, M., and Santana, M. (2015). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) in pharmaceutical development. *Journal of Advanced Chemical Engineering*, 5, 1-7.

Zhang, J., Lv, Y., Zhao, S., Wang, B., Tan, M., Xie, H., Lv, G., and Ma, X. (2014). Effect of lipolysis on drug release from self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) with different core/shell drug location. *AAPS PharmSciTech*, 15(3), 731-740.

Zhang, Q., He, N., Zhang, L., Zhu, F., Chen, Q., Qin, Y., Zhang, Z., Zhang, Q., Wang, S., and He, Q. (2012c). The in vitro and in vivo study on self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) based on insulin-phospholipid complex. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 8(1), 90-97.

Zhang, Y., Wu, X., Meng, L., Zhang, Y., Ai, R., Qi, N., He, H., Xu, H., and Tang, X. (2012b). Thiolated Eudragit nanoparticles for oral insulin delivery: preparation, characterization and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 436(1-2), 341-350.

Zhang, Z.H., Zhang, Y.L., Zhou, J.P., and Lv, H.X. (2012a). Solid lipid nanoparticles modified with stearic acid–octaarginine for oral administration of insulin. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 3333.

Zupančič, O., Grieβinger, J.A., Rohrer, J., de Sousa, I.P., Danninger, L., Partenhauser, A., Sündermann, N.E., Laffleur, F., and Bernkop-Schnürch, A. (2016a). Development, in vitro and in vivo evaluation of a self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for oral enoxaparin administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 109, 113-121.

Zupančič, O., Partenhauser, A., Lam, H.T., Rohrer, J., and Bernkop-Schnürch, A. (2016b). Development and in vitro characterisation of an oral self-emulsifying delivery system for daptomycin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81, 129-136.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Belgesi

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYEK)

Tarih: 16.08.2017 **Toplantı Sayısı: 08** **Karar No:17/076**

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 16.08.2017 tarihinde Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Fahri OĞUZKAYA	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	KATILMADI
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	KATILMADI
Füsun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Serpil SARIÖZKAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
Zühal HAMURCU	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	KATILMADI
Nükhet KÜTÜK	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Yard.Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	KATILMADI
Burcu ÜNLÜ ENDİRLİK	Yard.Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Osman İBİŞ	Yard.Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi	
Zeynep SOYER SARICA	Dr.	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.	
Serap ALTUNTAŞ EROĞLU	Avukat	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	
Asiye GÖKBELEN	Yardım Sevenler Derneği Başkanı	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	KATILMADI

Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji A.D.'dan **Doç. Dr. Yeşim AKTAŞ** tarafından sunulan **"Oral Yoldan Uygulanmak Üzere Exendin-4'ün Kendiliğinden Emülsifiye Olan Nanoformülasyonunun Geliştirilmesi, İn vitro / İn vivo Değerlendirilmesi."** başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : **16.08.2017**
Etik kurul Başkan Vekili : **Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA**
İmza :

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÇELİK TEKELİ, Merve

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 13.05.1990 / Kayseri

Medeni hali : Evli

Telefon : +90 352 207 6666 / 28381

Faks : 0352 437 91 69

e-mail : mervecelik@erciyes.edu.tr

Eğitim Derecesi	**Okul/Program**	**Mezuniyet yılı**
Doktora	Gazi Üniversitesi/ Eczacılık Fakültesi/ Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Erciyes Üniversitesi/ Eczacılık Fakültesi	2009-2014

İş Deneyimi, Yıl	**Çalıştığı Yer**	**Görev**
2014-Devam ediyor	Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Aktas, Y., Celik Tekeli, M., Celebi, N. 2020. "Development And Characterization of Exendin-4 Loaded Self Nanoemulsifiying System and In Vitro Evaluation on Caco-2 Cell Line, Journal of Microencapsulation", Journal of microencapsulation, 37(1), 41-51.

Bildiriler

1. Çelik Tekeli M., Tekeli M. Y., Aktaş Y., Çelebi N. "Oral Administration of Exendin-4 and Exendin-4/Chymostatin Loaded Self Nanoemulsifiying system: Evaluation of Hypoglycemıc Effects In Non-Diabetic And STZ-Induced Diabetic Rats "8th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, 14 - 16 October 2019, İzmir, ***Turkey (Sözlü Bildiri)***

2. Çelik Tekeli M., Aktaş Y., Çelebi N. "In Vitro Lipolysis Test For Exendin-4 And Exendin-4/Chymostatin Loaded Self Nanoemulsifiying system" 19th International Pharmaceutical Technology Symposium-IPTS 2018, 17 - 19 September 2018, Antalya, Turkey ***(Sözlü Bildiri)***

3. Çelik Tekeli M., Aktaş Y., Çelebi N. "Development And Characterization of Self Nanoemulsifiying Formulation for Oral Peptide Delivery". 12th International Symposium On Pharmaceutical Sciences, 26 - 29 Haziran 2018, Ankara, Turkey ***(Poster Bildiri)***

4. Çelik Tekeli M., Aktaş Y., Yücel Ç., Çelebi N. "Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System of Exendin-4: Development, Characterization and Assesment of Cytotoxicity on Caco-2 Cell Line" EUFEPS Annual Meeting 2018, 23 - 26 May 2018, Athens, Greece ***(Poster Bildiri)***

5. Çelik Tekeli M., Karaküçük A., Aktaş Y., Çelebi N. "Development of a Self Emulsifying Drug Delivery System by Design of Experiment (DoE) Approach" 2nd International Gazi Pharma Symposium (GPSS-2017), 11 - 13 October 2017, Ankara, Turkey ***(Poster Bildiri)***

6. Çelik Tekeli M., Çelebi N. , Aktaş Y. "Development and Characterization of Self Nanoemulsifying Systems for Oral Delivery of Peptides" 7th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, 05 - 07 October 2017, Balatonfüred, Hungary ***(Sözlü Bildiri)***

7. Çelik Tekeli M., Aktaş, Y., Aşık, Ç., Çelebi, N. "Preparation And Characterizatıon of Exendin-4 Loaded Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System And Permeability Assesment On Caco-2 Monolayers" 12th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 23-26 March 2020, Vienna, Austria ***(Poster Bildiri)*** (Kabul edildi)

Projeler

1. Oral yoldan uygulanmak üzere exendin-4'ün kendiliğinden emülsifiye olan nanoformülasyonunun geliştirilmesi, in vitro/in vivo değerlendirilmesi, 2018-Devam ediyor, Proje kodu: 217S416, TÜBİTAK 1001 Destek Programı, Bursiyer

2. Oral yoldan uygulanmak üzere peptid içeren nanoemülsiyon formülasyonunun geliştirilmesi ve intestinal geçiş çalışmaları, 2017-2018, Proje Kodu: TCD-2017-7087, Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje (BAP), Araştırmacı

Hobiler

Kitap okumak, yin-yoga



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

