

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
2013-YL-013**

**ALJİNAT-KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİN KOLŞİSİN
SALIMINDA KULLANILMASININ ARAŞTIRILMASI**

Mehlika GÜN

**Tez Danışmanı:
Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER**

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE
AYDIN

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Mehlika GÜN tarafından hazırlanan “Aljinat/Kitosan Nanopartiküllerin Kolşisin Salımında Kullanılmasının Araştırılması” başlıklı tez 18.01.2013 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Mustafa BİRİNCİOĞLU	ADÜ
Üye : Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER	ADÜ
Üye : Doç. Dr. Deniz Aktaş UYGUN	ADÜ

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN
Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

18/01/2013

Mehlika GÜN

ÖZET

ALJİNAT-KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİN KOLŞİSİN SALIMINDA KULLANILMASININ ARAŞTIRILMASI

Mehlika GÜN

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER
2012, 67 sayfa

Bu çalışmada glutaraldehit ile çapraz bağlanmış aljinat/kitosan nanopartiküllere bir antienflamatuvar ilaç olan kolşisinin bağlanması ve kontrollü salımı için uygun üretim ve kullanım koşulları araştırılmıştır. Bu çalışma kontrollü ilaç salımını sağlayan materyal geliştirmeye dönük bir çalışmadır. Kolşisinin bu çalışma için seçilmiş olması onun gut, ailesel Akdeniz Ateşi ve Behçet hastalığı gibi tedavisi zor olan hastalıklarda yerine başka preparatlar ikame edilemeyen bir ilaç olmasıdır. İlaç taşıyıcı nanopartiküller, aljinat ve kitosan polimerleri ile glutaraldehit çapraz bağlayıcısı kullanılarak oluşturulmuştur. Çalışmada kolşisin tutuklanma kapasitesi incelenmiş ve sıcaklıkla ilaç tutulma kapasitesinin arttığı görülmüştür. Son olarak ilacın nanopartiküllerden salım çalışmaları farklı yapay vücut sıvılarında gerçekleştirilmiştir. Kolşisinin *in vitro* mide ortamında çözünmemiş ve salım gerçekleşmemiştir. Kolşisinin *in vitro* ince bağırsak ortamında salımı ilk üç saat içinde maksimuma erişmiş ve daha sonra bir platoya ermiştir. Kolşisin gut, FMF, Behçet hastalığı tedavisinde çok kullanılmasına rağmen polimer sistemlerde tutuklanması ve salımıyla ilgili literatürde fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma sonuçlarının kolşisin salımı yapabilecek toksik olmayan doğal polimerlerden oluşmuş sistemlerin üretilme ve uygulama koşullarının belirlenmesine katkı yapması beklenmektedir.

Anahtar kelimeler: Kolşisin, aljinat, kitosan, nano, ilaç salımı, glutaraldehit

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE UTILIZATION OF ALGINATE- CHITOSAN NANOPARTICLES FOR COLCHICINE DELIVERY

Mehlika GÜN

M. Sc. Thesis, Department of Chemistry
Supervisor: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER
2012, 67 pages

In this study we aimed to assess appropriate production steps for binding and controlled delivery of colchicine, an anti-inflammatory drug, to glutaraldehyde cross-linked alginate/chitosan nanoparticles. This study is designed to develop materials using in controlled drug delivery. The reason lying behind choosing colchicine as trial drug was that colchicine is still the gold standard for treatment of several chronic diseases like gout, Familial Mediterranean Fever and Behçet's Disease and the necessity of chronic use of this drug in treatment of these diseases. Nanoparticles used for drug release was produced by using alginate and chitosan natural polymers. Glutaraldehyde was used as cross-linker. Colchicine entrapment capacity was investigated and a positive correlation between temperature and colchicine entrapment was observed. Release of colchicine from nanoparticles was investigated in various artificial body fluids. No colchicine release in *in vitro* artificial gastric juice. Release of colchicine in *in vitro* simulated gastric juice environments reach to a plateau in 3 hours and continued up to 5 hours with the same. Colchicine is used by oral administration and can be toxic in case of overdose. Colchicine is a commonly used drug for treatment of gout, FMF and Behçet's Disease but there is not enough study in the literature about entrapment of colchicine by polymer systems. With this study we aim to contribute to assessment and production of colchicine delivery systems made of natural polymers.

Key words: Colchicine, alginate, chitosan, nano, drug delivery, glutaraldehyde

ÖNSÖZ

‘Aljinat-Kitosan Nanopartiküllerin Kolşisin Salımında Kullanılmasının Araştırılması’ konulu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, maddi ve manevi destekleri ve ilgilerini esirgemeyen sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarım süresince katkılarından dolayı değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN’a, Kimya Bölümü Arş. Gör. Murat UYGUN’a ve Kimya Bölümü Arş. Gör. Rukiye YAVAŞER’e teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuar çalışmalarım ve tezimin yazılması sırasında sabır ve anlayış göstererek benden yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Çağdaş SUNNA’ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuarlarından yararlanma şansını bana sundukları için Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Kubilay METİN’e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım, eğitimim ve daha da önemlisi hayatım boyunca beni anlayış ve hoşgörü ile karşılayan, manevi yardımları ile destek olan aileme minnettar olduğumu belirtmek isterim.

Mehlika GÜN

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. İlacın Tanımı	1
1.2. İlaç Salım (İletim) Sistemleri	2
1.2.1. Transdermal İlaç Salım Sistemleri (TDDS)	2
1.2.2. Lipozomal ve Hedefe Yönelik İlaç Salımı	3
1.2.3. Oral İlaç Salımı	4
1.2.4. Parenteral İlaç Salımı	5
1.2.5. Kolona Spesifik İlaç Salımı.....	6
1.2.6. İntranasal İlaç Salım Sistemleri	6
1.2.7. Oküler İlaç Salım Sistemleri	6
1.2.8. İntravajinal İlaç Salım Sistemleri	7
1.3. Kolşisin	7
1.3.1. Tarihçe.....	9
1.3.2. Kolşisinin Biyosentezi.....	9
1.3.3. Kolşisinin Farmakolojisi	10
1.3.4. Kolşisin Farmakokinetiği	11
1.3.4.1. Absorbsiyon	11
1.3.4.2. Dağılım.....	11
1.3.4.3. Metabolizma ve eliminasyon	12
1.3.5. Kolşisinin Hastalıklarda Kullanımı	13
1.3.6. Kolşisin Yan Etkiler	13
1.3.7. Kolşisin Zehirlenmesine Yol Açan Nedenler.....	14

1.4. Aljinat/Kitosan Nanopartikülleri.....	14
1.4.1. Aljinat.....	15
1.4.2. Kitosan.....	16
1.4.3. Kitosan Mikroküreler	17
1.5. Gluteraldehit.....	17
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	19
2.1. İlaç Salım Sistemleri İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	19
2.2. Kolşisin İle İlgili Çalışmalar	21
2.3. Aljinat ve Kitosanın Kullanıldığı İlaç Salım Sistemleri	25
2.4. Aljinat ve Kitosanın Kolşisin Salım Sistemlerinde Kullanımı	30
3. MATERYAL ve YÖNTEM	31
3.1. Kimyasal ve Cihazlar	31
3.2. Yöntem	31
3.2.1. Kolşisin Çalışma Grafiğinin Hazırlanması.....	31
3.2.2. Aljinat Temelli İlaç Salım Partiküllerinin Hazırlanması	32
3.2.2.1. Boş Aljinat/Kitosan Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	32
3.2.2.2. Kolşisin Yüklü Aljinat/Kitosan Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	33
3.2.2.3. Boş Aljinat/Kitosan/Glutaraldehit Nanopartiküllerin Hazırlanması	35
3.2.2.4. Kolşisin Yüklü Aljinat/Kitosan/Glutaraldehit Nanopartiküllerin.....	36
3.2.2.5. Boş Aljinat Mikrokürelerinin Hazırlanması	38
3.2.2.6. Kolşisin Yüklü Aljinat Mikrokürelerinin Hazırlanması	39
3.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	40
3.3.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektroskopi) Ölçümleri	40
3.3.2. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) Ölçümleri	40
3.3.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri	40
3.4. Nanopartiküller İçin Kütle/Hacim Grafiğinin Hazırlanması	40
3.5. İlaç Tutuklama Kapasitesine Sıcaklığın Etkisi.....	41
3.6. Fizyolojik Koşulların İlaç Salımına Etkilerinin Saptanması	41
3.6.1. pH Çalışması	41
3.6.1.1. Kolşisinin in vitro Mide Oratmında Salımının İncelenmesi.....	42
3.6.1.2. Kolşisinin in vitro İnce Bağırsak Ortamında Salımının İncelenmesi	42

4. BULGULAR VE TARTIŞMA	43
4.1. Kolşisin Çalışma Grafiği	43
4.2. Nanopartikül ve Mikroküre Oluşturma Çalışmaları.....	45
4.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	47
4.3.1. FTIR Ölçümleri	47
4.3.2. AFM ve SEM Sonuçları.....	48
4.4. Nanopartiküllerin Kütle/Hacim Grafiğinin Oluşturulması.....	51
4.5. Kolşisin Tutuklanma Kapasitesine Sıcaklığın Etkisi.....	52
4.6. Kolşisinin Salımına pH'ın Etkisi.....	53
4.6.1. Kolşisinin in vitro Mide Ortamında Salımı.....	54
4.6.2. Kolşisinin in vitro İnce Bağırsak Ortamında Salımı.....	54
5. SONUÇ.....	57
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	67

SİMGELER DİZİNİ

AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
Alg	Aljinat
ATD	Antitüberkiloz İlaçlar
CD	Circular dichorism
CMC	Karboksilmetil selüloz
CS/ALG	Kitosan/aljinat
CS/ALG PEC	Kitosan/aljinat polielektrolit kompleksi
DOX	Doxurobicin
DPBS	Potasyum fosfat tuzu tableti
DSC	Differential scanning calorimetry
FDA	Amerikan Gıda ve Araştırma Kurumu
FITC	Fluorescein isothiocynate isomer I-Celite
FMF	Ailesel Akdeniz Ateşi
FTIR	Fourier transform infrared spektrofotometresi
5-FU	5-florasil
G	α -L-guluronik asidin
GI	Gastrointestinal
HPMC	Hidroksipropil metil sülüloz
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
INH	İsoniazid
IV	İntravenöz
LUVs	Büyük unilamellar
M	(1-4)-bağlı β -D-mannuronik asid
MLV	Multilameller
PCL	Policaprolactone
PEG	Poli etilen glikol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kolşisinin Biyosentezi	10
Şekil 3.1. Boş aljinat/kitosan nanopartikül oluşturma sürecinde işlem şeması	33
Şekil 3.2. Kolşisin yüklü aljinat/kitosan nanopartikül oluşturma işlemi	34
Şekil 3.3. Boş aljinat/kitosan/gluteraldehit nanopartikül oluşturma sürecinde işlem şeması	35
Şekil 3.4. Kolşisin yüklü aljinat/kitosan/gluteraldehit nanopartikül oluşturma sürecinde işlem şeması.....	37
Şekil 3.5. Boş aljinat mikroküreleri oluşturma sürecinde işlem şeması.....	38
Şekil 3.6. Kolşisin yüklü aljinat mikroküreleri oluşturma sürecinde işlem şeması.....	39
Şekil 4.1. Kolşisin bileşiğinin UV-Vis bölgedeki absorpsiyon spektrumu	44
Şekil 4.2. Kolşisin Çalışma Grafiği.....	44
Şekil 4.3. Boş ve kolşisin yüklü nanopartiküllerin FTIR spektrumu	47
Şekil 4.4. Kolşisin molekülünü FTIR spektrumu.....	48
Şekil 4.5. Nanopartiküllerin AFM ile çekilmiş fotoğrafı	49
Şekil 4.6. Boş aljinat/kitosan/gluteraldehit nanopartiküllerin SEM ile çekilmiş fotoğrafı	50
Şekil 4.7. Kolşisin yüklü aljinat/kitosan/gluteraldehit nanopartiküllerin SEM ile çekilmiş fotoğrafı.....	50
Şekil 4.8. Boş nanopartiküller kullanılarak hazırlanan kütle/hacim grafiği.....	51
Şekil 4.9. Aljinat/kitosan/gluteraldehit nanopartiküllere kolşisin tutuklanma kapasitesinin sıcaklıkla değişimi	52
Şekil 4.10. Aljinat/kitosan/gluteraldehit nanopartiküllerden pH 6,8 ortamında zamana bağlı kolşisin salımı.....	55
Şekil 4.11. Aljinat/kitosan/gluteraldehit nanopartiküllerden pH 7,4 ortamında zamana bağlı kolşisin salımı	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Nanopartikül ve mikroküre oluşturma çalışmalarında denenen bileşimler ve kolşisin salım oranları	45
Çizelge 4.2. İnsan gastrointestinal yolundaki sıvıların pH değerleri	53
Çizelge 4.3. Aljinat/kitosan/glutaraldehit nanopartiküllerden pH 6,8 ortamında zamana bağlı yüzde kolşisin salımı.....	56
Çizelge 4.4. Aljinat/kitosan/glutaraldehit nanopartiküllerden pH 7,4 ortamında zamana bağlı yüzde kolşisin salımı.....	56

1. GİRİŞ

1.1. İlacın Tanımı

Dünya Sağlık Örgütü'nün yapmış olduğu ilaç tanımı “fizyolojik sistemleri veya patolojik durumları ilacı alan kişinin yararına olacak şekilde değiştiren, üzerinde modifikasyon yapan her çeşit madde” şeklindedir. Bilimsel literatürde ise ilaç sözcüğü daha çok biyolojik olarak aktif olan maddeleri tarif etmek için kullanılır. İlaç farmakolojik etkiden sorumlu olan aktif bir materyaldir. İlacın uygulaması ile yapılan işleme “tedavi” denilmektedir. İlaç uygulamasında sadece aktif madde bulunmaz aynı zamanda yardımcı maddeler de bulunmaktadır.

Bir ilacın uygun dozunun ayarlanması ve tutarlı bir dozaj formunda sunulması onu üreten firmaya bağlıdır. İlacın dozaj formunda genellikle aktif olmayan yardımcı maddeler bulunur. Bu yardımcı maddeler sayesinde ilacın potansiyel, tutarlılık ve uygulama formunun miktarı gibi parametreler üzerinde kontrol sağlanmış olur. Dozaj formların hızlı bir şekilde salınması isteniyorsa bu amaçla jelatin, laktoz, nişasta, parafin, talk gibi yan maddeler sıklıkla kullanılmaktadır. Bu maddeler ilacın bağlanması, parçalanması veya çözünmesi için kolaylık sağlamaktadır. İlacın özelliklerine göre yardımcı maddeler gastrik sıvı içinde veya intestinal ortam içinde çözünabilir olmalıdır.

Dozaj formlarının salımının uzatılması için yardımcı maddeler önemli rol oynamaktadır. İlacın gastrointestinal kanal boyunca emilim hızı üzerine etki edebilirler. Kullanılan bu yardımcı maddeler vücut ile herhangi bir etkileşime girmeyen biyoyumluluğu olan bir polimer olmalıdır. Bir bütün olarak düşünüldüğünde yardımcı maddeler biyobozunur ve biyobozunur olmayan polimerler olarak sınıflandırılabilir (Jean ve Iosif, 2005).

Biyofarmasötik, 1958 yılında Levy tarafından “ilacın farklı fizikokimyasal formlarının emilim hızını ve dağılımını etkileyen faktörler üzerinde yapılan çalışma” olarak tanımlanmıştır. Biyofarmasötik ilacın farklı fizikokimyasal formlarının absorpsiyon, dağılım, metabolizma, birikim ve atılım gibi özellikleri ile ilgilenmektedir. İlacın dozaj formunun mümkün olan en uygun seviyede emilmesi, istenilen bölgede en yüksek konsantrasyonda olacak şekilde dağılmasını sağlar. Bir diğer değişle farmakolojik olarak aktif olan madde tek başına yeterli

değildir, bu maddenin etkinliği organizmaya ne şekilde verildiğine de bağlıdır (Jean ve Iosif, 2005).

1.2. İlaç Salım (İletim) Sistemleri

Biyomedikal mühendislik alanında son yıllardaki ilerlemeler ile pek çok makro moleküler ilaç üretilmiş ve piyasada satışa sunulmuştur. Biyobozunur polimerler dikiş materyali, yara kapatma materyali ve yapay deri gibi alanlarda geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Polimerik ilaç dağıtım sistemleri ise standart yöntemlere ek olarak pek çok uygulama şeklinde kullanılabilir. Bu ilaç dağıtım sistemleri mekanik pompalara göre çok daha az karmaşıktır ve ilaç, polimer matriks içerisinde çözünmemiş olarak da depolanabildiği için, daha küçüktür. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda polimerik araçların yüksek moleküler ağırlıklı ilaçlar için daha elverişli olduğu gösterilmiştir. Çevresel koşullardaki değişikliklere (sıcaklık, pH, UV-görünür ışık, elektriksel alan ve bazı kimyasallar) cevap verebilen yeni kontrollü ilaç salım sistemleri keşfedilmektedir. Amaca yönelik kontrollü ilaç salım sistemleri pek çok şekilde denenmiştir. Bunlar arasında en çok öne çıkan tür nanopartiküller olurken, bunları mikropartiküller ve hidrojel izlemektedir. Pek çok yöntem arasından nanopartiküller kontrollü ilaç salımı üzerinde çok önemli bir etki oluşturmuştur, bu nedenle nanopartikül hazırlama ve karakterizasyon tekniklerinin geliştirilmesi önem taşımaktadır (Majeti vd., 2002).

1.2.1. Transdermal İlaç Salım Sistemleri (TDDS)

Pek çok ilaç, uygulama yoluna bağlı olarak istenmeyen etkiler gösterebilmektedir. Geleneksel ilaç salım sistemlerinde karşılaşılan problemlerin önlenmesi için transdermal ilaç salım sistemleri geliştirilmiştir.

Oral ilaç uygulamaları yüzyıllardır denenmiştir ve günümüzde tablet ve kapsüller olarak kullanılmaktadır. Enjekte edilebilir ilaçlar son 130 yıl içinde ortaya çıkmış ve sterilizasyonun daha iyi anlaşılır hale gelmesiyle kabul edilebilir duruma gelmiştir. Başta lokal deri hastalıklarında olmak üzere topikal uygulamalar da yüzyıllardır kullanılmaktadır. Transdermal ilaç salım sistemleri (TDDS), sistemik kan seviyesini yakalamak için tasarlanmıştır ve 1950'lerden beri kullanılmaktadır. Transdermal nüfuz işlemi ya da deriden emilim, ilaç gibi moleküllerin derinin dışından nüfuz ederek derinin tabakalarını geçip kan dolaşımına ulaşması olarak

tanımlanabilir. İlacın sistematik girişinde istenmeyen yan etkiler veya toksik etkiler oluşabilir (Hollinger ve Ranade, 2004).

TDDS'lerin hepatic ilk geçiş etkisine uğramadan daha uzun süre boyunca kan düzeyi sağlanması, yan etkilerin azalması ve gastrik mukoza ile direkt etkileşim nedeniyle ortaya çıkan gastrointestinal etkilerin önlenmesi gibi avantajları vardır. TDSS'lerden gerçekleşen salım paternleri yapay membranlar, hayvan veya kadavra cildi kullanılarak *in vitro* ortamda çalışılmıştır

Kollagen ve kitosan membranlar kullanılarak ilaçların kontrollü TDSS salımı için membranlar geliştirilmiştir. İlaçların sistem içindeki stabilitesin artırılması amacıyla aljinat jel kullanılabilir. Salım hızı kullanılan membran tipine bağlıdır (Ksıhırsagar, 2000).

1.2.2. Lipozomal ve Hedefe Yönelik İlaç Salımı

İlaçların direkt dağılımı ile etkilenen dokulara daha etkili ilaç tedavisindeki asıl ilgi intraarteriyel veya periton gibi vücut boşlukları içine infüzyonlara benzer lokal veya bölgesel tekniklere yoğunlaşmaktadır. Bölgesel tedavinin, düşük sistemik toksisite ve direkt olarak hedeflenen alanda ilacın pik seviyeleri göstermesi gibi yararları bulunmaktadır. Fakat bu uygulamanın başarısı sınırlıdır. Günümüzde araştırmalar sadece tutulmuş dokulara gidecek ilaç dağıtım sistemleri oluşturulmaya çalışılmaktadır. Burada dikkati çeken taşıyıcı sistem lipozomlardır.

Lipozomlar amfipatik fosfolipitlerden oluşmuş çift-katmanlı konsentrik yapılarıdır ve sahip oldukları çift-katman sayısına göre lipozomlar multilamellar (MLV), küçük unilamellar (SUVs) veya büyük unilamellar (LUVs) olarak sınıflandırılırlar. Boyutları 0.025 μ ile 10 μ arasında değişiklik göstermektedir. Lipozomların boyutları ve yapıları hazırlama metodu ve içeriklerine göre değişiklik gösterir. Lipozomlar ilaç, aşı ve gen taşıma ve dağıtımını amacı ile pek çok hastalığın tedavisinde yer almaktadır.

Örnek olarak Termosensitif lipozomal taxol formülü (ısı aracılı hedeflenmiş ilaç dağıtımını) geliştirilmiştir. Taxol'un toksik yan etkileri olması nedeniyle Cremophor yardımcı madde olarak kullanılır. Tümör hücrelerinde termosensitif lipozom ve hipertermi kombinasyonu tedavisinin tümör hacminde daha büyük gerileme sağladığı saptanmıştır (Ksıhırsagar, 2000).

1.2.3. Oral İlaç Salımı

Oral yoldan ilaç alımı tarih boyunca, en uygun ve yaygın olarak kullanılan ilaç salım yöntemidir. Kaplama teknolojisi 1800'lerin ortalarında jelatin ve şeker kaplamaların keşfiyle gelişmiştir. İlaç içeren boncukların mumlar ve yağlar ile kaplanması ile bu teknoloji büyük ilerleme göstermiştir. İlacın kontrollü salımı üzerine 1900'lerin ortalarına kadar çalışmalar yapılmıştır ve bine yakın patent alınmıştır. Gerçekten etkili ilk oral ilaç salım sistemi olan katmanlı tablet (Spansule) 1950'lerde tanıtılmıştır. Bu sistem kaplanmış ilaç içeren boncukların kapsül içerisine yerleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Farklı salım hızlarında kapsül başına 50'den 100'e ya da daha fazla ilaç içeren boncuk olacak şekilde dizayn edilmiştir. Bu sistem Smith Kline & French Laboratories tarafından pazarlanmıştır.

1960'ların sonlarına doğru dozaj şekline dayalı yeni sistemleri isimlendirmek için "kontrollü ilaç salımı" terimi kullanılmıştır. Bu sistemlerin ilacın çözünürlüğünü kontrol altında tutma görevinin yanı sıra ek görevleri de vardı. Kontrollü ilaç salım sistemlerinin amacı ilacın güvenilirliğini geliştirmek ve etki süresini uzatmaktır. Güvenli emilim sağlamak, biyoyararlanımı ve ilaç iletim etkinliğini arttırmak için üretilmiş birçok kontrollü ilaç salım sistemi vardır. Çözünürlüğü, emilim hızını ve biyoyararlanımı arttırmak amacıyla tasarlanmış kontrollü salım ürününe örnek olarak mantar önleyici ilaç olan "griseofulvin" verilebilir.

Oral kontrollü salım sistemleri çoğunlukla polimerlerden yapılırlar ve salım mekanizması genellikle difüzyon, biyoozmoz ya da degradasyon, şişme ya da osmotik basınç ile düzenlenir. Difüzyon, ilaç-polimer karışımı gastrointestinal sıvı ile yüzleştğinde gerçekleşir ve ilacın tablet veya kapsülden salımı ile sonuçlanır. Biyoozmoz veya degradasyon, bazı ilaç-polimer kompleksleri gastrointestinal sistemden geçerken oluşur. Bazı ilaç-polimer formülasyonları gastrointestinal sıvı ile yüzleştiklerinde şişme ya da osmotik basınç oluşur ve ilacın salınması ya da çekilmesi ile sonuçlanır (Hollinger ve Ranade, 2004).

Protein ve peptit yapıdaki ilaçların oral yoldan kullanılması büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla jelatin kapsülleri değişik konsantrasyonlarda sodyum alginat ile kaplanmış, uygun konsantrasyonlardaki kalsiyum klorür ile çaprazlanmıştır. Gastrik ve intestinal ortam direnci açısından *in vitro* olarak test edilmiştir. Ağırlık olarak % 20 oranında polimer kaplı jelatin kapsüller *in vitro*

ortamda en umut verici sonuçları sağlamıştır. İnsan gönüllü denekler üzerinde denenmiş ve gastrointestinal ortamdaki davranışları incelenmiştir. Yapılan radyolojik çalışmalar kaplı olmayan jelatin kapsüllerin 15 dk'lık bir sindirimden sonra parçalandığını; aljinat kaplı jelatin kapsüllerin ise midede kaldığı süre boyunca parçalanmadan kaldığını (3 saate kadar), daha sonra ilioçekal (ince bağırsak) bölgeye geldiğinde parçalanmaya uğradığını göstermiştir (Ksırsagar, 2000).

1.2.4. Parenteral İlaç Salımı

Parenteral tedavi ilacın doğrudan damar yolu (intravenöz) ile hastaya verilmesidir. Diğer ilaç salım sistemleri ile karşılaştırıldığında ilaç iletiminin en hızlı yoludur. İlaç tedavilerindeki hatalar ve damardan enjekte edilebilecek ilaçların keşfedilmesi 1960'ların başında intravenöz ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesine yardımcı olmuştur.

İntravenöz, subkutanöz veya intramusküler enjeksiyon ile yapılan parenteral ilaç dağıtımında ilaç, hızlı ilaç absorpsiyonu ile sistemik dolaşıma kolayca geçebilir. Öte yandan, hızlı ilaç absorpsiyonuna sistemik dolaşımda ilaç seviyelerinde hızlı bir düşüş de eşlik etmektedir.

Etkili bir tedavi için; tedavi gerektiği sürece, sistemik ilaç seviyesinin terapötik olarak etkili konsantrasyon aralığında tutulması gereklidir. Sistemik sirkülasyonda sabit bir ilaç seviyesini elde etmek için iki strateji kullanılabilir; absorpsiyon veya ilaç oranına hakim olmak veya ilaç atılımına hakim olmak. İlaç absorpsiyonunun (dozaj formları modifiye ederek) kontrolü, ilaç atılımının kontrolünden (vücut fizyolojisini modifiye ederek) daha kolaydır. Devamlı intravenöz infüzyon; etkin tedavi gerektirdiği sürece terapötik konsantrasyon aralığında sabit ve devamlı bir ilaç seviyesi oluşturur. Fakat bu durum hastaneye bağımlılığı artırır ve yakın tıbbi gözetim uygulanması gerektirir. Yeni enjekte edilebilir ilaç dağıtım sisteminin gelişmesi geçen bir kaç yıldır önemli derecede dikkat çekmektedir. Dağılım sistem süreçlerinde uygulama kolaylığı, vücutta alana spesifik etki için lokalize ilaç dağılımı (ör: lokal anestezi/analjezi), tedavi etkinliğini bozmayan indirgenmiş doz miktarları farmakoekonomik ve ticari olarak çekici bazı nedenlerinin olması gibi avantajlarından dolayı depo formülasyonlar bilim adamlarının daima üzerinde durduğu bir konu olmuştur (Bari, 2010).

1.2.5. Kolona Spesifik İlaç Salımı

Kolon hedef alınarak gerçekleştirilen ilaç salımının pek çok terapötik avantajı vardır. Mide asidi veya pankreatik enzimler ile metabolize edilen ya da parçalanan ilaçlar kolon ortamından çok daha az etkilenmektedir. Ülseratif kolid, kolorektal kanser ve Crohn's hastalığı gibi kolonik hastalıkların tedavisinde ilacın direkt olarak etkilenmiş bölgeye salınması çok daha etkindir (Ksıhırsagar, 2000).

1.2.6. İntranazal İlaç Salım Sistemleri

Gastrointestinal ilk geçiş eliminasyonunu önlemek ve uygulamayı kolaylaştırmak için nazal yol bazı ilaçların günlük uygulaması için uygun bir alternatif olarak görünmektedir. Nazal yolun ilaç uygulamasında kullanımı eski çağlardan beri insanoğlunun dikkatini çekmiştir. Nazal tedavi Batı Hindistan tıbbının Ayurvedic sisteminde kullanılan bir uygulamaydı. Psikotropik ilaçlar ve halüsinojenler Güney Amerika yerlileri tarafından buruna çekme yöntemi ile yüzyıllardır kullanılmaktadır. Son on yıldır oral olarak emilimi olanaksız olan bileşikler için intranazal ilaç uygulamasının kullanışlı olabileceği tartışılmaktadır (Hollinger ve Ranade, 2004).

1.2.7. Oküler İlaç Salım Sistemleri

Göz preparatlarını oluşturan çözeltiler, süspansiyonlar ve merhemler kornea üzerine lokal olarak uygulanabilirler ya da göz küresi ile göz kapağı arasındaki boşluğa damlatılabilirler. Sulu bir çözelti kornea üzerine damlatıldığında ilaç gözün iç kısmına nüfuz etmelidir. Çözelti, gözyaşları ile yıkanıp ve gözyaşı kanalı ile atıldığından, göz damlaları göz ile uzun süre temasta kalamazlar ve sık aralıklarla düzenli olarak uygulanmalıdır. Süspansiyonlar daha uzun süre göz ile temas halinde olurlar fakat tanecikli yapılarından dolayı tahriş etme problemleri vardır. Tahriş aşırı göz yaşı boşalmasına ve damlatılmış dozun azalmasına sebep olabilmektedir. Merhemler de göz ile uzun süre etkileşebilme avantajına sahiptirler fakat göz üzerinde bulanık görüntü oluşmasına sebep olan bir film oluştururlar. Göz ile ilgili preparatlarda oluşabilecek dezavantajları ortadan kaldırmak için ilacı istenen hızda ve uzun süre salan kontrollü salım sistemleri kullanılmaktadır.

Oküler ilaç salım sistemlerinin kendine özgü uygulaması, ilacın puls girişini sağladıktan sonra ani bir şekilde ilaç konsantrasyonunun düşürülmesini takip eden

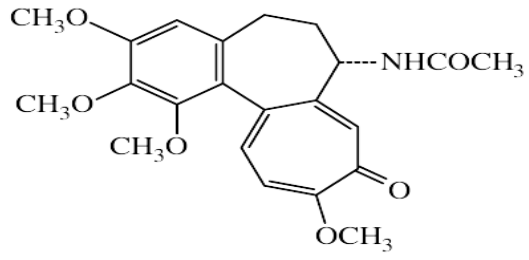
yöntemdir. Göz damlaları ile yeterli tedaviyi sağlamak yeterli büyüklükte ve güçte bir puls girişi ile ya da az yoğun bir puls girişini sık aralıklarla uygulayarak sağlanabilir. Korneadan emilimi geliştiren bazı yeni oküler ilaç salım sistemleri bildirilmiştir. Bu sistemlerde göz damlasının ihtiyaçtan daha az sıklıkta uygulanması ile istenilen etki sağlanabilmekte fakat yan etkiler artmaktadır. Bundan dolayı, bu sistemler dozdan kaynaklı ciddi olmayan yan etkileri olan ilaçlar ile sınırlı kullanıma sahiptirler (Hollinger ve Ranade, 2004).

1.2.8. İnvajinal İlaç Salım Sistemleri

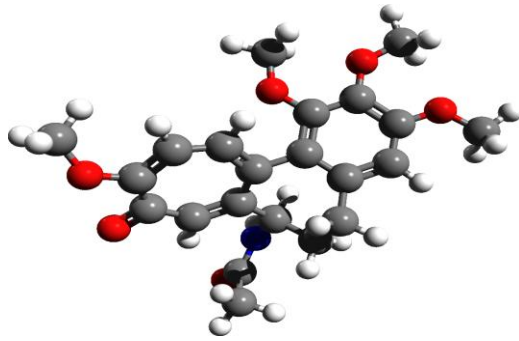
Steroid hormonlar gibi sistematik olarak aktif ilaçlar vajinal mukozadan emilebilirler. Vajinal emilim, progesteron emdirilmiş fitil formülasyonunun uygulanması ile ispat edilmiştir. Özellikle kontraseptif ilaçların vajinal yol ile uygulanmalarının birçok avantajı vardır. İlaveten ilacın vajinal epitelden emilimi oral yol ile alınan kontraseptif ilaçların yarattığı toksisiteyi azaltmaktadır. İlacın invajinal olarak uygulanması hepatik ilk geçiş etkisini ve oluşabilecek gastrointestinal uyumsuzluğu önlemektedir (Hollinger ve Ranade, 2004).

1.3. Kolşisin

Kolşisin adını *Colchicum* türü bitkiden alan, eski yunan ve arap yazıtlarında da bahsedilen toksisitesi olan ve gut tedavisinde kullanılan bir alkaloiddir. Günümüzde bu alkaloid halen gut tedavisi için kullanılmakta, ayrıca genetik hastalık olan, Ailesel Akdeniz Ateşi (Familiar Mediterreanam Fever) tedavisi için de kullanılmaktadır. Moleküler biyolojide poliploid bitkilerin oluşumu ve karyolojik çalışmalarda hücre bölünme inhibitörü olarak da uygulama alanı bulmaktadır. Molekül ağırlığı 399,437 g/mol, kapalı formülü $C_{22}H_{25}NO_6$ olup; açık formülü ve üç boyutlu yapısı aşağıda gösterilmiştir (Vinnersten ve Larsson, 2010).



Kolşisinin Molekül Yapısı



Kolşisinin Üç Boyutlu Yapısı



Colchicum Autumnale

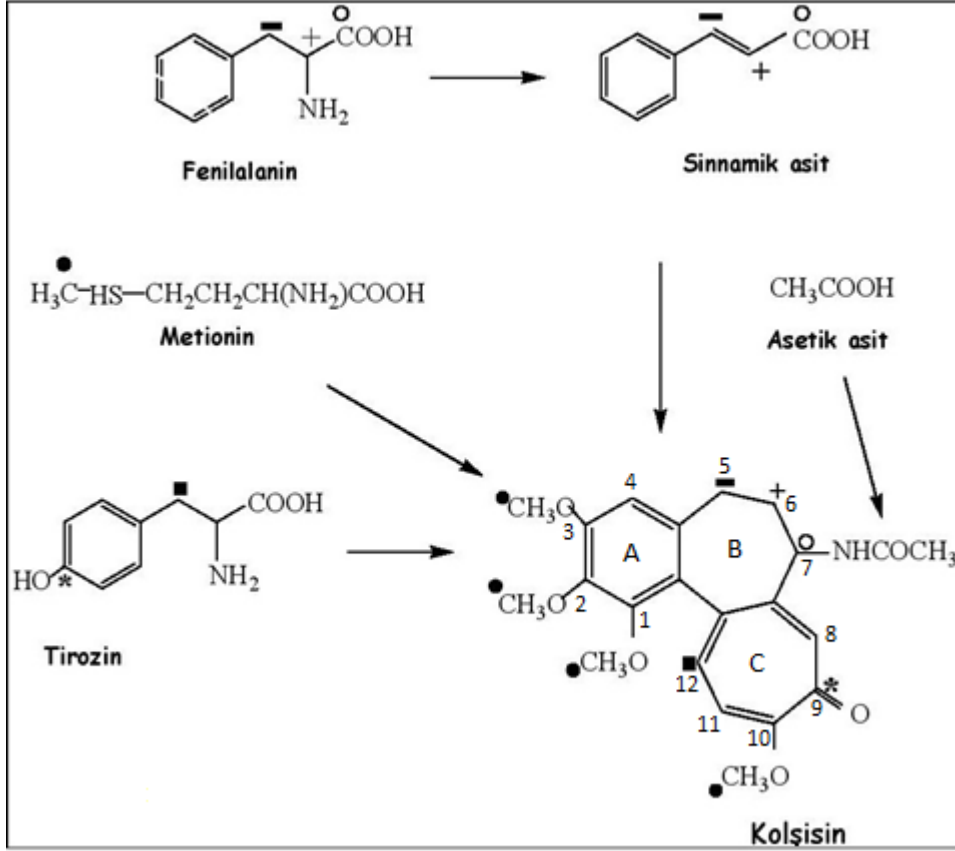
1.3.1. Tarihçe

Kolşisin öncülü olan *Colchicum*'un M.Ö 1500 yılında Ebers Papyrus kağıtlarında (eski mısır tıbbi yazıtları, MÖ 1550) romatizmanın tedavisi için kullanıldığı anlatılmaktadır. M.Ö 550 yılında, gut hastalığında *Colchicum* kullanımı (bitkinin soğan kısmı) Tralles'te yaşayan Lidyalı Alexander tarafından "hermodaktil" olarak tavsiye edilmiştir. *Colchicum* Persli doktor İbn Sina ve diğer İslami doktorlar tarafından kullanılmış, Fransız cerrah Ambroise Pare tarafından 16. yy'da tavsiye edilmiştir. 1618 yılında ise London Pharmacopoeia (tıbbi ilaç kitabı)'da kendine yer bulmuştur. 1833'te P.L. Gieger adını kolşisin koyduğu aktif bileşeni saflaştırmıştır. *Colchicum*, Amerika'ya Benjamin Franklin tarafından götürülmüştür. B. Franklin gut hastalığından yoğun acılar çekmiştir ve Fransa'da Amerika büyükelçiliği görevini yaparken hastalık hakkında kendi görüşlerini yazmıştır.

Colchicum ekstratı ilk defa birinci yüzyılda Pedanius Dioscroides tarafından oluşturulan De Materia Medica (tıbbi bilgiler içeren kitap)'da gut tedavisinde kullanılması ile tanımlanmıştır. Kolşisin ilk defa iki Fransız Kimyager P.S. Pelletier ve J. Caventon tarafından 1820 yılında izole edilmiştir. Daha sonra trisiklik alkaloid olarak tanımlanmış ve gut hastalığında tubulini bağlayarak ağrıları hafifletici ve anti-enflamatuvar etkileri olduğu anlaşılmıştır (Dewick, 2009).

1.3.2. Kolşisinin Biyosentezi

Colchicum alkaloitlerinin biyosentezi üzerindeki ilk çalışmalar 1960 yılında Battersby ve Leete tarafından izotopla işaretlenmiş bileşikler üzerinde yapılmıştır. Batterby ve Leete, fenilalanin, tirozin, methionin, asetik asit ve sinnamik asit kullanarak yapmış oldukları çalışmalar sonucunda, kolşisindeki asetamido grubunun asetik asitten, A halkası ve 5, 6, 7 ve 12 nolu karbon atomlarının fenilalanin, sinnamik asitten ve tropolon halkasının tirozinden meydana geldiğini göstermişlerdir (Pırıldar, 2006).



Şekil 1.1. Kolşisinin Biyosentezi

Kolşisinin tropolon halkasının gerçekte, tirozin halkasının genişlemesinden meydana geldiği kanıtlanmıştır. *Colchicum autumnale*'yi ileri radyoaktif besleme çalışmaları, kolşisinin biyosentetik olarak (S)-*Autumnaline*'den sentez edilebileceğini göstermiştir (Dewick, 2009).

1.3.3. Kolşisin Farmakolojisi

Kolşisinin etki mekanizmasının en önemli kısmını mikrotübül oluşumunu inhibe etmesi oluşturmaktadır. Mikrotübüller hücre iskeletini oluşturmada büyük görev üstlenir ve hücre göçü, bölünme ve polarizasyon gibi çok önemli hücre fonksiyonlarında görev yaparlar. Mikrotübüller sitoplazma boyunca uzanan rijit polimerlerdir. Her mikrotübül antimitotik maddelere duyarlı ve labil olan bir alfa ve bir beta tübülün heterodimeri içerir. Her kolşisin molekülü bir tubulin molekülüne bağlanır ve polimer yapısını oluşturmalarını engeller. Mikrotübül uzaması

durur ve mitotik çevrim kesintiye uğrar, bu nedenle hücre bölünmesi devam edemez. Kolşisin bu özelliği ile en eski antimitotik ilaçlardan birisi olarak öne çıkar. Hücre iskeletini bozmak suretiyle kolşisin, intrasellüler vezikül motilitesi, sekresyon ve sitokinler ve kemokinler gibi endojen mediatörlerin yer aldığı sinyalleme yollarını inhibe eder.

Kolşisin özellikle lökositlerin adhezyon, mobilite ve sitokin üretimi gibi özellikleri üzerinde inhibisyon etkisine sahiptir. Bu mekanizmalar kolşisinin antiinflamatuvar etkinliğini büyük ölçüde açıklar ve bu nedenle kolşisin pek çok hastalığın tedavisinde kullanılır (Niel ve Scherrmann, 2006).

1.3.4. Kolşisin Farmakokinetiği

1.3.4.1. Absorbsiyon

Kolşisin ana olarak jejunum ve ileumdan emilse de bu oranlar bireyler arasında değişiklik gösterir. Yapılan farmakodinamik çalışmalarda 1 mg dozunda oral yolla verilmesinden 30-90 dk. sonra en yüksek plazma konsantrasyonuna ulaştığı gösterilmiştir. Lipofilik kolşisinin absorpsiyonu, intestinal bariyerde ortalama % 45'tir.

Aynı tedavi metodu uygulanan hastalarda elde edilen yanıtların bireyler arasında büyük farklılıklar göstermesinin ana nedenlerinden birisi de kolşisin absorpsiyonudur. Absorpsiyon üzerinde en büyük etkiye sahip olan nedenler olarak enterositte kolşisini metabolize eden CYP3A4; ve kolşisini enterositte barsak lümenine atan enterositin luminal tarafında bulunan P-glikoprotein öne çıkmaktadır. Son olarak kolşisin bulantı, kusma gibi semptomlara neden olduğundan ilacın absorpsiyonu olumsuz etkilenebilir. Bu nedenlerden dolayı kolşisinin intravenöz enjeksiyonu önerilir fakat ven sklerozu, nekroz ve doz aşımı gibi yan etki riskleri ortaya çıkar. Üç ile 11 gün boyunca 8-18 mg dozunda intravenöz kolşisin enjeksiyonu sonunda kolşisin nedenli ölüm görüldüğü daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Niel ve Scherrmann, 2006).

1.3.4.2. Dağılım

Kolşisinin dağılım yarı ömrü 1-2,7 saat arasında değişiklik gösterir. Kolşisinin dağılımı ekstrasellüler kompartmanda daha fazladır. Bu da kolşisinin dokular tarafından difüzyonunun yüksek olduğunu göstermektedir. *In vitro* ortamda

kolşisinin % 40'ı albumine bağlanır. Çok az bir miktarı da asit alfa1-glikoprotein, gama globulin ve lipoproteinlere bağlanır. Eritrositler de kolşisin depolayabilirler.

Kolşisinin % 3'ünden daha az bir miktarı lökositler tarafından tutulur. Kolşisinin plazma konsantrasyonunda pik değerine ulaşması için 1 saat geçmesi gerekirken; intrasellüler pik değerine ulaşması için 48 saat geçmesi gerekir. Kolşisinin lökosit fonksiyonları üzerinde kemotaksis inhibisyonu veya adhezyon inhibisyonu gibi etkilerinin gelişmesi için 24-48 saat geçmesi gerekir. Kolşisin tedavisine devam edilmemesi durumunda kolşisin düzeyleri yaklaşık 16 saatlik bir eliminasyon yarı ömrü hızında düşüş gösterir ve lökosit fonksiyonu üzerindeki etkilerin düzelmeye başlaması için de 24-48 saatlik bir süre geçmesi gerekir.

Kronik olarak kolşisin kullanımı söz konusu olduğunda kolşisin plasental bariyerler gibi bariyerleri aşabilir. Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) tedavisi gören kadınların bebeklerinin kord kanında kolşisin saptanmıştır. Fakat sinsityotroblastlar tarafından sentezlenen P-glikoprotein kolşisini koryon villustan maternal dolaşıma atarak ilacın fetal hasarı engellenir. Kolşisin kan beyin bariyerini de aşarak büyük miktarda tubulin içeren beyinde de birikim gösterebilir. Endotelial hücrelerin luminal bölgesinden salgılanan P-glikoprotein kolşisini serebral intravasküler kompartmana transport eder. Bu sayede beyinin ilaca daha az maruz kalması sağlanarak hasar önlenmiş olur. Bu veriler kolşisinin vücuttaki tüm dokulara penetre olabildiğini gösterir. P-glikoprotein ise normalde doku bariyerleri ile korunan bölgelerin ilaca maruz kalmasını engeller. Dolayısıyla kolşisin dağılımı ile ilgili muhtemel riskler P-glikoprotein düzeyinin azlığı veya P-glikoprotein disfonksiyonuna neden olan diğer ilaçlardan köken alır (Niel ve Scherrmann, 2006).

1.3.4.3. Metabolizma ve eliminasyon

Kolşisinin eliminasyonunda en etkili yolun safra yolu olduğu düşünülmektedir. Enterohepatik siklus kolşisinin plazma pik düzeyine ulaşmasını geciktirir. Safra kesesi obstrüksiyonu olan hastalarda kolşisin toksisitesi görülebildiği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Safra ekstraksiyonunda en büyük role sahip olan etken safra kesesi membranından salgılanan P-glikoproteindir. P-glikoprotein kolşisini intrahepatik kompartmandan safraya transport eder.

Kolşisin klerensinin % 5-20'sinden böbrekler sorumludur fakat bu oran türler arasında değişiklik göstermektedir. Üriner sekresyon hem glomerüler filtrasyon hem de tübüler sekresyon mekanizmalarıyla sağlanır (Niel ve Scherrmann, 2006).

1.3.5.Kolşisinin Hastalıklarda Kullanımı

Kolşisin için resmi endikasyon gut ataklarının tedavisi ve önlenmesidir ancak Ailesel Akdeniz Ateşinin (FMF) ve primer biliyer sirozun tedavisinde de geniş çapta kullanılmaktadır. İlacın etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Özellikle bu hastalıklarda inflamatuvar cevabı azaltır. Farmakolojik etkilerin bir çoğu ilacın tubulin-kolşisin komplekslerinin formasyonu ile beta-tubuline bağlanarak mikrotübül kendi kendine birleşme, böylece de bir çok hücre sel fonksiyonla (örn: kemotaksis, degranülasyon, fagositoz) müdahale etme sürecini inhibe etme kapasitesine bağlı gibi gözükmektedir. Böylelikle, kolşisin lökosit motilitesini ve fagositozu azaltır.

Kolşisinin Ailesel Akdeniz Ateşindeki sistemik inflamatuvar süreçlerin (rekürren poliserozit) relapslarını önlemedeki etkinliği kanıtlanmıştır (Meurin ve Tabet, 2011).

Gut artritinin akut alevlenmeleri, Behçet Hastalığı, Ailesel Akdeniz Ateşi ve Rekürren Perikarditte endikasyon onayı almıştır.

Akut koroner sendrom, aftöz stomatit, kronik konstipasyon, karaciğer fibrozu ve siroz, kronik gut, dermatitis herpertiformis, dermatomyozit ve progresif sistemik skleroz, peyronie hastalığı, psoriasis, pulmoner fibrozis, pyoderma gangrenosum, koroner anjioplasti sonrası restenoz, trombositopenik purpura, ürtikeryal vaskülit, pulmoner adenokarsinom, gibi hastalıklarda deneysel endikasyon almıştır (Cocco vd., 2010).

1.3.6. Kolşisin Yan Etkiler

Kolşisinin yan etkileri gastrointestinal sistem rahatsızlıkları ve nötropenidir. Yüksek doz kemik iliğine hasar verebilir ve anemiye yol açabilir. Mitotik inhibitörlerle ilişkili ana yan etki ise, ellerde ve ayaklara hissizlik ve karıncalanmaya neden olan periferik nöropatidir ve bu durum ilaç dozunun azaltılması hatta ilacın tamamen kesilmesini gerektirecek kadar şiddetli olabilir (Dewick, 2009).

1.3.7. Kolşisin Zehirlenmesine Yol Açan Nedenler

Kolşisin ve metabolitleri büyük bir çoğunlukla böbrekler ve safra yolu ile elimine edilirler. Bu iki yolun herhangi birinde meydana gelen bozukluk kolşisin zehirlenmesi riskini artırır. Dolayısıyla böbrek yetmezliği ve karaciğer yetmezliği olan hastalarda kolşisin zehirlenmesi görüldüğü bildirilmiştir. 25 mL/dk düzeyinden daha az bir kreatinin klerensi olması durumunda kolşisin birikimi ortaya çıkabilir. Fakat kolşisinin böbrekler aracılığı ile elimine edilmesi total eliminasyonun % 20'sini oluşturmakta; eliminasyonun büyük bir kısmını hepatik klerens oluşturmaktadır. Net hepatik klerens ise hem safra hem de metabolik klerens komponentlerini içermektedir. Kolşisin eliminasyonunun ana yolunu safra yolu oluşturduğu için primer bilier siroz veya diğer siroz türlerinde kolşisin zehirlenmesi riski artar (Niel ve Scherrmann, 2006).

1.4. Aljinat/Kitosan Nanopartikülleri

Genel bir tanım olarak nanopartiküller 10-1000 nm boyutundadırlar. Biyoparçalanabilen 100 nm boyutlarındaki nanopartiküller ilaç salımında önemli avantajlar sağlamaktadır. Nanopartiküller küçük kapillere penetre olabilir, nanopartiküller ile hedeflenen alanlarda nanopartikül kaplı ilacın birikimi artırılabilir. Nanopartiküller permeasyon (nüfuz etme) ve retensiyon (tutulma) etkileri sayesinde hedeflenen tümör hücresine pasif olarak etki edebilir. Nanopartiküller uzak hedeflere, lokalize kataterli infüzyon ile iletilebilir veya nanopartikül yüzeyi doku-spesifik hedefleme ile etiketlenerek uzak hedeflere ulaştırılabilir. Ayrıca nanopartiküller gadolinium gibi bir görüntüleme ajanı ile kaplanabilir. Nanopartiküller hem görüntüleme hem de terapatik ajanlar ile doldurulabilir ve ilaç salımında ve görüntüleme uygulamalarında kullanılabilir (Chavanpatil vd., 2007).

Aljinat, agar, agaroz, kitosan veya sentetik polimerlerden oluşan nanopartiküllü hidrojel son yirmi yıldır geliştirilmekte ve test edilmektedir. Aljinat ve kitosan gibi polimerler biyoyumlu biyoparçalanabilir ve mukoadheziv olarak tanımlanmış, kontrollü salınım cihazların tasarlanmasını içeren bazı farmakötikal ve biyomedikal uygulamalara izin vermektedir. (1-4)-bağlı β -D-mannuronik asid (M) ve α -L-guluronik asidin (G) anyonik polisakaridi olan aljinat (Alg) ilaçların, proteinlerin ve hücrelerin biyoenkapsülasyonunda geniş ölçüde kullanılmaktadır.

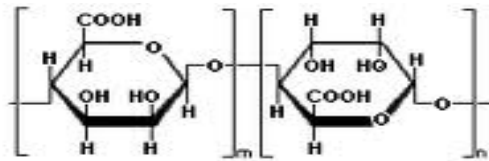
Kitosan, deniz eklembacaklılarının dış iskeletinden elde edilen kitinin (poli- β -(1-4)-N-asetil-D-glukozamin) katyonik deasetillenmiş formudur. Kitosan nanopartikül oral dağılım araçları için ilgi odağıdır çünkü transeptilyal elektrik rezistansını azaltabilmekte ve geçici olarak epitelyal hücreler arasındaki sıkı bağlantıları açabilmektedir. Aljinat/Kitosan nanopartikülleri, ilacın oral alıma başvurulduğunda midenin agresif çevresinden korunması için tasarlanmaktadır. Bağırsak pH'ında daha yaygın salım gözlenirken, gastrik pH' da kısmen 24 saate kadar tutulabilir (Sarmiento vd., 2007).

1.4.1. Aljinat

Aljinatlar kahverengi deniz yosunlarından (*Phaeophyceae* ailesi) izole edilen doğal polisakaritlerdir. Deniz yosunu, aljinik asiti çözebilen seyreltik alkali çözelti ile ekstrakte edilir. Serbest aljinik asit, kalın ve visköz katının mineral asitler ile işlenmesi sonucunda elde edilir. Daha sonra aljinik asit güncel olarak kullanılan major form olan sodyum aljinat tuzuna dönüştürülür. Aljinik asit D-mannuronik asit ve L-guluronik asit birimlerinden oluşan lineer bir polimerdir.

Aljinik asidin hidrasyonu intermoleküler bağlar sebebiyle yüksek viskositeli "asit jel" oluşumunu sağlar. Jelasyondan sonra su molekülleri aljinat matriksi içinde fiziksel olarak tutulurlar fakat hala serbesttirler ve geç edebilirler. Bu durumun birçok uygulamada çok büyük önemi vardır (ör: Hücre immobilizasyonu/enkapsülasyonu için aljinat jelleri). Jelin su tutma kapasitesi kapiller kuvvetler nedeniyle oluşmaktadır (Tønnesen ve Karlsen, 2002).

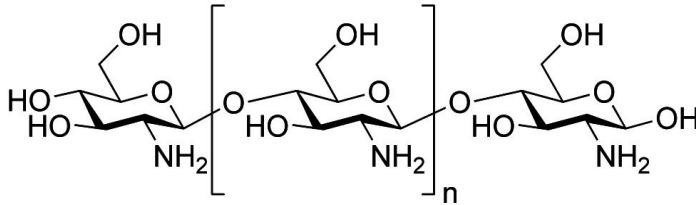
Alginat Mg^{2+} hariç Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} gibi birçok iki değerlikli katyonların varlığında hidrojel oluşturmak için kullanılır. Aljinatın hidrojel karakteri sergilemesi ilaç içeren lipozomlar ve hücrelerin kaplanması (enkapsülasyon) için çok uygun bir matriks seçeneği haline getirir (Patit vd., 2011).



Aljinat

1.4.2. Kitosan

Kitosan kabuklu deniz hayvanlarının ve böceklerin iskeletinin önemli bir kısmını oluşturan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen bir polisakkarittir. Deasetile edilmemiş form olan kitin ayrıca bakteri ve mantarların hücre duvarında da bulunur. Kitosan büyük miktarda yengeç, karides, istakoz gibi canlıların kabuklarından derişik alkali muamelesi ile elde edilir; fakat mantar hücresi kültürü aracılığı ile kitosan üretimi de sağlanmıştır. Kitin suda çözünmeyen, dallı olmayan β 1 \rightarrow 4-N-asetil-D-glukozamin zinciri içeren mukopolisakkarit ailesine dahil olan ve $1,0 \times 10^6$ D üzeri moleküler ağırlığa sahip bir moleküldür. Kitosanın saflığı, polimorföz yapısı, deasetilasyon derecesi (genellikle % 70-95) ve molekül ağırlığı ($1,0 \times 10^5$ D – $1,2 \times 10^6$ D) büyük değişiklikler gösterebilir çünkü üretim aşamasındaki pek çok basamak bu yapısal özelliklere etki eder. Kitosan suda çözünmeyen, alkali bir moleküldür fakat pH<6.0 olduğu uygun ortamlarda çözünebilir ve visköz yapı oluşturabilir. Düşük molekül ağırlığına sahip ve suda çözünebilir kitosan üretmek için pek çok metot kullanılmıştır.



Kitosan

Kitosanın, lamilin (tümör invazyonunda görev yapar) gibi proteinlere afinitesi olduğu, tümör hücrelerini inhibe eden antimikrobiyal aktiviteye sahipliğinin yanı sıra yara iyileşmesinin hızlanmasında ve immün sistem stimülasyonunda görev aldığı öne sürülmüştür. Kitosanın oral yoldan uygulanması ile serum ve mezenterik lenf nodlarındaki IgA, IgG ve IgM konsantrasyonlarında artışı stimüle ettiği gösterilmiştir. Kitosan hücre migrasyonunu, konnektif dokunun reformasyonunu, ve anjiyogenezi muhtemelen İnterlökin-8'in indüksiyonu aracılığı ile stimüle eder. Ayrıca kitosanın nazal veya intestinal ilaç emilimi ve kan-beyin bariyeri ilaç molekül geçiş özellikleri üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Kitosanın biyomedikal uygulamaları arasında bandajlar, yara

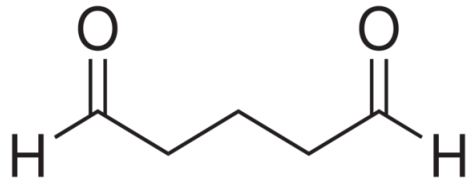
üzerini kapatmak için kullanılan sünger yapıdaki ürünler (hemostatik özelliklerinden yararlanılarak), yapay kan damarları, hücre enkapsülasyonu için matriksler sıralanabilir. Ayrıca oral kontrollü ilaç salınım mekanizmaları, kozmetik ürünler ve özellikle saç şekillendiricileri gibi ürünlerde de kullanılmaktadır. Polikasyonik kitosan ve diğer polimerler arasındaki makromoleküler kompleksler oluşturularak farklı özelliklere sahip yapılar elde edilebilir. Kollajen ve hiyaluronik asit gibi diğer biyopolimerlerle karşılaştırıldığında kitosanın ısıya daha dirençli olduğu ve elektrolitlere karşı daha az duyarlı olduğu görülmektedir (Friess, 2004).

1.4.3. Kitosan Mikroküreler

Kitosan miniküreler ilaç içeren asidik akışkan kitosan çözeltisinin yağ fazında (ör: rape-tohumu yağı veya parafin) emülsifiye edilmesi ve sonrasında glutaraldehit ile çapraz bağlanması veya ısı aracılığı ile hazırlanabilir. *In vitro* ortamda mikropartiküllerden ilaç salımı hem hidrofobik hem de hidrofilik ilaçlar için hızlı gerçekleşmektedir ve matriks degradasyonundan çok dağılma ve difüzyon mekanizmaları tarafından kontrol edilir. İlacın salınması bir noktaya kadar molekül büyüklüğü, ilaç yüklemesi ve kitosan ve türevleri için partiküllerden salımına engel olan faktörlerden etkilenir (Friess, 2004).

1.5. Gluteraldehit

Gluteraldehit biyolojik olarak fonksiyonel bir bileşik olup temel olarak protein ve polimerlerin kimyasal modifikasyonunda kullanılır. Bu biyolojik olarak kullanışlı bileşik protein molekülündeki lizinin veya hidrosilizininin amin gruplarını kovalent olarak bağlamakta ve tuzlar, organik çözücüler veya non-iyonik polimerlerin sebep olduğu protein moleküllerinin fiziksel agregasyonu ile ulaşılan yapıdan daha sağlam bir yapı elde edilmektedir. Bu katı agregatlar non-kovalent bağlar ile birbirine tutunmakta ve kolayca büzüşebilir veya tekrar çözülebilir. Bu sebeple proteinlerin çapraz bağlı ajanlarla kimyasal modifikasyonu pH inaktivasyonuna karşı protein stabilizasyonunu sağlar, tripsin, α -kimotripsin ve stabilizin gibi proteazların termostabilitesini arttırmak için kullanılabilir (Silva vd., 2004). Gluteraldehitin molekül ağırlığı 100.12 g/mol olup; molekül yapısı aşağıda gösterilmiştir.



Gluteraldehyt

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. İlaç Salım Sistemleri İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Narayani ve Rao (1995) yaptıkları bir çalışmada jelatin kapsülleri değişik konsantrasyonlarda sodyum aljinat ile kaplamışlar, uygun konsantrasyonlardaki kalsiyum klorür ile çaprazlanmışlar ve gastrik ve intestinal ortam direnci açısından *in vitro* olarak test etmişlerdir. Ağırlık olarak % 20 oranında polimer kaplı jelatin kapsüller *in vitro* ortamda en umut verici sonuçları sağlamıştır. Bu yapılar gönüllü insan denekler üzerinde denenmiş ve gastrointestinal ortamdaki davranışları incelenmiştir. Yapılan radyolojik çalışmalar kaplı olmayan jelatin kapsüllerin 15 dakikalık bir sindirimden sonra parçalandığını; aljinat kaplı jelatin kapsüllerin ise midede kaldığı süre boyunca parçalanmadığını (3 saate kadar), daha sonra ince bağırsağa geldiğinde parçalanmaya uğradığını göstermiştir.

Thacharodi ve Rap (1995) propranolol hidroklorür için geçirgenliği olan farklı kitosan membranları glutraldehit ile kontrollü çapraz bağlayarak ilaç salım regülasyonu amaçlamışlar. İlaç rezervuarı olarak kitosan jel kullanılmıştır. Modifiye Franz difüzyon hücreleri kullanılarak tavşan kulak cildi üzerinde bu oluşumların ilaç salım kapasiteleri araştırılmıştır. İlaç salım profilleri, salımın tamamen membran tarafından kontrol edildiğini göstermiştir. Salım hızının kullanılan membran tipine bağlı olduğu bildirilmiştir.

Sharma vd. (1996) ters mikro-emülsiyon metodu ile hazırlanmış taxol içeren polivinil pirolidin nanopartiküllerini araştırmışlardır. Nanopartiküllerin boyutları 50-60 nm olarak hesaplanmıştır. Taxol'ün antitümör etkinliği fareler üzerinde araştırılmıştır. Taxol içeren nanopartiküllerin *in vivo* etkinliği tümör boyutundaki küçülme ve hayatta kalma süresindeki değişikliklerle değerlendirilmiş ve her iki değer de eşit miktardaki serbest taxol'e göre daha yüksek bulunmuştur.

Murthy ve Satheesh (1997) hidroksipropil metil selüloz (HPMC), karboksimetil selüloz (CMC), PEG 400 ve propilen glikol gibi sellüloz polimerleri kullanılarak terbutalin sülfatin transdermal filmleri oluşturmuşlardır. Bu polimerler farklı oranlarda kullanılmıştır. *In vitro* difüzyon çalışmaları difüzyon hücresi olarak izole *stratum corneum* (kadavra cildinden elde edilen) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Plastikleştirici konsantrasyonu artırıldıkça ilacın transdermal geçirgenliğinde artış olduğu gözlenmiştir. HPMC filmler kullanıldığında salım hızı daha yüksek

bulunmuş, buna neden olarak bu polimerin CMC'den daha düşük viskoziteye ve daha yüksek hidrofiliteye sahip olduğu düşünülmüştür. PEG 400'ün propilen glikol ile karşılaştırıldığında geçirgenliğinin daha yüksek oranda arttığı saptanmıştır.

Jameela vd. (1998) progesteronun kontrollü salımı için 45-300 mikron boyutundaki kitosan mikroküreleri kullanmışlardır. *İn vitro* ve *in vivo* salım özellikleri test edilmiştir. Yüksek oranda çapraz bağlanmış olan mikrokürelerin 40 gün sonunda ilacın % 35' ini saldığı düşük oranda çapraz bağlanmış olan mikrokürelerin ise aynı süre içerisinde % 70' ini saldığı gösterilmiştir. *İn vivo* biyoyararlanım çalışmaları intramusküler yoldan tavşanlara uygulanan mikroküre formunun plazma konsantrasyonunu 5 ay boyunca 1-2 ng/mL düzeyinde seyretmesini sağladığı gösterilmiştir. Bu çalışmada ilaç ilk verildiğinde burst (patlama) etki gözlenmemiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler çapraz bağlanmış kitosan mikrokürelerinin uzun süreli steroid salım sistemleri için bir potansiyel olduğunu göstermektedir.

Rao ve Diwan (1998) diltiazem hidroklorür ve indometazin ilacı içeren polivinilpirolodin (PVP) film geliştirmişlerdir. *İn vitro* ortamda ilaç salım hızı ve ilacın geçirgenliği üzerinde ilacın başlangıç konsantrasyonunun film içeriğinin ve film kalınlığının etkileri ölçülmüştür. İlaç konsantrasyonunun ve PVP oranının artması ile birlikte ilaç salım hızı film kalınlığından bağımsız olarak lineer bir şekilde artış göstermiştir. Salımın birinci fazında burst (patlama) etkisi ile yüksek konsantrasyonda bir salım meydana gelmiştir. Filmin PVP konsantrasyonunun artması ve ilaç miktarının artmasıyla birlikte *in vitro* ortamda yapılan cilt geçirgenliği çalışmasında ilacın geçirgenliğinin artış gösterdiği bildirilmiştir.

Fredenberg vd. (2011) salım mekanizmaları üzerine odaklanmışlar ve salım oranını belirleyen proseslerin analizini yapmışlardır. Poly(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kontrollü ilaç salım sistemlerinde en sık kullanılan biyoçözünür polimerdir. Hangi faktörlerin ilaç salımını etkilediğinin yanı sıra salım mekanizmalarının anlaşılması sayesinde ilaç salımı daha iyi modifiye edilebilir. Ancak ilaç salımını etkileyen fizyokimyasal prosesler, değişik ilaç salım mekanizmaları bu çalışmada incelenmiş ve pratik örneklere yer verilmiştir. PLGA temelli ilaç salım sistemlerinin kompleks olması sonuçların genellenmesini ve ilaç salımının tahmin edilmesini zorlaştırmaktadır. Fakat bu kompleks aynı zamanda

karşılaşılan problemlerin çözülmesinde avantajlar sağlamak ve ilaç salımını daha kolay modifiye etmeye imkan vermektedir.

2.2. Kolşisin İle İlgili Çalışmalar

Kulkarni vd. (1997) kolşisinin lipozomlarda enkapsülasyonunu etkileyen faktörleri incelemişlerdir. Kolşisin toksisitesinin şiddetli olması ve terapötik indeksinin sınırlı olması kolşisinin kullanımını sınırlamaktadır. Çalışmanın amacı kolşisinin lipozomlardaki enkapsülasyonunu etkileyen faktörlerin belirlenmesi ve enkapsülasyon parametrelerinin optimizasyonudur. Kolşisin multilameller lipozomlarda ve geniş unilameller lipozomlarda pek çok fosfolipitlerin kullanılması ile enkapsüle edilmiştir. Farklı sıcaklıklarda ve *in vitro* ortamdaki kolşisin davranışları incelenmiştir. Lipozom oluşumu sıcaklık değişimlerine ve farklı ortam özelliklerine uyum sağlayabilir ve bu koşullar altında daha elverişli bir transport yapılabilir. Farklı sıcaklıklar altında 6 ay boyunca sürdürülen çalışmada kolşisinin partikül büyüklüğü ve konsantrasyonunun belirgin bir şekilde değişmediği gösterilmiştir. Enkapsüle kolşisinin lipozomlar içinde devamlılığını sağlamak için oda sıcaklığı veya daha düşük sıcaklıkların uygun olduğu görülmüştür.

Gladwin vd. (2000) kolşisini 3-6 µm çapındaki, poli(laktik asit)/poli(ε-kaprolaktone) karışımlarından oluşan poli etilen glikol (PEG) kaplı biyobozunabilen mikroküreler içine hapsedmişlerdir. Anjiyoplasti veya vasküler hasar sonrasında düz kas hücresi proliferasyonu restenozun sağlanmasında önem taşımaktadır. Vasküler yanıtlar üzerinde düzenleyici etkilere sahip olan ajanların lokal salınımı vasküler restenozun engellenmesinde rol oynayabilir. Fakat vasküler hasar bölgesinde ilaçların doku seviyesinin yüksek olmasını sağlamak için enjekte edilebilen mikrokürelerin ulaştırılması önemli bir sorundur. Antiproliferatif bir ajan olan kolşisinin 3-6 µm çapındaki, poli(laktik asit)/poli(ε-kaprolaktone) karışımlarından oluşan PEG-kaplı biyobozunabilen mikroküreler içine hapsedilebileceği gösterilmiştir. Kolşisin ve polilaktik asit (PLA) ve polikaprolaktone (PCL) den oluşan bir çözelti aseton-diklorometan karışımı içinde çözülmüş ve PEG (veya polivinil alkol) çözeltisi içerisine boşaltılmış ve karıştırılmış ve mikroküre oluşturulması için yüksek hızlı bir homojenizatör kullanılmıştır. Kolşisin geri kazanımı emülsifikasyon sistemine ve hazırlıkta kullanılan polimer yataklarının oranına bağlı olarak % 30-50 arasında değişiklik göstermiştir. Elektron mikroskobu görüntüsünde PLA/PCL mikrokürelerinin

küresel olduğu ve yumuşak bir yüzey yapısına sahip olduğu gösterilmiştir. *In vitro* salım çalışmalarının sonuçları uygun parçacık boyutu, yükleme ve PLA/PCL bileşimi seçilmek suretiyle kolşisin salımının kontrol edilmesinin mümkün olduğunu göstermektedir. Su geçirgenliğinin PLA membranında PCL'ye göre daha yüksek olarak bulunmuştur. 30 günlük süreç sonunda elde edilen ilaç salım miktarı da PLA'da (% 58) PCL'ye göre (% 39,3) daha yüksek olarak saptanmıştır. Dolayısıyla mikrokürelerden gerçekleşen ilaç salımı difüzyon mekanizmasında hacim erozyonu ve yüzey birikiminin göz ardı edilebilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Bonnel vd. (2002) akut gut tedavisinde intravenöz (IV) kolşisin tedavisi ile ilgili çalışma yapmışlardır. Son dönemde FDA'ya (Amerikan Gıda ve İlaç Araştırmaları Kurumu) uygun olmayan dozda damar yoluyla kolşisin verilmesi nedeniyle meydana gelen bir ölüm raporu iletilmiştir. Bu rapor nedeniyle FDA daha önceden IV kolşisin kullanılırken meydana gelen ölümleri incelemeye başlamıştır. Toplamda 20 ölüm meydana geldiği belirlenmiştir. Sekiz hastanın kadın, 11 hastanın erkek olduğu ve 1 hastanın cinsiyet bilgisinin yer almadığına ulaşılmıştır. Tüm olgularda tavsiye edilen maksimum doz olan 2-4 mg'ın üstüne çıkıldığı belirlenmiştir. Renal, hepatik hastalığı olanlar ve yaşlı hastalarda doz kısıtlaması yapılması önerilmektedir. Rapor edilen tüm yan etkiler kolşisin toksisitesiyle ilişkilidir. Bu yan etkiler arasında trombositopeni, lökopeni, pansitopeni, agranülositozis, aplastik anemi, akut renal yetmezlik ve dissemine intravasküler koagülasyon yer almaktadır. Kolşisinin damar yoluyla kullanımı için kılavuzlar geliştirilmiştir ve toksisite görülmesinin önüne geçmek için bu kılavuzların dikkatli bir şekilde takip edilmesi önerilmektedir.

Yongmei vd. (2002) çözünebilir ilaçlar için yüksek enkapsülasyon kapasitesine sahip olan niozomları hazırlamak için Span 60 ve kolesterolden başlayarak geliştirilmiş bir metod olan buharlaşma-sonikasyon metodunu ileri sürmüşlerdir. Niozomlar 40 güne kadar iyi bir stabilite göstermişlerdir. Bu niozomların enkapsülasyon kapasitesinin değerlendirilmesi için model ilaç olarak kolşisin tercih edilmiştir. En yüksek düzeyde enkapsülasyon kapasitesinin sağlanması için sürfaktan yapısı, lipit düzeyi, ilaç ve kolesterol içeriği gibi pek çok faktör incelenmiştir. Sonuçlar dört Span türü içinde sürfaktan olarak en uygun olanın Span 60 olduğunu göstermiştir. Ayrıca *in vitro* ortamda niozomlardan kolşisin ve 5-florasil (5-FU) salımı üzerindeki çalışmalar 24 saatin üzerinde bir salım süresi olduğunu göstermiştir. Sonuçlar bu şekilde üretilen niozomların sadece yüksek

enkapsülasyon kapasitesine sahip olmadığını aynı zamanda gözlenebilecek yan etkilerin de azaltılabileceğine işaret etmektedir. Bu çalışma çözünebilir ilaçların enkapsülasyonunda bu metodun yaygın olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Deveaux vd. (2004) kolşisin ilacının toksisitesi ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Kolşisinin yüksek dozda alınması ve buna bağlı toksisite gelişmesi nadir görülen bir durumdur. Öte yandan, gut ve diğer inflamatuvar hastalıkların akut dönem tedavisinde kullanılan bu ilacın alınmasıyla kolşisin zehirlenmesi meydana gelebilir. Fransa’da meydana gelen birisi intihar vakası olan toplamda 2 adet kolşisin zehirlenmesi sunulmuştur. Birinci olguda dış muayene sonrasında sadece kalpten kan örneği alınmıştır. İkinci olguda ise otopsi yapılmış, kalp kanı, idrar, mide içeriği ve safradan örnek alınarak toksikolojik inceleme yapılmıştır. Olgu 1’den alınan kalp kanı örneğindeki kolşisin konsantrasyonu 13 ng/mL; olgu 2’deki kalp kanı kolşisin konsantrasyonu 66 ng/mL, idrar konsantrasyonu 500 ng/mL, mide içeriği konsantrasyonu 12 ng/mL ve safra içeriği konsantrasyonu 5632 ng/mL olarak saptanmıştır. Bu bulgular daha önce bildirilen ölümcül dozların üzerindedir fakat bu değerlerin sindirilen ilaç miktarı ile bir ilişkisi yoktur. Masif bir aşırı doz alınımında bile kolşisin kanda saptanamayabilir. Ayrıca enterohepatik sirkülasyon yüksek olduğundan dolayı safra içeriği araştırma için kullanılabilir. Her iki olguda da ölüm nedeninin kolşisin ile intihar girişimi olduğu sonucuna varılmıştır.

Ghanem vd. (2010) kolşisin sıcaklık çalışması yapmışlar. Kolşisinin fotofiziksel özelliklerinin belirlenmesi için spektroskopik metodlar ve teorik hesaplamalar kullanılmıştır. Kolşisinin 245 nm ve 350 nm’de $n-\pi^*$ ve $\pi-\pi^*$ değişimi gösterdiği; ayrıca çözücünün polarite indeksi arttıkça maviye kaydığını, ortamın asiditesinin artması ile kırmızıya kaydığı gösterilmiştir. Çözücü tipinin ve polaritesinin hem hız sabitini hem de foto-konversiyonu etkilediği belirtilmiştir. Kolşisinin 366 nm’ye maruz bırakılması lumikolşisin üretimine sebep olur. Ortamın asiditesi hem hız sabitini hem de konversiyonu etkiler. Asitin ortamda bulunması kolşisinin foto konversiyonunu % 90’dan % 40’a indirir. İyonik kuvvet de hem hız sabitini hem de foto konversiyonu etkiler. İyonik kuvvet ve hız sabiti ters orantılı olarak ilişki gösterir.

Crielaard vd. (2011) yaptıkları çalışmada tümörün damarsal gelişimi üzerine etkili olan ilaçların tümörü hedef alan tedavilerde etkin olabileceğini göstermişler. Bu anjiyojenik tümör gelişiminin hedef alınarak lokal kan damarı konjesyonu oluşturulması, bu sayede de önemli miktarda tümör hücresinin öldürülmesi

amaçlanmaktadır. Vasküler gelişimi bozan ilaçlar (VDAs) tipik olarak tubuline bağlanmakta ve mikrotübül özelliklerini bozmaktadır. Kolşisin ve türevleri de potansiyel bir tübülün bağlayıcı ajanlardır fakat bu ilaçların terapötik aralığı dardır. Fakat lipozomal hedefleme stratejisi izlenerek bu dar olan terapötik aralık sorununun önüne geçilebilir. Ancak kolşisin türevleri fizikokimyasal özelliklerinden dolayı enkapsülasyon sonrasında göreceli olarak hızlı bir salım göstermektedir. Bu sınırlamanın üstesinden gelmek için birisi orta-hızlı hidrolize olabilen (prodrug 1) ve biri de daha yavaş hidrolize olabilen laktik-asite bağlanan (prodrug 2) iki ayrı hidrolize olabilen, kolşisin türevi üretilmiştir. 37 °C’de ve pH 7,4’te gerçekleştirilen hidroliz çalışmaları prodrug 1’in biraz daha hızlı bir dönüşüm karakteristiğine sahip olduğunu prodrug 2’nin ise daha yavaş dönüşüm karakteristiğine sahip olduğunu göstermiştir. Lipozomlarda enkapsülasyon sonrasında kolşisin hızlı bir şekilde salınırken; her iki kolşisin türevi de poli etilen glikol (PEG) bağlayıcıdan ayrılana kadar lipozomlar içinde durmaya devam etmiştir. Bu çalışma kolşisin türevlerinin lipozomlar içinde durabildiğini ve farklı biyobozunabilen bağlayıcılar kullanılarak bu salım süreci üzerinde değişiklikler yapılabileceğini göstermektedir.

Shen vd. (2011a) daha potent antitümör ajanlarının araştırılması için N-metil-kolşisinamid ve nitratların birleştirilmesi ile yeni nitrik-oksit-verici kolşisin türevleri oluşturmaya çalışmışlardır. Bu türevlerin *in vitro* ortamda insan kanser hücrelerine karşı sitotoksiteleri değerlendirilmiştir. Pek çok türevinin belirgin anti-tümör aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Shen vd. (2011b) izole rat intestinal membranından gerçekleşen kolşisin transportu üzerine eugenolün etkilerini bir *in vitro* difüzyon bölme sistemi kullanarak çalışmışlardır. Eugenolün ilaç absorpsiyonunu etkin bir şekilde artırdığı saptanmıştır. Eugenolün kolşisinin intestinal transportu üzerindeki etkileri *in vivo* ortamda oral yoldan uygulanan nanoemülsiyon formu için de denenmiştir. Kolşisinin nanoemülsiyon formu izopropil myristate, eugenol, Tween 80, etanol, su bileşenlerinden oluşturulmuştur. Bu formülasyonda eugenol yağ fazında kullanılmıştır ve nanoemülsiyonun ortalama parçacık boyutu 41.2 ± 7.2 nm’dir. Kolşisinin intestinal membranı geçme hızı kontrol grubuna (0,2 mM kolşisin) göre belirgin olarak daha hızlı bulunmuştur. Son olarak eugenol ve kolşisinin birlikte oral yoldan verilerek kolşisinin biyoyararlılığı üzerinde bir etkisinin olup olmadığı incelenmiştir. Kolşisin serbest kolşisin çözeltisi veya nanoemülsiyon olarak oral yoldan verildikten sonra (8 mg/kg) yapılan incelemede nanoemülsiyon ve eugenol-

nanoemülsiyon formlarının biyoyararlılığı serbest kolşisin solüsyonuna göre sırasıyla 1,6 kat ve 2,1 kat artırdığı gösterilmiştir.

2.3. Aljinat ve Kitosanın Kullanıldığı İlaç Salım Sistemleri

Lee vd. (1999) farklı çözünürlük özelliklerine sahip ilaçları içeren aljinat boncukların ilaç hapsedilme kapasitelerini gastrik ve intestinal sıvı ortamlarının taklit edildiği çalışmalarla değerlendirmişlerdir. Model ilaç olarak ibuprofen, aspirin, cimetidine, melatonin ve sodyum salisilat kullanılmıştır. İlaç çözünürlüğü ($0,2-383 \text{ mg/mL}^{-1}$) gastrik sıvıda artmakta iken (melatonin hariç) aljinat boncukların ilaç hapsedebilme kapasitesi (% 10-89) azalma eğilimi göstermiştir. Bu sonuç jelleşme prosesi sırasında yüksek çözünürlüğe sahip olan ilaçların alginat matriksten salınabileceğini buna bağlı olarak ilaç hapsedilme etkinliğinin azalacağını göstermektedir. Sudaki çözünürlüğü yüksek olan sodyum salisilat daha hızlı salınırken; daha düşük çözünürlüğe sahip olan ilaçların salımı da daha düşük olmuştur. Gastrik sıvıda melatonin dışındaki ilaçlar için çözünürlük arttıkça salım hızlarında da artış meydana geldiği gözlenmiştir. Öte yandan, çözünürlük ve salım hızları arasında lineer bir korelasyon saptanmamıştır. İntestinal sıvı ortamında 1 saatlik süre sonunda yapılan değerlendirmede çözünürlüğün artışıyla birlikte bifazik lineer bir profili gözlenmiştir. Bu bifazik profilin ilk kısmında ilaç ilk olarak hızlı bir salım aşamasına daha sonra da yavaş bir salım aşamasına girmektedir. Fakat çözünürlük ve salım hızı arasındaki ilişki intestinal sıvıda alginat matriksteki disintegrasyon ve erozyon faktörlerinin de işin içine dahil olmasıyla daha da komplike bir hale gelmiştir. Alginat matriksin hapsedebilme kapasitesinin etkinliği ve salım profilleri, ilacın çözünürlüğü ve içinde bulunulan ortamın (intestinal, gastrik vb.) özelliklerinden çok büyük ölçüde etkilenmiştir.

Janes vd. (2001) kitosan nanopartiküllerinin antrasiklin yapıdaki bir ilaç olan doxurobicin (DOX) taşıyabilme potansiyelini araştırmışlardır. Bu noktada gerçekleştirilmesi gereken hedef pozitif yüklü kitosan polisakkaritinin iyonik jelyonu ile oluşturulmuş kitosan nanopartiküller içine katyonik, hidrofilik bir molekülün hapsedilmesidir. Bu amacı yerine getirmek için DOX'un pozitif yükü dekstran sülfat isimli bir polianyon ile maskelenmiştir. Bu modifikasyon ile ilaç tutuklanması normalin 2 katına çıkarak % 4 oranında gerçekleşmiştir ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca kitosan ve DOX arasında partikül formasyonu olmadan bir kompleks oluşumunun olup olmayacağı üzerinde de durulmuştur. İlaç salımı üzerinde *in vitro* ortamda yapılan florometrik analizde

ilacın ilk salım fazındaki yoğunluğun ilişki moduna bağlı olduğu ve sonrasında yavaş salım gerçekleştiği gösterilmiştir. Hücre kültürleri üzerinde yapılan DOX-yüklü nanopartiküllerin aktivitesinin değerlendirilmesi için yapılan çalışmada dekstran sülfat içeren nanopartiküllerin serbest DOX'a göre sitostatik aktivitenin korunmasında daha elverişli olduğu, DOX-kitosan kompleksinin ise bir miktar daha düşük aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca çalışmalar DOX'un hücre kültürü ortamına değil hücre içerisine girdiğini ve bir kısmının da nanopartiküllere bağlı kaldığını göstermiştir.

Wong vd. (2005) tarafından yeni üretilen ve daha önceden üretilmiş olan aljinat, aljinat -kitosan ve kitosan matrikslerinin salım profilleri üzerindeki mikrodalga irridasyonunun etkileri araştırılmıştır. Matriksler sülfatazol kullanılarak hazırlandıktan sonra kurutulmuş ve matriksler 10 dakika, 20 dakika veya 10 ve 20 dakikalık 3 siklus halinde 80 W mikrodalga iritasyonuna maruz bırakılmıştır. İlaç çözünürlüğü, içeriği, stabilitesi, polimorfizmi, ilaç-polimer etkileşimi, polimer çapraz bağ yapısı incelenmiştir. Matrikste tutulmuş olan ilacın kimyasal stabilitesinin mikrodalgadan ve depolanma süresinden etkilenmediği görülmüştür. İlacın salım özelliklerinin ise daha çok polimer etkileşimi tarafından belirlendiği saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar polimer matriksin mikrodalga iritasyonuna gösterdiği yanıtın daha çok polimer zincirlerinin moleküler yapısına bağlı olduğunu göstermiştir.

Ahmad vd. (2006) antitüberküloz ilaçların (ATD) doz sıklığının azaltılması ve tüberkülozda (TB) hastanın tedaviye uyumunu araştırmışlardır. Nötral bir polimer olan aljinat TB tedavisinde ilk seçenek olarak kullanılan ATD'lerin verilmesi için geliştirilen mekanizmada kullanılmıştır. Kontrollü katyon-indüklenmiş jelleştirme metodu ile üretilmiş aljinat nanopartikülleri oral yoldan farelere verilmiştir. Plazma ve dokulardaki ilaç düzeyleri HPLC (high performance liquid chromatography) ile analiz edilmiş ve ilacın terapötik etkinliği incelenmiştir. Aljinat nanopartikülleri ile yüksek oranda ilaç enkapsülasyonu sağlanmıştır. Oral yoldan bir kez uygulanan doz ile 7-11 gün boyunca plazmada, 15 gün boyunca da organlarda (akciğer, karaciğer ve dalak) ve plazmada terapötik düzeyde ilaç konsantrasyonu sağlanmıştır. Oniki-24 saat içinde sistemden atılan diğer serbest ilaçlarla karşılaştırıldığında belirgin bir şekilde biyoyararlanım artışı olduğu saptanmıştır. TB-infekte farelerde 15 gün ara ile oral yoldan uygulanan formülasyonun 3 doz sonrasında organlardan tam bakteriyel klerensin sağlandığı gösterilmiştir. Oral yoldan uygulanan geleneksel tedavi ise günde 1 kez olmak

üzere 45 gündür. Aljinat nanopartiküllerin TB tedavisinde aralıklı tedavi için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Boonsongrit vd. (2006) iyonik etkileşim metodu ile kitosan-ilaç nanopartikülleri oluşturmak amacıyla farklı pI ve pKa'lara sahip 3 model ilaç (insülin, diklofenak sodyum ve salisilik asit) kullanmışlardır. Fizikokimyasal etkinlikler ve ilaç hapsedme özellikleri belirlenmiştir. Formülde hapsedilen ilaç miktarı zeta potansiyelini ve mikro/nanopartiküllerin yüzey yükünü etkilemektedir. Mikro/nanopartiküllerden ilaç salımında ilk evrede görülen burst (patlama) şeklinde ilaç salımı ortamın pH'sinden bağımsız olarak gerçekleşmiştir. Bu çalışmadan kitosan ve ilaç arasındaki iyonik etkileşimin zayıf ve ilaç salımını kontrol etmede yetersiz olduğu sonucu çıkarılmıştır.

Wittaya-Areekul vd. (2006) kolon spesifik ilaç salımı için prednizolon içeren mukoadheziv aljinat/kitosan partiküllerini incelemişlerdir. Bu partiküllerin oluşturulması amacıyla iki yöntem kullanılmıştır. One-step (tek basamak) modelinde prednizolon sodyum aljinat çözeltisi içinde dağıtılmış ve daha sonra bu karışım kalsiyum klorür ve kitosan içeren çözeltiliye ilave edilmiştir. Two step (iki basamak) metodunda ise aljinat çözeltisi içinde çözülmüş halde bulunan prednizolon kalsiyum klorür içeren dispersiyon içerisine bırakılmış ve partiküllerin kitosan çözeltisi içerisine geçmesi sağlanmıştır. Her iki yöntem ile yapılan çalışmalar partikül boyutunun ve ilaç içeriğinin daha çok ilaç konsantrasyonuna bağlı olduğunu, kitosan ve kalsiyum klorür miktarına bağlı olmadığını göstermiştir. Her iki metodla da üretilen mukoadheziv partiküllerin *in vitro* özellikleri domuz barsağı üzerinde incelenmiştir. Tek basamak yöntemi ile üretilen partiküller bir saatlik test sonrasında çok iyi mukoadheziv özellikler göstermişlerdir. Elde edilen sonuçlar kitosan kaplı aljinat partiküllerin hazırlanışının farklı yöntemlerle olması nedeniyle partiküllerin farklı mukoadheziv özelliklere sahip olacağını göstermektedir.

Al-Kassas, vd. (2007) iyonotropik jelleşme metoduyla aljinat polimerlerinde biyobozunabilir aljinat matriksin hazırlanmasını incelemişlerdir. Aljinat yataklarının mukoadheziv ve hacimsel artış gösterme özelliklerinden yararlanılarak oral antidiyabetik bir ajan olan gliklazidlerin oral yararlanımının artırılması amaçlanmıştır. Aljinat moleküllerinin iyonik jelasyonunu gliklazidlerin gastrointestinal sistem aracılığıyla emilim hızı üzerinde etkili olan prostepte fayda sağlamaktadır. Polimer konsantrasyonunda ve karıştırma hızındaki değişimlerin iç

faz hacmi ve dış fazda kullanılan sürfaktan tipi gibi değişkenlerin etkilerinin aljinat kürelerin partikül boyutu, emilim etkinliği ve akım özellikleri üzerindeki etkileri ayrı ayrı incelenmiştir. Aljinat yataklarının hacim artışı özellikleri ortamın pH ve polimer konsantrasyonuna büyük ölçüde bağlıdır. *In vitro* ortamda yapılan deneyler hacim artışının aljinat yataklarından gliklazid salım hızı üzerindeki en etkili parametre olduğunu göstermiştir. Diyabetik tavşanlar üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalarda ise aljinat yataklarına emdirilmiş gliklazidin hipoglisemik etkisinin ve süresinin piyasadaki klasik gliklazid preparatlarından belirgin bir şekilde daha iyi olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar gliklazidin sistemik absorpsiyonunun kontrollü ve daha uzun bir sürede gerçekleşmesinin daha iyi kan şekeri regülasyonunun sağlanmasında çok daha etkili olduğunu göstermektedir.

Rastogi vd. (2007) izoniazid (INH) salımını uzatan ve modifiye emülsifikasyon metodu ile üretilen sodyum aljinatın hidrofilik taşıyıcı olarak kullanıldığı mikroküreleri incelemişler. Mikrokürelerin şekil ve yüzey özellikleri elektron mikroskopunda incelenmiştir. Hem ilaç yüklenmiş formülün hem de plasebo formülün partikül büyüklükleri SEM ile incelenmiş, partikül dağılımı ise optik mikroskop yardımıyla incelenmiştir. İlacın formülasyonda hangi fiziksel halde olduğu DSC (differential scanning calorimetry) ile belirlenmiştir. INH'nin gastrik ortamın (pH 1,2) ve intestinal ortamın (pH 7,4) taklit edildiği sıvılardaki salım özellikleri incelenmiştir. İlacın oral alımdan sonraki lokalizasyonu ve gastrointestinal (GI) yoldaki yayılımını belirlemek için gama-sintigrafisi çalışması yapılmıştır. Mikrokürelerin yüzeyinin pürüzsüz olduğu ve küresel yapıya sahip oldukları belirlenmiştir. Partiküllerin heterojen özellikte olduğu ve en büyük partikül boyutunun 3,719 µm olduğu saptanmıştır. Sonuçlar ortalama partikül boyutunun polimer ve çapraz bağlayıcının konsantrasyonunun artışına paralel bir artış izlediğini ve çapraz-bağlanma süresinin de aynı şekilde etki ettiğini göstermektedir. İlaç hapsedme etkinliğinin % 40-91 arasında olduğu bulunmuştur. Yüzde 7,5'lik bir orana kadar olan çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun ilaç hapsedme kapasitesini artırdığı ve ilaç salım süresini artırdığı gösterilmiştir. Optimize izoniazid-aljinat mikrokürelerinin iyi bir biyoadhezyon özellik gösterdiği belirtilmiştir (% 72,25±1,015). Partiküllerin biyoadheziv özellikleri sayesinde ince barsakta kalma süreleri uzamıştır. Çözünme ve gama-sintigrafi çalışmaları bu formülasyonun enterik yoldan ilaç verilmesi için umut vaadedici olduğunu göstermektedir.

Sarmento vd. (2007a) insülin molekülünün kitosan/aljinat nanopartiküllerinin içine hapsedikten sonraki yapısını incelemişlerdir. Bu çalışmadaki nanopartiküller iyonotropik polielektrolit pre-jelasyon tekniği ile hazırlanmıştır. Aljinat/kitosan kütle oranının ve nanopartikül oluşumu esnasındaki pH'nin değiştirilmesi suretiyle istenilen nanopartikül ortalama boyutu ve insülin etkinliği elde edilmiştir. İnsülinin sekonder yapısı ise ilacın nanopartikül tarafından hapsedilmesi ve gastrointestinal ortamda salınmasını takiben FTIR ve CD (circular dichorism) yöntemleri ile analiz edilmiştir. Yapılan FTIR analizi sonrasında alfa-heliks ve beta-sheet yapılarında belirgin bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir. Spektrum analizi de nanopartikül üretimi sürecinde insülin yapısında bir değişiklik olmadığını göstermiştir. Nanopartikül sistemi insülinin yapısının ve biyoaktivitesinin korunmasının sağlanması nedeniyle insülinin oral kullanımında umut vaat edici bir gelişme olarak değerlendirilebilir.

Li vd. (2008) aljinat ve kitosan nanopartiküllerden nifedipin salımını incelemişlerdir. Kitosan-aljinat (CS/ALG) nanopartikülleri aljinat çekirdeğin iyonik prejelasyon sonrasında kitosan ile polielektrolit kompleksi oluşturulması ile üretilmiştir. Bu çalışmada nifedipin model ilaç olarak seçilmiştir. Nanopartiküllerin morfolojisi ve yapısal özellikleri sırasıyla Transmission Elektron Mikroskopu (TEM) ve FTIR (Fourier transform infrared spectra) ile incelenmiştir. Nanopartiküllerin çapı 20-50 nm olarak ölçülmüştür ve bu çap ilacın gastrointestinal yol ile alınması için uygun aralıktadır ve gerekli mukoadheziv özellikleri taşımaktadır. Nanopartiküller içindeki nifedipin dozunun belirlenmesi için HPLC (reversed phase high performance liquid chromatographig) metodu kullanılmıştır. Ayrıca nanopartiküller içindeki nifedipinin dağılım özellikleri üzerinde durulmuştur. Kitosan-aljinat nanopartiküllerinden nifedipin salımı 24 saat sonrasında pH 1,5'te % 26,52, pH 6,8'de % 69,69, pH 7,4'te % 56,50 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar nifedipinin nanopartiküllerden salımının pH'ye bağlı olduğunu göstermektedir. İntestinal sıvı ortamının yaratıldığı suni deney ortamında (pH 6,8) ve fosfat tampon solüsyonunda (pH 7,4) salım hızlı olurken; gastrik sıvının taklit edildiği deney ortamında (pH 1,5) salım daha yavaş olmuştur. İlaç salımı her üç ortamda da önce hızlı bir salım şeklinde sonrasında ise kontrollü yavaş salım şeklinde gerçekleşmiştir.

Arora vd. (2010) gastrik mukozal tabakada derin bir şekilde yerleşim gösteren *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) bakterisinin eradikasyonunu amaçlayan mukopenetran nanopartiküllerin üretimini incelemişler. Bu alanda kullanılmakta

olan ilaç salım sistemlerinin pek çoğu yeterli mukoadhezyon veya mukopenetrasyon sağlayamamıştır ve bugüne kadar hem adhezyon hem de penetrasyon sağlayabilme özelliğine sahip bir ilaç bulunmamaktadır. Bu çalışmada amoksisilin içeren yeni CS-ALG PEC (kitosan-aljinat polielektrolit kompleksi) geliştirilmiş ve pH, polimerlerin karışım oranları, polimerlerin konsantrasyonları, ilaç ve sürfaktan gibi değişkenlere göre (Box-Behnken dizaynına göre) optimize edilmiştir. Partikül büyüklüğü, yüzey yükü, hapsolan ilacın yüzdesi ve nanopartiküllerin *in vitro* ve *in vivo* mukopenetrasyon ve mukoadhezyon özellikleri rat modelleri üzerinde çalışılmıştır. Optimize edilmiş FITC (Fluorescein isothiocyanate isomer I-Celite) etiketli CS-ALG PEC nanopartikülleri kitosan partiküllerine göre göreceli olarak daha düşük bir *in vitro* mukoadhezyon göstermiştir. Fakat 6 saatlik süreç boyunca gastrik mukozanın floransında meydana gelen artışla birlikte çok iyi bir mukopenetrasyon ve lokalizasyon sergiledikleri görülmüştür.

2.4. Aljinat ve Kitosanın Kolşisin Salım Sistemlerinde Kullanımı

Literatürde bugüne kadar böyle bir çalışma yapıldığına dair bir bilgiye ulaşılamamıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kimyasal ve Cihazlar

Kitosan (low molecular weight), kalsiyum klorür (CaCl_2) ve kolşisin Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya)'dan; Tween 80 ve hidroklorik asit (HCl) Merck (Dramstadt, Almanya)'dan; sodyum hidroksit (NaOH) ve sodyum asetat trihidrat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) Riedel-de Haen (Seelze, Almanya)'dan; asetik asit (glacial, % 99) ve potasyum klorür (KCl) Carlo Erba (Ronado, İtalya)'dan; potasyum fosfat tampon tableti (DPBS) Oxoid (Hampshire, İngiltere)'dan; glutraldehit Merck (Darmstadt, Almanya)'dan; diyaliz tüpü (molekül ağırlığı 12000 ve üzerindeki molekülleri geçirmiyor. Selüloz membran) (Sigma D-9777)'dan; sülfürik asit (H_2SO_4), sodyum sülfid (Na_2SO_3) J.T.Baker (Hollanda)'dan; sodyum aljinat (low viscosity) MP Biomedicals (Illkirch, Fransa)'dan temin edildi.

Deneylerde Shimadzu (UV-1601) spektrofotometre, Heidolph (Reax Top) vorteks, Heraeus (Fuktion Line) etüv, Hanna (HI190M) manyetik karıştırıcı, Hanna (pH 211) pH metre, soğutmalı su banyosu (BS 402), Vestel (White FR 540) buzdolabı, Ohaus-Pioneer (PA214C) 0,0001g duyarlıkta terazi, Labconco (Freezone 6) liyofilizatör, Memmert (WBU 45) ısıtıcı, Hettich (Universal 32R) santrifüj cihazı, 3K30 Sigma (Almanya) santrifüj cihazı, Brand (Transferpette) otomatik pipetler, GLF (2001/4) saf su cihazı, homojenizatör (İKA RW 16 basic), Velp (Multistirrer 15) çoklu magnetik karıştırıcı kullanıldı.

Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonu için ADÜ Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan FTIR spektrofotometresi (Varian FTS 7000, USA), İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü-Malzeme Araştırma Merkezi'nde bulunan taramalı elektron mikroskobu (SEM, Philips XL-30S FEG) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM, Digital Instruments-MMSPM nanoscope IV) kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kolşisin Çalışma Grafiğinin Hazırlanması

Çalışmada absorbans ölçümlerinin gerçekleştirileceği dalga boyuna karar vermek için 100 mg saf kolşisin 100 mL saf suda çözülerek 1 mg/mL'lik stok çözelti hazırlandı. Bu çözelti 500 kat seyreltildi ve çözeltinin UV-Gör spektrofotometrede

400-200 nm aralığında spektrumu alındı. Spektrumda 353 ve 245 nm dalga boylarında 2 pik görüldü. Bundan sonraki absorbans ölçümlerinin 353 nm dalga boyunda yapılmasına karar verildi. Çalışılacak derişim aralığını kapsayan çalışma grafiği de aşağıdaki gibi hazırlandı:

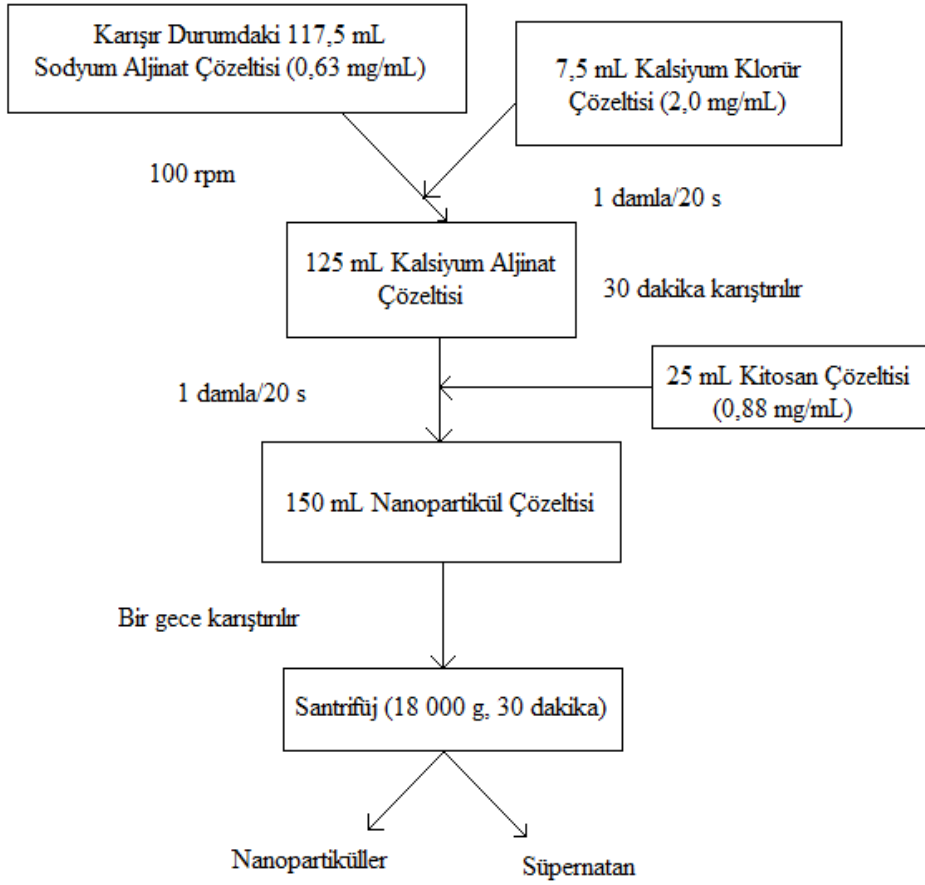
100 mg saf kolşisin 100 mL saf suda çözülererek 1.0 mg/mL'lik stok çözelti hazırlandı. Bu çözelti 50 kat seyreltildi. Bu stok çözeltiden son derişimler sırasıyla 0,0025; 0,005; 0,01; 0,012; 0,014; 0,016; 0,018 ve 0,02 mg/mL olacak şekilde 0,375; 0,75; 1,5; 1,8; 2,1; 2,4; 2,7 ve 3,0 mL tüpe alınarak son örnek hariç diğerleri saf su ile 3.0 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltilerin 353 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Absorbans değerleri kolşisin derişimlerine karşı grafiğe geçirildi. Bu çalışmanın ve bundan sonraki çalışmaların tüm denemeleri 3 tekrarlı gerçekleştirildi.

3.2.2. Aljinat Temelli İlaç Salım Partiküllerinin Hazırlanması

Aljinat doğal polimeri kullanılarak mikroküre, nanopartikül, boncuk gibi taşıyıcı birimlerin oluşturulması mümkündür. Aljinat polimerinin taşıyıcı olarak CaCl_2 ile çapraz bağlanarak yalnız başına kullanılması mümkün olabildiği gibi; bir diğer doğal polimer olan kitosan ile birlikte ve glutaraldehit çapraz bağlayıcısı ile de kullanılarak nanopartikül oluşturulabilir. Çalışmamızda nanopartikül oluşturulması planlandığından öncelikle bu partiküllerin sentezi denendi. Denenen her tip üretimin tutunma ve salım parametreleri incelenerek son üretimin hangi kombinasyonda yapılacağına karar verildi.

3.2.2.1. Boş Aljinat/Kitosan Nanopartiküllerin Hazırlanması

Aljinat/kitosan nanopartiküller Sunna (2012, yüksek lisans tezi) ve Sarmento vd. (2007b)'e göre hazırlandı. Bunun için 0,05 g CaCl_2 25,0 mL suda, 0,074 g sodyum aljinat 117,5 mL suda ve 0,022 g kitosan 25 mL % 1'lik asetik asit çözeltisinde çözüldü. Karışır durumda olan 117,5 mL sodyum aljinat (0,63 mg/mL) çözeltisine 7,5 mL kalsiyum klorür çözeltisi (2,0 mg/mL) damlalıkla 20 saniyede bir damla olacak şekilde eklendi. Bu işlem yaklaşık 50 dakika sürdü. Çözelti 30 dakika karıştırıldıktan sonra 25 mL kitosan çözeltisi karışmakta olan çözeltiye 20 saniyede bir damla olarak eklendi. Çözelti oda sıcaklığında hava ve ışık almayacak şekilde düşük devirde karışır durumda bir gece bırakıldı. Boş nanopartikül hazırlama süreci Şekil 3.1'de şema ile gösterilmiştir.

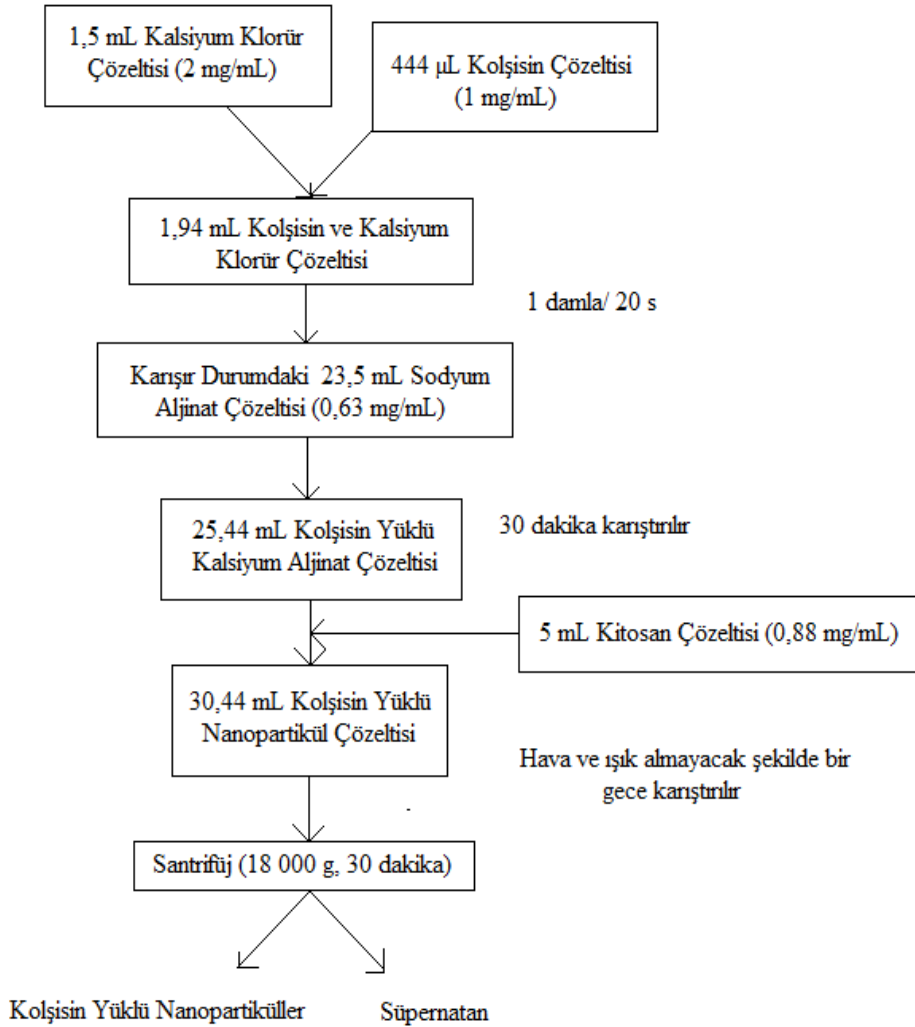


Şekil 3.1. Boş aljinat /kitosan nanopartikül oluşturma sürecinde işlem şeması.

3.2.2.2. Kolşisin Yüklü Aljinat/Kitosan Nanopartiküllerin Hazırlanması

Kolşisin stok çözeltisinden (1,0 mg/mL) seçilen derişimde alınıp 1,5 mL kalsiyum klorür çözeltisi (2,0 mg/mL) içerisine eklendi. Bu çözelti karıştır durumda olan 23,5 mL sodyum aljinat (0,63 mg/mL) çözeltisine damlalıklarla 20 saniyede bir damla damlatıldı. Otuz dakika karıştırıldıktan sonra karıştırılmakta olan çözeltiliye 5,0 mL kitosan çözeltisi 20 saniye aralıklarla birer damla damlatılarak eklendi. Çözelti oda sıcaklığında hava ve ışık almayacak şekilde düşük devirde karıştır durumda bir gece dinlenmeye bırakıldı. Ertesi gün çözelti 18 000 g'de 30 dakika santrifüj edilip süpernatan alındı. Spektrofotometrede 353 nm'de absorbans

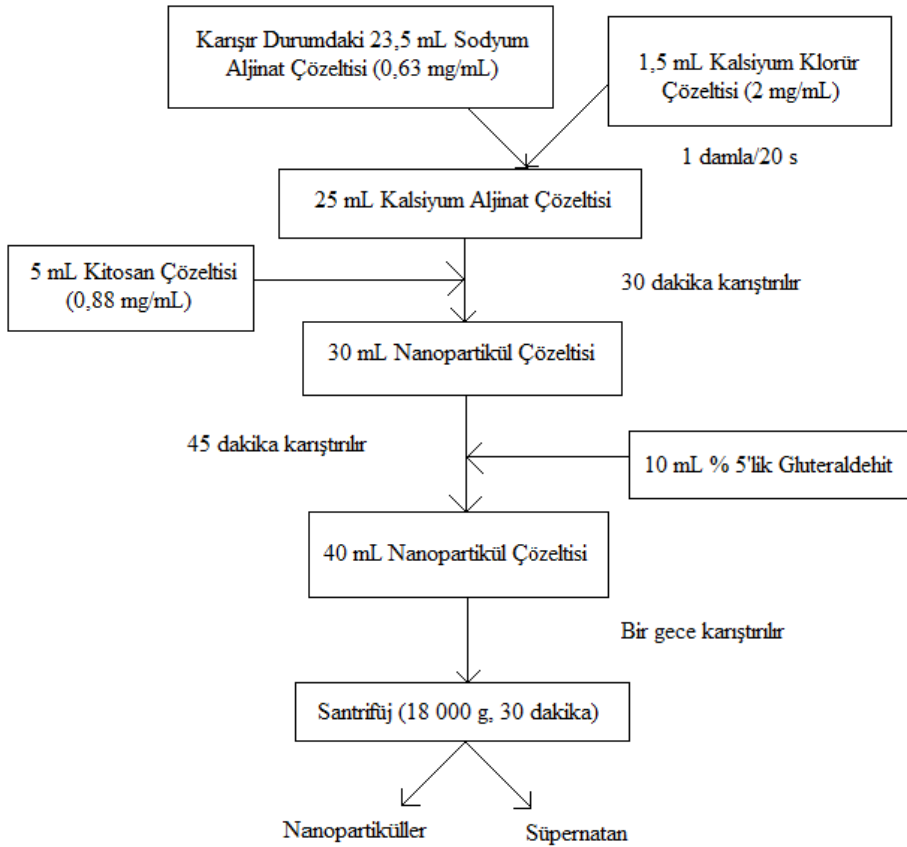
ölçümleri yapıldı. Kör olarak saf su kullanıldı. Hazırlanan kolşisin çalışma grafiğinin denkleminde yararlanılarak kolşisin % tutuklanma değeri “100 - [(süpernatant kolşisin/toplam kolşisin)x100]” formülü ile hesaplandı. Kolşisin yüklü nanopartikül hazırlama süreci Şekil 3.2’de şematize edilmiştir.



Şekil 3.2. Kolşisin yüklü aljinat /kitosan nanopartikül oluşturma işlemi

3.2.2.3. Boş Aljinat/Kitosan/Glutaraldehit Nanopartiküllerinin Hazırlanması

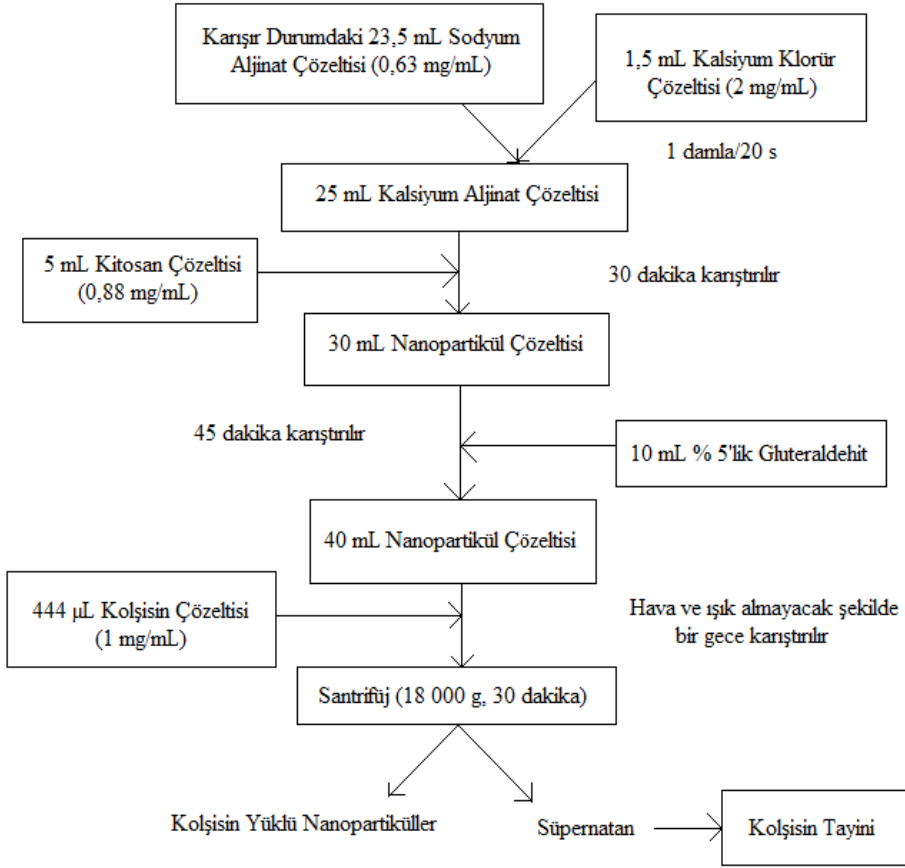
Karışır durumda olan 23,5 mL sodyum aljinat (0,63 mg/mL) çözeltisine 1,5 mL kalsiyum klorür çözeltisi (2,0 mg/mL) 20 saniyede bir birer damla eklendi. 30 dakika karıştırıldıktan sonra karışım halinde olan çözeltiliye 5,0 mL kitosan çözeltisi 20 saniye aralıklarla birer damla damlatıldı. Çözelti 45 dakika karıştırıldıktan sonra çözeltiliye 10 mL % 5'lik glutaraldehit eklenip karıştırılmaya devam edildi. Çözelti oda sıcaklığında hava ve ışık almayacak şekilde düşük devirde karışır durumda bir gece dinlenmeye bırakıldı. Gluteraldehit çapraz bağlı boş aljinat/kitosan nanopartiküllerin hazırlanması için yapılan işlemler Şekil 3.3'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.3. Boş aljinat/kitosan/glutaraldehit nanopartikül oluşturma sürecinde işlem şeması.

3.2.2.4. Kolşisin Yüklü Aljinat/Kitosan/Glutaraldehit Nanopartiküllerin Hazırlanması

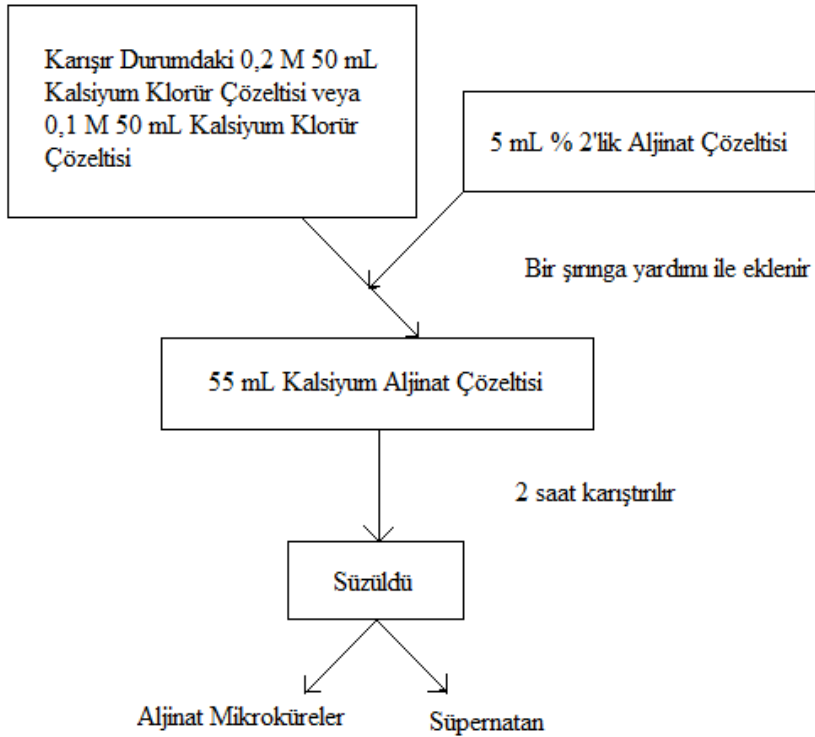
Karışır durumda olan 23,5 mL sodyum aljinat (0,63 mg/mL) çözeltisine 1,5 mL kalsiyum klorür çözeltisi (2,0 mg/mL) 20 saniyede bir birer damla eklendi. 30 dakika karıştırıldıktan sonra karışım halinde olan çözeltiliye 5 mL kitosan çözeltisi 20 saniye aralıklarla birer damla damlatıldı. Çözelti 45 dakika karıştırıldıktan sonra çözeltiliye 10 mL % 5'lik glutaraldehit eklenip karıştırılmaya devam edildi. Bir saat sonra kolşisin stok çözeltisinden (1,0 mg/mL) 444 µl eklendi ve çözelti oda sıcaklığında hava ve ışık almayacak şekilde düşük devirde karışır durumda bir gece dinlenmeye bırakıldı. Ertesi gün çözelti 18 000 g'de 30 dakika santrifüj edilip süpernatant alınıp 353 nm'de absorban ölçümleri yapıldı. Hazırlanan kolşisin çalışma grafiğinin denkleminde yararlanarak kolşisin % tutuklanma değeri hesaplandı. Kolşisin yüklü glutaraldehit çapraz bağlı aljinat/kitosan nanopartiküllerin hazırlanması için izlenen işlem sırası 3.4'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.4. Kolşisin yüklü aljinat/kitosan/glutaraldehit nanopartikül oluşturma sürecinde işlem şeması.

3.2.2.5. Boş Aljinat Mikrokürelerinin Hazırlanması

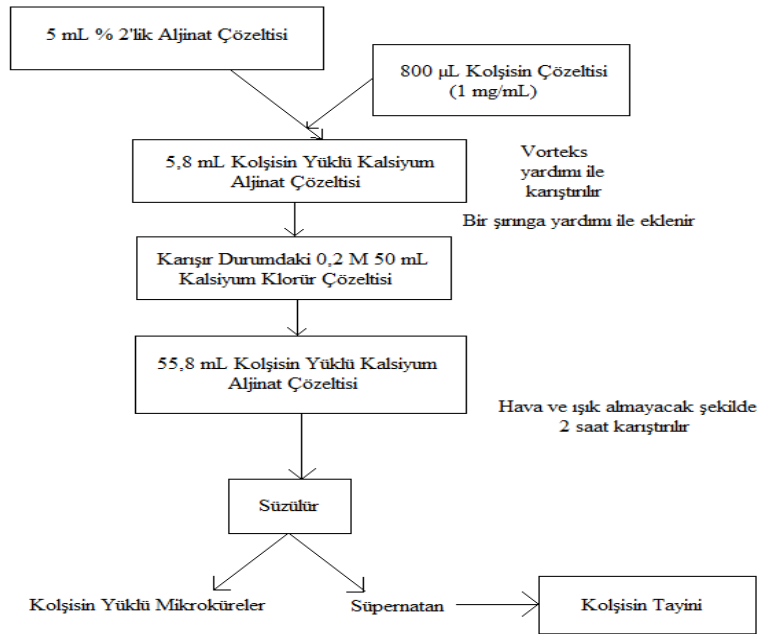
Beş mL % 2'lik aljinat çözeltisi bir tüpe alındı. Bu çözelti 0,2 M 50 mL karıştır durumda olan kalsiyum klorür çözeltisine bir şırınga yardımıyla damla damla eklendi. Çözelti oda sıcaklığında hava ve ışık almayacak şekilde düşük devirde 2 saat karıştırıldı. Aynı işlemler 0,1 M 50 mL kalsiyum klorür çözeltisi için tekrarlandı. Boş aljinat kürelerin hazırlanması Şekil 3.5'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.5. Boş aljinat mikroküreleri oluşturma sürecinde işlem şeması.

3.2.2.6. Kolşisin Yüklü Aljinat Mikrokürelerin Hazırlanması

Beş mL % 2'lik aljinat çözeltisi bir tüpe alındı. Bu çözeltinin üzerine kolşisin stok çözeltisinin (1,0 mg/mL) hesaplı miktarı eklenip vorteks yardımıyla karıştırıldı. Bu çözelti 0,2 M 50 mL karıştırıcı durumda olan kalsiyum klorür çözeltisine bir şırınga yardımıyla damla damla eklendi. Çözelti oda sıcaklığında hava ve ışık almayacak şekilde düşük devirde 2 saat karıştırıldıktan sonra süzüldü. Kolşisin çalışma grafiği kullanılarak süzüntüde kolşisin derişimi hesaplandı. Aynı işlemler 0,1 M 50 mL kalsiyum klorür çözeltisi için tekrarlandı. Kolşisin yüklü aljinat kürelerin hazırlanması Şekil 3.6'da şematize edilmiştir.



Şekil 3.6. Kolşisin yüklü aljinat mikroküreleri oluşturma sürecinde işlem şeması.

Diğer bir aljinat küre hazırlama yönteminde (Lee vd., 1999). 250 mg aljinat 12,5 mL distile suda çözüldü. Bu çözeltiye 250 mg kolşisin eklenip çözelti oda sıcaklığında hava ve ışık almayacak şekilde düşük devirde 2 saat karıştırıldı. Bu karışım 12,5 mL 0,2 M kalsiyum klorür çözeltisine şırınga yardımıyla damla damla ilave edilip 15 dakika beklendikten sonra süzüntü ayrıldı. Kolşisin çalışma grafiği kullanılarak süzüntüde kolşisin tayini yapıldı.

3.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.3.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektroskopi) Ölçümleri

Aljinat, kitosan, kolşisin, glutaraldehit, boş aljinat/kitosan/glutaraldehit nanopartiküller ve kolşisin yüklü aljinat/kitosan/glutaraldehit nanopartiküllerin FTIR spektrumları alınarak boş ve ilaç yüklü partiküllerin IR davranışları incelendi. Bunun için boş ve kolşisin yüklü aljinat/kitosan/glutaraldehit nanopartiküller hazırlandı ve 18000 g'de 30 dakika santrifüj edilip süpernatant ayrıldı. Çöken nanopartiküller buzdolabında dondurulup liyofilizatörde 2 gün boyunca suyu uzaklaştırıldı. Toz haline getirildi. Kuru örnekten bir miktar alındı. KBr ile karıştırılarak pellet haline getirildi ve FTIR aygıtı kullanılarak spektrumu alındı. Bu çalışma 5°C, 15°C, 25°C, 35°C, 45°C ve 55°C sıcaklıklarda hazırlanan nanopartiküller için gerçekleştirildi.

3.3.2. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) Ölçümleri

Sentezlenen nanopartiküllerin morfolojisi AFM ile incelendi. Bunun için, farklı sıcaklıklarda hazırlanan boş ve kolşisin yüklü nanopartikül çözeltileri saf su ile 100 kat seyreltildi ve seyreltilmiş çözeltilerden birer damla 1x1 cm boyutlarında cam yüzeye damlalık yardımıyla damlatılarak dağıtıldı. Etüvde 40 °C sıcaklıkta kurutuldu ve ölçümleri gerçekleştirildi.

3.3.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri

Bu ölçümler hazırlanan nanopartiküllerin boyutları ve yüzey özellikleri hakkında bilgi verir. Bunun için hazırlanan boş ve kolşisin yüklü nanopartiküller çözelti halinde buzdolabında dondurulup liyofilizatörde 4 gün suyu uzaklaştırıldı. Toz haline getirildikten sonra nanopartiküllerin SEM ölçümleri taramalı elektron mikroskobuyla gerçekleştirildi.

3.4. Nanopartiküller İçin Kütle/Hacim Grafiğinin Hazırlanması

Boş aljinat/kitosan/glutaraldehit nanopartiküller hazırlandı. Nanopartikül çözeltisinin çöktürülmesinde kullanılacak olan boş olarak ependorflar tartıldı. Nanopartikül çözeltisinden sırasıyla 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 ve 8,0 mL ependorflara alınarak 18 000 g'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı. Kalan polimer etüvde 40°C sıcaklıkta 24 saat kurutuldu. Kuru

nanopartikülleri içeren ependorflar tartıldı. Boş ependorfların kütleleri kuru nanopartikülleri içeren ependorfların kütlelerinden çıkarıldı ve kuru nanopartiküllerin kütlesi hesaplandı. Çözelti hacimlerine karşılık gelen polimer kütleleri yazılarak kütle/hacim grafiği çizildi.

3.5. İlaç Tutuklama Kapasitesine Sıcaklığın Etkisi

Belirlenen 10 mg aljinat/0,3 mg kolşisin oranı için yükleme kapasitesine sıcaklığın etkisi incelendi. Bunun için kolşisin yüklü nanopartiküller hazırlandı. Hazırlanan çözelti 5°C, 15°C, 25°C, 35°C, 45°C ve 55°C sıcaklıklarda karışır durumda bir gece bırakıldı. Ertesi gün kolşisin yüklü nanopartiküller 18000 g'de 30 dakika santrifüjlenerek ayrıldı. Süpernatant alınıp 353 nm'de absorbanans ölçüldü. Her sıcaklık için miligram nanopartikül başına kolşisin tutuklama kapasitesi hesaplandı.

3.6. Fizyolojik Koşulların İlaç Salınımına Etkilerinin Saptanması

3.6.1. pH Çalışması

İlaç salınımına pH etkisini incelemek üzere pH'ı 1,2 (mide sıvısı), pH'ı 1,5 (mide sıvısı), pH'ı 3,0 (mide sıvısı), pH'ı 6,8 (intestinal sıvı) ve pH'ı 7,4 (kan) olan çözeltilerde optimum pH çalışması yapıldı. Salım çalışmaları Yongmei vd. (2002)'ye göre diyaliz tüpü kullanılarak gerçekleştirildi. Diyaliz tüpü kullanılmadan önce aşağıdaki ön işlemlerden geçirildi;

- 1) Diyaliz tüpünden gliserini uzaklaştırmak için diyaliz tüpü oda sıcaklığında 3-4 saat saf suda bekletildi.
- 2) Diyaliz tüpü sülfür bileşiklerinin uzaklaştırılması için % 0,3 sodyum sülfid (Na_2SO_3) çözeltisinde 80 °C'de 1 dakika ısıtıldı.
- 3) Diyaliz tüpü 60°C'de sıcak suda 2 dakika bekletildi.
- 4) Diyaliz tüpü % 0,2 H_2SO_4 çözeltisinde 3-4 dakika asitlendirildi.
- 5) Daha sonra asidi uzaklaştırmak için diyaliz tüpü 60°C'deki sıcak su ile hafifçe çalkalandı.

3.6.1.1. Kolşisinin *in vitro* Mide Ortamında Salımının İncelenmesi

Mide ortamını *in vitro* olarak taklit etmek için çözeltiler hazırlandı: pH'ı 1,2 olan NaCl/HCl çözeltisi (2,0 g/L NaCl) hazırlamak için 400 mg NaCl alınıp 200 mL suda çözüldü. Bu çözeltiliye HCl damlatılarak pH'ı 1,2'ye düşürüldü. 50 mL 0,2 M KCl çözeltisi ve 41,4 mL 0,2 M HCl çözeltisi kullanılarak pH'ı 1,5 olan 200 mL HCl/KCl çözeltisi hazırlandı. 0,1M 982,3 mL asetik asit çözeltisi ve 0,1 M 17,7 mL sodyum asetat çözeltisi kullanılarak 200 mL pH'ı 3,0 olan asetik asit/sodyum asetat çözeltisi hazırlandı. Kolşisin yüklü nanopartiküller 18 000 g'de 30 dakika falkon tüplerde santrifüjlenerek ayrıldı. Falkon tüpteki kolşisin yüklü nanopartiküller pH'ı 1,2; pH 1,5 ve pH 3,0 olan çözeltilerin 7,0 mL'si ile yıkanarak aktiveleştirilmiş diyaliz tüpüne aktarıldı. Diyaliz tüpü her iki ucundan bağlanarak 100 mL çözelti (pH'ı 1,2; pH 1,5 ve pH 3,0) içeren 200 mL'lik şişelere yerleştirildi. Çözeltiler hava ve ışık almayacak şekilde sarıldı. Sıcaklık 37 °C'ye ayarlandı ve çözeltiler karıştırılmaya başlandı. Bu çözeltilerden her saat başı 10 mL örnek alındı. Her seferinde, ortama alınan örnek kadar temiz çözelti (pH'ı 1,2; pH 1,5 ve pH 3,0) geri eklendi. 5 saat boyunca alınan örneklerin 353 nm'de absorbanlarına bakıldı.

3.6.1.2. Kolşisinin *in vitro* İnce Bağırsak Ortamında Salımının İncelenmesi

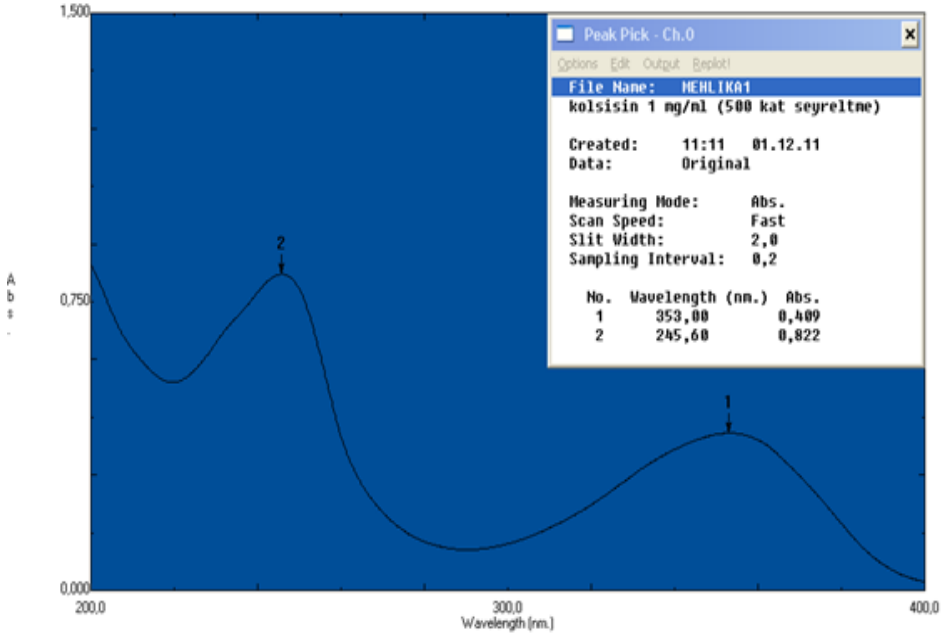
İnce bağırsak ortamını *in vitro* olarak taklit etmek için kullanılan pH 6,8 ve pH 7,4 ortamları potasyum fosfat tuzu tabletlerinin (DPBS) saf suda çözülmesi ve %1'lik Tween 80 çözeltisi ilavesi ile hazırlandı. Kolşisin yüklü nanopartiküller 18 000 g'de 30 dakika falkon tüplerde santrifüjlenerek ayrıldı. Falkon tüpteki kolşisin yüklü nanopartiküller pH 6,8 ve pH 7,4 olan çözeltilerin 7,0 mL'si ile yıkanarak aktiveleştirilmiş diyaliz tüpüne aktarıldı. Diyaliz tüpü her iki ucundan bağlanarak 100 mL çözelti (pH'ı 6,8 ve pH 7,4) içeren 200 mL'lik şişelere yerleştirildi. Çözeltiler hava ve ışık almayacak şekilde sarıldı. Sıcaklık 37 °C'ye ayarlandı ve çözeltiler karıştırılmaya başlandı. Bu çözeltilerden her saat başı 10 mL örnek alındı. Her seferinde, ortama alınan örnek kadar temiz çözelti (pH'ı 6,8 ve pH 7,4) geri eklendi. 5 saat boyunca alınan örneklerin 353 nm'de absorbanlarına bakıldı. Kolşisin çalışma grafiği kullanılarak salınan kolşisin miktarı hesaplandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kolşisin Çalışma Grafiği

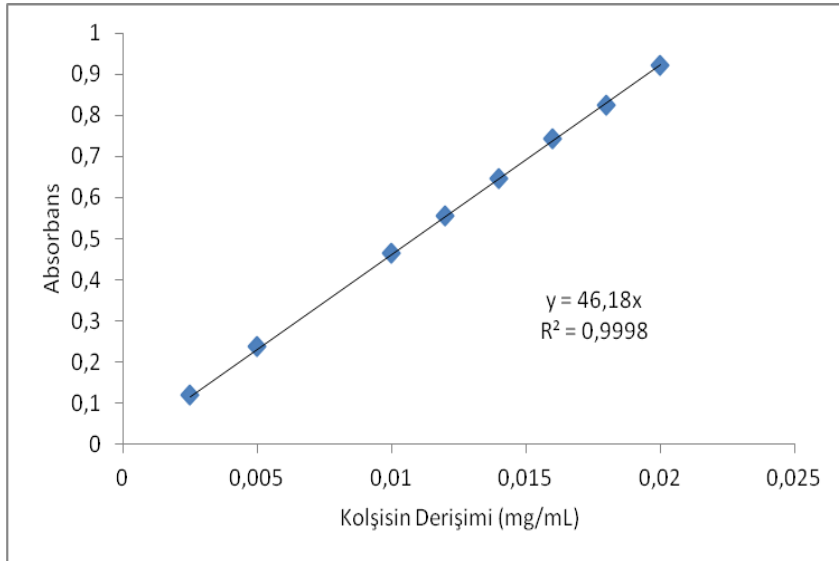
Çalışmanın her aşamasında çözeltide kolşisin derişimi tayini gerekmektedir. Bu tip bir tayin için eğer mümkünse UV-Vis bölgede absorbens ölçümü yapılır ve Lambert-Beer yasasından yararlanılarak derişim hesaplanır. Kolşisin UV-Vis bölgede absorbens yapan bir bileşiktir. Bu nedenle spektrofotometre ile tayini mümkün olmuştur.

Çalışmada absorbens ölçümlerinde kullanılacak dalga boyuna karar vermek için 1,0 mg/mL'lik stok kolşisin çözeltisinden 100 µL alınıp 500 kat seyreltildi ve çözeltinin UV-Vis spektrofotometrede 400-200 nm aralığında spektrumu alındı. Spektrumda 353 ve 245 nm dalga boylarında 2 pik görüldü. Bu spektrum Şekil 4.1'de görülmektedir. Bu dalga boylarından hangisinin kullanılacağına Patial ve Verma (2012)'ye göre karar verildi. Buna göre her iki dalga boyunda farklı kolşisin derişimlerinde absorbens okunduğunda 245 nm'de 2-12 µg/mL aralığında 353 nm'de ise 6-22 µg/mL aralığında doğrusal ilişki (Lambert –Beer yasasına uygunluk) tespit edilmiştir. Öte yandan kolşisin 245 nm' deki molar absorbtivitesi (ϵ) 353 nm' dekinden daha büyük olduğu için yüksek derişimli çözeltilerin absorbens okumalarında 245 nm' de doğrusal bölgenin çok üstüne çıkılmakta olduğu tespit edildi. Bu nedenle kolşisin derişim ölçümleri 353 nm dalga boyunda gerçekleştirildi.



Şekil 4.1. Kolşisin bileşiğinin UV-Vis bölgedeki absorpsiyon spektrumu.

Bu işlemden sonra kolşisin çözeltisinin çalışma grafiği hazırlandı. Kolşisinin 353 nm'deki absorbansı kullanılarak hazırlanan standart çalışma grafiği Şekil 4.2'de görülmektedir.



Şekil 4.2. Kolşisin çalışma grafiği ($\lambda=353$ nm).

Bu grafiğin kullanılan kolşisin derişim aralığında doğrusal olduğu ($R^2= 0.9998$) tespit edildi ve standart çalışma grafiğı olarak kullanıldı.

4.2. Nanopartikül ve Mikroküre Oluşturma Çalışmaları

Aljinat doğal polimerine kolşisin tutuklanma çalışması ilk kez gerçekleştiğinden kullanılacak aljinat/kolşisin oranı ve aljinatın tek başına veya kitosan ve/veya glutraldehit ile birlikte kullanıldığı değişik kombinasyonlar denendi. Bu çalışmanın başlangıcındaki amaç kontrollü kolsisin salımı yapacak bir ilaç salım sisteminin oluşturulması idi. Kitosan ile kaplanmış kalsiyum aljinat polimeri çıkış maddesi olarak planlanmış idi. Ancak; kolşisin molekülünün sudaki çözünürlüğünün fazla (45 mg/mL) olması ve molar absorpsiyonu katsayısının çok yüksek ($\epsilon^{mm}=16,6$) olması üretilecek salım sisteminin bileşiminin çok dikkatli ayarlanması ve ölçüm sistemlerinde de sürekli seyreltme yapılması gerektiğini göstermiştir. Çizelge 4.1’de denenen bileşimler ve kolşisin tutulma yüzdeleri özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Nanopartikül ve mikroküre oluşturma çalışmalarında denenen bileşimler ve kolşisin tutulma yüzdeleri

Sistem Bileşimi	Sistem Türü	Ölçülen En Yüksek Tutulma Yüzdesi
Aljinat + CaCl₂	Mikroküre	% 13,5
Aljinat + CaCl₂ + Kitosan	Nanopartikül	% 11,8
Aljinat + CaCl₂ + Kitosan + Glutraldehit	Nanopartikül	% 19,5

Çizelge 4.1’den de görüldüğü üzere sadece kalsiyum aljinat kullanılarak hazırlanan mikrokürelerde kolsisin tutulması % 13,5 olarak bulunmuştur. Bu sonuç üzerine oldukça sık kullanılan bir uygulama olan (Sarmiento vd., 2007b) polianyonik bir yapısı olan aljinat polimerinin polikatyonik yapıdaki kitosan ile kaplanarak nanopartiküller sentezlenmiştir. Ancak bu nanopartiküllerden de

kolşisin sızması çok olduğu için tutulma % 11,5 olarak tespit edilmiştir. Bir başka uygulama olan aljinat/kitosan ikilisinin bir çapraz bağlayıcı (bu çalışmada glutraldehit) ile bağlanması denenmiştir. Tablo 4.1'den de görüldüğü üzere aljinat/kitosan/kalsiyum klorür/glutraldehit nanopartiküllerinde kolşisin tutuklanması % 20 civarında olduğu için bu sistemin iyi bir salım sistemi olabileceğine karar verilmiş, karakterizasyon ve *in vitro* ölçümlerine bu nanopartiküller kullanılarak devam edilmiştir. Öte yandan ilaç salım sistemlerinde % 20 civarındaki bir tutuklanma başlangıç için iyi bir sonuç değildir.

Ancak, kolşisin yukarıda bahsedilen nedenlerle tutuklanma özellikleri düşük olan bir moleküldür. Literatürde kolşisin tutuklanması ile ilgili çalışmaların yok denecek kadar az olması da muhtemelen bu sebeptendir. Az sayıda olan bu çalışmalardan birinde (Kulkarni vd., 1997) kolşisin salımı için lipozomal formülasyonların kullanılması denenmiş ve çeşitli kombinasyonlar ile (farklı lipid türleri ve farklı yüklü tanecikler) elde edilen maksimum enkapsülasyon yüzdesi yaklaşık % 34 olarak tespit edilmiştir.

Öte yandan çeşitli Span 60 ve kolesterol oranlarında hazırlanmış niozomlardan kolşisinin enkapsülasyon etkinliği % 100'e yakın olarak bulunmuştur (Yongmei vd., 2002). Bu çalışmalar sudaki çözünürlüğü oldukça yüksek olan kolşisin gibi ilaçların hidrofobik özellikleri olan sistemlerde daha iyi tutunacağını ifade etmektedir. Öte yandan lipozom ve niozom sistemlerinin mide bariyerini geçerken lipaz enzimlerinin etkisi ile ilacın vaktinden önce çözülmesi de mümkündür.

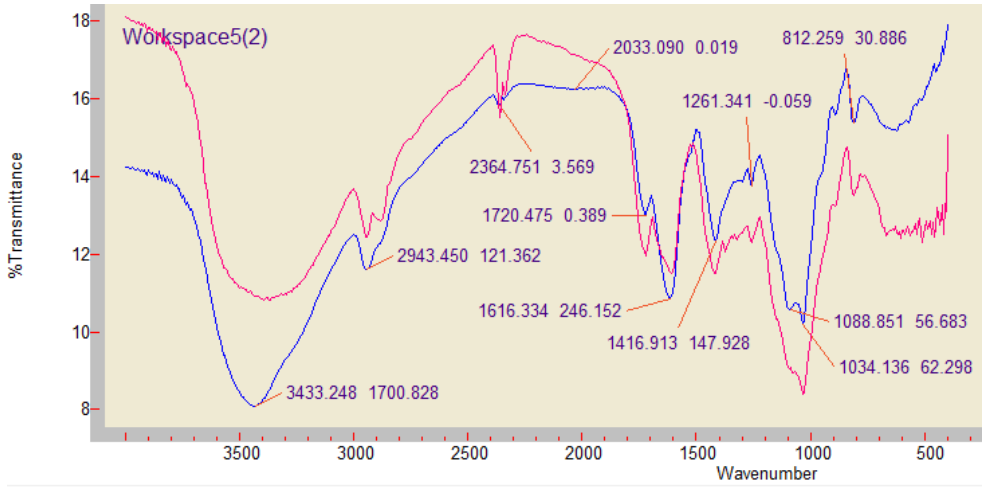
Nanopartikül oluşturulmasında sadece aljinat ve kitosan kullanıldığı durumda sonuçlar yeterli ilaç tutuklanmasının gerçekleşmediğini gösterdiği için nanopartikül oluşturulması yerine mikroküre oluşturma yoluna gidildi. Ancak, mikrokürelerde de ilaç tutuklanma yüzdesi düşük olduğu için nanopartiküllerin bir çapraz bağlayıcı varlığında oluşturulması için üçüncü bir çalışma gerçekleştirildi. Bu nanopartiküllerde kolşisin tutuklanması tespit edildiğinden çalışmaya aljinat/kitosan/glutraldehit kombinasyonu ile devam edildi.

4.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

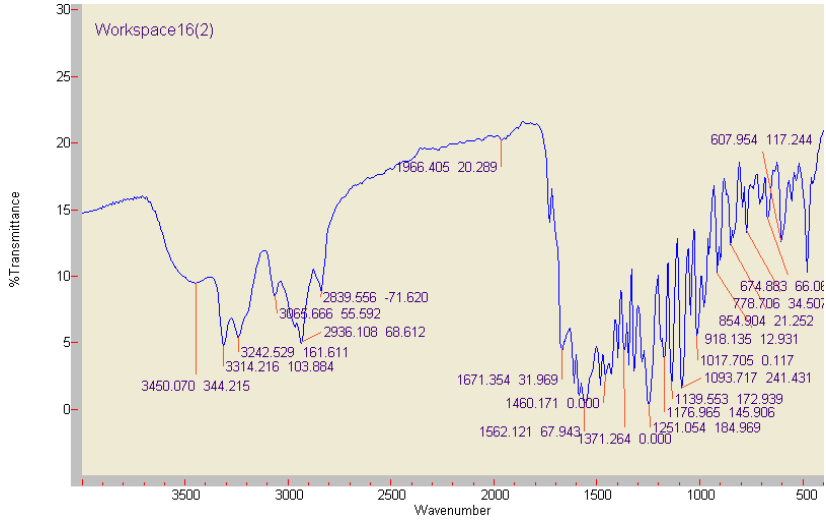
4.3.1. FTIR ölçümleri

FTIR spektrumları ilacın polimere inkopere olup olmadığının bir göstergesi olarak kullanılabilir. Şekil 4.3-4.4'de FTIR spektrumları görünmektedir.

Bu spektrumlarda kolşisinin varlığı çok kuvvetli bir gösterge ile ıspatlanmamakla birlikte yöntem bölümünde anlatıldığı üzere nanopartiküllerde kolşisinin kütesinin total kitle içinde çok küçük bir oran oluşturan kolşisinin muhtemel parmak izi bölgesi piklerinin polimerin diğer bileşenleri tarafından kapatıldığı düşünülmektedir.



Şekil 4.3. Boş ve kolşisin yüklü nanopartiküllerin FTIR spektrumu (Mavi: Boş aljinat/kitosan/glutaraldehit nanopartiküller; Kırmızı: Kolşisin yüklü nanopartiküller)



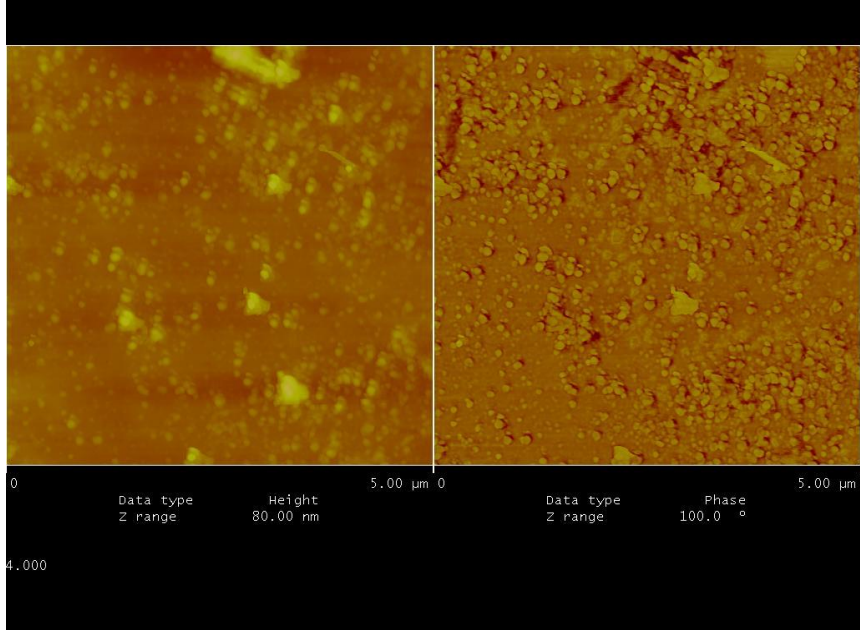
Şekil 4.4. Kolşisin molekülünün FTIR spektrumu

4.3.2 AFM ve SEM Sonuçları

Son yirmi beş yıldır taramalı prop mikroskopi (SPM) tetkikleri çeşitli alanlarda materyal karakterizasyonu için kullanılır olmuştur. Bu tetkikler içinde atomik kuvvet mikroskopi (AFM) materyal karakterizasyonu için en fazla kullanılanıdır. Bir başka deyişle AFM Angstrom düzeyinden mikron seviyesine kadar olan büyüklükte 3D topogafi görüntülerini analizleme yeteneğine sahip bir tekniktir. Nanopartikül oluşturma çalışmalarının hemen hemen hepsinde tanecik morfolojisi AFM ile görüntülenerek incelenir.

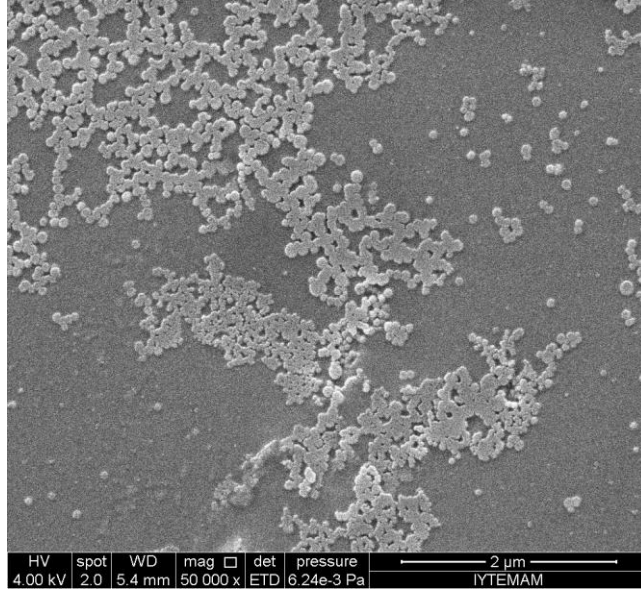
Partikül karakterizasyonu söz konusu olduğunda “her işe yarayan” tek bir enstrüman yoktur. Aslında partikül “sayısını”, “boyutlanması”, “analizi” ve “karakterizasyonu” için 400’den fazla teknik bulunmaktadır. Araştırmanın türüne göre yapılması gereken ölçümler dikkate alınarak yöntemler belirlenir. Nano düzeyindeki partiküllerin karakterizasyonunda en fazla kullanılan teknikler SEM, TEM ve AFM’dir. TEM ve SEM teknikleri geliştirilen tek bir partikülün karakterizasyonu ile görüntüleme tekniklerinin bileşiminden oluşur. AFM ise daha sonra geliştirilen ve bireysel partikül karakterizasyonuna hacim, şekil, büyüklük ve tanecik morfolojisi parametrelerini de katan bir tekniktir.

Yöntem bölümünde açıklandığı şekilde hazırlanan kolşisin tutuklanmış aljinat/kitosan/glutaraldehit nanopartiküllerinin AFM görüntüsü Şekil 4.5’de görülmektedir. Hazırlanmış nanopartiküllerin yaklaşık 100 nm boyutlarında olduğu görülmektedir.

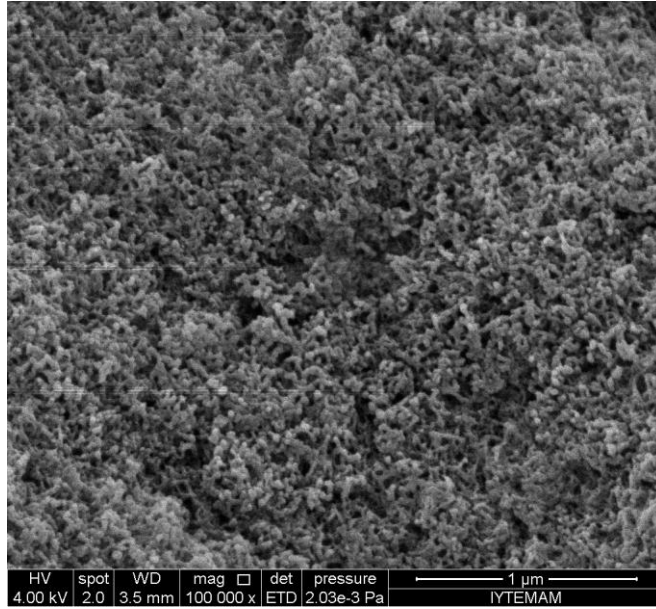


Şekil 4.5. Nanopartiküllerin AFM ile çekilmiş fotoğrafı.

SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) tekniği ile elde edilen görüntüler Şekiller 4.6-4.7’de görülmektedir.



Şekil 4.6. Boş aljinat/kitosan/glutaraldehit nanopartiküllerin SEM ile çekilmiş fotoğrafı

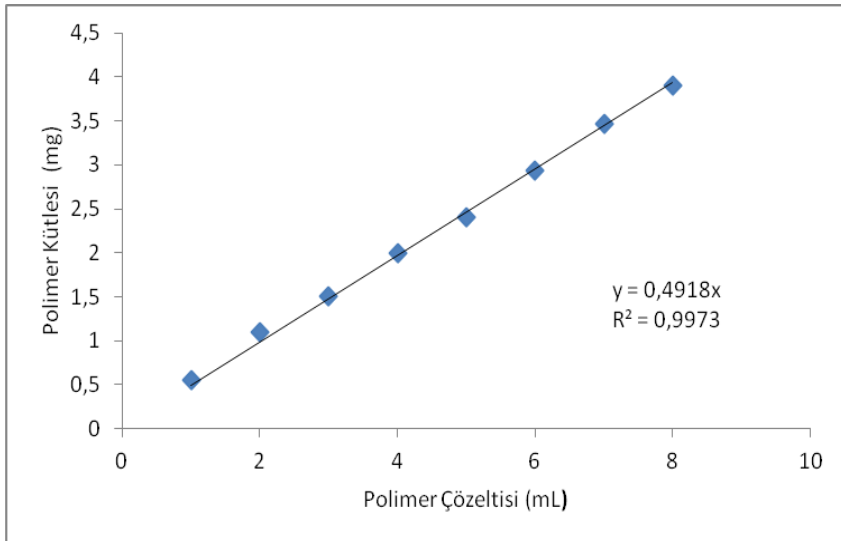


Şekil 4.7. Kolşisin yüklü aljinat/kitosan/glutaraldehit nanopartiküllerin SEM ile çekilmiş fotoğrafı

Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) örneğe odaklanmış bir elektron demeti ile tarama yaparak görüntü oluşturma tekniğidir. Elektronlar örnekteki elektronlarla etkileşir ve örneğin yüzey topografisi ve bileşimi hakkında bilgi veren sinyaller üretilir. SEM'in kullanılabilmesi için örneğin iletken olması ve yüzeyin topraklanmış olması gerekir. Aljinat/kitosan gibi iletken olmayan polimerlerin tanecek yüzeyi ultra ince iletken bir film ile (genellikle altın; altın/paladyum alaşımı; pilatin; osmiyum gibi) kaplanır. Bu çalışmada elde edilen SEM görüntüsü için hazırlanan örnek de altın ile kaplanarak analizlenmiştir.

4.4. Nanopartiküllerin Kütle/Hacim Grafiğinin Oluşturulması

Nanopartikül oluşturma işleminin ne kadar verimle gerçekleştiğini belirlemek için kütle/hacim grafiği oluşturuldu. Boş nanopartiküller kullanılarak hazırlanan kütle/hacim grafiği Şekil 4.8'de görülmektedir. Hazırlanan polimer çözeltisinin 1 mL'si 0.492 mg nanopartikül içerdiği saptanmıştır. Başlangıçta ortamda 200 mL çözeltide (çözeltideki glutaraldehit miktarı 50 mL) bulunan aljinat (0,074 g), kitosan (0,022 g), CaCl₂ (0,015g) kütleleri toplamı 0,111 g olarak hesaplandı. Buradan ortamın 1 mL'sinde bulunan aljinat, kitosan, CaCl₂ kütleleri toplamı 0,560 mg bulundu. Bu sonuç nanopartikül oluşturma işleminin % 88 verimle gerçekleştiğini göstermektedir.



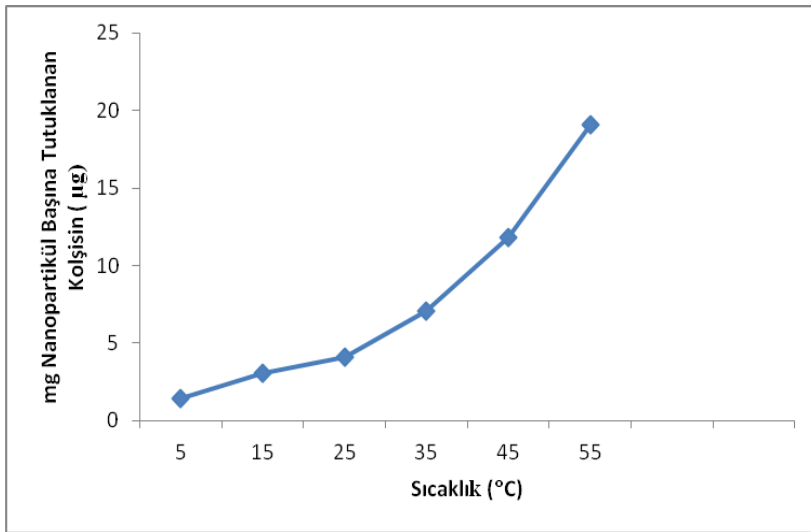
Şekil 4.8. Boş nanopartiküller kullanılarak hazırlanan kütle/hacim grafiği

4.5. Kolşisin Tutuklanma Kapasitesine Sıcaklığın Etkisi

Belirlenen 10 mg aljinat/0,3 mg kolşisin oranı kullanılarak tutuklanma kapasitesi sıcaklığın etkisi incelendi. Miligram nanopartikül başına yüklenmiş kolşisin miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\frac{1 \text{ mL reaksiyon ort. kolşisin miktarı } (\mu\text{g}) - 1 \text{ mL süpernatandaki kolşisin miktarı } (\mu\text{g})}{1 \text{ mL reaksiyon ortamındaki nanopartikül miktarı } (\text{mg})}$$

Şekil 4.9'da sıcaklığın kolşisin tutuklama kapasitesi üzerine olan etkisi görülmektedir. Şekilden anlaşıldığı gibi sıcaklık ile tutuklama kapasitesi artmaktadır.



Şekil 4.9. Aljinat/kitosan/gluteraldehit nanopartiküllere kolşisin tutuklanma kapasitesinin sıcaklıkla değişimi

Öte yandan Şekil 4.9'da görüldüğü gibi üzere kolşisin tutuklanma kapasitesi incelenen sıcaklık aralığı için giderek artmış ve 55 °C'de maksimuma ulaşmıştır. Daha yüksek sıcaklıklarda tutuklanma kapasitesi deneyleri yapılmıştır. Zira aljinat polimerinin termal bozunma eğrisi incelendiğinde (Mohan ve Nair, 2005) yapıdaki suyun kaybına bağlı olarak bozunma başlangıcının 60 °C'de gerçekleştiği bilinmektedir. Öte yandan daha önceki çalışmalardan (Sunna, 2012) alginat/kitosan nanopartiküllere bir başka ilacın (tamoksifen gibi) tutuklanma oranının sıcaklıkla azaldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada

aljinat/kitosan/gluteraldehit bileşimi kullanıldığından polimerin çapraz bağlı yapısı sıcaklığa karşı davranışını değiştirmiştir. Gerçekten de hidrojenlerin çapraz bağlanması durumunda 60 °C'ye ısıtıldıklarında çapraz bağlanmamış olandan daha dayanıklı hale geldiği görülmüştür (Pal vd., 2009)

4.6. Kolşisin Salımına pH'ın Etkisi

Gut hastalığının tedavisinde uzun zamandır tercih edilen ilaç kolsisindir. Aynı zamanda FMF ve Behçet hastalıklarında da kullanılmaktadır. Özellikle immunolojik hastalıklarda kolşisin kullanımına başlanması bu ilaca ilginin yeniden artmasına neden olmuştur. Öte yandan kolşisin oldukça toksik bir ilaç olup 7 mg kolşisin öldürücü olabildiğinden terapötik marjı çok dardır (Goodman ve Gilman, 1980). Bu nedenle klinik etkinlik ile yan etkiler arasındaki denge oldukça hassas olup kronik kolşisin tedavisinde ilaç salımının sürekli olması önemlidir. Ticari olarak kolşisin bitki ekstresi tablet olarak satılmakta olup genellikle inorganik bir matriksle (TiO₂) karıştırılmış, şeker ve boyar madde eklenmiştir. İlacın mide ortamından geçip ince bağırsak ortamında salınarak alınması ideal olanıdır ancak bu koşul her zaman sağlanmayabilir.

Çizelge 4.2. İnsan gastrointestinal yolundaki sıvıların pH değerleri (Grassi vd., 2007)

Anatomik Bölge	pH Değeri
Mide	1,5-3,5
Duodenum	5,0-7,0
Jejenum	6,0-7,0
İleum	7,0
Kolon	5,5-7,0
Rektum	7,0

İnsan gastrointestinal yolundaki sıvıların pH değerleri Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Bu bilgilere dayanarak kolşisinin salımına pH etkisi 5 farklı pH’ta incelenmiştir. Çalışılan pH değerlerinin 4’ü bu tabloda gösterilen sınırların içinde bulunmakta olup hariçten ilave edilen pH değeri 1,2’dir. Bu pH değerinde çalışma kararı Hu ve Rhodes, 1999’a göre alındı. Bu çalışmada USP XXII (United States Pharmacopodia) regülasyonuna göre yapay gastrik sıvı simülasyonlarında pH 1,2’nin kullanılmasının önerildiği bildirilmiştir.

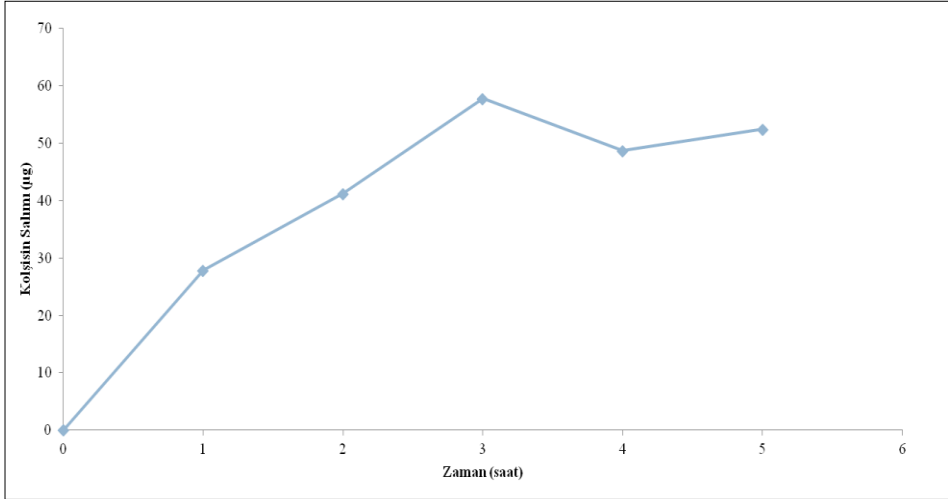
Hazırlanan kolşisin yüklü nanopartiküllerin insan vücudunda kolşisin salımına pH’ın etkisi iki farklı ortam taklit edilerek beş farklı pH değerinde gerçekleştirildi. *İn vitro* mide ortamını taklit etmek için pH 1,2; pH 1,5 ve pH 3,0 çözeltileri; ince bağırsak ortamını taklit etmek için ise % 1’lik Tween 80 çözeltisi içeren pH 6,8 ve pH 7,4 potasyum fosfat tamponları kullanıldı (Sarmiento vd., 2007b). Bütün denemeler 10 mg aljinat/0,3 mg kolşisin oranı kullanılarak hazırlanan nanopartiküller ile gerçekleştirildi.

4.6.1. Kolşisinin *in vitro* Mide Ortamında Salımı

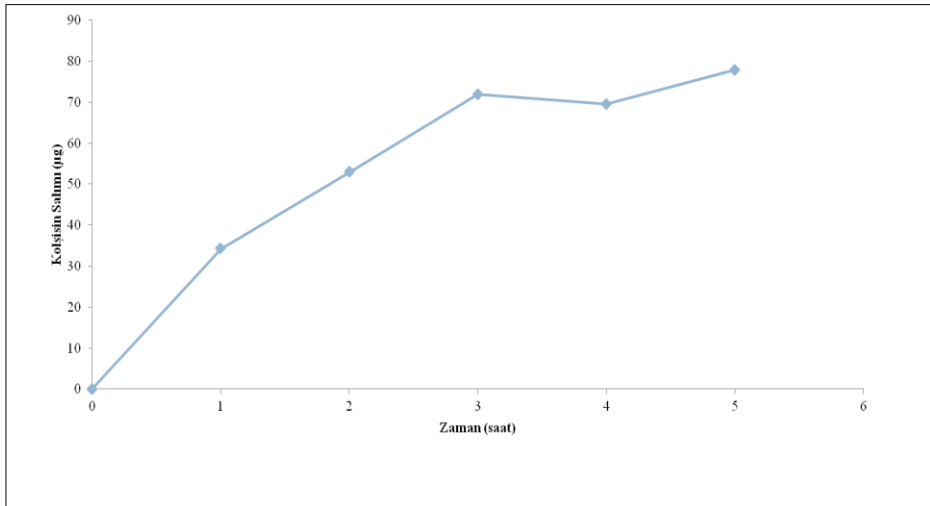
Mide ortamını taklit etmek üzere hazırlanan 3 farklı pH ortamının (1,2; 1,5; 3,0) hiçbirinde kolşisin salımı saptanmadı.

4.6.2. Kolşisinin *in vitro* İnce Bağırsak Ortamında Salımı

İnce bağırsak ortamını *in vitro* olarak taklit etmek için pH 6,8 ve pH 7,4 ortamları kullanıldı. Beş saat boyunca saatte bir ortamdan alınan çözelti santrifüjlendi ve süpernatanda kolşisin tayini yapıldı Süpernatantların absorbans değerleri kolşisin çalışma grafiğinde yerine koyularak bu süre içerisinde salınan kolşisin miktarı belirlendi. Aljinat/kitosan nanopartiküllerden pH 6.8 ve pH 7.4 ortamlarında zamana karşı kolşisin salımını (mg) gösteren grafikler sırasıyla Şekil 4.10. ve 4.11’de görülmektedir. Ayrıca her saatin sonundaki yüzde kolşisin salımı belirlendi. Aljinat/kitosan nanopartiküllerden pH 6.8 ve pH 7.4 ortamlarında zamana karşı yüzde kolşisin salımları sırasıyla çizelge 4.3. ve 4.4’de görülmektedir.



Şekil 4.10. Aljinat/kitosan/glutaraldehit nanopartiküllerden pH 6,8 ortamında zamana bağlı kolşisin salımı



Şekil 4.11. Aljinat/kitosan/glutaraldehit nanopartiküllerden pH 7,4 ortamında zamana bağlı kolşisin salımı

Çizelge 4.3. Aljinat/kitosan/glutaraldehit nanopartiküllerden pH 6,8 ortamında zamana bağlı yüzde kolşisin salımı

Zaman (saat)	Salınan Kolşisin (%)
1,0	32,1
2,0	47,6
3,0	66,7
4,0	56,2
5,0	60,5

Çizelge 4.4. Aljinat/kitosan/glutaraldehit nanopartiküllerden pH 7,4 ortamında zamana bağlı yüzde kolşisin salımı

Zaman (saat)	Salınan Kolşisin (%)
1,0	39,5
2,0	61,2
3,0	83
4,0	80,3
5,0	89,9

5. SONUÇ

- 1- İlaç iletim sistemlerinin dizaynı genellikle ilacın fizikokimyasal ve farmakokinetik özelliklerine bağlı olarak geliştirilir. Geleneksel ilaç iletim sistemleri ilacın terapötik olarak etkili plazma derişimlerine ulaşması için gerekli süre ile ilacın dozaj formunun gerçekte gösterdiği ilaç salım profili arasındaki minimum senkronizasyon nedeniyle oluşan sınırlamalara bağımlıdır. Bu nedenle farmosötik bilimi çalışanları ilgilerini aktif ilacın, vücutta istenen zaman ve yerde olmasını sağlayacak ideal ilaç salım sistemlerinin üretilmesine yoğunlaştırmaktadırlar. Bu konuda doğal jel oluşturan materyaller ilaç iletim sistemleri olarak umut verici materyaller olarak düşünölmektedir.
- 2- Aljinatlar geniş uygulama alanı bulan çok amaçlı doğal polisakkarit yapısında biyopolimerlerdir. Aljinatın, geleneksel ilaç üretiminde kullanımında kıvamlaştırıcı, jel-oluşturma ve stabilize edici özelliklerinden yararlanır. Ancak, uzun süreli ve daha iyi kontrol edilebilen ilaç iletimi araştırmaları aljinat gibi hidrokolloidlerin yeni bir görevle ilaç iletim sistemlerinde kullanılmasına neden olmuştur. Aljinat (asit formu: alginik asit) sodyum ve kalsiyum tuzlarının genellikle toksik olmadığı ve biyouyumlu oldukları bilinmektedir. Aljinat, kitosan gibi polikasyonik yapılarla dayanıklı kompleksler oluşturur. Aljinat jel matriksinin erezyonunu engellemesi ve/veya çözünürlüğü yüksek olan ilaçların salımının geciktirilmesi için aljinat taneciklerin kitosan ile kaplanması sıkça yapılan bir uygulamadır. Kitosan da aljinat gibi doğal polisakkarit türevi olan bir biyopolimer olup ayrıca tümör hücrelerini inhibe edici özelliğı de son yıllarda ortaya çıkarılmıştır. (Gupta vd., 2002). Bu çalışmada kullanılan her iki biyopolimer de (aljinat ve kitosan) kayda değer sitotoksisite göstermedikleri saptanmış polimerlerdir. Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan glutaraldehitin de antimikrobiyal aktivitesi bilinmekte olup (EPA-Reregistration Eligibility Decision for Glutaraldehyde-EPA 739-R-07-006) sertifikasında belirtildiğı üzere yapılan pek çok çalışmada kayda değer olumsuz etkisi tespit edilmemiştir.
- 3- Özellikle oral yol ile alınarak ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesinde doğal polimerlerin kullanılması önemlidir. Bu açıdan incelendiğinde bu tezin konusu olan polimerler ve çapraz bağlayıcı bileşik beklenen özellikleri karşılamaktadır.

- 4- Partikül boyutu yaklaşık 100 nm civarında olan biyobozunur nanopartiküllerin ilaç iletim sistemlerinde kullanımının avantajları vardır. Nanopartiküller kılcal damarlara girebilirler ve ilacın hedef bölgede daha fazla akümüle olmasını sağlayabilirler. Ayrıca nanopartiküller gelişmiş permeasyon ve retensiyon etkileri ile tümör dokusunu pasif olarak hedefleyebilir. İlâveten, nanopartiküller lokalize kateter temelli infüzyon veya nanopartikül yüzeyine doku-spesifik hedef ligantı bağlanarak uzak hedef bölgelerine gönderilebilirler. Bu çalışmada elde edilen nanopartiküllerin boyutları 100 nm civarında tespit edilmiş olup bu tip ilaç iletim sistemlerinde istenen/aranan özelliklere sahip oldukları düşünülmektedir.
- 5- Kolşisin ilacı genellikle kronik hastalıkların tedavisinde bazı durumlarda (örneğin FMF) ömür boyu kullanılması gereken bir ilaçtır. Öte yandan, kolşisinin insan vücudu için aynı zamanda bir toksin olması bu ilacın kullanımını sınırlamakta ve doz/derişim ayarlamasının dikkatli yapılmasını gerektirmektedir. Kolşisinin kimyasal yapısı nedeniyle suda çok çözünen bir bileşik olması onun polimerler üzerine/içine tutunma/ enkapsülasyon ve salınım özelliklerini çok etkilemektedir. Muhtemelen bu nedenle kolşisinin polimer yapılar içinde tutularak ilaç salım sistemlerinin hazırlanması çalışmaları oldukça azdır ve biyobozunur polimerlerle nanopartikül oluşturma çalışması literatürde yoktur. Bu çalışmada kolşisinin sudaki çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle oldukça fazla sayıda kombinasyon denenerek kolşisinin tutuklanacağı bir bileşimin elde edildiği düşünülmektedir.
- 6- İlaç salım sistemlerinin oluşturulmasında ilacın sistem içine enkopere olması/tutuklanmasının başarılması kadar hedeflenen doku/organda düzgün bir hızda (tercihan doğrusal) salınması da önemlidir. Kolşisinin ince bağırsaktan emilmesi istendiğinden in vitro olarak oluşturulan mide ve ince bağırsak ortamlarında elde edilen sonuçlar oldukça dikkat çekicidir. Sentezlenen glutaraldehit çapraz bağlı alginat/kitosan nanopartiküllerden kolşisin salımı in vitro mide ortamında hiç gerçekleşmezken, ince bağırsak ortamında pH'a bağlı olarak % 32,1 ile % 60,5 arasında salım tespit edilmiştir. Oral yol ile alınan ilacın mide ortamından hiç salınmadan geçmesi buna karşılık ince bağırsak ortamında salım göstermesi üzerinde durulması gereken bir sonuçtur.

- 7- Sonuç olarak, bu çalışmada kolşisinin çapraz bağlanmış alginat/kitosan nanopartikülleri ile taşınabileceği gösterilmiş olup, kolşisinin znrlkzellikleri nedeniyle daha yüksek oranda bağlanma ve salım gösterebilecek sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Ahmad, Z., Pandey, R., Sharma, S., Khuller, G.K., 2006. Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potential. **The Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences**, 48: 171-176.
- Al-Kassas, R.S., Al-Gohary, O.M.N., Al-Faadhel, M.M., 2007. Controlling of systemic absorption of gliclazide through incorporation into alginate beads. **International Journal of Pharmaceutics**, 341: 230-237.
- Arora, S., Gupta, S., Narang, R.K., 2010. Amoxicillin loaded chitosan–alginate polyelectrolyte complex nanoparticles as mucopenetrating delivery system for *H. Pylori*. **Sci Pharm.** 79: 673–694.
- Bari, H., 2010. A prolonged release parenteral drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, 3: 1-2.
- Bonnel, R.A., Villaba, M.L., Karwoski, C.B., Beitz, J., 2002. Deaths associated with inappropriate intravenous colchicine administration. **The Journal of Emergency Medicine**, 22: 385- 387.
- Boonsongrit, Y., Mitrevej, A., Mueller, B.W., 2006. Chitosan drug binding by ionic interaction. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 62: 267–274.
- Chavanpatil, Y., Handa, H., Mao, G., Panyam, J., 2007. Polymers surfactant nanoparticles for sustained release of water-soluble drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 96: 3379–3389.
- Cocco, G., Chu, D.C.C., Pandolfi, S., 2010. Colchicine in clinical medicine A guide for internists. **European Journal of Internal Medicine**, 21: 503-508.
- Crielaard, B.J., Van der Wal, S., Le, H.T., 2011. Liposomes as carriers for colchicine-derived prodrugs: Vascular disrupting nanomedicines with tailorable drug release kinetics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 45:429-435

- De la Riva, B., Nowak, C., Hernández, H., 2009. VEGF-controlled release within a bone defect from alginate/chitosan/PLA-H scaffolds. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 73: 50–58.
- Deveaux, M., Hubert, N., Demarly, C., 2004. Colchicine poisoning: case report of two suicides. **Forensic Science International**. 143: 219-222.
- Dewick, P.M., 2009. Biosynthetic approach. **Medicinal Natural Products**. 6: 360-362.
- Fredenberg, S., Wahlgren, M., Reslow, M., 2011. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, 415: 34-52.
- Friess, W., 2004. Technologies Available for Use in Cancer drug Delivery. Drug Delivery Systems in Cancer Therapy, Brown, D.M., USA, 71-76, USA.
- Ghanem, R., Baker, H., Seif, M.A., 2010. Photochemical transformation of colchicine: A kinetic study. **J. Solution Chem**, 39: 441-456.
- Gladwin S.D., Rao, G. H. R. Wilson R.F, Chandy, T., 2000. Colchicine encapsulation within poly(ethylene glycol)-coated poly(lactic acid)/poly(ϵ -caprolactone) microspheres-controlled release studies. **Drug Delivery**, 7: 129-138.
- Grassi, M., Grassi, G., Lapasin, R., Colombo, I., 2007. Understanding Drug Release and Adsorption Mechanisms: A Physical and Mathematical Approach. CRC Pres. 46 p., New York.
- Gupta, P., Vermani, K., Gary, S., 2002. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. **Drug Discovery Today**, 7: 10.
- Hollinger, V.V. Ranade, M.A. 2004. Drug Delivery Systems: Second Edition. CRC Press LLC., pp. 72-390, Florida.
- Hu, C., Rhodes, D.G., 1999. Proniosomes: A novel drug carrier preparation. **International Journal of Pharmaceutics**, 185: 23-25.

- Jameela, S.R, Kumary, T.V., Lal A.V, 1998. Jayakrishnan a. progressive loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system. **J. Cont, Rel.**, 52: 17-24.
- Janes, K.A., Fresneau, M.P., Marazuela, A., Fabra, A., Alonso, M.J., 2001. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. **Journal of Controlled Release**, 73: 255-267.
- Jean, M, V., Iosif, D.R., 2005. Assessing Bioavailability of Drug Delivery Systems , 2-5. Taylor & Francis Group. New York.
- Kshirsagar, N.A., 2000. Drug Delivery Systems. **Indian Journal of Pharmacology**, 32: 54-61.
- Kulkarni, B.S., Singh, M., Betageri, G.V., 1997. Encapsulation, stability and in-vitro release characteristics of liposomal formulations of colchicine. **J. Phar. Pharmacol**, 49: 491-495.
- Lee, B.J., Min, G.H., Cui, H., 1999. Correlation of drug solubility with trapping efficiency and release characteristics of alginate beads. **Pharmacy and Pharmacology Communications**, 5: 85-89.
- Li, P., Dai, Y.N., Zhang, J.P., Wang, A.Q., Wei, Q., 2008. Chitosan alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. **International Journal of Biomedical Science**, 4: 221- 228.
- Majeti, N. V., Kumar, R., Kumar, N., Domb, A.J., 2002. Pharmaceutical polymeric controlled drug delivery systems. **Advances in Polymer Science**, 160:45-50
- Meurin, P., Tabet, J.Y., 2011. Colchicine in acute pericarditis. **Archives of Cardiovasculer Disease**, 104: 425-427.
- Mohan, N., Nair, P.D., 2005 novel porous, polysaccharide scaffolds for tissue engineering applications. **Trends Biomater.Artif. Organs**, vol 18 (2): 219-224.

- Murthy, N.S, Satheesh, M., 1997. Enhancer synergism of propylene glycol and PEG -400 in terbutaline sulphate transdermal drug delivery systems. **Indian Drugs**, 34: 224-6.
- Narayani R, Rao, KP. 1995. Polymer-coated gelatin capsules as oral delivery devices and their gastrointestinal tract behaviour in humans. **J. Biomaterials Science Polymer Edition.**, 7: 39-48.
- Niel, E., Scherrmann, J.M., 2006. Colchicine today. **Joint Bone Spine** , 73 : 672–678.
- Pal, K., Banthia, A.K., Majumdar, D.K., 2009. Polymeric Hydrogels: characterization and biomedical applications-a mini review. **Designed monomers and polymers**, 12: 197-220.
- Patial, A., Verma P. 2012. Development of uv spectrophotometric method for estimation of colchicine in phosphate buffer saline pH 6.4 **International Research Journal of Pharmacy** 3(2): 87-89.
- Patit, P., Sarkar, K., Sarkar, K. 2011. Biopolymers for Specific Applications. Biopolymers: Biomédical and Environmental Applications. (Kalia,S, Avérous. L, Eds.) France, 593-596, France.
- Pırıldar, S., 2006. Colchicum Baytopiorum C.D. Brickell Üzerine Farmakognozık Araştırmalar. **İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi**, ISTANBUL.
- Rao P.R., Diwan, P.V., 1998. Formulation and in vitro evaluation of polymeric films of diltiazem hydrochloride and indomethacin for transdermal administration. **Drug Dev Indian Pharmac**, 24: 327-36.
- Rastogi, R., Sultana, Y., Aqil, M., Ali, A., Kumar, S., 2007. Alginate microspheres of isoniazid for oral sustained drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 334: 71-77.
- Sarmiento, B., Ribeiro, A., Veiga, F., Sampaio, P., Neufeld, R., Ferreira, D., 2007a. Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. **Pharmaceutical Research**, 24: 2198-2199.

- Sarmiento, B., Ferreira, D.C., Jorgensen, L., Weert, M., 2007b. Probing insulin's secondary structure after entrapment into alginate/chitosan nanoparticles **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 65: 10-17.
- Sharma, D., Chelvi, T.P., Kaur, J., Chakravorty, K., De, T.K., Maitra, A., Ralhan, R., 1996. Novel taxol formulation : polyvinylpyrrolidone nanoparticle-encapsulated taxol for drug delivery in cancer therapy. **Oncol Res.** 8: 281-6.
- Shen, L., H., Li, Y., Zhang, D.H., Lai, Y.S., Liu, L.J., 2011a. Synthesis and evaluation of nitrate derivatives of colchicine as anticancer agents. **Chinese Chemical Letters**, 22: 768-770.
- Shen, Q., Wang, Y., Zhang, Y., 2011b. Improvement of colchicine oral bioavailability by incorporating eugenol in the nanoemulsion as an oil excipient and enhancer. **International Journal of Nanomedicine**, 6: 1237-1243.
- Silva, C., Sousa, F., Gübitz, G., 2004. Chemical modifications on proteins using glutaraldehyde. **Food Technol. Biotechnol.**, 42: 51–56.
- Sunna, Ç., 2012. Aljinat-Kitosan Nanopartiküllerin Tamoksifen Salımında Kullanılmasının Araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Thacharodi, D., Rap, K.P., 1995. Development and in vitro evaluation of chitosan-based transdermal drug delivery system for the controlled delivery of propranolol hydrochloride. **Biomaterials**, 16: 145-8.
- Tønnesen, H.H., Karlsen, J., 2002. Alginate in drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 28: 621–630.
- Wittaya-areekul, S., Kruenate, J., Prahsarn, C., 2006. Preparation and *in vitro* evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone. **International Journal of Pharmaceutics**, 312: 113–118

- Wong, T.W., Chan, L.W., Kho, S.B., Heng, P.W.S., 2005. Aging and microwave effects on alginate/chitosan matrices. **Journal of Controlled Release**, 104: 461–475.
- Vinnersten, A., Larsson, S., 2010. Colchicine is still a chemical marker for the expanded colchicaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, 38: 1193–1198.
- Yongmei, H., Fenglin, Z., Na, L., Yanhong, Y., Ke'an, L., 2002. Studies on a high encapsulation of colchicine by a niosome system. **International Journal of Pharmaceutics**, 244: 73–80.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mehlika GÜN
Doğum Yeri ve Tarihi : Serik/ANTALYA, 27/09/1979

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi,
Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : 2007/2009 Özel Aydın Artı Dersanesi Kimya
Öğretmenliği

İLETİŞİM

E-posta Adresi : larakucuk2010@hotmail.com
Tarih : 18/12/2012