**METFORMİN HCl YÜKLÜ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Behzad MOKHTARE**

**Yüksek Lisans Tezi**
**Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı**
**Nanotıp Bilim Dalı**
**Doç. Dr. Meltem ÇETİN**
**2015**
**Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

# METFORMİN HCl YÜKLÜ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

**Behzad MOKHTARE**

**NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**
**Nanotıp Bilim Dalı**

**ERZURUM**
**2015**

**Her hakkı saklıdır**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAY FORMU

# METFORMİN HCl YÜKLÜ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

Doç. Dr. Meltem ÇETİN danışmanlığında, Behzad MOKHTARE tarafından hazırlanan bu çalışma 28/05/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı–Nanotıp Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği/oy ~~çokluğu~~ (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ahmet HACIMÜFTÜOĞLU *İmza* :

Üye : Doç. Dr. Meltem ÇETİN *İmza* :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Serkan YILDIRIM *İmza* :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 04/06/2015 tarih ve 22/769 nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Ertan YILDIRIM**
**Enstitü Müdürü**

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2013/57

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

# ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

## METFORMİN HCl YÜKLÜ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

Behzad MOKHTARE

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı
Nanotıp Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Meltem ÇETİN

Bu çalışmanın amacı, oral uygulama için metformin HCl-yüklü polimerik ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirmek ve bu sistemlerin *in vitro* özelliklerini ve *in vivo* aktivitesini değerlendirmektir. UV-spektrofotometrik yöntem kullanılarak etkin madde miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Aljinat (AL), aljinat-kitosan (AL-CS) boncukları ve CS mikroküreleri sırasıyla iyonotropik jelasyon ve emülsiyon-çapraz bağlanma yöntemleriyle hazırlanmıştır. Hazırlanan boncuk ve mikroküre formülasyonlarının partikül büyüklüğü-dağılımı, yüzey morfolojisi, yüzde yükleme etkinliği (%EE) ve i*n vitro* etkin madde salım özellikleri (fosfat tamponu (PB) pH 6,8 ve HCl pH 1,2 ortamlarında) değerlendirilmiştir. FT-IR ve DSC de bu sistemleri karakterize etmek için kullanılmıştır. Ayrıca, uygun özelliklere sahip boncukların in vivo hipoglisemik etkileri diyabetik Sprague Dawley cinsi sıçanlarda değerlendirilmiştir. Hazırlanan AL ve AL-CS boncuklarının yaş halde partikül boyutları 1714±140-1850±103 μm ($p>0.05$) aralığında bulunmuştur. Liyofilize boş ve metformin HCl içeren CS mikrokürelerinin ortalama partikül boyutları ise sırasıyla 9.06±1.32 ve 9.21±2.16 μm ($p>0.05$) olarak saptanmıştır. %EE değerleri %20.05±6.92-33.58±1.56 aralığında olan boncuk ve mikroküre formülasyonlarından PB pH 6,8 ortamında 8 gün içerisinde %89-96 oranlarında sürekli salım elde edilmiştir. Boncuk formülasyonu için kitosan kullanıldığında yükleme etkinliği hafif bir düşüş göstermiştir ($p=0.05$). Saf etkin madde ile karşılaştırıldığında metformin HCl-yüklü AL ve AL-CS boncuk formülasyonları diyabetik sıçanlarda oral uygulama sonrası daha uzun süreli hipoglisemik etki göstermişlerdir ($p<0.05$). Metformin HCl'nin yüksek dozlarda tekrarlayan oral uygulamalarını ve yan etkilerini azaltmak, hasta uyuncunu artırmak ve uzun süreli hipoglisemik etki elde etmek için AL ve AL-CS boncukları faydalı olabilir.



**2015, 68 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Aljinat, boncuk, kitosan, metformin HCl, mikroküre, *in vivo* çalışma

## ABSTRACT

Master Thesis

**THE PREPARATION AND *IN VIVO* EVAULATION OF METFORMIN HCL–LOADED DRUG DELİVERY SYSTEMS**

Behzad MOKHTARE

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Nanoscience and Nanoengineering Department
Nanomedicine Science

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Meltem ÇETİN

The purpose of the present study was to prepare metformin HCl-loaded polymeric drug delivery systems for oral application and to evaluate their *in vitro* characteristics and in vivo activity. The amount assay of active substance was performed using UV-spectrophotometric method. Alginate (AL) and alginate-chitosan (AL-CS) beads and CS microspheres were prepared using ionotropic gelation and emulsion-crosslinking method, respectively. The prepared beads and microspheres were evaluated for particles size and distribution, surface morphology, drug encapsulation efficiency (EE%) and in vitro drug release (in phosphate buffer (PB) pH 6.8 and HCl pH 1.2). FT-IR and DSC were also used to characterize these systems. Besides, the beads with expected characteristic was evaluated in vivo by hypoglycemic response in diabetic Sprague Dawley rats. The mean particle sizes of prepared AL and AL-CS beads in wet state ranged from 1714±140 to 1850±103 μm ($p>0.05$). The average sizes of lyophilized blank and metformin HCl-loaded CS microspheres were 9.06±1.32 and 9.21±2.16 μm, respectively ($p>0.05$). The EE% of beads and microspheres was within the range of 20.05±6.92 to 33.58±1.56% with sustained in vitro drug release of about 89 to 96% within 8 days in PB pH 6.8. The encapsulation efficiency slightly decreases with using CS polymer in the beads formulation ($p=0.05$). The optimized metformin HCl-loaded AL and AL-CS beads showed significant hypoglycemic effect in diabetic rats over prolonged period after oral administration compared to pure drug ($p<0.05$). AL and AL-CS beads might be useful to reduce the repeated oral administrations of high doses of metformin HCl and its side effects, to increase patient compliance and to obtain prolonged hypoglycemic effect.



**2015, 68 pages**

**Keywords:** Alginate, beads, chitosan, metformin HCl, microsphere, *in vivo* study

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Meltem ÇETİN'e en derin saygı ve şükranlarımı sunarım. DSC diyagramlarının alınmasındaki yardımları ve yakın ilgileri için Sayın Prof. Dr. M. Şahin GÜLABOĞLU'na ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Hatice BAYRAKÇEKEN'e, FT-IR spektrumlarının ve SEM görüntülerinin elde edilmesindeki katkılarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Hatice BAYRAKÇEKEN'e, çalışmalarımda benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM'a, EIA test kiti desteği ve ilgili deneyin gerçekleştirilmesindeki yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Abdulkadir YILDIRIM'a, bugüne kadar yetişmemde emeği geçen tüm hocalarıma, her zaman yanımda olan ve beni destekleyen Sayın Arş. Gör. Rukiye SEVİNÇ ÖZAKAR'a, Sayın Arş. Gör. Emrah ÖZAKAR'a, Sayın Arş. Gör. Afife Büşra UĞUR'a, Sayın Arş. Gör. Büşra SERVER'e ve sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Behzad MOKHTARE**

**Mayıs, 2015**

# İÇİNDEKİLER

**ÖZET** ..... **i**
**ABSTRACT** ..... **ii**
**TEŞEKKÜR** ..... **iii**
**SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ** ..... **vi**
**ŞEKİLLER DİZİNİ** ..... **viii**
**ÇİZELGELER DİZİNİ** ..... **x**
**1. GİRİŞ** ..... **1**
**2. KURAMSAL TEMELLER** ..... **3**
2.1. Diabetes Mellitus ..... 3
2.1.1. Tip 2 Diyabet tedavisi ..... 7
2.1.1.a. Metformin ..... 8
2.2. İlaç taşıyıcı yeni sistemler ..... 10
2.3. Streptozosin (STZ) ve nikotinamid (NA) ..... 16
**3. MATERYAL ve YÖNTEM** ..... **19**
3.1. Materyaller ..... 19
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler ..... 19
3.1.2. Kullanılan cihazlar ..... 20
3.2. Yöntemler ..... 21
3.2.1. UV-Spektrofotometrik yöntemle miktar tayini ..... 21
3.2.1.a. Analitik yöntem validasyonu ..... 21
3.2.2. Polimerik taşıyıcı sistemlerin hazırlanması ..... 22
3.2.2.a. Boş AL ve AL-CS boncuk formülasyonlarının hazırlanması ..... 22
3.2.2.b. Metformin HCl içeren AL ve AL-CS boncuk formülasyonlarının hazırlanması ..... 23
3.2.2.c. Boş CS mikroküre formülasyonunun hazırlanması ..... 23
3.2.2.d. Metformin HCl yüklü-CS mikroküre formülasyonunun hazırlanması ..... 24
3.2.3. Hazırlanan boncuk ve mikroküre formülasyonlarının karakterizasyonu ..... 24
3.2.3.a. Hazırlama verimi ..... 24

3.2.3.b. Hazırlanan formülasyonların yüzey özelliklerinin ve partikül büyüklüklerinin tayini ..... 25
3.2.3.c. Boncuk ve mikroküre formülasyonlarına yüklenen metformin HCl miktarının saptanması ..... 25
3.2.3.d. *İn vitro* salım deneyleri ..... 26
3.2.3.e. Etkin maddenin, polimerlerin ve hazırlanan formülasyonların FT-IR spektrumlarının alınması ..... 27
3.2.3.f. Etkin maddenin, polimerlerin ve hazırlanan formülasyonların DSC diyagramlarının elde edilmesi ..... 27
3.2.4. *İn vivo* çalışmalar ..... 27
3.2.5. İstatistiksel yöntem ..... 29
**4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA ..... 30**
4.1 UV-spektrofotometrik yöntemle miktar tayini bulguları ..... 30
4.1.1. Analitik yöntem validasyonu bulguları ..... 31
4.2. Boncuk ve mikroküre formülasyonlarına ait bulgular ..... 33
4.2.1. Formülasyonlara ait hazırlama verimi bulguları ..... 34
4.2.2. Formülasyonların yüzey özelliklerine ve partikül büyüklüklerine ait bulgular ..... 35
4.2.3. Formülasyonlara ait yükleme etkinliği ve yükleme kapasitesi bulguları ..... 38
4.2.4. *İn vitro* salım çalışmalarına ait bulgular ..... 39
4.2.5. Etkin madde, polimerler ve formülasyonlar için elde edilen DSC termogramları ..... 46
4.2.6. Etkin madde, polimerler ve formülasyonlar için elde edilen FT-IR spektrumları ..... 49
4.3. *İn vivo* çalışma bulguları ..... 55
**5. SONUÇ ve ÖNERİLER ..... 59**
**KAYNAKLAR ..... 60**
**EKLER ..... 68**
EK 1 ..... 68
**ÖZGEÇMİŞ ..... 69**

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

**A1C** **:** Glikozillenmiş hemoglobin
**AL** : Aljinat
**APG** : Açlık plazma glikozu
**CS** : Kitosan
**DM** : Diabetes Mellitus
**DPP-**4 : Dipeptidilpeptidaz-4
**DSC** : Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
**DSÖ** : Dünya Sağlık Örğütü
**EMA** : Avrupa İlaç Ajansı
**FDA** : Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi
**FT-IR** : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
**GLP-1** : Glukagon Benzeri peptit-1
**A1c** : Glikozillenmiş hemoglobin
**HDL** : Yüksek Dansiteli Lipoprotein
**IFG** : Bozulmuş Açlık Glikozu
**IGT** : Bozulmuş Glikoz Toleransı
**LDL** : Düşük Dansiteli Lipoprotein
**mV** : Milivolt
**Met HCl** : Metformin Hidroklorür
**OGTT** : Oral Glikoz Tolerans Testi
**PB** : Fosfat Tamponu
**PG** : Plazma glikozu
**PGA** : Poli(glikolik asit)
**PKOS** : Polikistik Over Sendromu
**PLA** : Poli(laktik asit)
**PLGA** : Poli(laktik-ko-glikolik asit)
**PVA** : Polivinil Alkol
**$r^2$** : Belirlilik Katsayısı
**rpm** : Dakikadaki Devir Sayısı

| | |
|---|---|
| **SEM** | : Taramalı Elektron Mikroskobu |
| **SGLT-2** | : Sodyum Glukoz Taşıyıcısı-2 |
| **SS** | : Standart Sapma |
| **VK** | : Varyasyon Katsayısı |
| **X** | : Ortalama |
| **λmax** | : Maksimum Dalga Boyu |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 2.1.**Metformin etkin maddesinin kimyasal yapısı..... 8
**Şekil 2.2.** a. Aljinatın kimyasal yapısı (G: Guluronat, M:Mannuronat); b. Aljinat ve divalent katyonlar arasındaki iyonik etkileşim..... 12
**Şekil 2.3.** Kitosanın kimyasal yapısı..... 13
**Şekil 2.4.** Streptozosin kimyasal yapısı ..... 16
**Şekil 2.5.** NA'nın kimyasal yapısı ..... 18
**Şekil 3.1.** AL ve AL-CS boncuk formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi. ..... 23
**Şekil 3.2.** Hazırlama verimi hesaplaması. ..... 24
**Şekil 4.1.** Metformin HCl standart çözeltilerinin PB pH 6,8 ortamı içindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (X±SS; n=6). ..... 30
**Şekil 4.2.** Metformin HCl standart çözeltilerinin HCl pH 1,2 ortamı içindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (X±SS; n=6). ..... 31
**Şekil 4.3.** Metformin HCl yüklü-AL boncuk formülasyonunun (a) SEM görüntüsü ve (b) dijital fotoğrafı. ..... 36
**Şekil 4.4.** Metformin HCl yüklü-AL-CS boncuk formülasyonunun (a) SEM görüntüsü ve (b) dijital fotoğrafı. ..... 36
**Şekil 4.5.** Metformin HCl yüklü-CS mikroküre lerinin SEM görüntüsü. ..... 37
**Şekil 4.6.** AL ve AL-CS boncuk formülasyonlarının HCl pH 1,2 ve PB pH 6,8 içindeki salım profilleri (X±SS; n=3). ..... 39
**Şekil 4.7.** CS mikroküre lerinin HCl pH 1,2 ve PB pH 6,8 içindeki salım profilleri (X±SS; n=3). ..... 40
**Şekil 4.8.** Hazırlanan AL boncuk formülasyonlarına, etkin madde ve polimere ait DSC diyagramları. ..... 46
**Şekil 4.9.** Hazırlanan AL-CS boncuk formülasyonlarına, etkin madde ve polimerlere ait DSC diyagramları. ..... 47
**Şekil 4.10.** Hazırlanan CS mikroküre formülasyonlarına, etkin madde ve polimere ait DSC diyagramları. ..... 48
**Şekil 4.11.** CS FT-IR spektrumu. ..... 50

**Şekil 4.12.** AL FT-IR spektrumu. ..... 50
**Şekil 4.13.** Metformin HCl FT-IR spektrumu. ..... 51
**Şekil 4.14.** AL boncuk FT-IR spektrumu. ..... 51
**Şekil 4.15.** AL-Met HCl boncuk FT-IR spektrumu. ..... 52
**Şekil 4.16.** AL-CS boncuk FT-IR spektrumu. ..... 52
**Şekil 4.17.** AL-CS-Met HCl boncuk FT-IR spektrumu. ..... 53
**Şekil 4.18.** CS mikroküre FT-IR spektrumu. ..... 53
**Şekil 4.19.** CS-Met HCl mikroküre FT-IR spektrumu. ..... 54
**Şekil 4.20.** a. Diyabetik sıçanlarda boncuk formülasyonlarının hipoglisemik etkisi.
b. Sıçanlarda 12 saatlik deney sonucunda meydana gelen % ortalama ağırlık değişimi. ..... 58

# ÇİZELGELER DİZİNİ

**Çizelge 2.1.** DM ve diğer glikoz metabolizma bozuklukları için son değişiklikleri de kapsayan tanı kriterleri..... 4
**Çizelge 4.1.** Analitik yöntem validasyonu için elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri. ..... 32
**Çizelge 4.2.** Formülasyonlara ait hazırlama verimi bulguları (X±SS; n=3). ..... 34
**Çizelge 4.3.** Hazırlanan formülasyonlara ait ortalama partikül büyüklüğü değerleri (X ± SS). ..... 37
**Çizelge 4.4.** Formülasyonlara ait yükleme etkinliği ve yükleme kapasitesi değerleri (X±SS; n=3)..... 38

# 1. GİRİŞ

Konvansiyonel dozaj şekillerinin kullanıldığı tıbbi tedavide gün içinde birkaç kez dozlama yapılarak etkin maddenin plazma düzeyi terapötik pencere aralığında tutulmaya çalışılmakta ancak, plazma konsantrasyon-zaman grafiğinde dalgalanmalar meydana gelmektedir (etkisiz alana düşme veya toksik alana çıkma riski artmaktadır). Modifiye salım sistemleri ise dozlama sıklığının düşürülmesi, etkin madde salım hızının/yerinin kontrol edilmesi, istenmeyen yan etkilerin azaltılması, terapötik etkinliğin ve hasta uyuncunun artırılması gibi pek çok üstünlüğe sahiptir. İnsülin salgılanmasında, insülin duyarlılığında veya her ikisinde birden gözlenen eksikliklerden kaynaklanan ve metabolik bir hastalık olan "Diabetes Mellitus (DM)" Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre dünya genelinde 347 milyon insanı etkilemektedir. Bununla birlikte, 2012 yılında meydana gelen ölümlerin tahminen 1,5 milyonunun doğrudan DM'den kaynaklandığı, DM'ye bağlı ölümlerin %80'ininden fazlasının ise düşük veya orta gelirli ülkelerde görüldüğü ve 2030 yılında meydana gelecek ölümlerin nedenleri arasında diyabetin 7. sırada yer alacağı ön görülmektedir. Tip 2 diyabet insülinin etkin bir şekilde kullanılamaması sonucu görülmektedir. Obezite ve fiziksel aktivitenin azalması Tip 2 diyabet görülme sıklığında artışa neden olmaktadır. Hem açlık hem de postprandial plazma glukoz düzeylerini düşüren metformin (Met) düşük bir oral biyoyararlanıma (%50-60), kısa ve değişken bir biyolojik yarılanma ömrüne (0.9-2.6 saat) sahiptir. Metforminin hemen salım yapan formülasyonları için etkili plazma konsantrasyonu yüksek dozlarda tekrarlayan uygulamalarla sağlanmaktadır. Bu uygulamalar, hasta uyuncunda azalmaya ve istenmeyen yan etkilerde (bulantı, karın ağrısı, kusma, diyare, gaz vb.) ise artışa neden olmaktadır. Bu nedenlerle, Metforminin dozunun/dozlama sıklığının azaltılması, biyoyararlanımının artırılması ve istenmeyen yan etkilerinin azaltılması amacıyla modifiye salım sistemleri geliştirilmektedir.

Bu tez kapsamında, yaygın kullanımı olan aljinat (AL) ve kitosan (CS) gibi doğal polimerlerden hareketle metformin HCl-yüklü farklı polimerik taşıyıcı sistemlerin hazırlanması ve bu sistemlerin yüzey morfolojisinin, partikül büyüklüğünün, partikül

büyüklüğü dağılımının, enkapsülasyon etkinliğinin, farklı ortamlardaki (fosfat tamponu (PB) pH 6.8 ve HCl pH 1.2) salım özelliklerinin, etkin madde polimer etkileşimlerinin [Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) kullanılarak] incelenmesi ve uygun in vitro özelliklere sahip formülasyonların Sprague-Dawley cinsi diyabetik sıçanlarda in vivo etkinliğinin saptanması amaçlanmıştır.

# 2. KURAMSAL TEMELLER

## 2.1. Diabetes Mellitus (DM)

Metabolik bir hastalık olan DM insülin salgılanmasında, insülin duyarlılığında veya her ikisinde birden gözlenen eksikliklerden kaynaklanmaktadır. Kronik hiperglisemi, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasının bozukluğu ve bununla birlikte, kronik mikro/makrovasküler ve nöropatik komplikasyonlar (retinopati, nöropati, nefropati, koroner arter hastalığı, inme ve periferik damar hastalığı gibi) hastalığın ilerleyen dönemlerinde gelişebilmektedir (Bastaki 2005).

Diyabet hastalarının sayısı, dünya çapında nüfusun yaşlanması, kentleşme, diyet ve yaşam tarzlarında meydana gelen köklü değişikliklerden dolayı artmaktadır (Chen *et al*. 2011; Murakami *et al*. 2012). DSÖ verilerine göre, DM dünya genelinde 347 milyon insanı etkilemektedir. Bununla birlikte, 2012 yılında meydana gelen ölümlerin tahminen 1,5 milyonunun doğrudan diyabet nedeniyle oluştuğu, diyabete bağlı ölümlerin %80'ininden fazlasının ise düşük veya orta gelirli ülkelerde görüldüğü ve 2030 yılında meydana gelecek ölümlerin nedenleri arasında diyabetin 7. sırada yer alacağı da DSÖ tarafından bildirilmektedir (Anonymous 2014a).

Tip 2 diyabet dünyada son otuz yıldır hızla artmakta, özellikle, genç erişkin ve çocuklar arasında görülme sıklığı önemli bir artış eğilimi göstermektedir. Türkiye'de 2000 yılında 2.920.000 olan diyabet hasta sayısının 2030 yılında %220 artış oranı ile 6.422.000'e ulaşacağı DSÖ tarafından tahmin edilmektedir. Bu artış oranı, Avrupa ve dünyadaki artış oranının 1,5-2 katı kadardır (Anonim 2011; Chen *et al*. 2011). Avrupa ülkeleri arasında diyabet prevalansının en yüksek olduğu ülke Türkiye'dir (%14.85) (Anonim 2014b).

Diyabet, insülin gereksinimi, başlama yaşı gibi farklı parametrelere göre sınıflandırılabilir. DSÖ tarafından önerilen Oral Glikoz Tolerans Testi (OGTT)'ne

alternatif olarak 1997 yılında Amerikan Diyabet Birliği tarafından yeni tanı ve sınıflandırma sistemi ortaya atılmış, bu sistem 1999 yılında DSÖ tarafından küçük değişiklikler yapılarak kabul edilmiştir. 2003 yılında ise Amerikan Diyabet Birliği, bozulmuş açlık glikozu (IFG) tanısı için küçük bir değişiklik yapmıştır. Amerikan Diyabet Birliği ve Avrupa Diyabet Çalışma Birliği 2007 yılında yayınladıkları raporlarında 2003 yılındaki düzenlemeyi aynen kabul etmişlerdir. Buna göre, plazma açlık glikoz seviyesine bakılarak normal, IFG ve diyabet şeklinde bir sınıflandırma yapılması tavsiye edilmektedir (Çizelge 2.1) (Salman *et al*. 2001; Anonymous 2007; 2009; Anonim 2013)

**Çizelge 2.1.** DM ve diğer glikoz metabolizma bozuklukları için son değişiklikleri de kapsayan tanı kriterleri (Anonim 2013)

| | **DM[b]** | **İzole IFG[c,d]** | **İzole IGT[c]** | **IFG+IGT[c]** | **Yüksek DM Riski** |
|---|---|---|---|---|---|
| **APG (8 saat ve üzeri açlık durumunda); mg/dL** | ≥126 | 100-125 | <100 | 100-125 | - |
| **OGTT 2. saat PG (75 g glikoz); mg/dL** | ≥200 | <140 | 140-199 | 140-199 | - |
| **Rastgele PG; mg/dL** | ≥200 ve diyabet belirtileri | - | - | - | - |
| **A1C[e]** | ≥%6,5 (≥48 mmol/mol) | - | - | - | %5,7-6,4 (39-46 mmol/mol) |

APG: Açlık plazma glikozu; PG: Plazma glikozu; OGTT: Oral glikoz tolerans testi; A1C: Glikozillenmiş hemoglobin; IFG: Impaired fasting glucose (Bozulmuş açlık glikozu); IGT: Impaired glucose tolerance (Bozulmuş glikoz toleransı). [a]Glisemi, glikoz oksidaz yöntemiyle venöz plazmada ölçülür (mg/dL); [b]Dört tanı kriterinden herhangi birinin varlığı yeterlidir; [c]İzole IFG, İzole IGT ve IFG+IGT iki kriterinde bulunması şarttır; [d]DSÖ ve Uluslararası Diyabet Federasyonu raporuna (2006) göre IFG için APG değer aralığı 110-125 mg/dL olarak benimsenmiştir; [e]Standardize edilmiş yöntemlerle ölçülmesi gerekmektedir.

Diyabet belirtileri aşağıdaki şekilde sıralanabilir (Anonim 2013):

- ✓ Poliüri
- ✓ Polidipsi
- ✓ Polifaji veya iştahsızlık

- ✓ Halsizlik, çabuk yorulma
- ✓ Ağız kuruluğu
- ✓ Noktüri
- ✓ Bulanık görme
- ✓ Açıklanamayan kilo kaybı
- ✓ İnatçı infeksiyonlar
- ✓ Tekrarlayan mantar infeksiyonları
- ✓ Kaşıntı

Fiziksel hareketsizlik, birinci dereceden akrabada diyabet öyküsü, yüksek riskli ırksal özellik, ağırlığı ≥4,5 kg olan bebek doğurmuş veya gestasyonel diyabet tanısı konmuş olmak, HDL <35 mg/dL ve/veya trigliserid >250 mg/dL, hipertansiyon (≥140/90 mmHg), polikistik over sendromu (PKOS), daha önceden pre-diyabet tanısı konmuş olmak, damar hastalığı öyküsü gibi faktörler diyabet risk faktörleri arasında yer almaktadır (Anonymous 2004, 2007).

DM sınıflandırılmasında dört klinik tip yer almaktadır. Bunlar (Gündoğdu 2012; Anonim 2013):

**Tip 1 diyabet:** Önceleri "insüline bağımlı diyabet", "juvenil diyabet", "çocukluk çağında başlayan diyabet" olarak da adlandırılmıştır. Diyabet hastalarının %5-10'u bu gruba dâhildir ve genellikle, mutlak insülin noksanlığına sebep olan β-hücre yıkımı söz konusudur. Kanda adacık otoantikorları bulunmaz, hastaların %90'ında otoimmun (Tip 1A), %10 kadarında ise otoimmun olmayan (Tip 1B) β-hücre yıkımı görülür. Genellikle, 30 yaşından önce başlar. Okul öncesi (6 yaş civarı), puberte (13 yaş civarı) ve geç adolesan dönemde (20 yaş civarı) üç pik görülür. Ancak, son yıllarda daha ileri yaşlarda ortaya çıkabilen latent otoimmun diyabetin çocukluk çağı (<15 yaş altı) Tip 1 diyabete yakın oranda görüldüğü bildirilmektedir. Tip 1 diyabet hastaları sıklıkla zayıf/normal kiloya sahiptir. Ancak, son yıllarda, Tip 2 diyabete benzeyen, kilolu/obez kişilerde görülen ve Duble diyabet (Hibrid, Dual veya Tip 3 diyabet) olarak adlandırılan Tip 1 diyabet tipi de tanımlanmıştır.

İnsülin eksikliğinin giderilmesi için günlük injeksiyonlar yapılır. Çok su içme, ağız kuruluğu, sık idrara çıkma, sürekli açlık hissi, bulanık görme, yorgunluk vb. şikâyetler söz konusudur.

**Tip 2 diyabet:** En yaygın görülen diyabet tipidir ve toplumda görülen diyabetli hastaların ~%90–95'i Tip 2 diyabet grubuna dâhildir. Önceleri "insüline bağımlı olmayan diyabet", "erişkin diyabet" olarak da adlandırılmıştır. Hastalar sıklıkla obez/kiloludur, insülin direnci zemininde zamanla azalan insülin salgılanması ve yüksek kan glikoz seviyesi ile karakterize bir hastalıktır. Periferik dokularda (özellikle, kas ve yağ dokularında) insülinin etkisi yetersizdir, kas ve yağ hücresinde glikoz tutulumu azalmıştır. Genellikle, 30 yaşından sonra görülen ve yaşlanma ile sıklığı artan bu hastalık ne yazık ki gerek gelişmiş gerekse gelişmekte olan ülkelerde diyet ve yaşam tarzı değişimlerine (obezite, fiziksel aktivitede azalma vb) bağlı olarak çocuk ve gençlerde (özellikle obezitenin çocukluk çağında artışıyla) de sıklıkla görünür hale gelmiştir. Güçlü bir genetik yatkınlık söz konusudur, ailede genetik yoğunluk arttıkça, sonraki nesillerde diyabet riski artmaktadır. Tip 2 diyabet hastalarında genellikle birçok hastada başlangıçta hiçbir belirti görülmezken, bu hastalığa bağlı olarak gelişebilecek belirtiler ise bulanık görme, tekrarlayan mantar enfeksiyonları, yara iyileşmesinde gecikme, el ve ayaklarda uyuşma/karıncalanma veya ayak ağrıları gibi sıralanabilir.

Son çalışmalar, Tip 2 diyabetin patofizyolojisi ile ilgili önemli bir takım hususları (önemli yönleri) ortaya koymaktadır, bunlar (Rizza 2010; Thulé 2012):

a. Orta şiddette (hafif tip) Tip 2 diyabet hastalarında oral glikoz alımı sonrası kan şekeri bu hastalığa sahip olmayanlara göre daha fazla artmakta ve bu artış daha uzun süreli olarak devam etmektedir. Bununla birlikte, serum insülininde beklenen artış daha geç gerçekleşmekte ve bu artış daha uzun süre devam etmektedir. Ayrıca, β-hücre fonksiyon bozukluğuna ek olarak bastırılmamış glukagon konsantrasyonu söz konusudur.

b. Daha şiddetli (belirgin diyabetli kişilerde) diyabet hastalarında ise glikoz seviyesi daha yüksek, β-hücre disfonksiyonu daha ciddi ve bastırılmamış normal glukagon seviyeleri mevcuttur.

**Gestasyonel diyabet:** Gebelik sırasında tanı konur ve gebelerin % 2-4'ünde görülür. Belirtileri genelde Tip 2 diyabete benzer, doğumdan sonra genellikle düzelir; ancak tekrarlama riski yüksektir, bu nedenle bu kişilerin kontrol altında olması gerekir.

**Diğer özel tipler:** Diğer nedenlere bağlı olarak nadir görülen özel diyabet tipleridir (β-hücre fonksiyonlarının bozulmasına bağlı genetik defektler, insülin etkilerinde bozulmaya yol açan genetik defektler, bazı enfeksiyonlar, ekzokrin pankreas hastalıkları, ilaç ve kimyasal maddeler (nikotinik asit, glukokortikoidler, tiroid hormonu, tiyazidler) vb. nedenlere bağlı olarak ortaya çıkabilirler).

### 2.1.1. Tip 2 diyabet tedavisi

Tip 2 diyabet insidansı ve bununla ilişkili komorbidite hızlı bir şekilde yükselmektedir. Diyabet hastaları, hastalığın ilerlemesini geciktirmek için aynı anda çok sayıda ilaç kullanmak zorunda kalmakta ve bunun sonucu olarak da istenmeyen yan etkiler ve ilaç-ilaç etkileşim riskleri artmaktadır (Amin and Suksomboon 2014). Dolayısıyla, bu hastalığın, antidiyabetik etkili maddelerin etki mekanizmalarının ve metabolik yolaklarının çok iyi anlaşılması gerekmektedir (Rizza 2010; Thulé 2012).

Tip 2 diyabet tedavisi, geleneksel olarak aşamalı bir tedavi şeklinde gerçekleştirilir. Yaşam tarzının değiştirilmesi (eğitim, diyet ve egzersiz) ile başlar ve tek/kombine oral antidiyabetik ajanların kullanılması ile devam eder (Zimmet 2000).

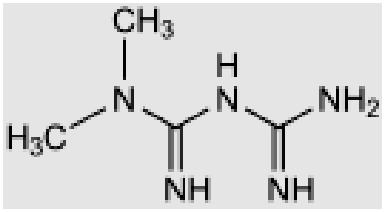
Oral antidiyabetikler, insülin'e duyarlılığı artıran ilaçlar (tiyazolidindionlar, biguanidler), insülin salgılatıcı ilaçlar (sülfonilüreler, meglitinidler), α-glukozidaz inhibitörleri ve inkretin mimetik ilaçlar (dipeptidilpeptidaz-4 (DPP-4) inhibitörleri)

şeklinde sınıflandırılabilir (Tsang 2012). Ayrıca, Tip 2 diyabet tedavisi için kullanımı onaylanan diğer bir ilaç sınıfı ise böbrekten glukoz atılımını artırıcı ilaçlardır (sodyum glukoz taşıyıcısı-2 (SGLT-2) inhibitörü; dapagliflozin) (Anonymous 2012; Anonymous 2014c). Bununla birlikte, dapagliflozin ve metformin hidroklorür içeren uzatılmış salım tableti Tip 2 diyabet tedavisine yönelik olarak 2014 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (Anonymous 2014d).

### 2.1.1.a. Metformin

Metformin, Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılmak üzere Amerika'da 1995 yılında onaylanırken Avrupa'da uzun yıllardan beri kullanılmaktaydı. Gerek Amerikan diyabet derneği, gerekse diyabet çalışmaları için kurulmuş olan Avrupa Derneği tarafından tedavide ilk seçenek olarak tavsiye edilmekte ve dünya çapında en az 120 milyon hastaya reçete edilmektedir. Metformin net bir hipoglisemiye neden olmadan kan glikoz seviyesini hızla düşürmektedir. Metformin klinik olarak 1950'li yıllardan beri bilinmesine rağmen etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Son klinik denemeler, metforminin Tip 2 diyabet tedavisindeki etkinliğinin yanısıra diyabetik nefropati, kardiyovasküler hastalıklar, polikistik ovaryum hastalığı ve kanser tedavisinde/önlenmesinde de terapötik potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Rizza 2010; Thulé 2012; Viollet 2012).

Doğada,"Galega officinalis"(Fransız leylağı ya da sedef otu) bitkisinde bulunan Metformin iki molekül guanidin içermektedir (Şekil 2.1.) (Sweetman 2007; Atmaca ve Ecemiş 2012).




**Şekil 2.1.** Metformin etkin maddesinin kimyasal yapısı (Sweetman 2007)

Metformin hem açlık hem de postprandial plazma glikoz düzeylerini düşürmekte, karaciğer ve diğer periferik dokuların insüline karşı duyarlılığını ise artırmaktadır. İnsülin duyarlılığındaki artış, esas olarak bazal hepatik glikoz üretimi (temelde glukoneogenez) azalmasının ve glikozun periferik dokular (iskelet kasları ve adipozitler gibi) tarafından alımındaki/kullanımındaki artışın bir sonucudur. İnsülin salgılanmasını ise etkilemediğinden hipoglisemi nadiren görülmektedir. Bunun yanısıra, plazma trigliserid ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) kolesterol seviyelerini düşürmektedir (Gündoğdu 2012). Metformin tarafından insülin duyarlılığının iyileştirilmesi, onun insülin reseptör ekspresyonu ve tirozin kinaz aktivitesi üzerindeki olumlu etkilerine bağlanmaktadır. Metformin, kısmen inkretinlerin çoklu bileşenlerinin modülasyonu yoluyla da faydalı metabolik etkiler gösterebilmektedir. Metformin akut bir şekilde glukagon benzeri peptid-1 (glukagon-like peptide; GLP-1)'in plazma seviyesini artırırken peroksizom proliferatör-aktive reseptör (PPAR)-α'ya bağlı olan bir mekanizma yoluyla da adacık inkretin reseptör gen ekspresyonunu indüklemektedir (Viollet 2012).

Diğer antidiyabetik etkin maddeler ile birlikte kullanıldığında dahi kilo artışı gözlenmez, hatta hafif düzeyde kilo kaybına neden olduğundan genellikle oral antidiyabetik olarak obez hastalarda ilk tercih edilen etkin maddedir (Nathan 2006; Ayvaz ve Kan 2010).

Tedavi başlangıcında bulantı, kusma, karın ağrısı, gaz, diyare gibi istenmeyen yan etkiler oluşmakta ve bu nedenle, metformin yemeklerle birlikte verilmektedir. Ayrıca, düşük dozla başlanarak yavaş bir şekilde doz artırılırsa genellikle iki haftalık süre sonrasında bu etkiler kaybolmaktadır (Bloomgarden *et al*. 2001; Ahmann and Riddle 2002; Ayvaz ve Kan 2010). Metformin kullanımına bağlı olarak ağızda metalik bir tat ve uzun süreli kullanımda ise B12 vitamin eksikliği oluşabilmekte ve ayrıca, nadir olarak gözlenen laktik asidoz ise tehlikeli olabilmektedir (Stumvoll 1995; Sweetman 2007; Ayvaz ve Kan 2010).

Metformin öncelikle ince bağırsaktan absorbe edilir ve nispeten düşük (%50-60) biyoyararlanıma ve kısa-değişken bir biyolojik yarılanma ömrüne (0.9-2.6 saat) sahiptir. Bu nedenlerle, metforminin hemen salım yapan dozaj şekilleri kullanıldığında etkili etkin madde plazma konsantrasyonunun devam ettirilebilmesi için yüksek dozlarda tekrarlayan uygulamalara gereksinim duyulmaktadır ve sonuç olarak da hasta uyuncunda azalma, istenmeyen yan etkilerde artış ortaya çıkmaktadır. Mide-bağırsak hareketliliği yavaşladığında ise metformin emilimi düzelmektedir (Corti *et al*. 2008).

Metforminin istenmeyen yan etkilerinin azaltılması, biyoyararlanımının artırılması ve dozlama sıklığının azaltılması amacıyla metformin içeren yeni formülasyonların geliştirilmesi önemlidir (Marathe *et al*. 2001).

### 2.2. İlaç Taşıyıcı Yeni Sistemler

İlaç etkinliğini ve güvenilirliğini artırmak üzere etkin madde/maddelerin salım hızını/salım yerini kontrol etmek, dozunu/dozlama sayısını azaltmak, dayanıklılığını artırmak (fotodegredasyon, pH değişiklileri gibi çevre koşullarına karşı) vb. farklı yaklaşımlarla ilaç taşıyıcı yeni sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemler, hasta uyuncunun ve yaşam kalitesinin artırılmasında çok önemli faydalar sağlamaktadır (Martinho *et al*. 2011; Tiwari *et al*. 2012).

Salım hızının değiştirilmesi amacıyla geliştirilmiş modifiye salım sistemlerini Amerikan Farmakopesi (USP/NF35) iki ana başlık altında toplamaktadır. Bunlar, geciktirilmiş (genellikle, iritasyon gibi yan etkilerin önlenmesi veya asit pH'ya duyarlı etkin maddelerin korunması amacıyla hazırlanır) ve uzatılmış salım sistemleridir. Uzatılmış salım sistemleri (“prolonged-release systems”, “extended-release systems”), etkin maddelerin uzun süreli salımını gerçekleştirmek amacıyla hazırlanmakta ve bu salım sistemleri, “repeat-action”, “controlled-release”, “sustained-release” olarak da ifade edilir (USP30/NF25 2007).

Polimerik taşıyıcı sistemler, farklı amaçlar için çok farklı yollarla (intravasküler, oral, pulmoner, subkütan vb.) kullanıma imkân sağlayan ve bu nedenle de farklı tasarım gereksinimlerine ihtiyaç duyan sistemlerdir (Champion 2007).

İlaç taşıyıcı sistemlerin (boncuklar, mikropartiküler/nanopartiküler sistemler, lipozomlar vb) geliştirilmesi ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır ve yapılmaktadır (Bhattarai 2011; Martinho *et al*. 2011; Tiwari *et al*. 2012).

Polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında biyoparçalanabilen ve biyoparçalanmayan polimerler kullanılmaktadır. Biyoparçalanabilen doğal ve sentetik polimerler toksisitelerinin düşük olması/olmaması, biyolojik sistemle uyumlu olmaları ve biyolojik sistemden parçalanarak uzaklaştırılabilmeleri gibi üstünlüklerinden dolayı sıklıkla tercih edilmektedir (Tunçay ve Çalış 1999). Sentetik ve doğal polimerler için aşağıdaki bazı örnekler verilebilir (Pillai and Panchagnula 2001; Brannon-Peppas and Peppas 2002):

**Sentetik Polimerler:**

- **Poliesterler:** Poli(hidroksi bütirat), poli(laktik asit), poli(glikolik asit), poli(laktik ko-glikolik asit), poli(ε-kaprolakton), poli(β-malik asit)
- **Poliamidler:** Poli(amino asitler), poli(imino karbonatlar)
- **Polianhidritler:** Poli(sebasik asit), poli(adipik asit)

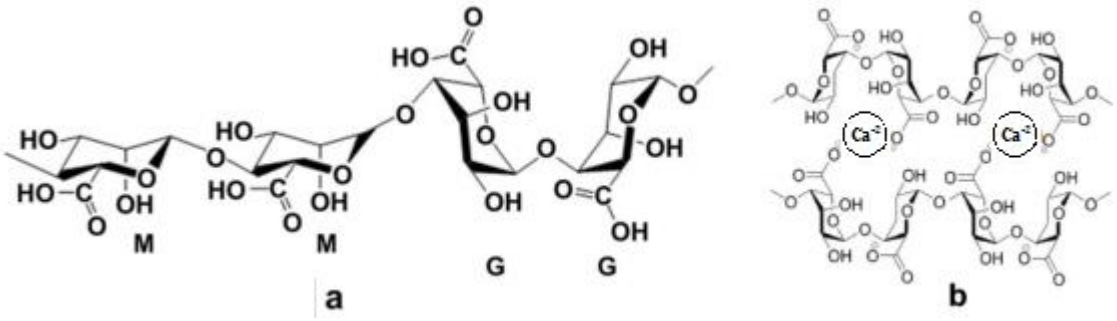
**Doğal Polimerler:**

- **Polisakkaritler:** Kitosan, agaroz, dekstran, aljinat, hyaluronik asit.
- **Protein yapısında olan polimerler:** Albümin, jelatin, kollajen

**Aljinat:** Aljinat, kahverengi su yosunlarında ve bazı bakteri türlerinde bulunmaktadır. Bu polimer, homojen mannuronik asit parçaları (M-M blokları), homojen guluronik asit

parçaları (G-G blokları) ve bu parçaların bloklarından (M-G) oluşmuş bir polisakkarit yapısıdır (Şekil 2.2) (Tunçay ve Çalış 1999; Chan *et al*. 2002; Sun and Tan 2013). Aljinatın bileşimi ve monomer düzeni yüksek oranda polimerin elde edildiği orijine bağlıdır (Mofidi 2000).

Aljinatın bileşimi, düzenlenme sırası ve molekül ağırlığı polimerin fiziksel özelliklerini belirler. Ticari olarak satılan aljinatların molekül ağırlığı nadiren 500.000 g/mol'den daha yüksektir. Sodyum, potasyum, amonyum, kalsiyum aljinatlar düzenli olarak kullanılmaktır (Chan *et al*. 2002; Pawar and Edgar 2012). Özellikle, sodyum aljinat yoğun bir şekilde kullanılan ilgi çekici bir biyopolimerdir (El-Aassar *et al*. 2014). Aljinatlar, G-G blokları aracılığı ile çok değerli katyonlarla ($Ca^{+2}$, $Al^{+3}$ v.b.) yumurta sepeti tarzında agregatlar oluştururlar (Tunçay ve Çalış 1999; Mofidi 2000; Chan *et al*. 2002).




**Şekil 2.2.** a. Aljinatın kimyasal yapısı (G: Guluronat, M:Mannuronat); b. Aljinat ve divalent katyonlar arasındaki iyonik etkileşim (Sun and Tan 2013)

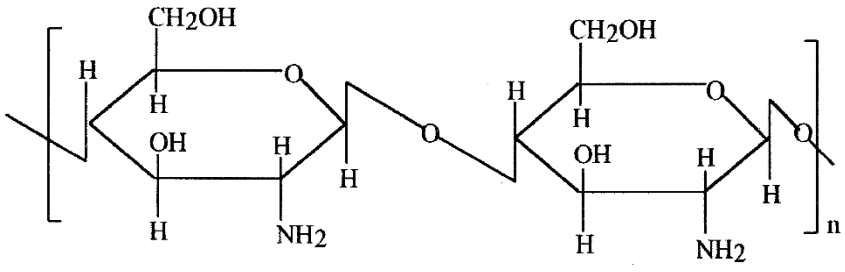
Aljinat gıda ve ilaç endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Etkin madde/maddelerin, makromoleküllerin (protein, peptid), canlı hücrelerin hapsedilmesi için ayrıca akut/kronik yaraların tedavisi için yara pansuman malzemesi olarak da kullanılmaktadır (Lee and Mooney 2012).

AL-boncuk formülasyonu hazırlanmasında en çok kullanılan yöntem aljinat çözeltisinin çok değerlikli katyon çözeltisine damlatılmasıdır. Kalsiyum aljinat boncukları, kalsiyum klorür çözeltisi içerisine sodyum aljinat çözeltisinin damlatılmasıyla hazırlanmaktadır

(Fathy 1998). Hazırlanan boncuk boyutları üzerinde aljinat çözeltisi viskozitesi ve damlatma için kullanılan enjektör çapı etkilidir ve bunların artışıyla boncuk boyutu artmaktadır. Elde edilen boncukların boyutları genellikle 1000 μm'den büyüktür. Hazırlanan boncuklardan etkin madde salımı üzerine birçok faktör (başlıca ortam pH'sı, aljinat konsantrasyonu, aljinat yapısındaki guluronik/mannurik asit oranları, çapraz bağlayıcı tipi/miktarı, sertleştirme süresi, etkin madde: polimer oranı gibi) etki etmektedir (İskenderoğlu 2007).

**Kitin ve Kitosan:** Kitin, yengeç ve karides gibi kabuklu su ürünlerinin ana bileşeni olup, böceklerin iskeletinde ve mantarların hücre duvarlarında bulunmaktadır (Duman ve Şenel 2004; Demir ve Seventekin 2009).

Kitosan, poli-[β-(1,4)-2-amino-2-deoksi-β-D-glukopiranoz], kitinin alkali ortamda deasetilasyonu sonucu elde edilen (1-4) bağlı D-glukozamin ünitelerinden oluşan lineer bir polisakkarittir (Şekil 2.3). Katyonik bir doğaya sahip olan kitosan, biyoparçalanabilir, biyoadezif doğal bir polimerdir. Toksik olmaması, irritan ve alerjik özellik göstermemesi önemli üstünlükleridir. Kitosan, eczacılık, tıp, kozmetik, gıda ve tekstil gibi çok çeşitli alanlarda farklı amaçlarla [ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında (boncuk, nanopartikül, mikroküre gibi), tablet formülasyonlarında yardımcı madde olarak, dişçilikte dolgu maddesi olarak, cerrahi iplik, antikoagülan olarak vb.] kullanılmaktadır (Duman ve Şenel 2004; Demir ve Seventekin 2009; Rajendran and Basu 2009).




**Şekil 2.3.** Kitosanın kimyasal yapısı (Ravi Kumar 2000)

Kitosanın fizikokimyasal özellikleri deasetilasyon derecesine (kitinin yapısında bulunan aminoasetil gruplarından asetil grubunun uzaklaştırılma derecesi;≥%60), molekül ağırlığına, çözünürlük ve viskozitesine bağlıdır. Bu özelliklerin değişmesi kitosanın ve dolayısıyla hazırlanan dozaj şekillerinin özelliklerini değiştirmektedir (Duman ve Şenel 2004; Demir ve Seventekin 2009).

Bu kısımda, aljinat ve kitosan polimerleri kullanılarak gerçekleştirilen bazı boncuk çalışmalarına kısaca yer verilecektir.

Metforminin Tip 2 diyabet tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmasını sağlamak üzere midede yüzen aljinat boncuk formülasyonu geliştirilmiş ve bu boncukların in vivo etkinliği normal ve diyabetik albino sıçanlarda değerlendirilmiştir. Bu formülasyonun diyabetik sıçanlarda hipoglisemik etkiyi önemli derecede artırdığı ve daha uzun süreli hipoglisemik etki sağladığı saptanmıştır (Nayak *et al*. 2011).

Yapılan diğer bir çalışmada ise metforminin uzun süreli salımına yönelik aljinat boncukları katyonik iyonlar olan $Ca^{+2}$ ve $Al^{+3}$ kullanılarak iyonotropik jelasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. $Ca^{+2}$ kullanılarak hazırlanan boncuklardan metformin salımı yaklaşık 8 saatte, $Al^{+3}$ ile hazırlanan boncuklardan ise yaklaşık 10 saatte gerçekleşmiştir. Ayrıca, $Ca^{+2}$ kullanıldığında yükleme etkinliğinin daha düşük olduğu da saptanmıştır (Ramteke *et al*. 2012).

Nayak *et al*. (2013) ise fenugreek (Trigonella foenum-graecum L.) tohum müsilajı, aljinat ve $CaCl_2$ kullanarak iyonotropik jelasyon yöntemi ile boncuk formülasyonları hazırlamışlardır. Boncuk boyut aralığı tüm formülasyonlar için 0,92-1,3 mm aralığında saptanmış ve bu boncuklar için yüksek yükleme etkinliği değerleri elde edilmiştir. Bu çalışmada, sodyum aljinat:müsilaj oranı ile kullanılan $CaCl_2$ konsantrasyonu değiştirilerek hazırlanan boncukların özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiş ve boncuk boyutları üzerinde sodyum aljinat:müsilaj oranının ve $CaCl_2$ konsantrasyonunun etkili olduğu, müsilaj artışıyla boncuk boyutunun arttığı, $CaCl_2$ konsantrasyonu artışıyla

ise azaldığı tespit edilmiştir. Metformin HCl'nin uzatılmış salımı (yaklaşık 10 saat) için bu boncukların uygun taşıyıcı sistemler olduğu raporlanmıştır.

Başka bir çalışmada ise metformin HCl içeren boncuklar sodyum aljinatla birlikte farklı polimerler [pektin, sodyum karboksi metilselüloz, karbopol, hidroksipropil metil selüloz (HPMC)] kullanılarak iyonotropik jelasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Tüm formülasyonlar için %81 civarında yükleme etkinliği değerleri elde edilmiştir. HPMC ve pektin içeren boncuk formülasyonlarından %100 metformin HCl salımı 8 saatte gerçekleşmiştir. Ancak, aynı sürede karbopol ve sodyum karboksi metil selüloz içeren boncuk formülasyonlarından gerçekleşen metformin HCl salımı ise sırasıyla ~%84 ve ~%91 olarak bulunmuştur (Lohithasu 2013).

Samyuktha Rani *et al*. (2012) da sodyum aljinat ile farklı polimerlerin (sodyum karboksi metil selüloz, karboksi metil selüloz, metil selüloz, polivinil prolidon) karışımını kullanarak metformin HCl yüklü boncuklar hazırlamışlardır. Kullanılan yardımcı polimerler farklı mukoadezif özelliklerde olacak şekilde seçilmiştir (bu polimerler arasında mukoadezif özelliği en fazla olan sodyum karboksi metil selüloz iken en düşük olan polivinil prolidondur). $CaCl_2$ kullanılarak iyonotropik jelasyon yöntemiyle hazırlanan boncukların 710-1530 μm boyut aralığında olduğu, yardımcı polimer konsantrasyonu artırıldığında yüksek yükleme etkinliği değerlerinin (sodyum karboksi metil selüloz varlığında en yüksek yükleme değeri elde edilmiş) saptandığı bildirilmiştir. Bunun yanı sıra, yüksek jelleşme karakterinden dolayı sodyum karboksi metil selüloz içeren boncukların şişme derecesinin daha yüksek olduğu ve bu boncuklardan 7 saatte %79 oranında metformin HCl salımının gerçekleştiği saptanmıştır.

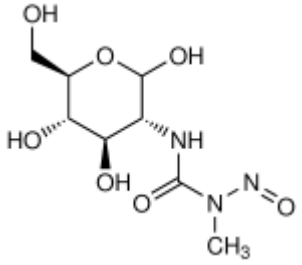
Aljinat ve kitosan kullanılarak oluşturulan polielektrolit kompleks yapısıda uzun süreli etkin madde salımı için kullanılmıştır (Mi *et al*. 2002; Rajendran and Basu 2009). Aljinatın karboksil grupları ile kitosanın amino grupları arasındaki iyonik etkileşim sonrası bu polielektrolit kompleks oluşmaktadır. Rajendran and Basu (2009) nimodipin yüklü-aljinat-kitosan boncuklarını iyonotropik jelasyon yöntemi ile $CaCl_2$ kullanarak

hazırlamışlardır. Hazırlanan boncuklar için ortalama boyut aralığı 1486-1602 µm olarak bulunmuştur. *İn vitro* salım çalışmalarında (PB pH 6.8 ortamında), kitosan varlığında hazırlanan boncuklardan etkin madde salımının oluşan polieletrolit kompleks yapısından dolayı sadece aljinat kullanılarak hazırlanan boncuklara göre daha yavaş gerçekleştiği saptanmıştır. Mi *et al*. (2002) ise aljinat-kitosan boncuklarının hazırlanmasında "genipin"'i çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanmışlar ve bu boncukların sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Etkin madde salımı üzerinde pH'nın ve aljinat konsantasyonunun etkili olduğu ve hazırlanan boncukların hücresel uyumluluğunun iyi olduğu tespit edilmiştir.

### 2.3. Streptozosin (STZ) ve Nikotinamid (NA)

Bu tez çalışması kapsamında sıçanlarda Tip 2 diyabet oluşturulması amacıyla STZ ve NA kullanılmştır. STZ**,** 2-deoksi-2-(3-metil-3-nitrozoüreido)-D-glukopiranoz kimyasal yapısında (Şekil 2.4), molekül ağırlığı 265.2 olan, -20°C'de ve ışıktan korunarak saklanması gereken beyaz veya hafif sarımsı bir tozdur (Sweetman 2007; Anonymous 2015). STZ, çözelti halinde pH 4-4.5 aralığında dayanıklıdır. Daha yüksek veya daha düşük pH değerlerinde hızla stabilitesini kaybeder. Çözeltisi (0.1 M soğutulmuş sitrat tamponunda, pH 4.5) uygulamadan hemen önce hazırlanmalı ve ışıktan korunmalıdır (Motyl and McCabe 2009; Kurçer ve Karaoğlu 2012).

STZ antineoplastik etkili bir antibiyotiktir ve ağırlıklı olarak pankreasın endokrin (adacık hücreleri) tümörlerinin tedavisinde kullanılır. Ayrıca, STZ glikoz metabolizmasını etkileyebilmektedir (Kurçer ve Karaoğlu 2012; Strosberg 2013).

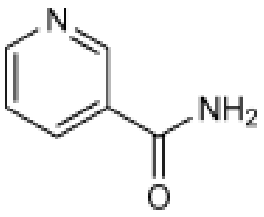



**Şekil 2.4.** Streptozosin kimyasal yapısı (Sweetman 2007)

Hayvan deneyleri sırasında farklı yöntemlerle (cerrahi, farmakolojik, genetik) diyabet oluşturulabilmektedir. STZ, farmakolojik diyabet oluşturmak amacıyla yaygın bir şekilde kullanılan diyabetojenik bir ajandır. İntraperitonal (i.p.), intravenöz (i.v.), subkütan (s.c.) gibi farklı yollarla ve geniş bir doz aralığında uygulanabilmektedir (sıçanlarda genellikle uygulanan doz aralıkları: 40-80 mg/kg i.v. yolla; 35 (yüksek yağlı diyetle birlikte)-150 mg/kg i.p. yolla; 60-100 mg/kg s.c. yolla). Verilen doza bağlı olarak Tip 1 veya Tip 2 diyabet modellerinin hayvanlarda oluşturulması sağlanmaktadır (Gür 2010; Kurçer ve Karaoğlu 2012).

STZ'nin β hücreleri üzerindeki etkisi kan insülin ve glikoz düzeylerinde karakteristik değişimlere neden olmaktadır. Aç bırakılan sıçanlara STZ'nin injeksiyonundan 2 saat sonra hiperglisemi ve kan insülin seviyesinde ise eş zamanlı bir düşüş gözlenir, yaklaşık 6 saat sonra ise kan insülin seviyesinde yükselme ve buna bağlı olarak hipoglisemi gözlenir. Son olaraksa STZ'nin diyabetojenik etkilerinin sonucu olarak kan insülin seviyesi azalır ve hiperglisemi oluşur. Kan glikoz ve insülin seviyelerindeki bu değişimler β hücre fonksiyonundaki bozulmalardan kaynaklanmaktadır. STZ'nin glikoz oksidayonunu bozduğu, insülin biyosentezini ve salgılanmasını azalttığı da ifade edilmektedir. STZ'nin beta hücresi içine alımı glikoz taşıyıcısı (GLUT2) aracılığıyla gerçekleşmektedir. STZ ilk olarak β hücrelerinin glikoza yanıtını ortadan kaldırmakta bu olayı ise kalıcı β hücre hasarı ve kaybı izlemektedir. STZ'nin pankreatik β hücresi içindeki etkisi sonucu DNA bazlarının alkilasyonu gerçekleşir. STZ'nin bu alkilleyici aktivitesi ise nitrozoüre gruplarından kaynaklanmaktadır. STZ-kaynaklı DNA hasarı poli ADP-ribolizasyon aktivasyonuna neden olmakta ve bu durum hücresel $NAD^+$ ve ATP içeriğini azaltmakta ve insülin biyosentezini ve salgılanmasını inhibe etmektedir. STZ'nin nitrik oksit vericisi olmasınında gerçekleşen bu DNA hasarında etkili olabileceği ifade edilmektedir. Oksidan özelliğe sahip STZ'nin uygulanması sonrası ksantin oksidaz sisteminin aktivasyonuyla hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin üretildiği bildirilmektedir (Szkudelski 2001; Kurçer ve Karaoğlu 2012).

NA, piridin-3-karboksamid kimyasal yapısında (Şekil 2.5) molekül ağırlığı 122.1 olan beyaz kristalimsi toz veya renksiz kristallerdir (Sweetman 2007).




**Şekil 2.5.** NA'nın kimyasal yapısı (Sweetman 2007)

NA, poli [adenozin difosfat (ADP) riboz] polimeraz aktivitesini inhibe etmekte, hücre içi nikotinamid adenin dinükleotid seviyelerini düzeltmekte ve nitrik oksitin sitotoksik etkilerine karşı beta-hücrelerini korumaktadır. Bu nedenle, NA hayvan diyabet modellerinde STZ'nin diyabetojenik etkilerine karşı koruyucu olarak kullanılmaktadır (Gedik 2004). Tip 2 diyabet modelinin hayvanlarda oluşturulması amacıyla STZ ve NA'nın birlikte kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Ananda *et al*. 2012; Bisht ve Bhattacharya 2013). NA, koruyucu olarak diyabet modeli geliştirilmesi çalışmalarında farklı dozlarda uygulanabilmektedir (sıçanlarda 110-120mg/kg i.p., farelerde 150 mg/kg i.p.) (Sharma 2011; Kurçer ve Karaoğlu 2012).

# 3. MATERYAL ve YÖNTEM

## 3.1. Materyaller

### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

| Kimyasal Maddeler | Firma |
|---|---|
| Metformin HCl | Sandoz İlaç Sanayi ve Ticaret AŞ, Türkiye |
| Kitosan (Protosan UP CL 113) | FMC Biopolymer AS, Novamatrix Co., Norveç |
| Sodium Alginate | Sigma-Aldrich Co., ABD |
| Kalsiyum Klorür | Sigma-Aldrich Co., ABD |
| Gluteraldehit çözeltisi (%25 a/h'lik sulu çözeltisi) | Sigma-Aldrich Co., ABD |
| Aseton | Sigma-Aldrich Co., ABD |
| Monobazik Potasyum Fosfat | Merck, Almanya |
| Sodyum Hidroksit | Merck, Almanya |
| Potasyum Klorür | Riedel-de Haën.,Almanya |
| Hidroklorik Asit | Riedel-de Haën., Almanya |

### 3.1.2. Kullanılan cihazlar

| Kullanılan Cihazlar | Firma |
|---|---|
| Homojenizatör | Ultraturrax, IKA®, RW20.n, Almanya |
| Liyofilizatör | Alpha 1-2 LD plus LT, Martin Christ, Almanya |
| Mastersizer 2000 | Malvern Instruments Ltd. İngiltere |
| Işık Mikroskobu | Olympus, DP72, Japonya |
| Taramalı Elektron Mikroskobu | Inspect S50, FEI, Amerika |
| Diferansiyel Taramalı Kalorimetre | Netzsch STA 409 PC Luxx®, Netzsch, Almanya |
| FT-IR Spektrofotometresi | Perkin-Elmer Spectrum One, Amerika |
| Soğutmalı Santrifüj (Kubota 3780) | Kubota Co., Japonya |
| Çoklu Manyetik Karıştırıcı (WisestirR MS-MR4) | Wisd Lab. Instruments, Almanya |
| Vorteks (MS 3) ve İlave Aksesuarları | IKA®-Werke GmbH & Co., Almanya |
| Çalkalamalı Su Banyosu | Memmert GmbH & Co., Almanya |
| Hassas Terazi | AND, A&D Company, Japonya |
| Rotavapor (Heidolph 4001) | Heidolph Instruments GmbH & Co.,Almanya |
| Ultra Saf Su Cihazı (Easypure®RF) | Barnstead/Thermolyne Co., ABD |
| UV- Spektrofotometre | Beckman Coulter-DU ® 730., ABD |
| Etüv | Memmert GmbH & Co., Almanya |
| pH Metre | Orion 3 Star., ABD |
| Ultrasonik Banyo | Bandelin Electronics, Almanya |
| Glukometre | On.Call® Plus, Acon Lab., Inc. Amerika |

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. UV-spektrofotometrik yöntemle miktar tayini

Etkin maddenin fosfat tamponu (PB, pH 6.8; USP30/NF25) ve HCl tamponu (0.2 M; pH 1.2; USP30/NF25) içinde hazırlanan sırasıyla 10 μg/mL ve 8 μg/mL konsantrasyonlarındaki çözeltilerinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumları alınmış ve gözlenen maksimum absorbans dalga boyları (λmax) tespit edilmiştir (USP30/NF25 2007).

Etkin maddenin kalibrasyon doğrusunu hazırlamak üzere PB pH 6,8 ve HCl pH 1,2 tamponlarında hazırlanan stok çözeltilerinden (100 μg/mL) hareketle uygun seyreltmeler yapılarak sırasıyla, 3-9 μg/mL ve 3-8 μg/mL konsantrasyon aralıklarında (altı farklı konsantrasyonda) her bir konsantrasyon için 6'şar standart çözelti hazırlanmış ve önceden belirlenmiş olan λmax değerlerinde absorbansları belirlenmiştir. Her bir konsantrasyon ve bu konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek regresyon analizi yardımıyla kalibrasyon doğruları ve denklemleri elde edilmiştir.

#### 3.2.1.a. Analitik yöntem validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, analizi yapılacak maddenin tayininde kullanılacak olan analitik yöntemin belirlenen koşullarda doğru, özgün ve tekrarlanabilir olduğunu garanti etmek için uygulanan işlemdir ve analitik yöntemin güvenilirliğinin teminatıdır (Shabir 2003). Bir analitik yöntemin değerlendirilmesinde doğrusallık, doğruluk, kesinlik (tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik) ve özgünlük parametreleri incelenmiştir (Van Zoonen 1999).

### 3.2.2. Polimerik taşıyıcı sistemlerin hazırlanması

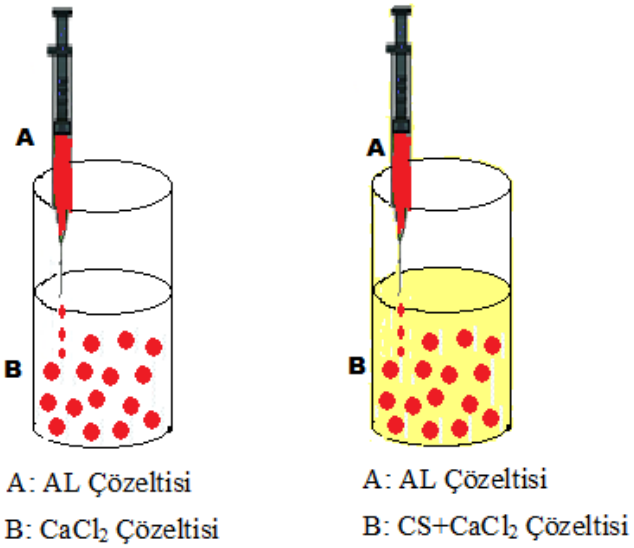
Bu çalışmada, doğal polimerlerden kitosan ve aljinat kullanılarak metformin HCl içeren polimerik taşıyıcı sistem formülasyonları hazırlanmıştır.

#### 3.2.2.a. Boş AL ve AL-CS boncuk formülasyonlarının hazırlanması

Tüm boncuk formülasyonları iyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Rajalakshmi *et al*. (2013) tarafından raporlanan yöntem modifiye edilerek aljinat boncukları hazırlanmıştır. Öncelikle, $CaCl_2$ (3 g) deiyonize su (20 mL) içerisinde çözündürülmüş ve daha sonra deiyonize suda hazırlanmış olan sodyum AL çözeltisi (10 mL, %2 a/h) enjektör yardımıyla (26 G) bu çözeltiye damlatılmıştır (700 rpm, 15 dakika). Oluşan boncukların karıştırılmasına devam edilerek sertleşmeleri sağlanmış, daha sonra boncuklar süzülerek toplanmış ve boncuklar liyofilize (24 saat) edilmiştir (Şekil 3.1).

AL-CS boncuk formülasyonu ise farklı çalışma grupları tarafından verilen yöntemler modifiye edilerek hazırlanmıştır (Rasool and Fahmy 2013; Mujtaba *et al*. 2014). Hazırlanan sodyum AL çözeltisi (10 mL, %2 a/h) enjektör yardımıyla (26 G) 0,1 g CS içeren ve pH'sı asetik asitle 4,5'e ayarlanmış $CaCl_2$ (1 g) çözeltisine (20 mL) damlatılmıştır (700 rpm, 15 dakika). Oluşan boncukların karıştırılmasına devam edilerek sertleşmeleri sağlanmış, daha sonra boncuklar süzülerek toplanmış ve boncuklar liyofilize (24 saat) edilmiştir (Şekil 3.1).

Herbir formülasyon en az üçer kez hazırlanmıştır.




**Şekil 3.1.** AL ve AL-CS boncuk formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi

### 3.2.2.b. Metformin HCl içeren AL ve AL-CS boncuk formülasyonlarının hazırlanması

Metformin HCl yüklü-boncuk formülasyonlarının hazırlanması için Bölüm 3.2.2.a'da açıklanan hazırlama yöntemi sodyum aljinat çözeltisine 100 mg metformin HCl ilave edilmesi dışında aynen tekrar edilmiştir. Herbir formülasyon en az üçer kez hazırlanmıştır.

### 3.2.2.c. Boş CS mikroküre formülasyonunun hazırlanması

CS mikroküreleri emülsiyon-çapraz bağlanma yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır (Nayak 2009). 0,5 g CS ve 0,5 g Tween 80 içeren sulu çözelti (25 mL) 1 g Span 80 içeren sıvı parafin (50 mL) üzerine bir enjektör (26 G) yardımıyla damlatılırken homojenizatör (Ultraturrax, IKA®, RW20.n, Almanya) kullanılarak homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (30 dakika). Bu sürenin sonunda çapraz bağlayıcı olarak 2,5 mL gluteraldehit çözeltisi (%25 a/h'lik sulu çözeltisi) karışıma enjektör (26 G) yardımıyla damlatılarak 1 saat karıştırılmıştır. Daha sonra, 3000 rpm'de 30 dakika (15C°) santrifüj yapılarak mikroküreler toplanmış ve petrol eteri ile 3 kez yıkama işlemi

gerçekleştirilmiştir (her yıkama sonrası santrifüj koşulları: 3000 rpm, 30 dakika, 15 C°). Yıkama işlemi sonrası küreler saf su içerisinde süspande edilerek yıkama çözeltisi kalıntısı rotavaporda 45°C'de, 20 dakika süreyle uzaklaştırılmıştır. Mikroküreler 48 saat süreyle liyofilize edilmiştir. Herbir formülasyon en az üçer kez hazırlanmıştır.

### 3.2.2.d. Metformin HCl yüklü-CS mikroküre formülasyonunun hazırlanması

Metformin HCl yüklü-kitosan mikroküre formülasyonunun hazırlanması için Bölüm 3.2.2.c'de açıklanan hazırlama yöntemi CS çözeltisine 100 mg metformin HCl ilave edilmesi dışında aynen tekrar edilmiştir. Herbir formülasyon en az üçer kez hazırlanmıştır.

## 3.2.3. Hazırlanan boncuk ve mikroküre formülasyonlarının karakterizasyonu

### 3.2.3.a. Hazırlama verimi

Taşıyıcı sistemleri hazırlamada kullanılan yöntemlerin etkinliğinin değerlendirilmesi için verim hesabı yapılmıştır. Üretim sonunda elde edilen taşıyıcı sistem ağırlığı, üretim sırasında kullanılan kuru madde (etkin madde, polimer) ağırlığının toplamına oranlanmış, elde edilen bu oran yüzde cinsinden ifade edilmiştir (Şekil 3.2).

Verim = (A/B)x100

A: Elde edilen toplam taşıyıcı sistem ağırlığı (mg)

B: Etkin madde + Polimer ağırlığı (mg)

**Şekil 3.2.** Hazırlama verimi hesaplaması

### 3.2.3.b. Hazırlanan formülasyonların yüzey özelliklerinin ve partikül büyüklüklerinin tayini

Hazırlanan metformin HCl yüklü-AL ve AL-CS boncuk formülasyonlarının (yaş halde) dijital fotoğrafları çekilmiştir. Ayrıca, SEM kullanılarak liyofilize edilmiş metformin HCl yüklü-AL ve AL-CS boncuk formülasyonları ve CS mikrokürelerinin şekilleri ve yüzey özellikleri incelenmiştir. SEM analizi için formülasyonlar iki tarafı yapışkan bant aracılığı ile metal levhalar üzerine tespit edilerek altınla kaplanmıştır. Daha sonra örnekler SEM ile incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

AL ve AL-CS boncuk formülasyonlarının (yaş halde) partikül boyutları kumpas kullanılarak ölçülmüştür. Liyofilizasyon öncesi CS mikrokürelerinin partikül büyüklüğü ölçümleri Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd. İngiltere) cihazı kullanılarak 25°C'de gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.3.c. Boncuk ve mikroküre formülasyonlarına yüklenen Metformin HCl miktarının saptanması

Hazırlanan liyofilize AL ve AL-CS boncuk formülasyonlarından (boş ve etkin madde yüklü) 20'şer mg tartılarak renkli şişelere konmuş ve üzerlerine 20 mL PB, pH 6.8 ilave edilmiştir. Bu şişeler oda sıcaklığında 15 dakika ultrasonik banyo içerisinde tutulmuştur. Daha sonra, çok noktalı karıştırıcıya alınarak 750 rpm'de 4 saat karıştırılmış (karanlık ortamda) ve bu sürenin sonunda karışımlar 5000 rpm'de 15 dakika (15°C) santrifüj edilerek süpernatantları alınmıştır. UV-spektrofotometrik yöntemle (232 nm) etkin madde miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

Liyofilize CS mikroküre formülasyonlarından da (boş ve etkin madde yüklü) 20'şer mg tartılarak renkli şişelere konmuştur. Şişelere 15 mL PB, pH 6.8 ilave edilerek 2 dakika vortekslenmiştir. Daha sonra, çok noktalı karıştırıcıya alınarak 750 rpm'de 3 saat karıştırılmıştır (karanlık ortamda) ve bu sürenin sonunda karışımlar 5000 rpm'de 20

dakika (15°C) santrifüj edilerek süpernatantları alınmıştır. UV-spektrofotometrik yöntemle (232 nm) etkin madde miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.3.d. *İn vitro* salım deneyleri

*İn vitro* salım deneyleri iki farklı ortamda (PB pH 6,8 ve HCl pH 1,2 tamponu) gerçekleştirilmiştir. Hassas terazide, renkli cam şişelere tam olarak 20 mg tartılan etkin madde yüklü boncuk formülasyonları üzerine 20'şer mL uygun ortam konmuş ve salım çalışması, sıcaklığı 37±0,5°C'de sabit tutulan yatay çalkalayıcılı su banyosunda (50 rpm) gerçekleştirilmiştir. Aynı işlemler, boş boncuk formülasyonlarına da uygulanmıştır. Belirli zaman aralıklarında, 3'er mL örnek alınmış ve alınan örnek yerine aynı hacimde taze ortam konmuştur. Alınan örnekler, 12500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlarda etkin madde miktar tayini UV spektrofotometrik yöntem (PB pH 6,8 ortamı için 232 nm; HCl pH 1,2 ortamı için 209 nm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

CS mikroküre formülasyonları için in vitro salım çalışması diyaliz torbası yöntemi kullanılarak iki farklı ortamda (PB pH 6,8 ve HCl pH 1,2 tamponu) gerçekleştirilmiştir Metformin HCl-yüklü mikroküre lerinin (20 mg) söz konusu ortamlardaki süspansiyonları molekül büyüklüğü geçirgenlik sınırı (MWCO) 14000 Da olan diyaliz membranı içerisine yerleştirilmiştir. Bu diyaliz torbaları renkli cam şişelere yerşleştirilerek üzerlerine 15'er mL ilgili salım ortamları eklenmiş ve salım çalışması yatay çalkalayıcılı su banyosunda (37±0,5°C, 50 rpm) gerçekleştirilmiştir. Aynı işlemler, boş mikroküre formülasyonlarına da uygulanmıştır. Belirli zaman aralıklarında salım ortamlarından 3'er mL örnek alınmış ve alınan örnek yerine aynı hacimde taze ortam konmuştur. Alınan örnekler, 12500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlarda etkin madde miktar tayini UV-spektrofotometrik yöntem kullanılarak (PB pH 6,8 ortamı için 232 nm; HCl pH 1,2 ortamı için 209 nm) gerçekleştirilmiştir.

Her bir formülasyon için n=3 olacak şekilde çalışılmıştır. % Kümülatif salım değerleri hesaplanmış ve veriler grafikler halinde sunulmuştur.

### 3.2.3.e. Etkin maddenin, polimerlerin ve hazırlanan formülasyonların FT-IR spektrumlarının alınması

Metformin HCl, AL, CS, boncuk ve mikroküre formülasyonlarının KBr diskleri hazırlanmış ve FT-IR kullanılarak infrared spektrumları alınmıştır.

### 3.2.3.f. Etkin maddenin, polimerlerin ve hazırlanan formülasyonların DSC diyagramlarının elde edilmesi

Çalışmada kullanılan metformin HCl, AL, CS, boncuk formülasyonları ve mikroküre formülasyonları için DSC diyagramları Netzsch STA 409 PC Luxx® marka diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılarak elde edilmiştir. DSC deneylerinin tümü azot atmosferinde gerçekleştirilmiş ve gaz akış hızı 60 mL/dakika olarak ayarlanmıştır. Tüm DSC ölçümleri için 25-400°C sıcaklık aralığında 5 veya 10°C/dakika ısıtma hızında çalışılmıştır. Bütün analizlerde bir dizi standart (In, Sn, Bi, Zn, Al, Ag, Au, Ni) ve referans olarak da alumina kullanılmıştır.

### 3.2.4. *İn vivo* çalışmalar

Söz konusu çalışma için Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'ndan 31.05.2013 tarih ve 38 karar numarası ile etik onay alınmıştır **(EK-1)**. Çalışma için 180-250 g ağırlık aralığında erkek Sprague-Dawley cinsi 59 adet sıçan Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM)'nden temin edilerek standart sıçan yemi ile beslenmeleri sağlanmış ve içme suyu şişeleri günlük olarak değiştirilmiştir. Tüm sıçanlar deney öncesi ve deney sonlanıncaya kadar deney hayvanları laboratuarında 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 24±2°C oda sıcaklığında barındırılmıştır.

**Açlık serum insülin seviyesinin tayini:** Deneyden bir gece önce sıçanlara yem verilmesi kesilerek sadece su verilmiştir. STZ injeksiyonundan önce sıçanların başlangıç ağırlıkları (g) saptanmış ve bazal kan glikoz değerleri (mg/dL) glukometre (On.Call® Plus, Acon Lab., Inc. Amerika) ile ölçülmüştür. Daha sonra, sıçanlarda diyabet oluşturmak için hemen uygulama öncesi pH 4,5 soğuk sitrat tamponu içinde hazırlanmış STZ çözeltisi (1 mL) sıçanlara i.p. olarak enjekte edilmiş (40 mg/kg) ve bu enjeksiyondan 15 dakika sonra hemen uygulama öncesi hazırlanan NA'nın %0,9'luk NaCl içerisindeki çözeltisi (1 mL) i.p. olarak hayvanlara (120 mg/kg) verilmiştir. Uygulamanın 7. gününde kuyruk veninden alınan kan örneğinde açlık kan glikoz düzeyi >126 mg/dL olanlar diyabetik (Tip 2) olarak kabul edilmiş ve bu sıçanların (n=8) kuyruk veninden kan örnekleri alınarak santrifüj edilmiştir (10000 rpm, 10 dakika). Elde edilen serum örnekleri analiz gerçekleştirilinceye kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. Ayrıca, hiçbir uygulama yapılmayan sağlıklı sıçanlarında (n=8) aynı şekilde serumları elde edilerek aynı şartlarda saklanmıştır. İnsülin tayini EIA test kiti (SPI-BIO Bertin Pharma, Rat Insulin Enzyme Immunoassay kit, Fransa) kullanılarak sağlıklı ve diyabetik sıçanlardan elde edilen serumlarda insülin tayini gerçekleştirilmiştir (Barik 2008; Kakadiya 2010; Bisht and Bhattacharya 2013; Skovsø 2014).

**Hipoglisemik etkinin saptanması:** Yukarıda anlatıldığı şekilde diyabet oluşumu için seçilen STZ ve NA dozlarının uygun olduğu saptanmıştır. Daha sonra ise hipoglisemik etkinin saptanması amacıyla, deneyden bir gece önce sağlıklı sıçanlara yem verilmesi kesilmiş ve sadece su verilmiştir. STZ injeksiyonundan önce sıçanların başlangıç ağırlıkları (g) saptanmış ve bazal kan glikoz değerleri (mg/dL) glukometre ile ölçülmüştür. Daha sonra, sıçanlarda diyabet oluşturmak için hemen deney öncesi pH 4.5 soğuk sitrat tamponu içinde hazırlanmış STZ çözeltisi (1 mL) sıçanlara i.p. olarak enjekte edilmiş (40 mg/kg) ve bu enjeksiyondan 15 dakika sonra hemen uygulama öncesi hazırlanan NA'nın %0.9'luk NaCl içerisindeki çözeltisi (1 mL) i.p. olarak hayvanlara (120 mg/kg) verilmiştir. Uygulamanın 7. gününde kuyruk veninden alınan kan örneğinde açlık kan glikoz düzeyi >126 mg/dL olanlar diyabetik (Tip 2) olarak kabul edilip çalışmaya dâhil edilmiştir (Barik 2008; Kakadiya 2010; Bisht and Bhattacharya 2013; Skovsø 2014). Çalışma grupları aşağıdaki şekilde belirlenmiştir.

***Çalışma Grupları:*** Grup I: Hiçbir madde uygulanmayan sağlıklı sıçanlardan (n=6) oluşan gruptur.

Tip 2 diyabet olduğu kabul edilen sıçanlar ise 5 ayrı grup oluşturacak şekilde bölünmüştür. *İn vitro* özellikleri en uygun olan formülasyonlar (AL ve AL-CS boncukları) seçilerek bu çalışmada kullanılmıştır.

Grup II: İlaç almayan diyabetik hayvanlar (DM grubu) (n=8); Grup III: saf Met HCl çözeltisi (100 mg/kg) verilen diyabetik hayvanlar (n=6); Grup IV: boş boncuk formülasyonu verilen diyabetik hayvanlar (n=8); Grup V: AL-CS Met HCl boncuk formülasyonu (100 mg/kg metformin HCl'ye eşdeğer) verilen diyabetik hayvanlar (n=9); Grup VI: AL Met HCl boncuk formülasyonu (100 mg/kg metformin HCl'ye eşdeğer) verilen diyabetik sıçanları (n=6) içermektedir. Diyabetik sıçanlara etkin madde çözeltisi ve tüm boncuk formülasyonları plastik besleme tüpü kullanılarak oral yolla uygulanmıştır.

Belirlenen zaman aralıklarında (0., 2., 3., 4., 6., 8., 12. saat) kuyruk veninden alınan kan örneğinde kan glikoz düzeyi glukometre kullanılarak ölçülmüştür. Bu süre boyunca tüm sıçanlara sadece su verilmiş ve yem verilmemiştir.

### 3.2.5. İstatistiksel yöntem

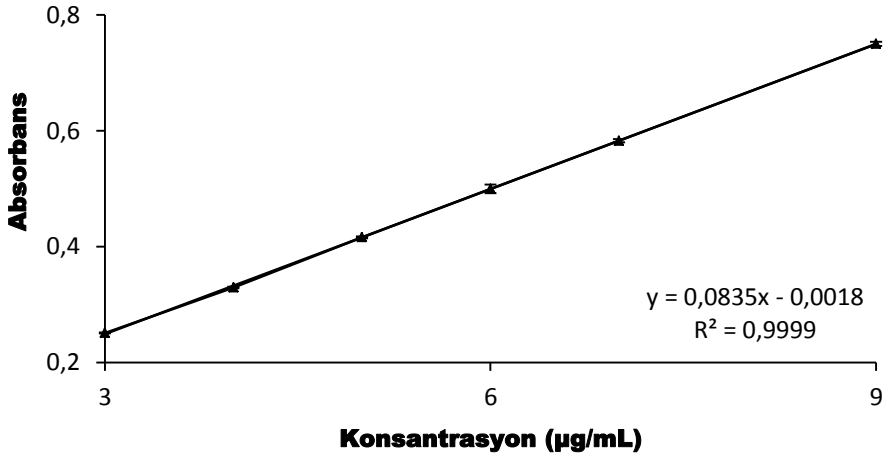
Tez çalışması kapsamında, formülasyonlar arasında partikül büyüklüğü, enkapsülasyon etkinliği ve *in vitro* salım çalışma sonuçları ve in vivo deney verilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır ($p<0.05$: aradaki farkın anlamlı olması durumu).

# 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

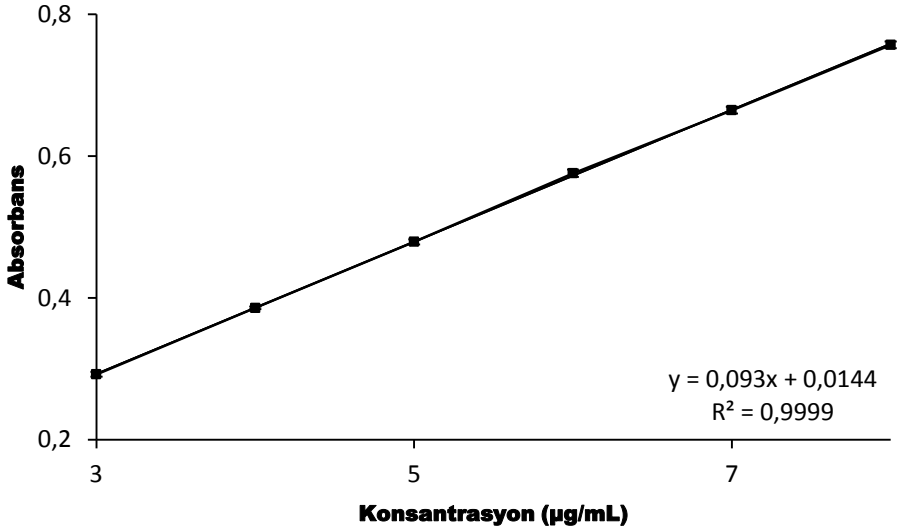
## 4.1. UV-spektrofotometrik yöntemle miktar tayini bulguları

PB pH 6,8 ve HCl pH 1,2 tamponu içinde hazırlanan etkin madde çözeltilerinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumları Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde alınmış ve maksimum absorbans dalga boyları sırasıyla 232 nm ve 209 nm olarak tespit edilmiştir.

Etkin maddenin belirtilen ortamlardaki kalibrasyon doğruları da Bölüm 3.2.1'de belirtildiği şekilde çalışılarak elde edilmiştir. Çalışmalar 6 seri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin absorbansları ölçülmüştür. Her bir konsantrasyon ve bu konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek doğru denklemleri elde edilmiştir. Kalibrasyon doğrularına ait denklemler lineer regresyon ile bulunmuştur. Her seri için elde edilen kalibrasyon doğrusuna ait eğimler karşılaştırılmış ve her iki ortam içinde hesaplanan VK değerleri <%1 olarak bulunmuştur. Metformin HCl'nin kalibrasyon doğru ve denklemleri Şekil 4.1 ve 4.2'de verilmiştir.




**Şekil 4.1.** Metformin HCl standart çözeltilerinin PB pH 6,8 ortamı içindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (X±SS; n=6)




**Şekil 4.2.** Metformin HCl standart çözeltilerinin HCl pH 1,2 ortamı içindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (X±SS; n=6)

### 4.1.1. Analitik yöntem validasyonu bulguları

Gün içi kesinlik ve doğruluğun tespiti için kalibrasyon doğrusu aralığında yer alan 3 farklı konsantrasyonda (etkin madde konsantrasyonları: PB pH 6,8 ortamı için 3,5; 5,5; 8,5 µg/mL ve HCl pH 1,2 ortamı için 3,5; 5,5; 7,5 µg/mL), her bir konsantrasyondan 6'şar adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Günler arası kesinlik ve doğruluğun tespiti içinse yine yukarıda belirtilen 3 farklı konsantrasyonda (farklı ortamlardaki), her bir konsantrasyondan 6'şar adet olacak şekilde hazırlanan standart çözeltilerin birbirini takip eden 3 gün içinde absorbansları ölçülmüş ve ilgili hesaplar yapılarak sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Analitik yöntem validasyonu için elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

| | | Konsantrasyon (µg/mL) | Hesaplanan Konsantrasyon (µg/mL) (X±SS) | [1]Doğruluk | [2]Kesinlik |
|---|---|---|---|---|---|
| **PB pH 6,8** | **[3]Gün içi** | 3,5 | 3,455 ± 0,034 | -1,295 | 0,972 |
| | | 5,5 | 5,461 ± 0,029 | -0,715 | 0,527 |
| | | 8,5 | 8,343 ± 0,026 | -1,848 | 0,307 |
| | **[4]Günler arası** | 3,5 | 3,507 ± 0,045 | 0,207 | 1,293 |
| | | 5,5 | 5,506 ± 0,091 | 0,119 | 1,656 |
| | | 8,5 | 8,499 ± 0,106 | -0,001 | 1,249 |
| **HCl pH 1,2** | **[3]Gün içi** | 3,5 | 3,481 ± 0,020 | -0,533 | 0,567 |
| | | 5,5 | 5,438± 0,042 | -1,121 | 0,765 |
| | | 7,5 | 7,483 ± 0,038 | -0,225 | 0,503 |
| | **[4]Günler arası** | 3,5 | 3,479 ± 0,035 | -0,601 | 1,005 |
| | | 5,5 | 5,447 ± 0,016 | -0,969 | 0,299 |
| | | 7,5 | 7,507 ± 0,008 | 0,094 | 0,110 |

[1]Bağıl Hata(%); [2] Varyasyon katsayısı (%); [3] Her bir konsantrasyon için n=6; [4]Her bir konsantrasyon için n=6/gün

Hazırlanan formülasyonlarda kullanılan maddelerin (CS, AL gibi), kullanılan ortamların içerdiği bileşenlerin ilgili dalga boyunda metformin HCl'nin absorbansını etkileyip etkilemediğini ve analitik yöntemin etkin maddeye özgün olup olmadığını göstermek üzere boş (etkin madde içermeyen) formülasyonların ve ortamların UV spektrumları alınarak incelenmiştir. Metformin HCl'nin maksimum absorbans verdiği dalga boyunda ortam bileşenleri ve formülasyona giren yardımcı maddelerin absorbans vermedikleri gözlenmiştir. Geliştirilen ve validasyonu gerçekleştirilen analitik yöntemin metformin HCl tayini için uygun olduğu tespit edilmiştir.

## 4.2. Boncuk ve mikroküre formülasyonlarına ait bulgular

Polimerler katı, sıvı ve yarı-katı dozaj şekilllerinin ve özellikle değiştirilmiş salım sistemlerinin formülasyonlarında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bu amaçla, biyoparçalanabilir, sentetik ve doğal polimerler çoğunlukla tercih edilmektedir. Özellikle, doğal polimerler ekonomik olmaları, kolaylıkla bulunabilir olmaları, kimyasal olarak modifiye edilebilmeleri, biyouyumlu, biyoparçalanabilir olmaları, toksik olmamaları gibi üstünlüklerinden dolayı farmasötik alanda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Gandhi *et al*. 2012).

Kitosan biyouyumlu ve biyoparçalanabilir doğal bir polimerdir. Kitosanın ilaç taşınmasıyla ilgili önemli özellikleri pozitif yük taşıması ve mukoadezif özellik göstermesidir. Oral ilaç taşıyıcı sistemler açısından mukoadezif özellik önemlidir. İlaç taşıyıcı sistemin absorpsiyon bölgesinde daha uzun süre kalmasını sağlamak üzere bu özellikten faydalanılır ve sonuç olarak da etkin madde absorpsiyonunda artış ve oral biyoyararlanımda ise düzelme sağlanır (Zhang 2012). Bu nedenle, intestinal epitel boyunca absorpsiyon artırıcı potansiyelinden dolayı kitosan polimeri üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Ma and Lim 2003; Van der Merwe *et al*. 2004; Garcia-Fuentes *et al*. 2005; Mao *et al*. 2005; Gandhi *et al*. 2012; Zhang 2012).

Aljinat, farmasötik dozaj şekillerinde ve özellikle değiştirilmiş salım sistemlerinin hazırlanmasında yoğun bir şekilde tercih edilerek kullanılan, biyouyumlu, biyoparçalanabilir, mukoadezif özeliklere sahip doğal, polianyonik ve hidrofilik bir polimerdir (Kesavan 2010; Donati *et al*. 2011). Sodyum aljinat, aljinik asitin sodyum tuzudur. Aljinat, G-G blokları aracılığı ile çok değerli katyonlarla ($Ca^{+2}$, $Al^{+3}$ v.b.) etkileşimi sonucu moleküller arası bağlanma gerçekleşir (Kesavan 2010). Çoğunlukla çapraz bağlayıcı olarak $CaCl_2$ tercih edilmektedir (Tavakol *et al*. 2013; El-Aassar *et al*. 2014). Aljinatın G yapıları ile kalsiyum iyonları arasındaki tercihli etkileşim sonucu 3-boyutlu iyonotropik hidrojel matriks yapısı şekillenir (Kesavan 2010). Ortamdaki katyonun miktarına bağlı olarak zincirler arasında oluşan bağ geçici veya devamlıdır. Oluşan iyonik etkileşim yüksek katyon konsantrasyonlarında devamlı iken düşük konsantrasyonlarda ise geçicidir (Gandhi *et al*. 2012). AL-boncuk formülasyonu

hazırlanmasında da çok değerlikli katyonlarla olan bu etkileşimden yoğun bir şekilde faydalanılmaktadır. Çapraz bağlayıcının tipi, konsantrasyonu ve sertleştirme süresi boncukların özelliklerine etki eden önemli faktörlerdir (İskenderoğlu 2007).

Bizim çalışmamızda da çapraz bağlayıcı olarak çokça tercih edilen $CaCl_2$ (AL boncuk formülasyonu için %15 a/h; AL-CS boncuk formülasyonu için %5 a/h) seçilerek kullanılmış ve boncuk formülasyonları iyonotropik jelasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Aljinat çözeltisinin konsantrasyonu ise her iki boncuk formülasyonu içinde %2 a/h olarak belirlenerek kullanılmıştır. Boncuklarla ilgili yapılan bir çalışmada, yüksek aljinat konsantrasyonu seçildiğinde (%3) polimer çözeltisinin viskozitesinin arttığı ve bu durumun damlatmayı zorlaştırdığı, düşük aljinat konsantrasyonlarında (<%1,8) ise boncukların tam olarak küresel olmadığı ve kurutma sırasında şekillerinin hızla bozulduğu, bu nedenlerden dolayı alijnat konsantrasyonunun %2 olarak seçildiği ifade edilmiştir (İskenderoğlu 2007). Çalışmamızda, CS mikroküreleri ise emülsiyon-çapraz bağlanma yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır.

### 4.2.1. Formülasyonlara ait hazırlama verimi bulguları

Hazırlama verimi bulguları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Formülasyonlara ait hazırlama verimi bulguları (X±SS; n=3)

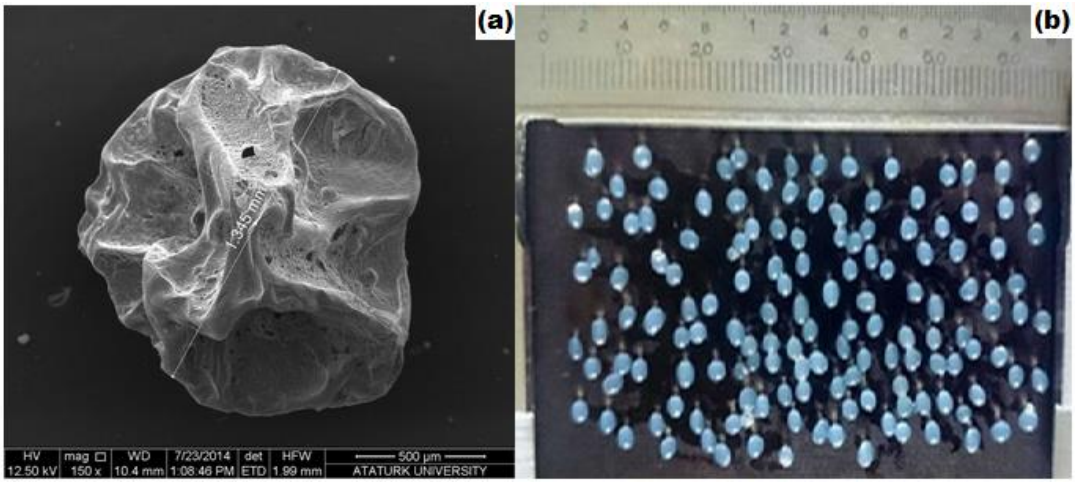
| Formülasyonlar | Verim (%) |
|---|---|
| Boş AL Boncuk | 30,71±1,02 |
| Boş AL-CS Boncuk | 39,25±0,67 |
| Boş CS Mikroküre | 50,51±11,95 |
| Metformin HCl yüklü-AL Boncuk | 51,69±1,27 |
| Metformin HCl yüklü-AL-CS Boncuk | 37,86±0,36 |
| Metformin HCl yüklü-CS Mikroküre | 42,32±2,95 |

Çalışmamızda, tüm boncuk ve mikroküre formülasyonları için hazırlama verimi değerleri %30,71-51,69 aralığında saptanmıştır (Çizelge 4.2). Hazırlama verimleri açısından boş ve etkin madde yüklü AL ve AL-CS boncuk formülasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p=0.05$) tespit edilmiştir. Metformin HCl suda yüksek çözünürlüğe sahip olan ve büyük olasılıkla fizyolojik koşullarda pozitif yük taşıyan bir moleküldür (EMEA 2007). $CaCl_2$ çözeltisinden dolayı ortam pH'sı yükselmektedir. İyonotropik jelasyon sırasında + ve – yüklerin dengesindeki bu gibi ufak değişiklikler hazırlama verimini etkilemektedir. Aynı şekilde, boş ve etkin madde yüklü mikrokürelerin hazırlama verimi değerleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır.

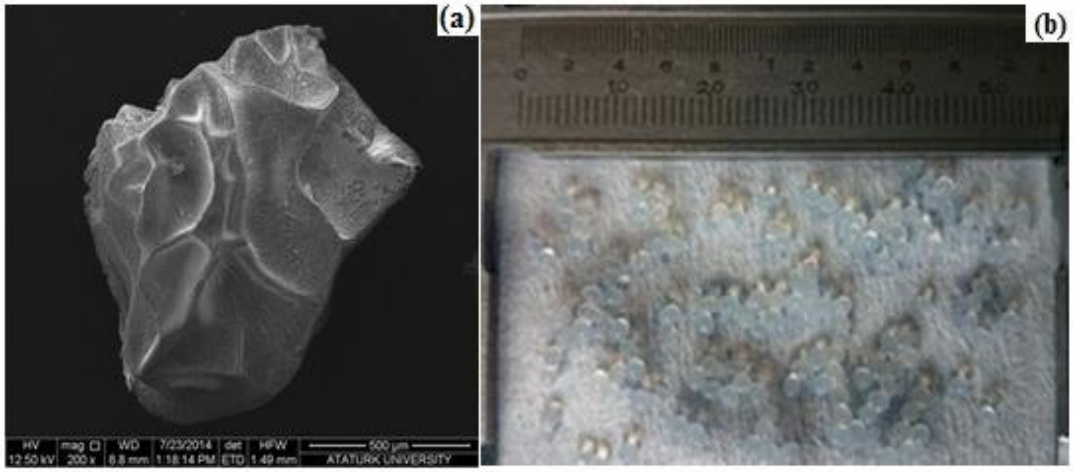
### 4.2.2. Formülasyonların yüzey özelliklerine ve partikül büyüklüklerine ait bulgular

Metformin HCl içeren AL ve AL-CS boncuklarının dijital görüntüleri alınmış ve yaş halde iken tüm boncukların küresel oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4). Dondurarak kurutma sonrası ise boncukların SEM görüntüleri alınmış ve boncuklarda büzülme olayının meydana geldiği saptanmıştır (Şekil 4.3, Şekil 4.4). Zohar-Perez *et al*. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş ve liyofilizasyon sonrası boncuklarda büzülme meydana geldiği raporlanmıştır. Bununla birlikte, liyofilize edilmiş metformin HCl içeren CS mikrokürelerinin de SEM görüntüleri alınmış ve küresel oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.5).

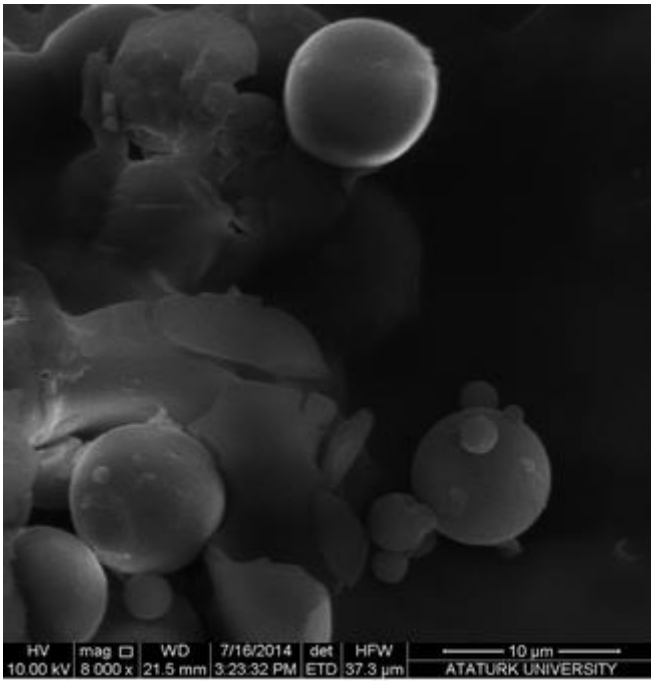
Hazırlanan tüm formülasyonlara ait partikül büyüklüğü değerleri ise Çizelge 4.3'te verilmiştir.




**Şekil 4.3.** Metformin HCl yüklü-AL boncuk formülasyonunun (a) SEM görüntüsü ve (b) dijital fotoğrafı




**Şekil 4.4.** Metformin HCl yüklü-AL-CS boncuk formülasyonunun (a) SEM görüntüsü ve (b) dijital fotoğrafı




**Şekil 4.5.** Metformin HCl yüklü-CS mikroküre lerinin SEM görüntüsü

**Çizelge 4.3.** Hazırlanan formülasyonlara ait ortalama partikül büyüklüğü değerleri (X ± SS)

| **Formülasyonlar** | **Ortalama Partikül Büyüklüğü (µm)** |
|---|---|
| Boş AL Boncuk (n=36) | 1742±105 |
| Boş AL-CS Boncuk (n=36) | 1714±140 |
| Boş CS Mikroküre (n=3) | 9,06±1,32 |
| Metformin HCl yüklü-AL Boncuk (n=36) | 1850±103 |
| Metformin HCl yüklü-AL-CS Boncuk (n=36) | 1733±60 |
| Metformin HCl yüklü-CS Mikroküre (n=3) | 9,21±2,16 |

Ayrıca, hazırlanan boncuk formülasyonlarının partikül büyüklüğü değerlerinin 1714-1850 µm aralığında olduğu (Çizelge 4.3), tüm boncuk formülasyonlarının (boş ve etkin madde yüklü AL ve AL-CS boncuk formülasyonları) partikül büyüklüğü değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır. Etkin madde:aljinat oranı, çapraz bağlayıcı konsantrasyonu ve sertleştirme süresi boncukların partikül boyutunu

etkileyen önemli faktörlerdir (İskenderoğlu 2007). Boş ve metformin HCl-yüklü CS mikroküre formülasyonlarının partikül boyutları ise sırasıyla 9,06 ve 9,21 μm ($p>0.05$) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).

### 4.2.3. Formülasyonlara ait yükleme etkinliği ve yükleme kapasitesi bulguları

Taşıyıcı sistemlere yüklenen metformin HCl miktarı Bölüm 3.2.3.c'de açıklandığı şekilde tespit edilmiştir. Hesaplanan yükleme etkinliği ve yükleme kapasitesi değerleri Çizelge 4.4'de verilmiştir.

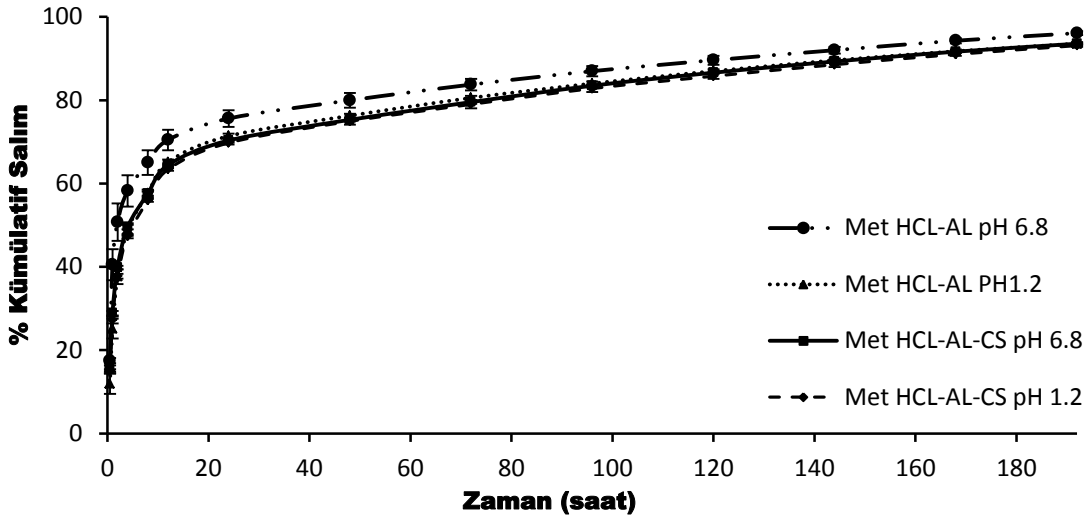
**Çizelge 4.4.** Formülasyonlara ait yükleme etkinliği ve yükleme kapasitesi değerleri (X±SS; n=3)

| Formülasyonlar | Yükleme Etkinliği (%) | Yükleme Kapasitesi (%) |
|---|---|---|
| Metformin HCl yüklü-AL Boncuk | 33,58±1,56 | 1,98±0,08 |
| Metformin HCl yüklü-AL-CS Boncuk | 24,11±1,72 | 4,55±0,28 |
| Metformin HCl yüklü-CS Mikroküre | 20,05±6,92 | 1,44±0,47 |

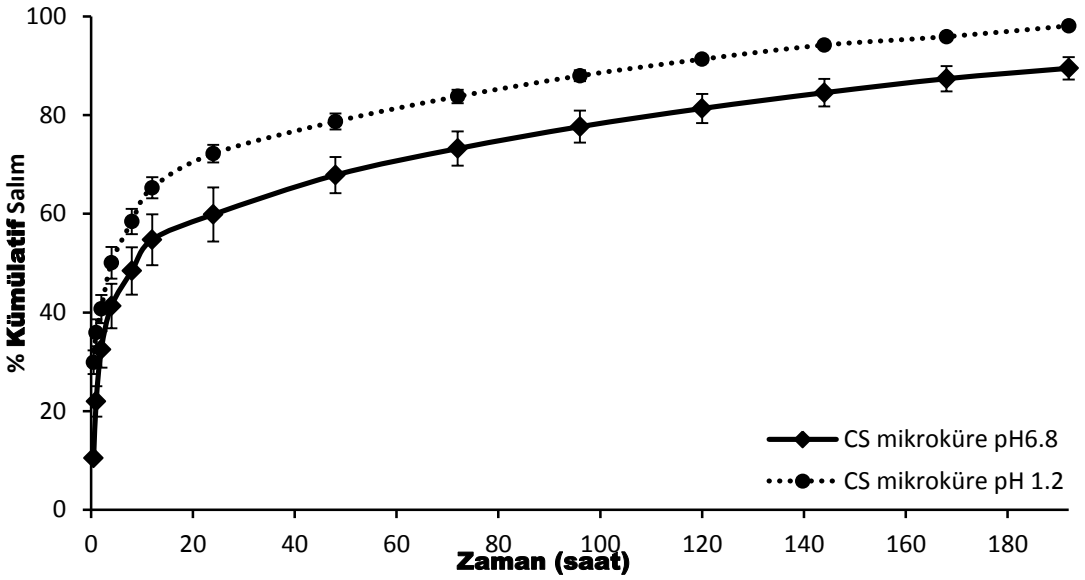
AL ve AL-CS boncuk formülasyonları için elde edilen yükleme etkinliği değerleri ise sırasıyla %33,58 ve %24,11 (Çizelge 4.4) olarak tespit edilmiş ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p=0.05$) tespit edilmiştir. CS mikroküreleri içinse saptanan yükleme etkinliği değeri %20,05'tir. Üç formülasyon içinde hesaplanan yükleme etkinliği değerleri düşük bulunmuştur. Suda yüksek çözünürlüğe sahip olan metformin HCl'nin hazırlama sırasında sulu kısma kaçışı bu durumun nedeni olarak gösterilebilir. Boncuk formülasyonlarında sertleştirme süresi artıkça bu kaçış daha da fazla olmaktadır. Ramteke *et al*. (2012) hazırladıkları metformin HCl-yüklü aljinat boncukları ($CaCl_2$ çapraz bağlayıcı olarak kullanıldığında) için yükleme etkinliği değerini %25 olarak saptamışlar ve düşük yükleme etkinliğini etkin maddenin sudaki yüksek çözünürlüğüne bağlamışlardır.

### 4.2.4. *İn vitro* salım çalışmalarına ait bulgular

Hazırlanan tüm formülasyonlara ait *in vitro* salım çalışmaları iki farklı ortamda (PB pH 6,8 ve HCl pH 1,2) gerçekleştirilmiş ve elde edilen salım grafikleri Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verilmiştir. PB pH 6,8 ortamında 1 saatte AL- ve AL-CS boncuklarından gerçekleşen % kümülatif metformin HCl salım değerleri sırasıyla %40 ve %28 ve 8 günde ise ~%96 ve ~%93 olarak bulunmuştur. HCl pH 1,2 ortamında ise % kümülatif salım değerleri 1 saatte AL- ve AL-CS boncukları için sırasıyla %25 ve %27 civarında, 8 günde ise her iki formülasyon içinde yaklaşık %93 civarında gerçekleşmiştir (Şekil 4.6).




**Şekil 4.6.** AL ve AL-CS boncuk formülasyonlarının HCl pH 1,2 ve PB pH 6,8 içindeki salım profilleri (X±SS; n=3)




**Şekil 4.7.** CS mikrokürelerinin HCl pH 1,2 ve PB pH 6,8 içindeki salım profilleri (X±SS; n=3)

AL-boncuk formülasyonlarından etkin madde salımı HCl pH 1,2 ile karşılaştırıldığında PB pH 6,8 ortamında daha hızlı olarak gerçekleşmiş, ancak her iki ortamdaki % kümülatif salım değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olmadığı (ilk 24 saatte her zaman aralığı için $p=0.05$ iken daha sonraki her zaman aralığı için $p>0.05$'tir) saptanmıştır. AL-boncuk ve AL-CS formülasyonlarından gerçekleşen kümülatif salım yüzdeleri karşılaştırıldığında da benzer şekilde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı (her zaman aralığı için $p\geq0.05$; her iki ortamda içinde) belirlenmiştir (Şekil 4.6).

Aljinat boncukları asidik ortama karşı duyarlıdır. Aljinat, pKa değerlerinin (guluronik asit ve mannuronik asit için sırasıyla 3,2 ve 4) altındaki pH değerlerine (asidik ortam, $pH<4$) maruz kaldığında aljinatın karboksil grupları protonlanarak (-COOH) bu gruplar arasındaki elektrostatik itme kuvvetlerinde azalmaya neden olur ve moleküller arası hidrojen bağı varlığıyla da polimer zincirlerinin gevşemesini kısıtlarlar. Böylece, daha sıkı bir ağ yapısı şekillenir ve etkin madde salımı azalır (Jao *et al*. 2010; Tous *et al*. 2014). Diğer taraftan, nötral ve alkali ortamda karboksil grupları iyonize hale gelir ($COO^-$), negatif yükler arasındaki elektrostatik itme sonucu polimerik ağ yapısı gevşer

ve daha yüksek difüzyon katsayıları elde edilir. Örneğin, yapay bağırsak sıvısında (pH 7,5) kalsiyum aljinat matriks yapısı, ortamdaki katyonlarla kalsiyumun yer değiştirmesi sonucu şişer, ağ yapısı büyük ölçüde gevşer ve daha hızlı bir etkin madde salımı gerçekleşir (Jao *et al*. 2010).

Rajendran and Basu (2009) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada nimodipin-yüklü AL ve AL-CS (CS konsantrasyonları %0,5 ve %0,75 a/h olarak kullanılmıştır) boncuk formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan boncuk boyutlarının 1486-1602 µm aralığında değiştiği, kitosan varlığıyla boncuk boyutlarının farklılaşmadığı, etkin madde:polimer oranı 1:3'den 1:4'e değiştirildiğinde yükleme etkinliği değerinin %23'den %18'e düştüğü, şişme çalışmalarında ise şişme derecesinin ortam pH'sına bağlı olarak değiştiği, AL boncukları için maksimum şişme oranlarının PB pH 6,8'de elde edildiği, pH 1,2'de ise herhangi bir dağılmanın/yapısal değişimin görülmediği (8 saat boyunca), pH artıkça şişme oranının arttığı belirtilmiştir. Kitosan varlığının ise pH 1,2'de AL boncuklarına göre AL-CS boncuklarının şişme derecesini artırdığı ve PB pH 6,8 ortamında ise daha yavaş şişmeye neden olduğu ifade edilmiştir. *İn vitro* salım çalışmalarında ise PB pH 6,8 ortamında AL-boncuklarından 6 saatte yaklaşık %96 oranında etkin madde salımı gerçekleşirken kitosan varlığıyla birlikte etkin madde salımı yaklaşık %76'ya düşmüştür. PB'deki $Na^{+}$ iyonları ile boncuk yapısındaki $Ca^{+2}$ iyonlarının yer değiştirmesi sonucu zincir yapısında gevşemenin olduğu, jelleşme veya şişme derecesinin arttığı belirtilmiştir. AL-CS boncuk yapısındaki $Ca^{+2}$ iyonunun AL boncuk yapısındakinden daha az olduğu çünkü aljinatın bu durumda hem $Ca^{+2}$ hemde CS ile kompleks oluşturduğu ifade edilmiştir. Dolayısıyla, PB pH 6,8 ortamında AL boncukları için daha yüksek şişme derecesi, daha hızlı yapısal kayıplar ve daha yüksek etkin madde salım yüzdeleri elde edilmektedir. Tüm bu bulgular, çalışmamızda AL ve AL-CS boncuk formülasyonları için elde ettiğimiz salım sonuçlarıyla uyuşmaktadır.

Nayak *et al*. (2013) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise çemen *(Trigonella foenum-graecum* L.) tohomu müsilajı ve aljinat kullanılarak mukoadezif boncuk formülasyonu geliştirilmiştir. Boncuk hazırlanması için iyonotropik jelasyon yöntemi seçilmiş ve çapraz bağlayıcı olarak $CaCl_2$ kullanılmıştır. Kullanılan çapraz bağlayıcı

çözeltisinin konsantrasyonu artıkça boncuk boyutlarının küçüldüğü, alginat:müsilaj oranının 1 olduğu formülasyonlar için %10, 7,5, 5 (a/h) $CaCl_2$ konsantrasyonları kullanıldığında boncuk boyutlarının sırasıyla 0,88 mm, 1,01 mm ve 1,12 mm olduğu saptanmıştır. Yüksek çapraz bağlayıcı konsantrasyonu sonucu gerçekleşen yüksek çapraz bağlanma derecesi ile polimerik yapının büzülmesinin boyut küçülmesine neden olduğu belirtilmiştir. Formülasyonlar için bulunan metformin HCl hapsedilme etkinlikleri ise %71,63-95,08 (a/a) aralığında saptanmıştır. Formülasyonda müsilaj miktarı artışıyla polimerik çözeltinin viskozitesinin arttığı, etkin maddenin çapraz bağlayıcı çözeltisine kaçışının azaltıldığı ve sonuçta hapsedilme etkinliğinin arttığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, yüksek çapraz bağlanma derecesinden dolayı çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun artırılması da hapsedilme etkinliğinin artırılmasına katkıda bulunmuştur. Boncukların şişme özellikleri HCl pH 1,2 ve PB pH 7,4 içerisinde incelenmiştir. % şişme indeksinin HCl ortamında daha düşük olduğu raporlanmıştır. PB içerisinde ise maksimum şişmenin 2-3 saat içerisinde gerçekleştiği, daha sonra erozyon ve çözünmenin meydana geldiği ifade edilmiş, ortamdaki katyonların kalsiyum ile yer değiştirmesi ve ayrıca PB içindeki fosfat iyonlarının ortamdaki varlığının (kalsiyum tutucu olarak işlev görürler) bundan sorumlu olabileceği bildirilmiştir. *In vitro* salım çalışmalarını HCl (pH 1,2) ortamında 2 saat ve sonrasında PB (pH 7,4) ortamında 8 saat olarak gerçekleştirmişlerdir. Tüm formülasyonlar için uzun süreli (yaklaşık 10 saat) bir salım elde edildiği, HCl ortamında boncuklardan (aljinat, asidik ortama duyarlıdır) etkin madde salımının yavaşça gerçekleştiği ve 2 saat sonunda elde edilen % kümülatif salım değerlerinin %15,5'den daha az olduğu ve bu salımın boncuk yüzeyine tutunmuş etkin maddeden kaynaklanabileceği raporlanmıştır. Bu durumun aksine, PB pH 7,4 ortamında boncukların daha yüksek derecede şişme özelliği gösterdiği, bundan dolayı etkin madde salımının daha hızlı gerçekleştiği, 10 saatte saptanan % kümülatif salım değerlerinin %69,78-95,70 aralığında bulunduğu ve daha yüksek $CaCl_2$ konsantrasyonu kullanıldığında ise daha yavaş ve sürekli bir etkin madde salımı elde edildiği bildirilmiştir.

Nayak *et al*. (2011) ise metformin HCl'nin salımını kontrol etmek ve midedeki kalış süresini uzatmak üzere midede yüzen boncuk formülasyonu geliştirmişlerdir. Bu

amaçla, aljinat:hidroksipropil metil selüloz polimer karışımı, kalsiyum karbonat (gaz oluşturucu ajan olarak) ve $CaCl_2$ (%2, 3, 4 a/h; çapraz bağlayıcı olarak) kullanılarak yüzen aljinat boncukları hazırlanmıştır. Bununla birlikte, gaz oluşturucu ajan ve hidroksipropil metil selüloz kullanılmadan yüzmeyen aljinat boncukları da hazırlanmıştır. Boncuk formülasyonları için elde edilen yükleme etkinliği değerleri ~%78-82 aralığında bulunmuş ve gaz oluşturucu ajanın (gözenek oluşumunu ve çapını artırır) konsantrasyonu azaltıldığında daha yüksek yükleme etkinliği değerleri elde edilmiştir. Boncuk boyutlarının ise 861-991 μm aralığında olduğu saptanmış ve gaz oluşturucu ajan konsantrasyonu arttıkça boncuk boyutu da artmıştır. Yüzen boncuklar için elde edilen gözeneklilik değerlerinin yaklaşık %68-78 olduğu belirtilmiştir. Gaz oluşturucu ajan konsantrasyonu artışı ile gözeneklilik artmıştır. *İn vitro* salım çalışmaları yapay mide sıvısında (pH 2) gerçekleştirilmiş ve 1 saat içinde tüm boncuk formülasyonlarından metformin HCl salımı %19,5-25 oranında gerçekleşmiştir. Kalsiyum karbonatın en düşük olduğu formülasyon için 8. saatin sonunda en yüksek salım yüzdesi (yaklaşık %98) elde edilmiştir. Kalsiyum karbonat miktarının artışı ile boncuk gözenekliliğinin arttığı ancak asidik ortamda $Ca^{+2}$ iyon oluşumuna neden olduğu içinde çapraz bağlanmadan dolayı iç jelasyonun artırdığı ve sonuç olarak da salım yüzdesinin azaldığı (%89,7) ifade edilmiştir.

Choudhury and Kar (2005) tarafından metformin HCl içeren aljinat boncukları iki farklı yöntem (emülsiyon-jelasyon yöntemi (farklı yağlar kullanılarak) ve iyonotropik jelasyon yöntemi) kullanılarak hazırlanmış, yüzey şekilleri, boyut ve salım özellikleri incelenmiştir. İyonotropik jelasyon yöntemi ile 780-900 μm ve emülsiyon jelasyon yöntemiyle ise 840-1100 μm boyutlarında boncuklar hazırlanmıştır. Emülsiyon jelasyon yönteminde yağ konsantrasyonu artışıyla boncukların boyutunda artış ve küreselliğinde ise düzelme sağlandığı vurgulanmıştır. Yağ olarak sıvı parafin kullanılarak hazırlanan boncukların, diğer yağlarla hazırlanan boncuklara ve iyonotropik jelasyonla hazırlanan boncuklara göre daha başarılı bir şekilde sürekli salım gösterdiği raporlanmıştır.

Ramteke *et al*. (2012) metformin HCl-yüklü sürekli salım sistemi geliştirmek üzere aljinat boncuklarını, çapraz bağlayıcı olarak kalsiyum klorür ve alüminyum sülfat

kullanarak iyonotropik jelasyon yöntemiyle hazırlamışlardır. Hazırlanan boncukların boyutlarının 1,33-1,67 mm ($CaCl_2$ çapraz bağlayıcı olarak kull.) ve 1,47-1,73 mm (alüminyum sülfat çapraz bağlayıcı olarak kull.) aralığında olduğu saptanmış ve polimer konsantrasyon artışı ile de boncuk boyutlarında artış olduğu raporlanmıştır. Etkin madde yükleme etkinliği %25 ($CaCl_2$ çapraz bağlayıcı) ve %37 (Alüminyum sülfat çapraz bağlayıcı) olarak bulunmuştur. Düşük yükleme etkinliğinin etkin maddenin sudaki yüksek çözünürlüğünden kaynaklandığı bildirilmiştir. Her iki çapraz bağlayıcının kullanıldığı formülasyonlarda polimer konsantrasyonu artışıyla yükleme etkinliğinin arttığı, düşük konsantrasyonda $CaCl_2$ kullanıldığı durumda ise etkin maddenin oluşan gözenekli yüzeyden dışarı kaçarak yükleme etkinliğinin düşmesine neden olduğu ifade edilmiştir. İn vitro salım çalışması PB (pH 6,8) ortamında gerçekleştirilmiş ve $Al^{+3}$ kullanılan boncuk formülasyonları (~10 saatlik sürekli salım) ile karşılaştırıldığında $Ca^{+2}$ kullanılan boncuklardan (~8 saatlik sürekli salım) yapısındaki $Ca^{+2}$ iyonunun PB ortamında hızla uzaklaşmasından dolayı daha hızlı bir etkin madde salımı elde edilmiştir. Boncuk boyutları, yükleme etkinliği ve salım bulguları açısından bizim çalışmamızla benzer sonuçlar elde edildiği görülmektedir.

Bunun yanısıra, metformin HCl-yüklü boncuk formülasyonları ile ilgili yapılan diğer bir çalışmada ise, sodyum aljinatın farklı polimerlerle (hidroksipropilmetil selüloz, karbopol, pektin ve sodyum karboksi metil selüloz) karışımı ve çapraz bağlayıcı olarak da $CaCl_2$ (%10 a/a) kullanılmıştır. Boncukların şişme indeksi değerleri, HCl (0,1 N) ortamı ile karşılaştırıldığında PB içerisinde daha yüksek bulunmuştur (pektin içeren formülasyon hariç). *İn vitro* salım çalışması (PB pH 6,8) sonucu hidroksipropilmetil selüloz ve pektin içeren formülasyonlar için daha hızlı bir salım gözlenmiş ve tüm formülasyonlar için yaklaşık 8 saat devam eden bir salım grafiği elde edilmiştir (Lohithasu *et al*. 2013).

Başka bir çalışma grubu ise metformin HCl-yüklü boncuklar hazırlamış ve boncukları tablet haline getirmişlerdir. Boncuklar, sodyum aljinat, sodyum karboksi metil selüloz (polimer karışım oranları 1:1) ve $CaCl_2$ (%5 a/h) kullanılarak iyonotropik jelasyon

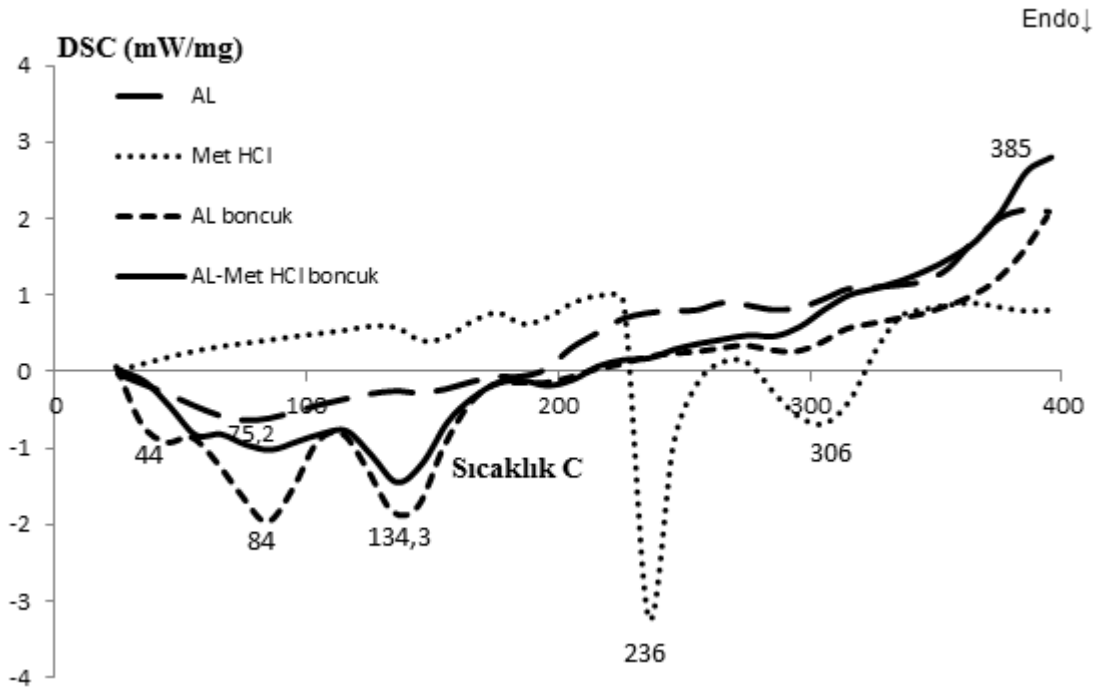
yöntemiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan tablet formülasyonları 10 saate kadar uzatılmış salım özelliği göstermiştir (Damodar and Movva 2014).

Bizim çalışmamızda, CS mikroküre lerinden HCl pH 1,2 ve PB pH 6,8 ortamında 1 saatte sırasıyla yaklaşık %36 ve %22, 8 günde ise %98 ve 89 metformin HCl salımı gerçekleşmiştir (Şekil 4.7). Salım grafiği değerlendirildiğinde pH 6,8 ortamına göre asidik koşullarda biraz daha hızlı bir metformin HCl salımı olduğu görülmüştür. Ancak, istatistiksel analiz gerçekleştirildiğinde ise her iki ortamda gerçekleşen etkin madde salımları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.05$; tüm zamanlar için). Çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, şişme derecesi, porozite, etkin madde çözünürlüğü gibi faktörler CS mikroküre lerinden etkin madde salımını etkileyen başlıca faktörlerdir. Çapraz bağlayıcı olarak gluteraldehit kullanılarak hazırlanan CS mikroküreleri pH'sı 1,2 olan ortamda imin bağlarının kısmi asit hidroliziyle serbestleşen amin gruplarının kademeli olarak asidik koşullarda proton kazanması sonucu matriks yapısının gevşemesi ve artan şişme derecesinden dolayı etkin madde salımı daha hızlı gerçekleşir. pH 6,8'de gerçekleşen bağ hidrolizi ise asidik koşullara göre daha düşüktür (Gonçalves *et al*. 2005).

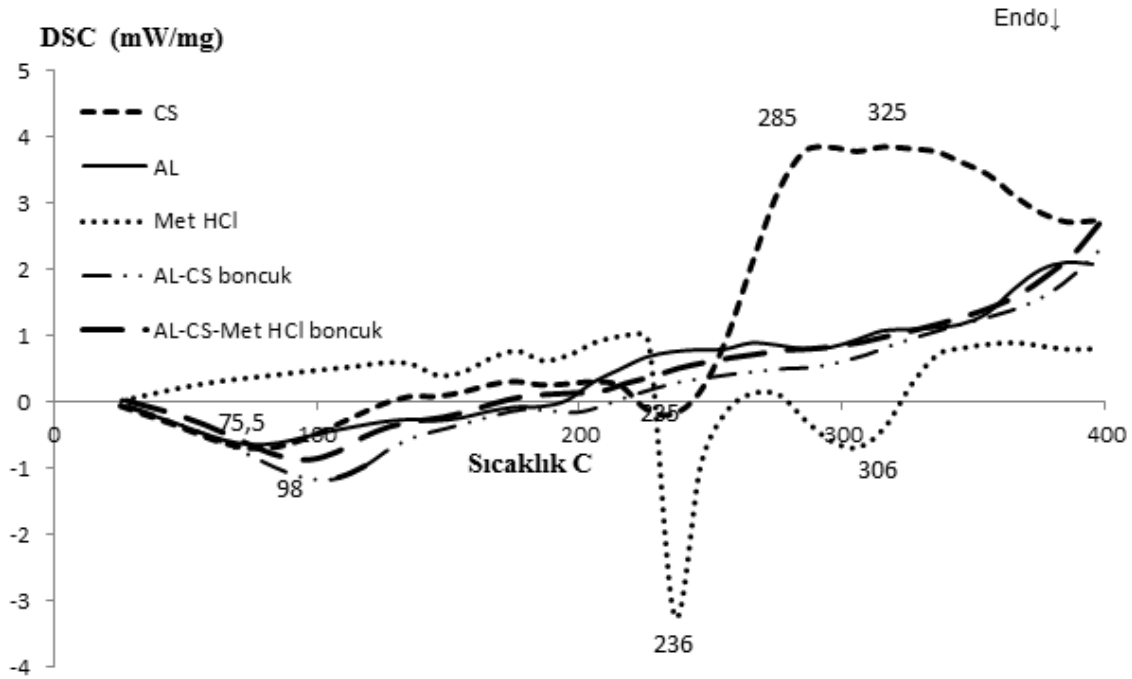
CS içerdiği hidroksil ve amino gruplarından dolayı kolaylıkla hidrate olmaktadır, ancak, çapraz bağlanma sonrası hidrofilik özelliği değişir. Çapraz bağlanmada aldehit grupları CS'nin amino grupları ile bağlanarak kovalent imin bağları oluşturur. Oluşan bu yapı nedeniyle içeriye daha az su girişi olur ve daha düşük şişme derecesi elde edilir. Nayak *et al*. (2009) tarafından çapraz bağlayıcı olarak gluteraldehit kullanılarak hazırlanan CS mikroküre formülasyonları için etkin madde salım çalışması PB pH 7,4 ortamında gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlayıcı konsantrasyonu %15'den %35 (a/a)'e yükseltildiğinde CS mikroküre lerinin şişme kapasitesi PB pH 7,4 ortamında %190'dan %150'ye düşmüştür. Daha düşük çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında ise mikroküre matriks yapısı daha gevşektir, su girişi ve şişme derecesi yüksektir. %35 gluteraldehit ve 1:6 etkin madde:CS oranı ile çalışıldığında PB pH 7,4 ortamında 12 saatte %70 oranında etkin madde salımı gerçekleşmiştir.

### 4.2.5. Etkin madde, polimerler ve formülasyonlar için elde edilen DSC termogramları

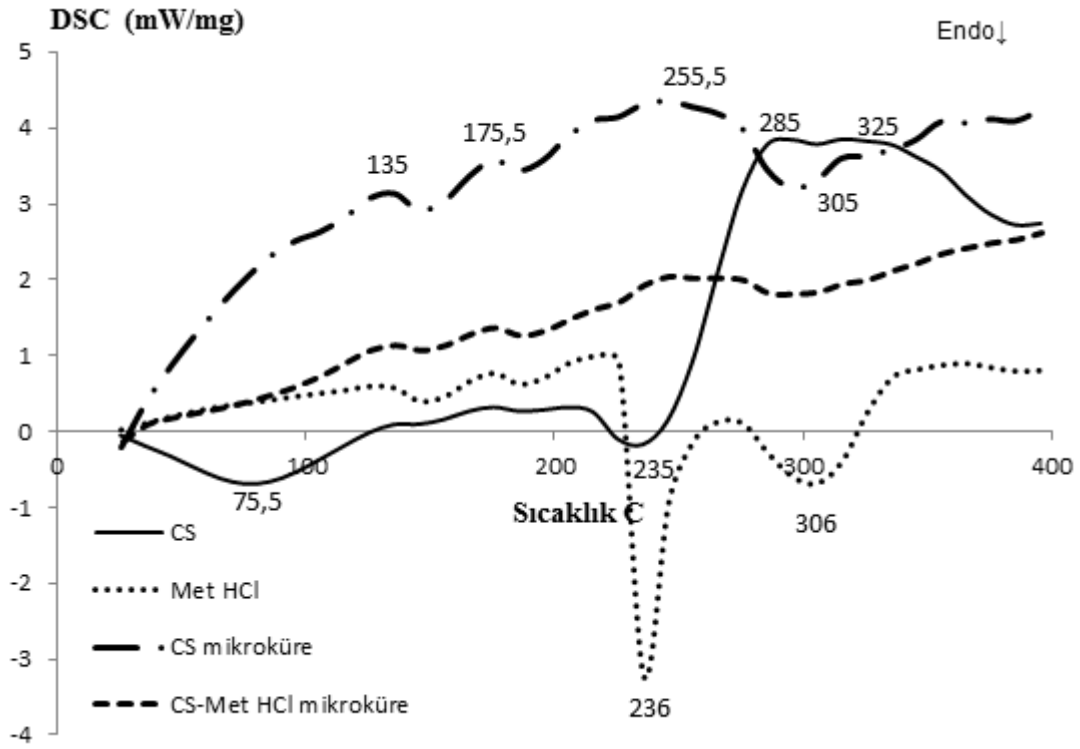
DSC cihazı kullanılarak hazırlanan formülasyonların, etkin maddenin ve polimerlerin termogramları alınmış ve bunlar Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10'da gösterilmiştir.




**Şekil 4.8.** Hazırlanan AL boncuk formülasyonlarına, etkin madde ve polimere ait DSC diyagramları




**Şekil 4.9.** Hazırlanan AL-CS boncuk formülasyonlarına, etkin madde ve polimerlere ait DSC diyagramları



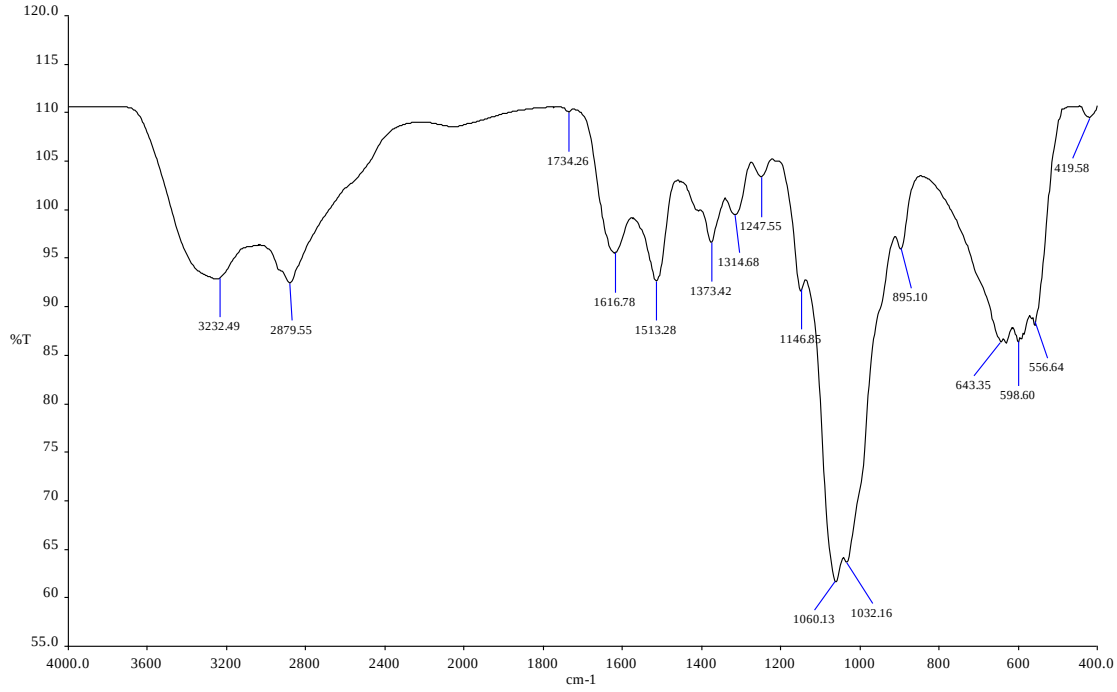

**Şekil 4.10.** Hazırlanan CS mikroküre formülasyonlarına, etkin madde ve polimere ait DSC diyagramları

DSC gibi termoanalizler polimer analizlerinde, etkin madde-polimer etkileşimlerinin tayininde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Calvo *et al*. 1996; Gamisans *et al*. 1999; Mainardes *et al*. 2006). Etkin madde-polimer etkileşimlerini görmek, termal özellik değişimlerini tespit etmek amacıyla saf metformin HCl, kitosan, aljinat, etkin madde içeren ve içermeyen AL, AL-CS boncukları ve CS mikroküreleri için DSC analizleri gerçekleştirilerek DSC diyagramları elde edilmiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10). Metformin HCl'nin DSC diyagramında (Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10), 236°C'de karakteristik, keskin bir endotermik pik görülmektedir. Metformin HCl ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda da benzer şekilde DSC diyagramlarında 226-231 °C aralığında belirgin keskin bir pik saptandığı ifade edilmiştir (Corti *et al*. 2008; Block *et al*. 2009; Kumar 2011; Pandit *et al*. 2013). Kitosan polimerinin DSC diyagramında ise (Şekil 4.9, Şekil 4.10) karakteristik olarak gösterilen pikler 80-100 °C civarında (Tpik:75,5°C) olan ve polimerin hidrofilik gruplarıyla ilişkili olan suyun kaybedilmesi sonucu oluşan endotermik pik ve diğer pik ise, büyük bir olasılıkla polielektrolitlerin oksidasyon

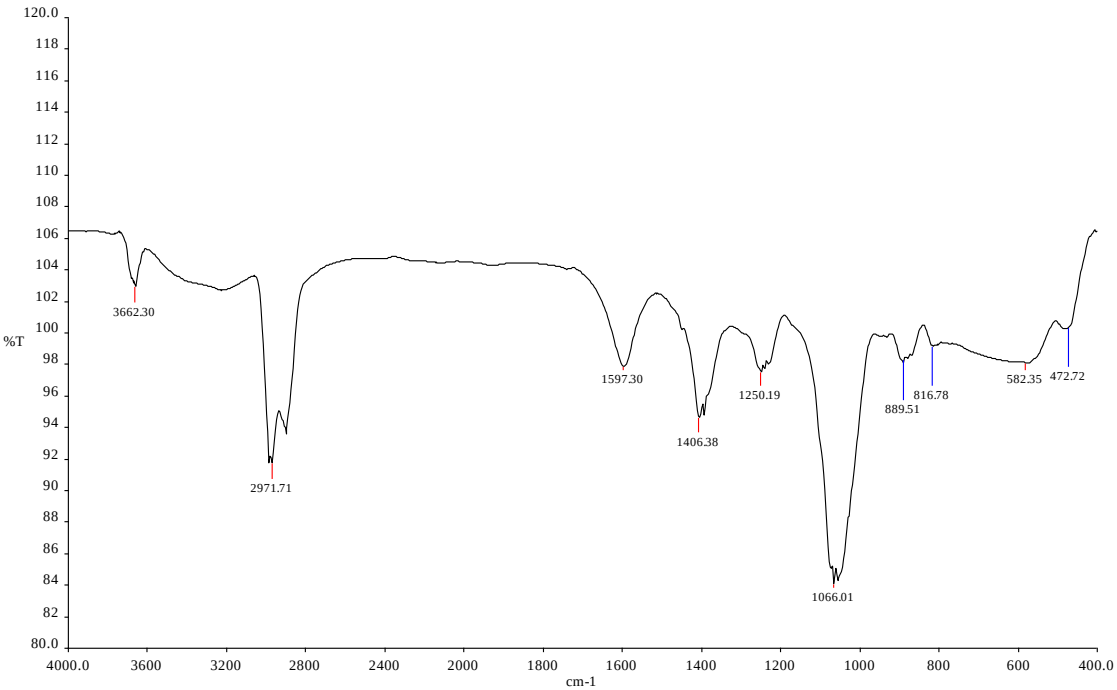
reaksiyonları ve protonlanmış karboksilik gruplarının kısmi dekarboksilasyonu ile ilişkili dehidratasyon ve depolimerizasyon reaksiyonlarının neden olduğu polielektrolit degradasyonunun sonucu oluşan ekzotermik piktir (280-300°C) (Cevher *et al*. 2006; Gazori *et al*. 2009; Tripathi *et al*. 2009; Yang and Chiu 2012). AL polimerine ait DSC diyagramında ise 75,2°C (endotermik) ve 235,2°C (ekzotermik) de iki pik elde edilmiştir (Şekil 4.8; Şekil 4.9). Soares *et al*. (2004) tarafından yapılan çalışmada da ısıtma hızına bağlı olarak AL polimeri için ~80-102°C de endotermik, ~220-260°C de ise ekzotermik pikler elde edildiği belirtilmiştir. AL boncuk ve Met HCl-AL boncuk formülasyonlarına ait DSC diyagramlarına (Şekil 4.8) bakıldığında ise 84°C ve 134°C civarında, AL-CS boncuk ve AL-CS-Met HCl boncuk formülasyonlarına ait DSC diyagramlarında ise (Şekil 4.9) 98°C civarında endotermik pikler elde edilmiştir. Metformin HCl'nin polimerik matriks içerisinde moleküler düzeyde dağılmasının bir sonucu olarak metformin HCl'nin karakteristik piki her iki formülasyon içinde DSC diyagramlarında görülmemektedir (Pandit *et al*. 2013). CS mikroküre ve Met HCl-CS mikroküre formülasyonlarına ait diyagramların ise CS ve Met HCl diyaramlarından farklı olduğu görülmektedir. Aynı şekilde, metformin HCl polimerik matriks içerisinde moleküler düzeyde dağılmıştır (Pandit *et al*. 2013).

### 4.2.6. Etkin madde, polimerler ve formülasyonlar için elde edilen FT-IR spektrumları

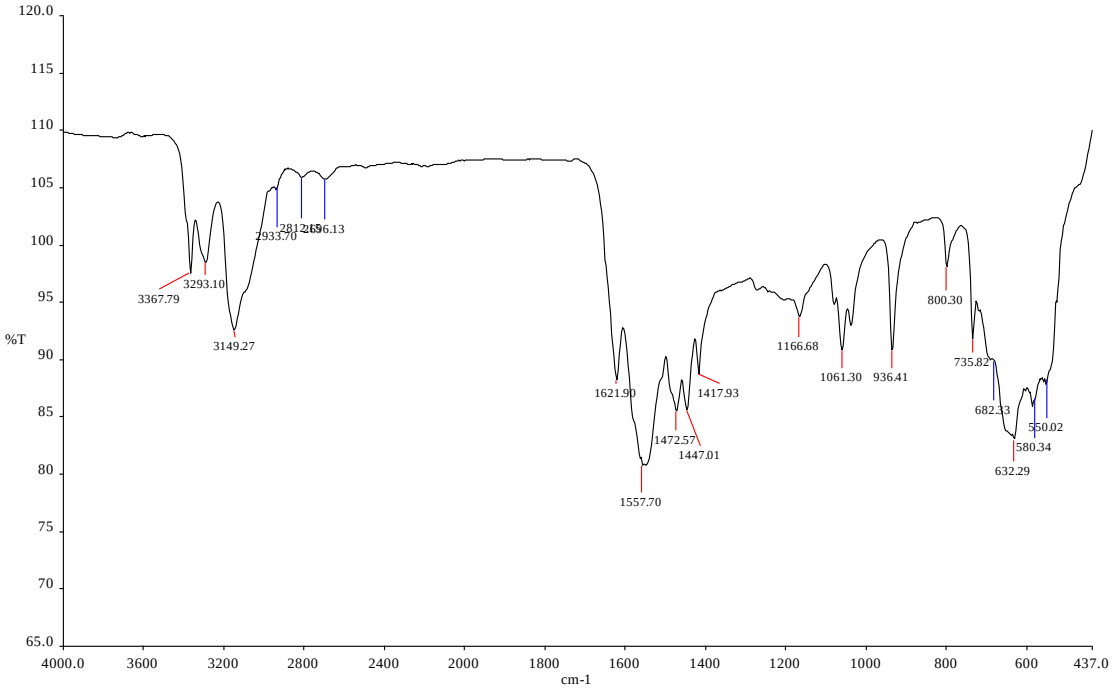
Etkin madde-polimer etkileşiminin ve hazırlanan formülasyonlar içinde yer alan etkin madde varlığının saptanması amacıyla metformin HCl, AL, CS, boncuk formülasyonları ve mikroküre formülasyonları için FT-IR kullanılarak infrared spektrumları alınmıştır. Spektrumlar, Şekil 4.11-4.19'da gösterilmiştir.



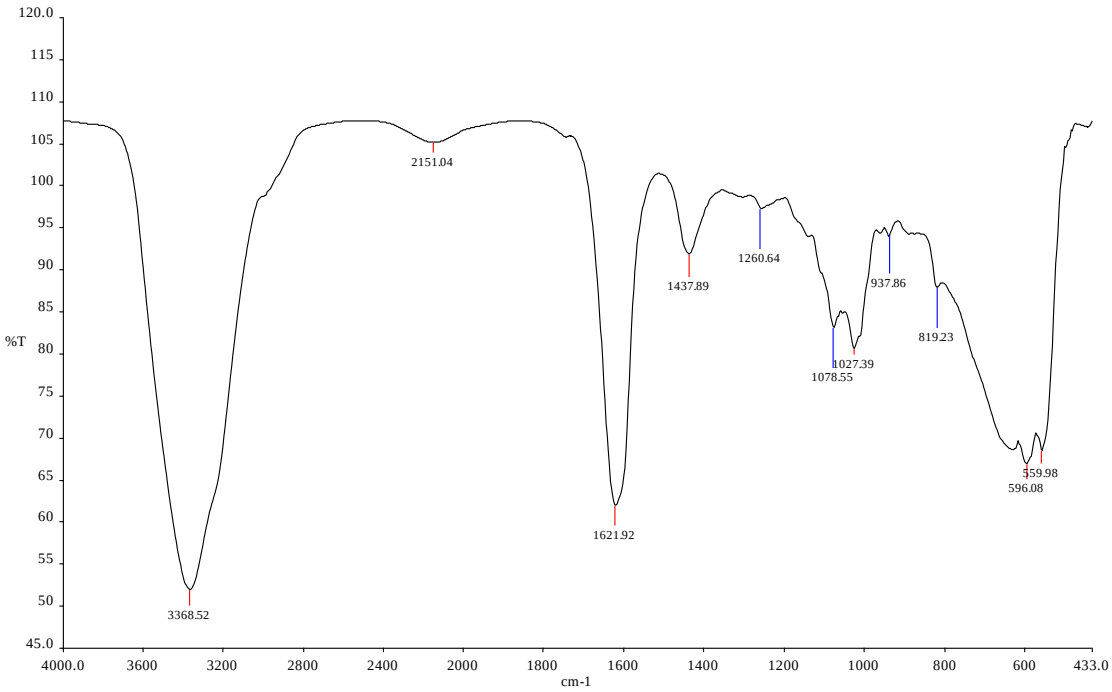

**Şekil 4.11.** CS FT-IR spektrumu



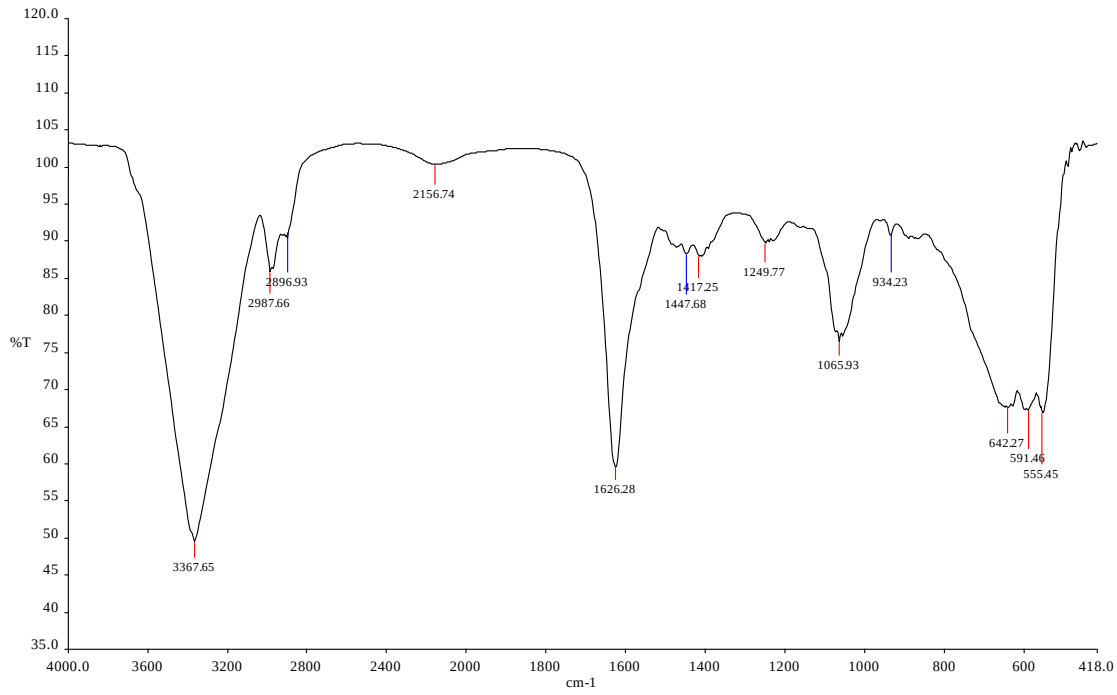

**Şekil 4.12.** AL FT-IR spektrumu



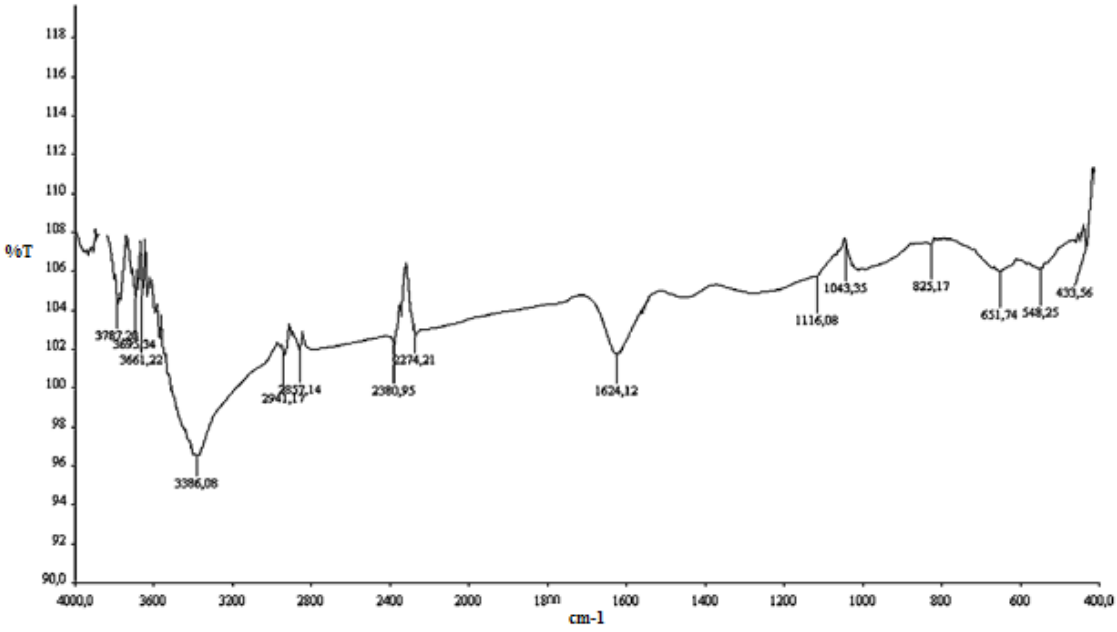

**Şekil 4.13.** Metformin HCl FT-IR spektrumu



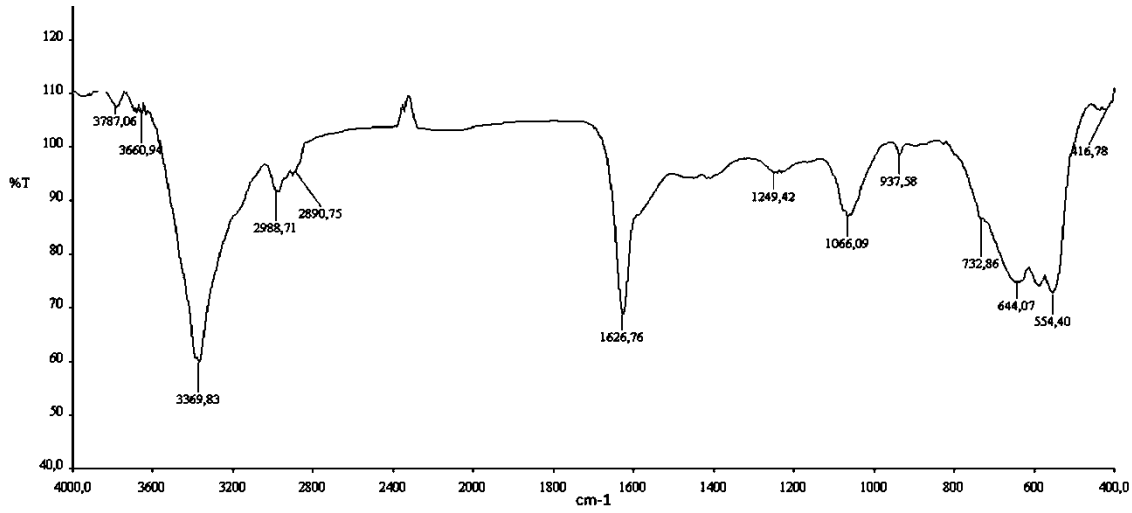

**Şekil 4.14.** AL boncuk FT-IR spektrumu



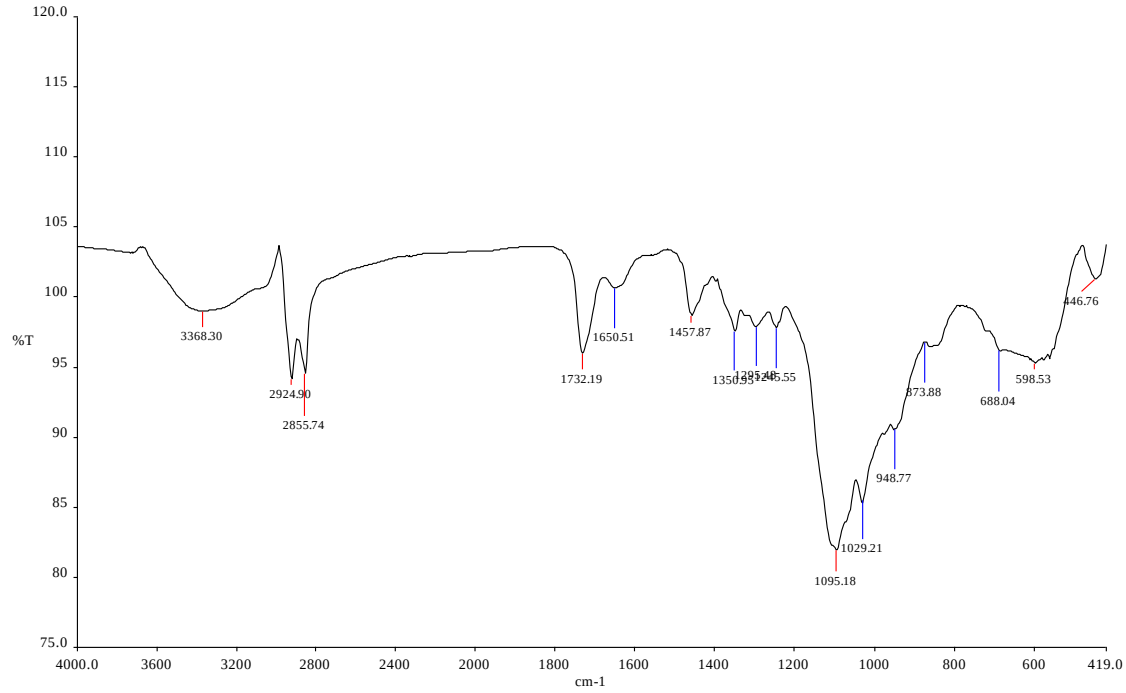

**Şekil 4.15.** AL-Met HCl boncuk FT-IR spektrumu



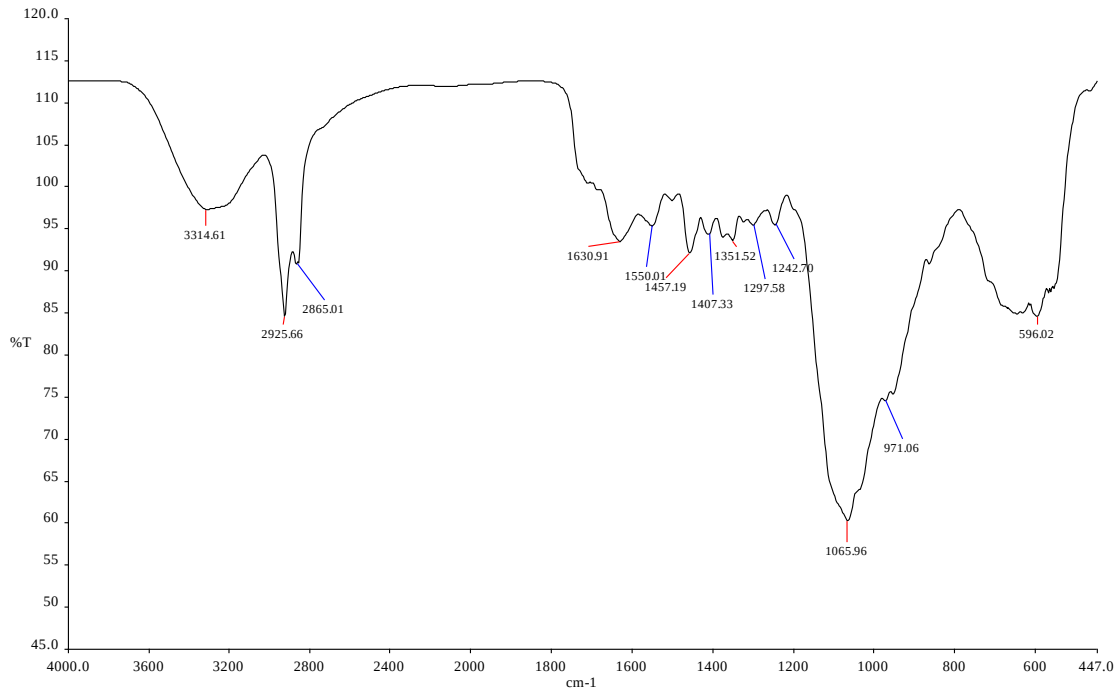

**Şekil 4.16.** AL-CS boncuk FT-IR spektrumu




**Şekil 4.17.** AL-CS-Met HCl boncuk-FT-IR spektrumu




**Şekil 4.18.** CS mikroküre FT-IR spektrumu




**Şekil 4.19.** CS-Met HCl mikroküre FT-IR spektrumu

CS'ye ait FT-IR spektrumu incelendiğinde, 3232,49 $cm^{-1}$'deki pikin $NH_2$, O-H gerilimi ve hidrojen bağlarından kaynaklandığı söylenebilir (3200-3550 $cm^{-1}$'de hidroksil ve molekül içi hidrojen bağları ve 3300-3500 $cm^{-1}$'de ise primer aminler pik vermektedir). 2879,55 $cm^{-1}$'de $–CH_2$, 1616,78 $cm^{-1}$'de CO, 1146,85 $cm^{-1}$'de O-köprüsü, 1032,16 $cm^{-1}$ ve 1060,13 $cm^{-1}$ civarında ise C-O gerilimlerine ait pikler ve sekonder amidler için karakteristik frekanslarda NHCO'nun kompleks titreşimlerinden dolayı 1373,42 $cm^{-1}$'de pik gözlenmiştir (Şekil 4.11) (Mouryaa *et al*. 2010; Gonil *et al*. 2011; Salehizadeh *et al*. 2012). Metformin HCl'nin FT-IR spektrumu, 3367,79 $cm^{-1}$'de N-H asimetrik gerilme, 3293,10 $cm^{-1}$ ve 3149,27 $cm^{-1}$'de N-H simetrik gerilme, 1621,90 $cm^{-1}$'de C=N gerilme, ve 1557,70 $cm^{-1}$'de -N-H eğilme (düzlem içi), 1472,57 $cm^{-1}$, 1447,01 $cm^{-1}$, 1417,93 $cm^{-1}$'de C-H asimetrik eğilme ($-CH_3$), 1166,68 $cm^{-1}$, 1061,30 $cm^{-1}$'de, C-N gerilme (alkil), 936,41 $cm^{-1}$, 735,82 $cm^{-1}$ N-H sallanma, 550,02, 530,34 $cm^{-1}$'de C-N-C eğilme ve 632,29 $cm^{-1}$'de $NH_2$ bükülmelerinden ileri gelen pikler görülmektedir (Şekil 4.13) (Gunasekaran *et al*. 2006; Banerjee *et al*. 2012). AL spektrumunda ise O-H bağları ile ilgili olan gerilme titreşim piki 3662,30 $cm^{-1}$'de elde edilmiş, 2971,71 $cm^{-1}$'de alifatik C-H gerilme titreşimlerinden, 1406,38 $cm^{-1}$'de karboksilat esnemesinden, 1066,01 $cm^{-1}$

C-O gerilme titreşimlerinden kaynaklanan pikler, 889,51 $cm^{-1}$'de C-C gerilme, C-C-H gerilme ve C-O eğilme titreşimlerinden kaynaklanan pik elde edilmiştir (Şekil 4.12) (Daemi and Barikani 2012). AL-boncuk formülasyonuna ait FT-IR spektrumu (Şekil 4.14) ile AL-Met HCl formülasyonuna ait FT-IR spektrumu (Şekil 4.15) karşılaştırıldığında AL-Met HCl formülasyonuna ait FT-IR spektrumunda, Metformin HCl'ye ait piklere benzer şekilde 2987,66 $cm^{-1}$, 2896,93 $cm^{-1}$, 1417,25 $cm^{-1}$, 642,27 $cm^{-1}$'de pikler elde edilmiştir. AL-CS boncuk formülasyonuna ait FT-IR spektrumu (Şekil 4.16) ile AL-CS-Met HCl formülasyonuna ait FT-IR spektrumu (Şekil 4.17) karşılaştırıldığında AL-CS-Met HCl formülasyonuna ait FT-IR spektrumunda Metformin HCl'ye ait piklere benzer 3369,83 $cm^{-1}$, 2988,71 $cm^{-1}$, 1626,76 $cm^{-1}$, 1066,09 $cm^{-1}$'de ki piklerin şiddeti artmış ve 937,58 $cm^{-1}$ ve 732,86 $cm^{-1}$'de pikler saptanmıştır. CS mikroküre spektrumuna göre CS-Met HCl mikroküre spektrumunda 2925,66 $cm^{-1}$, 1407,33 $cm^{-1}$ ve 1065,96 $cm^{-1}$'de ki piklerin şiddeti Metformin HCl varlığıyla artmıştır (Şekil 4.18; Şekil 4.19). DSC ve FT-IR analizlerinin sonucu olarak, metformin HCl'nin gerek boncuk gerekse mikroküre formülasyonlarına yüklendiği sonucuna varılmıştır.

### 4.3. *İn Vivo* çalışma bulguları

Açlık serum insülin seviyesinin tayini kısmında (Bölüm 3.2.4) açıklandığı şekilde diyabetik (STZ ve NA kullanılarak sıçanlarda diyabet oluşturulmuştur) ve sağlıklı sıçanlardan elde edilen serum örneklerinde insülin EIA test kiti kullanılarak insülin tayini gerçekleştirilmiştir. Sağlıklı sıçanlar için ortalama açlık serum insülin seviyesi 0,66±0,09 ng/mL, diyabetik sıçanlar (açlık kan glikoz seviyeleri >126 mg/dL olan) için ise 0,51±0,15 ng/mL olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, Tip 2 diyabet modeli geliştirildiğine karar verilmiştir. Tahara *et al*. (2008) Sprague Dawley cinsi sıçanlarda STZ (50 mg/kg) ve NA (0, 50, 100, 150 ve 200 mg/kg) kullanarak diyabet oluşturmuşlardır. Daha sonra bu sıçanların ve sağlıklı sıçanların plazmalarını toplayarak bunların açlık insülin seviyelerini insülin EIA test kiti kullanarak saptamışlardır. Sadece STZ kullanılarak diyabet oluşturulan sıçanların açlık plazma insülin seviyesinin (0,27 ng/mL) sağlıklı sıçanların açlık plazma insülin seviyesi (0,55 ng/mL) ile

karşılaştırıldığında oldukça düştüğü ve diyabetik sıçanların önemli bir kilo kaybına uğradığı saptanmıştır. Ancak, NA kullanılmasıyla ve dozunun artırılmasıyla birlikte STZ tarafından oluşturulan hiperglisemi, pankreas üzerindeki olumsuz etkiler ve vücut ağırlık kaybı azaltılmış ve 200 mg/kg kullanıldığında ise STZ'nin bu etkilerinin tamamen önlendiği raporlanmıştır. STZ (50 mg/kg) ile birlikte NA, 50 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg ve 200 mg/kg kullanıldığında saptanan açlık plazma insülin seviyeleri sırasıyla 0,50; 0,52; 0,61 ve 0,70 ng/mL olarak saptanmıştır. Açlık plazma glikoz seviyeleri ise sağlıklı sıçanlar için 94,6±5,3 mg/dL, STZ kullanıldığında 249±17 mg/dL, STZ-NA (50 mg/kg) kullanıldığında 179±15 mg/dL, STZ-NA (100 mg/kg) kullanıldığında 125±8 mg/dL ve diğer iki NA (150 ve 200 mg/dL) dozu içinse sırasıyla 117±5 mg/dL ve102±8 mg/dL olarak saptanmıştır. Sağlıklı, STZ uygulanan ve STZ-NA (50, 100, 150, 200 mg/kg) uygulanan sıçanların ağırlıkları (uygulamadan 1 hafta sonra) ise sırasıyla 308±8 g, 243±4 g, 264±13 g, 295±6 g, 302±10 g ve 313±4 g olarak bulunmuştur. Sağlıklı sıçanların ortalama ağırlığı ile karşılaştırıldığında STZ ve STZ-NA 50 mg/kg doz uygulanan sıçanların ortalama ağırlıkları istatistiksel olarak farklı iken STZ-NA (100, 150 ve 200 mg/kg dozları) uygulanan sıçanların ortalama ağırlıkları ise anlamlı bir fark göstermemiştir. Bu nedenle, araştırmacılar tarafından ciddi diyabet modeli oluşturmak için sadece STZ (50 mg/kg) kullanılırken ılımlı diyabet modeli oluşturmak içinse STZ (50 mg/kg)-NA (100 mg/kg) kullanılmıştır.

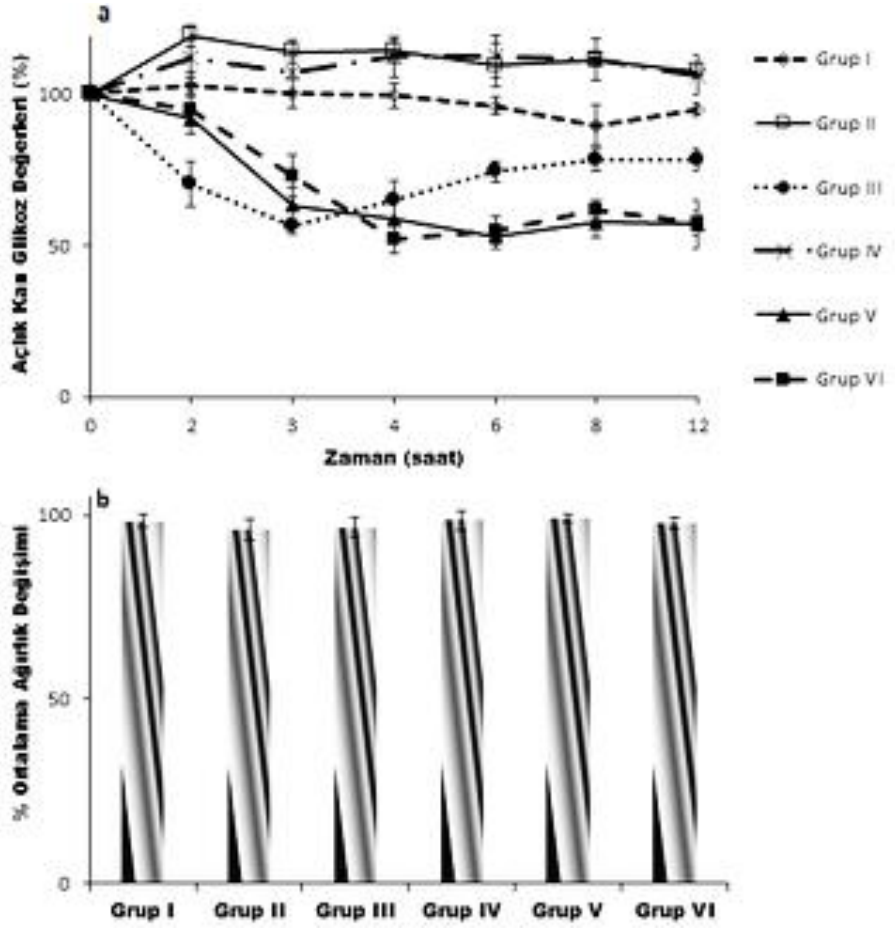
Hipoglisemik etkinin saptanması kısmında (Bölüm 3.2.4) açıklandığı şekilde STZ-NA kullanılarak diyabet oluşturulan ve bir gece öncesinden aç bırakılan sıçanlara saf Met HCl, boş boncuk, AL-Met HCl boncuk ve AL-CS-Met HCl boncuk uygulanmış ve uygulamanın 12. saatine kadar farklı zaman aralıklarında kuyruk venlerinden alınan kan örneklerinde açlık kan glikoz düzeyleri ölçülmüştür (Şekil 4.20). Aynı işlemler, saf etkin madde çözeltisi ve formülasyon uygulanması dışında sağlıklı ve diyabetik sıçanlar için de gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın 12. saatinde tespit edilen ortalama % sıçan ağırlık değişimleri Şekil 4.20'de verilmiştir. Buna göre, Grup I (kontrol, sağlıklı) açlık kan glikoz düzeyleri ile karşılaştırıldığında Grup II (diyabetik)'nin açlık kan glikoz düzeyleri anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$ tüm noktalar için). Grup II ve Grup IV (boş boncuk) açlık kan glikoz değerleri arasında anlamlı bir fark

saptanmamıştır ($p>0.05$). Grup III (saf Met HCl) açlık kan glikoz değerleri Grup V (AL-CS-Met HCl) ve Grup VI (AL-Met HCl) açlık kan glikoz değerleri ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (Grup V için 3. ve 4. saat; Grup VI için 4. saat açlık kan glikoz değerleri hariç diğer tüm noktalar için $p<0.05$'dir). Grup V ve Grup VI açlık kan glikoz değerleri ise istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($p>0.05$; tüm noktalar için). Sonuç olarak, saf metformin HCl'ye göre metformin HCl içeren boncuk formülasyonları için kan glikoz seviyesinde daha yavaş bir düşüş gözlenmiştir. Met HCl-AL boncukları uygulamanın 3. saatinden itibaren etkin bir şekilde kan glikoz seviyesinde düşüşe neden olurken maksimum düşüş 4. saatte saptanmıştır. Met HCl AL-CS boncukları için ise kan glikoz seviyesinde uygulamanın 3.-6. saatleri arasında düşüş gözlenmiştir. Her iki formülasyon içinde saf met HCl'ye göre daha uzun süreli hipoglisemik etki elde edilmiştir (Şekil 4.20). Çalışmanın 12. saatinde tespit edilen ortalama sıçan ağırlıkları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.20; $p>0.05$).

Nayak *et al*. (2011) tarafından STZ kullanılarak Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlarda diyabet oluşturulmuş ve midede yüzen/yüzmeyen boncukların (400 mg/kg metformin HCl'ye eşdeğer) *in vivo* etkinliği incelenmiştir. Yüzmeyen boncuk formülasyonu diyabetik sıçanlarda uygulama sonrası 1 saat içinde plazma glikoz seviyesini kademeli olarak azaltmış ve 4. saatten sonra ise kademeli olarak yükselerek eski seviyesine dönmüştür. Yüzen boncuklarda ise 5. saatten sonra plazma glikoz seviyesi daha yavaş bir şekilde kademeli olarak yükselmiştir. Dolayısıyla, yüzen boncuklar açısından 9. saate kadar, yüzmeyen boncuklar içinse 5. saate kadar devam ettirilen hipoglisemik etki elde edilmiştir.

Nayak *et al*. (2013) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise çemen tohomu müsilajı ve aljinat kullanılarak mukoadezif boncukların in vivo etkinliği, alloksan kullanılarak diyabet oluşturulmuş Albino erkek sıçanlarda değerlendirilmiştir. Saf metformin HCl'nin (100mg/kg) uygulandığı diyabetik sıçanlarda uygulamanın 3. saatine kadar kan glikoz değerinde hızlı bir düşüş sağlanmış ve daha sonrasında ise kan glikoz seviyesi eski seviyesine dönmüştür. Metformin HCl içeren boncuk formülasyonunun (100 mg/kg

metformin HCl'ye eşdeğer) uygulandığı diyabetik sıçanlarda kan glikoz değerinde 2. saate kadar % 25 ve 10. saate kadar ise %30'dan daha fazla bir azalma sağlanmıştır. Glikoz seviyesinde %25'lik bir azalma önemli bir hipoglisemik etki olarak kabul edilmektedir (Pal and Nayak 2011; Pal and Nayak 2012; Nayak *et al*. 2013).




**Şekil 4.20.** a. Diyabetik sıçanlarda boncuk formülasyonlarının hipoglisemik etkisi. b. Sıçanlarda 12 saatlik deney sonucunda meydana gelen % ortalama ağırlık değişimi
Grup I: sağlıklı sıçan grubu; Grup II: diyabetik şıçan grubu; Grup III: saf Met HCl çözeltisi (100 mg/kg) verilen diyabetik sıçan grubu; Grup IV: boş boncuk formülasyonu verilen diyabetik sıçan grubu; Grup V: Met HCl-AL-CS boncuk formülasyonu (100 mg/kg metformin HCl'ye eşdeğer) diyabetik sıçan grubu; Grup VI: Met HCl-AL boncuk formülasyonu (100 mg/kg metformin HCl'ye eşdeğer) verilen diyabetik sıçan grubu.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

✓ Söz konusu çalışmada; metformin HCl-yüklü polimerik taşıyıcı sistemler başarıyla hazırlanmış, *in vitro* ve *in vivo* olarak karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

✓ Metformin HCl için miktar tayini yöntemi geliştirilmiş (UV-spektrofotometre kullanlarak) ve analitik yöntem validasyonu gerçekleştirilmiştir.

✓ Hazırlanan taşıyıcı sistemlerin yaklaşık küresel şekilli ve uygun salım özelliklerine sahip sistemler oldukları tespit edilmiştir.

✓ Önformülasyon çalışmaları sırasında metformin HCl-yüklü PLGA nanopartikülleri de hazırlanmıştır. Ancak, bu sistemler için enkapsülasyon etkinliği değeri artırılamamıştır. Dolayısıyla, boncuk (~%24-34) ve mikroküre (~%20) formülasyonları hazırlanmış ve etkin madde yükleme etkinliği değeri AL/CS polimerleri kullanılarak artırılabilmiştir.

✓ Polimerik taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonu için FT-IR, DSC analizleride gerçekleştirilmiştir.

✓ Hazırlanan boncuk formülasyonlarının in vivo etkinliği de incelenmiş ve saf metformin HCl'ye göre daha uzun süreli hipoglisemik etki gösterdikleri belirlenmiştir.

✓ Farklı polimerler (hidrofobik, hidrofilik) kullanılarak hazırlanmış, yüksek yükleme etkinliğine sahip nano/mikro-boyutlu taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve *in vivo* etkinliklerinin incelenmesi devam çalışması olarak planlanabilir.

## KAYNAKLAR


Aboonabi, A., Rahmat, A., Othman, F., 2014. Antioxidant effect of pomegranate against streptozotocin-nicotinamide generated oxidative stress induced diabetic rats. Toxicology Reports, 1, 915–922.

Ahmann, A.J. and Riddle, M.C., 2002. Current oral agents for type 2 diabetes: Many options, but which to choose when? Postgraduate Medicine, 111 (5), 32-46.

Amin, M. and Suksomboon, N., 2014. Pharmacotherapy of type 2 diabetes mellitus: an update on drug-drug interactions. Drug Safety, 37 (11), 903-919.

Ananda, P.K., Kumarappan, C.T., Sunil, C., Kalaichelvan, V.K., 2012. Effect of Biophytum sensitivum on streptozotocin and nicotinamide-induced diabetic rats. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2 (1), 31-35.

Anonymous, 2004. Screening for type 2 diabetes. American Diabetes Association, Diabetes Care, 27, 11-14.

Anonymous, 2007. Standards of medical care in diabetes. American Diabetes Association, Diabetes Care, 30, 4-41.

Anonymous, 2009. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. American Diabetes Association, Diabetes Care, 32 (Suppl 1), 62-67.

Anonim, 2011. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye diyabet önleme ve kontrol programı, eylem planı (2011-2014). Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, http://www.saglik.gov.tr/tr/dosya/1-71375/h/turkiye-diyabet-onleme-ve-kontrol-programi.pdf (22.10.2014).

Anonymous, 2012. Forxiga, EMA/CHMP/259852/2012. Committee for medicinal products for human use (CHMP), http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion_ _Initial_authorisation/human/002322/WC500125684.pdf (01.12.2014).

Anonim, 2013. Diabetes mellitus ve komplikasyonlarının tanı, tedavi ve izlem kılavuzu-2013, Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği -2013, http://www.turkendokrin.org/files/pdf/diabetes_klvz2011_web.pdf (14.12.2014).

Anonymous, 2014a. WHO, World Diabetes Day 2014, http://www.who.int/diabetes/en/ (15.12.2014)

Anonim, 2014b. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Diyabet Programı Türkiye Halk sağlığı Kurumu, http://beslenme.gov.tr/content/files/diyabet/turkiyediyabetprogrami.pdf (23.03.2015)

Anonymous, 2014c. Forxiga Approved for Type 2 Diabetes. FDA, http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm380829.htm (15.12.2014).

Anonymous, 2014d. US FDA approves once-daily XIGDUO™ XR tablets for adults with Type 2 Diabetes. http://www.astrazeneca.com/Media/Press-releases/Article/20141030-us-fda-approve-oncedaily-xigduo-xr (15.12.2014)

Anonymous, 2015. http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COfAInfo /SigmaSAPQM/SPEC/S0 /S0130/S0130-BULKSIGMA.pdf (03.04.2015).

Atmaca, M.H. ve Ecemiş, G.C., 2012. Oral antidiyabetik ajanlar. Journal of Experimental and Clinical Medicine, 29 (1), 23-29.

Ayvaz, G. ve Kan, E., 2010. Tip 2 Diabetes Mellitus Tedavisinde Oral Antidiyabetik İlaçlar Tip 2 Diabetes Mellitus Tedavisi. Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi, 23-24, 8-13.

Banerjee, P., Deb, J., Roy, A., Ghosh, A., Chakraborty, P., 2012. Fabrication and Development of Pectin Microsphere of Metformin Hydrochloride. ISRN Pharmaceutics, 230621, 1-7.

Barik, R., Jain, S., Qwatra, D., Joshi, A., Tripathi, G.S., Goyal, R., 2008. Antidiabetic activity of aqueous root extract of *Ichnocarpus frutescens* in streptozotocin-nicotinamide induced type-II diabetes in rats. Indian Journal of Pharmacology, 40 (1), 19–22.

Bastaki, S., 2005. Diabetes mellitus and its treatment. International Journal of Diabetes and Metabolism, 13, 111-134.

Berscht, P.C., Nies, B., Liebendörfer, A., Kreuter, J., 1994. Incorporation of basic fibroblast growth factor into methylpyrrolidinone chitosan fleeces and determination of the *in vitro* release characteristics. Biomaterials, 15 (8), 593-600.

Bhattarai, R.S., Dhandapani, N.V., Shrestha, A., 2011. Drug delivery using alginate and chitosan beads: An Overview. Chronicles of Young Scientists, 2 (4), 192-196.

Bisht, R. and Bhattacharya, S., 2013. Effect of various extracts of Desmodium gangeticum on Streptozotocin-nicotinamide induced type-2 diabetes. Asian Journal of Plant Science and Research, 3 (3), 28-34.

Block, L.C., Schmeling, L.O., Couto, A.G., Silva, M.A.S., Tagliari, M.P., Bresolin, T.M.B., Mourão, S.C., 2009. Effect of binders on 500 mg metformin hydrochloride tablets produced by wet granulation. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 30 (2), 145-152.

Bloomgarden, Z.T., Futterweit, W., Poretsky, L., 2001. Use of insulin-sensitizing agents in patients with polycystic ovary syndrome. Endocrine Practice, 7 (4), 279-286.

Brannon-Peppas, L. and Peppas, N., 2002. Kontrollü salım sistemlerinde kullanılan polimerler. Kontrollü salım sistemleri, Ed. A.Z. Gursoy. Kontrollü Salım Sistemleri Derneği, İstanbul, 21-40.

Calvo, P., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1996. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. Journal of Pharmaceutical Sciences, 85 (5), 530-536.

Cevher, E., Orhan, Z., Mülazimoğlu, L., Sensoy, D., Alper, M., Yildiz, A., Ozsoy, Y., 2006. Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus with prepared microspheres. International Journal of Pharmaceutics, 317 (2), 127-135.

Champion, J.A., Katare, Y.K., Mitragotri S., 2007. Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. Journal of Controlled Release, 121 (1–2), 3–9.

Chan, L., Lee, H., Heng, P., 2002. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. International Journal of Pharmaceutics, 242 (1-2), 259-262.

Chen, L., Magliano, D.J., Zimmet, P.Z., 2011. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives. Nature Reviews Endocrinology, 8 (4), 228-236.

Choudhury, P.K. and Kar, M., 2005. Preparation of Alginate Gel Beads Containing Metformin Hydrochloride Using Emulsion-Gelation Method. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 4 (2), 489-493.

Corti, G., Cirri, M., Maestrelli, F., Mennini, N., Mura, P., 2008. Sustained-release matrix tablets of metformin hydrochloride in combination with triacetyl-β-cyclodextrin. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 68 (2), 303-309.

Daemi, H., and Barikani, M., 2012. Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. Scientia Iranica, 19 (6), 2023–2028.

Damodar, R. and Movva, B., 2014. Preparation and In-vitro Evaluation of Metformin HCl Tablets Containing Sustained Release Beads for Increasing Therapeutic Window. Journal of Bioequivalence &Bioavailability, 6 (3), 91-95.

Demir, A. ve Seventekin, N., 2009. Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları. Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi, 3 (2), 92-103.

Donati, I., Feresini, M., Travan, A., Marsich, E., Lapasin, R., Paoletti, S., 2011. Polysaccharide-basedpolyanion--polycation--polyanionternarysystems. A preliminaryanalysis of interpolyelectrolyteinteractions in dilutesolutions. Biomacromolecules, 12 (11), 4044-4056.

Duman, S. ve Şenel, S., 2004. Kitosan ve veteriner alandaki uygulamaları. Veteriner Cerrahi Dergisi,10 (3-4), 62-72.

El-Aassar, M.R., Hafez, E.E., El-Deeb, N.M., Fouda, M.M., 2014. Microencapsulation of lectin anti-cancer agent and controlled release by alginate beads, biosafety approach. International Journal of Biological Macromolecules, 69, 88–94.

EMEA, 2007. Scientific Discussion. EMA, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000807/WC500030597.pdf. (04.04.2015).

Fathy, M., Safwat, S.M., el-Shanawany, S.M., Shawky Tous, S., Otagiri, M., 1998. Preparation and evaluation of beads made of different calcium alginate compositions for oral sustained release of tiaramide. Pharmaceutical Development and Technology, 3 (3), 355-364.

Gamisans, F., Lacoulonche, F., Chauvet, A., Espina, M., García, M.L., Egea, M.A., 1999. Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods. International Journal of Pharmaceutics, 179 (1), 37-48.

Gandhi, K.J., Deshmane, S.V., Biyani, K.R., 2012. Polymers in Pharmaceutical Drug Delivery System: A Review. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 14 (2), 57-66.

Garcia-Fuentes, M., Prego, C., Torres, D., Alonso, M.J., 2005. A comparative study of the potential of solid triglyceride nanostructures coated with chitosan or poly (ethylene glycol) as carriers for oral calcitonin delivery. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 25 (1), 133-143.

Gazori, T., Khoshayand, M.R., Azizi, E., Yazdizade, P., Nomani, A., Haririan, I., 2009. Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization. Carbohydrate Polymers, 77 (3), 599-606.

Gedik, O., 2004. Tip 2 ve Tip 1 Diyabet Gelişmesinin Önlenmesi. Türkiye Tıp Dergisi, 11 (1), 10-17.

Gonçalves, V.L., Laranjeira M.C.M., Fávere V.T., 2005. Effect of Crosslinking Agents on Chitosan Microspheres in Controlled Release of Diclofenac Sodium. Polímeros, 15 (1), 6-12.

Gonil, P., Sajomsang, W., Ruktanonchai, U.R., Pimpha, N., Sramala, I., Nuchuchua, O., Saesoo, S., Chaleawlert-umpon, S., Puttipipatkhachorn, S., 2011. Novel quaternized chitosan containing β-cyclodextrin moiety: Synthesis, characterization and antimicrobial activity. Carbohydrate Polymers, 83 (2), 905-913.

Gunasekaran, S., Natarajan, R.K., Renganayaki, V., Natarajan, S., 2006. Vibrational spectra and thermodynamic analysis of metformin. Indian Journal of Pure and Applied Physics, 44 (7), 495-500.

Gündoğdu, N., 2012. Polimerik taşıyıcı sistem geliştirilmesi ve *in vitro* karakterizasyonu. Y.Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Gür, S., 2010. Antidiyabetik Aktivite Araştırma Yöntemleri. Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi, 23–24, 49-52.

İskenderoğlu, C., 2007. Düşük molekül ağırlıklı heparinin oral ilaç şekli üzerine çalışmalar. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Jao, W.C., Ho, L.J., Chen Z.W., 2010. Evaluation of the Drug Release Mechanism of pH-Sensitive Calcium Alginate Hydrogels in Simulated Physiological Fluids. Journal of China University of Science and Technology, 42, 37-61.

Kakadiya, J., Shah, M., Shah N.J., 2010. Effect of nobivolol on serum diabetic marker and lipid profile in normal and streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 1 (2), 329-334.

Kesavan, K., 2010. Sodium Alginate Based Mucoadhesive System for Gatifloxacin and Its In Vitro Antibacterial Activity. Scientia Pharmaceutica, 78 (4), 941-957.

Kumar, A., 2011. Formulation and evaluation of mucoadhesive microcapsules of metformin HCl with gum karaya. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 3 (S3), 150-155.

Kurçer, Z. ve Karaoğlu, D., 2012. Deneysel Diyabet Modellerinde Alloksan ve Streptozotosin Kullanımı. Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism, 16, 34-40.

Lee, K. Y. and Mooney, D.J., 2012. Alginate: properties and biomedical applications. Progress in Polymer Science, 37 (1), 106–126.

Lohithasu, D., Ramana, J.V., Kumar, V.A., Anand, N.P., Praveen, G., 2013. Formulation and evaluation of metformin hydrochloride beads by using various polymers with sodium alginate. Der Pharmacia Lettre, 5 (4), 56-61.

Ma, Z. and Lim, L.Y., 2003. Uptake of chitosan and associated insulin in Caco-2 cell monolayers: a comparison between chitosan molecules and chitosan nanoparticles. Pharmaceutical Research, 20 (11), 1812-1819.

Mainardes, R.M., Gremião M.P.D., Evangelista R.C., 2006. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 42 (4), 523-530.

Mao, S., Germershaus, O., Fischer, D., Linn, T., Schnepf, R., Kissel, T., 2005. Uptake and transport of PEG-graft-trimethyl-chitosan copolymer–insulin nanocomplexes by epithelial cells. Pharmaceutical Research, 22 (12), 2058-2068.

Marathe, P.H., Wen, Y., Norton J., Greene, D.S., Barbhaiya, R.H., Wilding, I.R., 2000. Effect of altered gastric emptying and gastrointestinal motility on metformin absorption. British Journal of Clinical Pharmacology, 50 (4), 325-332.

Martinho, N., Damgé, C., Reis, C., 2011. Recent Advances in Drug Delivery Systems. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2 (5A), 510-526.

Mi, F.L., Sung, H.W., Shyu, S.S., 2002. Drug release from chitosan–alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. Carbohydrate Polymers, 48 (1), 61–72.

Mofidi, N., Aghai- Moghadam, M., Sarbolouki, M.N., 2000. Mass preparation and characterization of alginate microspheres. Process Biochemistry, 35 (9), 885-888.

Motyl, K. and McCabe, L.R., 2009. Streptozotocin, Type I Diabetes Severity and Bone. Biological Procedures Online, 11, 296–315.

Mourya, V.K., Inamdar, N.N., Tiwari, A., 2010. Carboxymethyl chitosan and its applications. Advance Matterial Letters, 1 (1), 11-33.

Mujtaba, A., Ali, M., Kohli, K., 2014. Formulation of extended release cefpodoxime proxetil chitosan-alginate beads using quality by design approach. International Journal of Biological Macromolecules, 69, 420–429.

Murakami, H., Yasui, H., Yoshikawa, Y., 2012. Pharmacological and Pharmacokinetic Studies of Anti-diabetic Tropolonato-Zn (II) Complexes with Zn (S(2)O(2)) Coordination Mode. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 60 (9), 1096-1104.

Nathan, D.M., Buse, J.B., Davidson, M.B., Heine, R.J., Holman, R.R., Sherwin, R., Zinman, B., 2006. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. Diabetes Care, 29 (8), 1963-1972.

Nayak, A., Jain, S.K., Pandey, R.S., 2011. Controlling release of metformin HCl through incorporation into stomach specific floating alginate beads. Molecular pharmaceutics, 8 (6), 2273-2281.

Nayak, U.Y., Gopal, S., Mutalik, S., Ranjith, A.K., Reddy, M.S., Gupta, P., Udupa, N., 2009. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of Zidovudine. Journal of Microencapsulation, 26 (3), 214–222.

Nayak, A.K., Pal, D., Pradhan, J., Hasnain, M.S., 2013. Fenugreek seed mucilage-alginate mucoadhesive beads of metformin HCl: Design, optimization and evaluation. International Journal of Biological Macromolecules, 54, 144– 154.

Pal, D. and Nayak, A.K., 2011. Development, optimization, and anti-diabeticactivity of gliclazide-loadedalginate-methylcellulose mucoadhesive microcapsules. AAPS PharmSciTech, 12 (4), 1431-1441.

Pal, D. and Nayak, A.K., 2012. Novel tamarind seed polysaccharide-alginate mucoadhesive microspheres for oralgliclazide delivery: in vitro-in vivo evaluation. Drug Delivery, 19 (3), 123-131.

Pandit, V., Pai, R.S., Yadav, V., Devi, K., Surekha, B.B., Inamdar, M.N., Suresh S., 2013. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of floating microspheres of metformin hydrochloride. Drug Development and Industrial Pharmacy, 39 (1), 117-127.

Pawar, S.N. and Edgar, K.J., 2012. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. Biomaterials, 33 (11), 3279-3305.

Pillai, O. and Panchagnula, R., 2001. Polymers in drug delivery. Current Opinion in Chemical Biology, 5 (4), 447-451.

Rajalakshmi, G., Dhulipati, R., Damodharan, N., 2013. Design and characterization of ambroxol hydrochloride sustained release microbeads. International Journal of Biological & Pharmaceutical Research, 4 (9), 655-662.

Rajendran, A. and Basu, S.K., 2009. Alginate-Chitosan Particulate System for Sustained Release of Nimodipine. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 8 (5), 433-440.

Ramteke, K.H., Vansola, J.B., Tailor, D.J., Parmar, J.R., 2012. Formulation and evaluation of metformin hydrochloride beads by ionotropic gelation technique. Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation, 1 (1), 75-78.

Rasool, B.K. and Fahmy, S.A., 2013. Development of coated beads for oral controlled delivery of cefaclor: In vitro evaluation. Acta pharmaceutica, 63 (1), 31-44.

Ravi Kumar, M.N.V., 2000. A review of chitin and chitosan applications. Reactive and Functional Polymers, 46 (1), 1-27.

Rizza, R.A., 2010. Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy. Diabetes, 59 (11), 2697-2707.

Salehizadeh, H., Hekmatian, E., Sadeghi, M., Kennedy, K., 2012. Synthesis and characterization of core-shell Fe3O4-gold-chitosan nanostructure. Journal of Nanobiotechnology, 10, 3.

Salman S., Salman, F., Gedik, S., Baştar, İ., Yılmaz, Y., Çiftci, S.Ö., Karşıdağ, K., Dinççağ, N., Satman, İ., Yılmaz, M.T., 2001. Diyabet ve bozulmuş glukoz metabolizması tanısında Dünya Sağlık Örgütü ve Amerikan Diyabet Birliği tanı kriterlerinin karşılaştırılması. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri, 21 (1), 63-68.

Samyuktha Rani, B., 2012. Mucoadhesive microbeads of metformin HCl: a promising sustained drug delivery system. International Research Journal of Pharmacy, 3 (5), 263-274.

Shabir, G.A., 2003. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. Journal of Chromatography A, 987 (1-2), 57-66.

Sharma, M., Siddique, M.W., Shamim, A.M., Gyanesh, S., Pillai, K.K., 2011. Evaluation of Antidiabetic and Antioxidant Effects of Seabuckthorn (Hippophae rhamnoides L.) in Streptozotocin-Nicotinamide Induced Diabetic Rats. The Open Conference Proceedings Journal, 211 (53), 53-58.

Skovsø, S., 2014. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin, Journal of Diabetes Investigation, 5 (4), 349–358.

Soares, J.P., Santos, J. E., Chierice, G. O., Cavalheiro, E. T. G., 2004. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. Eclética Química, 29 (2), 57-63.

Strosberg, J., 2013. Advances in the Treatment of Pancreatic Neuroendocrine Tumors (pNETs). Gastrointestinal Cancer Research : GCR, 6 (4-S1), S10–S12.

Stumvoll, M., Nurjahan, N., Perriello, G., Dailey, G., Gerich J.E., 1995. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. New England Journal of Medicine, 333 (9), 550-554.

Sun, J. and Tan, H., 2013. Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. Materials, 6 (4), 1285-1309.

Sweetman, S., 2007. Martindale: The complete drug reference, Electronic version. London, Pharmaceutical Press.

Szkudelski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiological Research, 50 (6), 537-546.

Tahara, A., Matsuyama-Yokono, A., Nakano, R., Someya, Y., Shibasaki, M., 2008. Hypoglycaemic effects of antidiabetic drugs in streptozotocin-nicotinamide-induced mildly diabetic and streptozotocin-induced severely diabetic rats. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 103 (6), 560-568.

Tavakol, M., Vasheghani-Farahani, E., Hashemi-Najafabadi, S., 2013. The effect of polymer and CaCl2 concentrations on the sulfasalazine release from alginate-N,Ocarboxymethyl chitosan beads. Progress in Biomaterials, 2, 10.

Thulé, P.M., 2012. Mechanisms of current therapies for diabetes mellitus type 2. Adv Physiol Educ, 36 (4), 275-283.

Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., Bannerjee, S.K., 2012. Drug delivery systems: An updatedreview. International Journal of Pharmaceutical Investigation, 2 (1), 2-11.

Tous, S., Fathy, M., Fetih, G., Gad, S.F., 2014. Preparation and Evaluation of Ketoprofen-loaded Calcium Alginate Beads. International Journal of PharmTech Research, 6 (3), 1100-1112.

Tripathi, S., Mehrotra, G.K., Dutta, P.K., 2009. Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan–PVA film for food packaging applications. International Journal of Biological Macromolecules, 45 (4), 372-376.

Tsang, M.W., 2012. The Management of Type 2 Diabetic Patients with Hypoglycemic Agents. ISRN Endocrinology, 2012, 478120.

Tunçay, M. ve Çalış, S., 1999. İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan biyoparçalanabilir sentetik ve doğal polimerler. FABAD Journal Pharmaceutical Sciences, 24 (2), 109-123.

USP30/NF25 (U. S. Pharmacopeia, The standart of Quality), 2007.

Van der Merwe, S.M., Verhoef, J.C., Kotzé, A.F., Junginger, H.E., 2004. N-Trimethyl chitosan chloride as absorption enhancer in oral peptide drug delivery. Development and characterization of mini tablet and granule formulations. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 57 (1), 85-91.

Van Zoonen, P., 1999. Some practical examples of method validation in the analytical laboratory. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 18 (9-10), 584-593.

Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., Andreelli, F., 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. Clinical Science (London), 122 (6), 253-270.

Yang, J.M. and Chiu, H.C., 2012. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol/chitosan blended membrane for alkaline direct methanol fuel cells. Journal of Membrane Science, 419-420, 65-71.

Zhang, X., Sun, M., Zheng, A., Cao, D., Bi, Y., Sun, J., 2012. Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 45 (5), 632-638.

Zimmet, P., 2000. Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the Doomsday scenario be averted? Journal of Internal Medicine, 247 (3), 301- 310.

Zohar-Perez, C., Chet, I., Nussinovitch, A., 2004. Irregular textural features of dried alginate-filler beads. Food Hydrocolloids, 18 (2), 249-258.

# ÖZGEÇMİŞ

Behzad MOKHTARE, 1985 yılında İran'ın Tebriz kentinde doğdu. 2005 yılında Shebister Üniversitesi Laboratuvar Bilgileri Bölümünde eğitime başladı, 2009 yılında bu programdan mezun oldu. Askerliğini yaptıktan sonra, 2013 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı, Nanotıp Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen öğrenimine devam etmektedir.