

142010 / 1

**BİTKİ EKSTRESİ İÇEREN
NAZAL FORMÜLASYON ÇALIŞMASI
VE İN VİTRO-İN VİVO
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz.Funda ÖZTAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİTKİ EKSTRESİ İÇEREN NAZAL FORMÜLASYON
ÇALIŞMASI ve İN VİTRO-İN VİVO
DEĞERLENDİRİLMESİ .**

**ECZ. FUNDA ÖZTAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Şubat-2000**

Danışman: Prof. Dr. Yasemin YAZAN

JURİ ve ENSTİTÜ ONAYI

Funda ÖZTAN' ın " Bitki Ekstresi İçeren Nazal Formülasyon Çalışması ve İn Vitro-İN VİVO Değerlendirilmesi " başlıklı Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 04.02.2000 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye(Tez Danışmanı) : Prof.Dr. Yasemin YAZAN

Üye : Prof.Dr. A.Yekta ÖZER

Üye : Yrd.Doç.Dr.Müzeyyen DEMİREL

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 24.01.2000 gün ve 3/1 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

T.C.
Enstitü Müdürü
Prof.Dr. Yusuf ÖZTÜRK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİTKİ EKSTRESİ İÇEREN NAZAL FORMÜLASYON ÇALIŞMASI ve İN VİTRO-İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

FUNDA ÖZTAN

Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Yasemin YAZAN
2000

Nazal yol uzun yıllar boyunca lokal etki sağlamak için kullanılmıştır. Nazal formülasyonlara gittikçe artan ilgi, nazal yolun uygulama kolaylığı ve nazal mukozanın istenen etki için uygun şartlara sahip olması nedeniyledir.

Ecballium elaterium Türkiye’de yaygın olarak bulunan ve sıkma yoluyla elde edilen suyu, halk arasında sinüzit tedavisinde kullanılan bir bitkidir. Sıkma ile elde edilen meyve suyunun kararlı olmaması nedeniyle, bu çalışmada nazal formülasyon çalışmaları yapılmıştır. *Ecballium elaterium* meyvelerinin suyu alındıktan sonra süzgeç kağıdından süzülmuş ve liyofilize edilerek toz şeklinde nazal formülasyonlarda etkin madde olarak kullanılmıştır.

Formülasyon çalışmalarında, farklı özellikte maddeler içeren altı değişik formülasyonun ön çalışmaları yapılmıştır. Bu ön formülasyonlar, renk ve kıvam değişikliği, zamanla çökelti veya faz ayrışması olup olmadığına göre gözlenmiş, santrifüjleme testi yapılmış ve bu incelemelerin sonuçlarına göre değerlendirilerek en uygun olan formülasyon seçilmiştir. Seçilen formülasyon, Methocel®, Carbopol®, Vit E, benzalkonyum klorür:benzil alkol karışımı, toz ekstre ve distile su kullanılarak hazırlanmıştır. Bu formülasyonun fiziksel özellikleri değerlendirilmiş, üzerinde santrifüj ve stabilite testleri, pH ölçümü, reolojik analiz ve in vivo histolojik çalışmalar yapılmıştır. İn vivo histolojik çalışmalarda, formülasyonların sıçan nazal mukozasındaki etkileri incelenmiştir.

Yapılan fiziksel, kimyasal ve in vivo çalışmalar sonucunda, hazırladığımız nazal formülasyonun kararlı olduğu, pH’sının burun mukozası pH’sına uygun olduğu, ve histolojik olarak etkin olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Ecballium elaterium*, nazal formülasyon, in vitro-in vivo değerlendirme

ABSTRACT

Master of Science Thesis

NASAL FORMULATION of a PLANT EXTRACT and IN VITRO-IN VIVO EVALUATION

FUNDA ÖZTAN

Anadolu University
Graduate School of Health Sciences
Pharmaceutical Technology Program

Supervisor: Prof.Dr. Yasemin YAZAN
2000

Nasal route has been used to obtain local activity for long years. There is an increasing interest in the nasal formulations because of the ease of administration and the appropriate conditions that nasal mucosa has for required effects.

Ecballium elaterium is a plant found widespread in Turkey and whose juice obtained by pressing the fruits has been used for the treatment of sinusitis. Nasal formulation studies were performed in this study because of the instability of the fruit juice. Following the obtention of the fruit juice of *Ecballium Elaterium*, it was filtered through filter paper and lyophilized. This powder was used as the active material in nasal formulations.

Six different formulations containing materials with different properties were preformulated during formulation studies. These preformulations were observed according to changes in colour, viscosity, formation of sedimentation or phase separation and centrifugation tests were performed. The results were evaluated and the most suitable formulation was selected. The selected formulation was prepared using Methocel[®], Carbopol[®], Vit E, benzalchonium chloride:benzyl alcohol mixture, powder extract and distilled water. The physical properties of this formulation were evaluated and, centrifugation tests, stability tests, pH measurements, rheological analysis, and in vivo histological studies were performed on this formulation. The affects of the formulation on rats' nasal mucosa were examined by in vivo histological studies.

According to the results of the physical, chemical and in vivo studies, it was found that the nasal formulation prepared was stable, its pH was suitable to the pH of the nasal mucosa and it was affective histologically.

Key Words: *Ecballium Elaterium*, nasal formulation, in vitro-in vivo evaluation.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans'a başladığımdan bu yana çalışmanın her safhasında engin bilgileri ve önerileri ile beni yönlendiren, çalışma boyunca bana her türlü imkanı sağlayan, her zaman iyi niyet, sabır ve anlayışla beni destekleyen ve tez süresince benimle aynı heyecanı paylaştığını hissettiğim çok değerli danışman hocam Prof.Dr. Sayın Yasemin YAZAN'a minnet duygularımı ve sonsuz teşekkürlerimi saygılarımla sunarım.

Histolojik çalışmaların yürütülmesinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Osmangazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Sayın Cengiz BAYÇU'ya ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı personeline katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Değerli yardımlarından dolayı Osmangazi Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Sayın Kevser EROL'a ve Yrd.Doç.Dr. Sayın Fatma S. KILIÇ'a teşekkürlerimi iletmek isterim.

Ecballium elaterium'un formülasyonu fikrini ortaya koyan Eczacılık Fakültesi Dekanı ve Tıbbi ve Aromatik Bitkiler ve İlaç Araştırma Merkezi Müdürü Prof.Dr. Sayın K. Hüsnü Can BAŞER'e teşekkür ederim.

Eğitim-öğretim yaşamımda her zaman maddi ve manevi olarak bana destek olan, hoşgörü ve anlayışları ile beni cesaretlendiren, yardım ve ilgilerini her zaman hissettiğim değerli aileme ve dostlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bana gösterdikleri iyi niyet, ilgi ve yardımlarından dolayı bölüm arkadaşlarım Yrd.Doç.Dr. Müzeyyen DEMİREL'e, Arş.Grv.Uzm.Ecz. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na, Arş.Grv.Ecz. Bahar Selen KALAVA'ya, Arş.Grv.Ecz.Ebru CENGİZ'e ve Kimyager Sefa AVCIER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Literatürlerin sağlanması sırasında yardımlarından dolayı Osmangazi Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı elemanı Arş.Grv. Özlem BATU'ya teşekkür ederim.

Funda ÖZTAN

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| İÇİNDEKİLER..... | iv |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | vi |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | viii |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ..... | 1 |
| 2. KAYNAK BİLGİSİ..... | 3 |
| 2.1. BURUN..... | 3 |
| 2.1.1. Burunun Anatomik Özellikleri..... | 4 |
| 2.1.2. Burunun Fizyolojik Özellikleri..... | 5 |
| 2.1.3. Burunun Histolojik Özellikleri..... | 6 |
| 2.1.4. Nazal Mukozanın Özellikleri..... | 7 |
| 2.1.4.1. Mukus salgısının özellikleri..... | 8 |
| 2.2. NAZAL SİSTEMLER..... | 9 |
| 2.2.1. Tanımı ve Tarihçesi..... | 9 |
| 2.2.2. Nazal Uygulama..... | 9 |
| 2.2.2.1. Nazal uygulama yolunun diğer | |
| uygulama yolları ile karşılaştırılması..... | 10 |
| 2.2.2.2. Nazal emilime etki eden faktörler..... | 11 |
| 2.2.2.2.1. Nazal olarak uygulanabilecek maddeler..... | 13 |
| 2.2.2.2.2. Nazal formülasyonda kullanılan | |
| maddeler ve özellikleri..... | 13 |
| 2.3. SİNÜZİT..... | 15 |
| 2.4. <i>ECBALLIUM ELATERIUM</i> BİTKİSİ..... | 17 |
| 2.4.1. Genel Özellikleri..... | 17 |
| 2.4.2. Kimyasal İçeriği..... | 19 |
| 2.4.3. Farmakolojik Özellikleri..... | 20 |

| | |
|--|----|
| 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER..... | 23 |
| 3.1. GEREÇLER..... | 23 |
| 3.1.1. Cihazlar..... | 23 |
| 3.1.2. Maddeler..... | 23 |
| 3.2. YÖNTEM VE DENEYLER..... | 25 |
| 3.2.1. Bitki Ekstresinin Hazırlanması..... | 25 |
| 3.2.1.1. Ekstre üzerinde yapılan ön çalışmalar..... | 25 |
| 3.2.2. Formülasyonlar..... | 25 |
| 3.2.2.1. Formülasyonların hazırlanışı..... | 27 |
| 3.2.2.2. Karakterizasyon..... | 29 |
| 3.2.2.2.1. Fiziksel özellikler..... | 29 |
| 3.2.2.2.2. Kimyasal özellikler..... | 29 |
| 3.2.2.2.3. Reolojik analiz..... | 30 |
| 3.2.2.2.4. İn vivo histolojik çalışmalar..... | 31 |
| 4. BULGULAR..... | 33 |
| 4.1. BİTKİ EKSTRESİNİN HAZIRLANMASI..... | 33 |
| 4.1.1. Ekstre Üzerinde Yapılan Ön Çalışma Sonuçları..... | 33 |
| 4.2. FORMÜLASYONLARIN HAZIRLANIŞI VE KARAKTERİZASYON SONUÇLARI..... | 33 |
| 4.2.1. Reolojik Analiz Sonuçları..... | 46 |
| 4.2.2. İn Vivo Histolojik Etkinlik..... | 51 |
| 5. SONUÇ VE TARTIŞMA..... | 62 |
| 5.1. BİTKİ EKSTRESİNİN HAZIRLANMASI..... | 62 |
| 5.1.1. Bitki Ekstresi Üzerinde Yapılan Ön Çalışmalar..... | 62 |
| 5.2. FORMÜLASYONLARIN HAZIRLANIŞI VE KARAKTERİZASYON SONUÇLARI..... | 63 |
| 5.2.1. Reolojik Analiz Sonuçları..... | 68 |
| 5.2.2. Histolojik İnceleme Sonuçları..... | 69 |
| 5.3. SONUÇ..... | 73 |
| KAYNAKLAR..... | 74 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 82 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1. Burun ve burun boşluğu..... | 3 |
| Şekil 2.2. <i>Ecballium elaterium</i> meyve ve çiçeklerinin genel görünüşü..... | 18 |
| Şekil 2.3. <i>Ecballium elaterium</i> meyvelerinin görünüşü..... | 18 |
| Şekil 4.1. F1 formülasyonuna ait kayma hızı-kayma gerilimi eğrileri..... | 48 |
| Şekil 4.2. F1 formülasyonuna ait kayma hızı-vizkozite eğrileri..... | 49 |
| Şekil 4.3. F1 formülasyonunun uyum gösterdiği Üslü Yasa'ya göre,..... | 50 |
| kayma geriliminin logaritmasına karşı, kayma hızının logaritması eğrileri | |
| Şekil 4.4. Sağ (R) ve sol (L) taraf burun boşluğu solunum bölgesi..... | 53 |
| E: Epitel, B: Lamina propria bezleri, K: Kıkırdak (HE, X12) | |
| Şekil 4.5. Sol taraf burun boşluğu solunum bölgesi..... | 53 |
| Normal yapıda epitel ve mukoza (HE, X66) | |
| Şekil 4.6. Sağ taraf burun boşluğu solunum bölgesi..... | 54 |
| Minimal mukus salgısı (↓) Normal yapıda epitel, sil ve mukozal bezler | |
| B: Lamina propria bezleri (HE, X66) | |
| Şekil 4.7. Sağ (R) ve sol (L) taraf burun boşluğu solunum bölgesi..... | 54 |
| (←): Sağ tarafta zayıf mukus reaksiyonu, S: Septum, E: Epitel (PAS, X12) | |
| Şekil 4.8. Sol taraf burun boşluğu solunum epiteli ve mukoz Goblet salgıları..... | 55 |
| Mukozada yoğun PAS (+) boyanan bezler (B) (PAS, X66) | |
| Şekil 4.9. Sağ taraf burun boşluğu solunum bölgesi..... | 55 |
| Azalmış Goblet salgısı (↑) (PAS, X66) | |
| Şekil 4.10. Sağ (R) ve sol (L) taraf burun boşluğu solunum bölgesi..... | 56 |
| Sağ tarafta yoğun hücre infiltrasyonu (*), K: Kıkırdak (HE, X12) | |
| Şekil 4.11. Sol taraf burun boşluğu solunum bölgesi..... | 56 |
| Normal yapıda solunum epiteli ve diğer yapılar (HE, X66) | |
| Şekil 4.12. Sağ taraf burun boşluğu solunum bölgesi..... | 57 |
| Yoğun hücre infiltrasyonu | |
| Sağlam kalmış siller (▼) yanında sil kaybı (↓) (HE, X66) | |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.13. Sağ taraf burun boşluğu solunum bölgesi..... | 57 |
| Sil kaybı ve normal görünümünü kaybetmiş epitel (*) (HE, X66) | |
| Şekil 4.14. Sağ (R) ve sol (L) taraf burun boşluğu solunum bölgesi..... | 58 |
| Sağ tarafta epitel atrofisi ve mukus azalması (⇐) | |
| Sol taraf normal yapıda (PAS, X33) | |
| Şekil 4.15. Sağ (R) ve sol (L) taraf burun boşluğu solunum bölgesi..... | 59 |
| Sağ tarafta belirgin mukus artışı (⇐) (HE, X33) | |
| Şekil 4.16. Sol taraf burun boşluğu solunum bölgesi..... | 59 |
| Normal yapıda epitel (HE, X66) | |
| Şekil 4.17. Sağ taraf burun boşluğu solunum bölgesi..... | 60 |
| Normal yapıda epitel ve yoğun mukus salgısı (m) (HE, X66) | |
| Şekil 4.18. Sağ (R) ve sol (L) taraf burun boşluğu solunum bölgesi..... | 60 |
| Sağ taraf epiteli ve Goblet'lerdeki mukus kontrole benzer yapıda (⇐) | |
| (PAS, X33) | |
| Şekil 4.19. Sağ taraf burun boşluğu solunum bölgesi..... | 61 |
| Yüzey mukusu artışı ve normal yapıdaki solunum epiteli (↓), m: Mukus | |
| (PAS, X66) | |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Çizelge 3.1. Nazal formülasyonların içerdiği maddeler ve kodları..... | 26 |
| Çizelge 4.1. Ekstre üzerinde yapılan ön çalışma sonuçları..... | 33 |
| Çizelge 4.2. Ön formülasyon sonuçları..... | 34 |
| Çizelge 4.3. F1 formülasyonu pH analiz sonuçları..... | 45 |
| Çizelge 4.4. Farklı ortamlarda bekletilmiş F1 formülasyonunun reolojik analiz sonuçları..... | 47 |
| Çizelge 4.5. Nazal mukozadaki histolojik bulguların skorlanması (n=5)..... | 52 |

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nazal yol, uzun yıllar boyunca lokal etki sağlamak için kullanılmıştır. Nazal mukoza kan damarları açısından çok zengin olması sonucu birçok ilaca karşı yüksek geçirgenliğe sahiptir. Mikrovillilerin varlığından dolayı sahip olduğu geniş yüzey alan emilim için çok uygundur. Nazal yolun uygulama kolaylığı da diğer ilaç veriliş yollarına göre tercih nedenlerinden birisidir.

Burun, dışta bulunan görünebilen kısmı ve burun boşluğu olmak üzere iki kısma ayrılmıştır. Solunum bölgesinin yüzey alanının çok geniş olmasının nedeni sinüslerdir ve emilim buradan gerçekleşir. Sinüs membranları tarafından oluşturulan mukus, içeride sinüs deliklerine açılıncaya dek siliar hareketler aracılığı ile nazal boşluğa dağılırlar. Sinüslerin drenaj deliğinin tıkanmasına bağlı olarak uzun süren iltihabi olay ise sinüzit olarak adlandırılır.

Halk arasında acıdülek, acıdüvelek, acıkavun, cırtlak, cırtatan, hıyarcık, kargadüveleği, şeytankeleği, yabani hıyar olarak bilinen *Ecballium elaterium* meyvelerinin suyu, buruna uygulanmak suretiyle, sinüzit tedavisinde, Anadolu'da yaygın olarak çok eskilerden beri kullanılmaktadır. 1949'dan bu yana British Pharmacopeia ve British Pharmaceutical Codex'te yer almaktadır. Bitkinin ayrıca antipiretik, analjezik, antitümör, purgatif, antikanser, katartik ve diüretik etkisi olduğu da bildirilmiştir. Bitkinin meyvelerinden elde edilen sıvı ekstre, elde edildiği şekilde buruna uygulanmaktadır. Ancak meyve ekstresi seyreltilmeden kullanıldığında çok toksiktir. Çözeltiler genellikle kararsız olduklarından dolayı meyve ekstresinin uygun nazal taşıyıcı içinde formüle edildikten sonra kullanılması hasta güvenliği açısından önemlidir. Bu amaç ile, *Ecballium elaterium* meyveleri ağustos ayının sonlarına doğru toplanıp, halk arasındaki kullanımından yola çıkılarak, sıkma yolu ile sıvı ekstresi elde edildikten sonra süzülerek kaba posası atılacak; liyofilize edilip kullanılıncaya kadar 25°C'lik etüvde saklanacaktır.

Nazal formülasyonlar, farklı taşıyıcı maddeler ve maddelerin özelliklerine göre farklı hazırlama yöntemleri kullanarak hazırlanacak ve böylece en uygun formülasyon araştırılacaktır.

Formülasyon çalışmalarında *Ecballium elaterium* meyve ekstresinin liyofilize tozu etkin madde olarak kullanılacaktır. Nazal formülasyonlara eklenen koruyucu, yüzey etkin, antioksidan ve taşıyıcı madde, çalışmalarda farklı kombinasyonlarda kullanılacaktır. Bu guruplara ek olarak bazı formülasyonlarda kıvam arttırıcılar ve pH ayarlayıcı maddeler de kullanılacaktır. Nazal mukozanın pH değeri 6.8 olduğuna göre formülasyonların tümünde pH 6.8'e ayarlanacak veya pH'sı 6.8 olacak şekilde formüle edilecektir.

Hazırlama yöntemlerini değiştirerek veya yüzey etkin madde tiplerinde değişiklikler yaparak nazal formülasyon denemeleri yapılacak, görünüm ve santrifüjleme testi sonuçlarına göre değerlendirmeler yapılarak en uygun formülasyon saptanacaktır. Saptanan formülasyonun fiziksel özellikleri değerlendirilip, stabilite testleri ve reolojik analizler yapılacaktır.

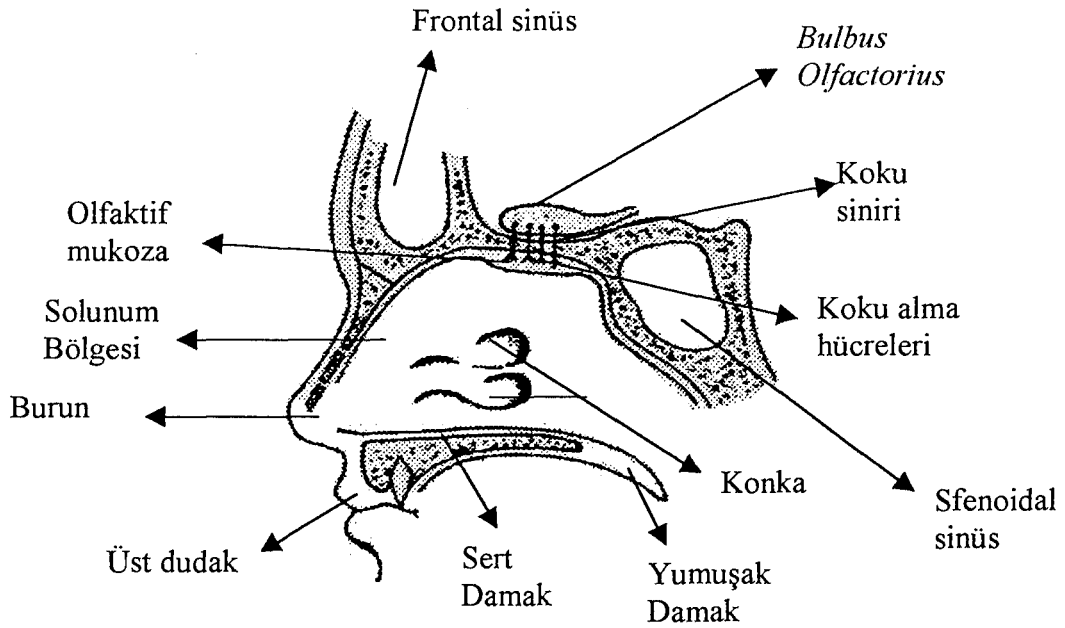
Fizikokimyasal testler sonucunda seçilen formülasyonun etkinliğini saptamak üzere, hayvanlarda histolojik çalışmalar yapılacaktır. Böylece halk arasında yaygın olarak intranazal yoldan kullanılan bitki ekstresinin kararlı ve etkili bir nazal formülasyonu oluşturulmaya çalışılacaktır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. BURUN

Solunum organları, burun boşluğu, farinks (yutak), larinks (gırtlak), trake, bronşlar, bronşiyoller ve alveollerden oluşmaktadır (1, 2). Üst solunum yolları burun boşluğu ile başlar (2). Solunum bölgesine hava burundan girer, farinksten geçerek larinkse ulaşır (1).

Burun boşluğunun ilk kısmı olan vestibulumda bulunan kıllar, havaya karışmış olan toz parçalarının daha ileriye geçmesine engel olur. Burun deliklerinin daha yukarı kısımlarında hava ısınır ve buraya kadar gelen tozlar her zaman ıslak olan mukozaya yapışır (3). Burun ve burun boşluğunun kısımları Şekil 2.1.'de gösterilmiştir (3, 4, 5, 6).



Şekil 2.1. Burun ve burun boşluğu

2.1.1. Burunun Anatomik Özellikleri

Burun, öne doğru bir çıkıntı halinde uzamış kısım ile arkada daha yaygın olan burun boşluğunu içerir (1, 3, 7). Dış görünüş olarak burun, üç yüzlü bir piramide benzer. Bu çıkıntının altı geniş bir boşluktur. Bu boşluğa burun boşluğu (*cavitis nasi*) denir (3). Burun içinde, yukarı doğru üç yol vardır: birisi ağız yönüne gider ki o delikten hava akciğerlere ulaşır; diğer iki yol da geniz yanında bulunan etmoid kemik diye anılan “süzgeç”e gider. Buradan, önce “durameter” denilen kalın zara daha sonra beynin önündeki *lobus olfactorius*'a ulaşır (7).

Burun boşluğunda dört kısım vardır (3). Bunlar önde burun delikleri ile dışa, arkada ise yutağa açılır (1, 3, 5). Burun boşluğunun iç yüzü mukoza ile örtülüdür (3). Burun boşluğunun etrafında bulunan lateral nazal duvarı oluşturan kemiklerin (*frontal, maxillar, ethmoid ve sphenoid*) içinde hava dolu geniş 4 çift boşluk vardır. Bu boşluklar nazal boşluk ve lateral duvardaki delikler ile iletişim içindedir. Bu boşluklara paranasal sinüsler (*sinus paranales*) denir (1, 3, 8). Sfenoidal sinüs, frontal sinüs (göz yörüngesinin üstündeki frontal kemiklerde), ön etmoid hava hücreleri (etmoid sinüsler) ve maksiller sinüsten oluşmuştur (1, 9). Lateral duvardaki çıkıntılar, konkalar, hem mukoz membranın yüzey alanını artırırlar hem de boşluktan geçerken havanın döndürülmesini sağlarlar; böylece hava ile mukoz membran arasındaki teması artırırlar. Bu temas partiküler maddeleri uzaklaştırmak ve havayı ısıtıp nemlendirmek için gereklidir. Burun boşluğu, mukoz salgı yapan bir çok beze sahiptir (1, 2).

Burun iskeletinin bir kısmı kemikten, bir kısmı ise kıkırdaktan yapılmış olup kas ve deri ile örtülmüştür. Burun sırtının alınla birleşen kısmına *radix nasi* denir. Burunun ucu ise *apex nasi* adını alır (3). Burun delikleri aşağıya doğru geniştir, yukarıya doğru daralır ve nazal boşluğa ulaşan vestibüllere açılırlar. Kıkırdaklar, burun deliklerinden hava geçişinin, kanatlara tutturulmuş istemle çalışan nazal kaslar tarafından kapatılmasını önlerler (1, 7). Burun delikleri ortada *septi nasi* denilen, kıkırdaktan yapılmış bir bölme ile birbirinden ayrılmış, sağ ve sol olarak ikiye

bölünmüş burunun kanatları ile yanlara bağlanmıştır (1, 3, 5). Önde kıkırdak ve arkada kemikten oluşan stroma iskeleti tarafından desteklenmektedir (1).

Burun boşluğunda oldukça az yer kaplayan *regio olfactorium* (koku alanı), sarımtırak renkli mukoz bir membrandır (4). Mukoz membran, nazal boşluğun üst bölgelerinde değişmiştir. Olfaktif epitel, havadaki kimyasallara tepki yeteneğine sahip sinir hücreleri içerir. Bu sinirler beyin tarafından koku olarak algılanan uyarıları naklederler (1).

Solunum bölgesinin arka kısmındaki endotelyal hücreler, 4-6 µm uzunluğundaki tüylerle kaplıdır. Silia, burunun ön 1/3 'lük kısmında yoktur. Burada endotelyal hücreler çıplak olarak görülebilir. Silialar hareketlidir ve dakikada 1000 titreşimlik bir frekansa sahiptirler. Herbir silianın titreşimi ileri doğru hızlı, geriye doğru yavaş dönüşü içerir. Silia tabakası, ince ve devamlı bir mukus tabakasıyla kaplıdır (5).

2.1.2. Burunun Fizyolojik Özellikleri

Burun boşluğunun iki farklı görevi, solunum ve koku almaktır (3). Kokulu madde moleküllerinin ilk önce havaya difüze olduğu ve burun çekme sırasında buruna girdiği bulunmuştur. Burun mukozasına gelen kimyasal maddeler burayı kaplayan mukus içinde erir ve koku duyusunu algılayan olfaktif reseptör hücrelerinde aksiyon potansiyellerinin oluşumuna neden olur (2, 6). Amoore'un ortaya koyduğu stereokimyasal bir teoriye göre, koku reseptör hücresinin membranında, koku molekülünün oturabileceği anahtar-kilit benzeri yerlerin (reseptör alanlarının) bulunduğu kabul edilmektedir (4). Wright teorisine göre ise, düşük enerjili moleküler titreşimler koku reseptörlerini uyarmaktadır (4). Soğuk algınlığı ve açlık gibi nedenlerle mukoza tıkanığında, koku duyusu azalır (6).

Solunum bölgesinin yüzey alanının çok geniş olmasının nedeni sinüslerdir ve etkin madde emiliminin en önemli miktarının burada olduğu düşünülmektedir (5). Sinüslerin fonksiyonları kafanın ön kısmında bulunan kemiklerin ağırlığını azaltmak ve dengenin sağlanmasını kolaylaştırmaktır (1, 3). Solunum bölgesindeki mukoz

membran çok sayıda mikrovilli taşır. Bu yapı, ince barsaklarda olduğu gibi, yüzey alanını ve dolayısıyla emilim alanını artırır (150 cm^2) (5, 10, 11, 12). Burunun solunum bölgesi mukozasındaki damar yatağının, sıvılarda çözülmüş maddelerin kandan dokulara ve tersi yönde hızlı geçişine olanak verecek şekilde olduğu bulunmuştur. GI kanalın çoğu bölgesinin iyi metabolize etme kapasitesinin tersine nazal mukozanın metabolize etme kapasitesi azdır (5). Bileşiklerin, mukoz membrandan emilim mekanizması nazal mukoza için de geçerlidir yani pasif difüzyon, kolaylaştırılmış transport ve aktif transport nazal mukozadan emilim mekanizmalarıdır (5, 13).

Burun boşluğunda zengin kan damarı (venöz) ağları vardır ve bunların sayesinde havanın sıcaklığı vücut sıcaklığına ayarlanır. Giren hava aynı zamanda nemlendirilir (2). Salgı yapan bezler burun mukozasını devamlı nemli tutar (3).

2.1.3. Burunun Histolojik Özellikleri

Nazal boşluğun değişik bölgelerinde, membran kalınlığı, damarlanması ve histolojik yapısında farklılıklar vardır. Üst bölgeler ile septumun üstünde kalın ve çok damarlı bir membran varken, nazal boşluğun tabanında ve sinüslerde membran çok incedir (5). Nazal boşluğun en geniş olan alt bölgesi solunum bölgesi, en uç ve üst kısımları ise koku bölgesidir (5, 9). Nazal boşluk, yalancı çok katlı silialı prizmatik tipte epitel ile döşelidir (8, 14).

Paranasal sinüsler, nazal boşlukta bulunandan daha ince yalancı çok katlı silialı prizmatik solunum epiteli ile döşelidir. Daha az sayıda Goblet hücresi ve salgı bezi içeren lamina propria'dan oluşur (8, 9). Paranasal sinüslerin tümü, delikler aracılığı ile nazal boşlukla iletişim halindedir (9). Bu boşluğun mukus ürünü, titretilmiş epitel hücrelerinin faaliyeti sonucunda burun boşluğuna boşaltılır (8).

Solunum bölgesi: Nazal boşluğun mukozası özel solunum epiteliyle döşenmiştir. Nazal kaviteden larinkse doğru, epitel, yer yer çok katlı yassı olur. Bu tür epitel, direkt hava akımına veya fiziksel aşınmaya uğrayan bölgelerde belirgindir ve aşınmaya karşı tipik solunum epitelinden daha koruyucudur (8). Solunum

mukozasının lamina propria'sında zengin damar pleksusları, çok sayıda mukoz ve seröz bezler bulunur (8, 9). Lamina propria, mukoz ve seröz salgıların bulunduğu bağ dokusu tarafından desteklenir (9).

Olfaktif bölge: Nazal boşluğun aşağıya doğru genişleyen kısmı ve septuma bitişik bölümde yer alan ve solunum mukozasının pembe renginin tersine sarımsı kahverengi renk ile diğer bölgelerden ayırt edilen yere koku bölgesi denir (2, 3, 9). Bu bölgede bulunan epitel hücreleri arasındaki koku hücreleri, burun mukozasına doğru yönelmiş bir takım küçük uzantılara (dendrit) sahiptir (2, 3, 4). Olfaktif epitel, yaklaşık 60 µm uzunluğundadır. Goblet hücreleri ve farklı bazal laminası bulunmaz. Olfaktif epitelde, kalın, kısa apikal mikrovillileri içeren fırçamsı hücreler bulunur ve bu mikrovilliler sinir lifleri ile temas ederek, muhtemelen, olfaktif mukozadaki duyuları alırlar (9).

2.1.4. Nazal Mukozanın Özellikleri

Mikrovillilerin emilim için uygun, geniş yüzey alan yaratmasının yanısıra, nazal mukozanın kan damarlarınca zengin olması, birçok ilaca karşı yüksek geçirgenlik ve hızlı emilim sağlar (5, 10, 11, 14, 15).

İyonik ilaçlar, kısmen de peptidler ve proteinler için nazal mukozanın elektrik yükünün araştırılması önemlidir. Birkaç çalışmada nazal mukozanın elektrik iletkenliği rapor edilmişken, NaCl ve KCl çözeltilerinde nazal mukozanın elektrik yükü bilinmediğinden Maitani ve ark. (16) tavşanlarda membran potansiyelini ölçerek nazal mukoza üzerine safra tuzlarının etkisini araştırmışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre, nazal mukoza membranı negatif yüklüdür ve membran yük yoğunluğu, KCl çözeltisinde -3.4 mm/L iken, NaCl çözeltisinde -3.5 mol/L'dir. Safra tuzları nazal mukozadan geçmiştir ve negatif membran yükü yoğunluğu artmıştır (16). Safra tuzları, küçük ve büyük peptid ilaçların nazal taşınmasında anlamlı bir artışa sebep olmuştur (17). Sekretin emilimi, 0.462 M NaCl çözeltisi ile incelenmiş ve bu konsantrasyonun sekretin emilimi için yeterli NaCl molar konsantrasyonunu sağladığı ileri sürülmüştür. Sulfisoksazol'ün biyoyararlanımı ise, NaCl çözeltisinin

osmotik basıncının artırılması ile düşmüştür (18). Aminoasitler gibi, peptidlerin de, nazal membranın su içeren porlarından geçtiği kabul edilmektedir (19).

2.1.4.1. Mukus salgısının özellikleri

Mast hücreleri, polimorf çekirdekli lökositler ve eosinofilleri içerir. % 95'i su, % 2.5-3'ü tuz ve % 1-2'si müsin'den (kükürtlü skleroprotein) oluşur (20). Proteinler endoplazmik retikulumdan, karbonhidratlar ise golgi cisimciklerinden salgılanır. Salgı miktarı 24 saatte 1 L civarındadır (5, 20).

Mukus örtüsünün yüzeyi incelendiğinde üst tabakanın viskoz, alt tabakanın ise yapışkan olduğu görülür (5). Nazal boşluktaki havanın döngüsü, partiküler maddeleri sürükler ve yapışkan mukus ile temasını sağlar (1). Solunan partiküller veya damlalar mukus tabakasına gelince 15-20 dakika içinde klerense uğrarlar (13). Boyutu 1 µm'den küçük olan partiküller mukus üstünde açığa çıkmazlar, ancak solunan havayla akciğerlerin bronşiyal bölgesine kadar ulaşırlar. Büyüklüğü 10-15 µm'den fazla olan partiküller ise burunun ön bölgesinde tutulurlar (5, 13). Mukus tarafından tutulan partiküller membran yüzeyindeki siliaların hareketi tarafından oluşturulan akıntı ile oral farinkse taşınırlar (1). Silia hareketleri ile, üst mukus tabakası nazofarinkse 5 mm/dk hızla taşınır (13).

Silialar her yerde aynı sıcaklık ve harekette değildir (5). Silia hareketine etki eden faktörler; sıcaklık, nem, tahriş, etkin madde, çözücü ve pH'dır (20). Siliaların hareketi için en uygun sıcaklık 18-37°C'dir; 7-12°C'de hareketleri durur (5). Sinüs membranları tarafından oluşturulan mukus, içeride sinüs deliklerine açılıncaya kadar siliar hareketler ile nazal boşluğa eklenirler (1).

2.2. NAZAL SİSTEMLER

2.2.1. Tanımı ve Tarihçesi

Nazal ilaç taşıyıcı sistemler, buruna uygulanan tek veya iki fazlı sistemlerdir. Nazal çözeltiler, damla veya aerosol şeklinde uygulanırlar (20). “ Nazal” kelimesinin sözlük anlamı buruna ait, genizden veya burundan gelendir (21). Nazal yol, uzun süre, nazal mukozadan yerel etki sağlamak için, çoğunlukla alerjik burun iltihabı ve yaygın soğuk algınlığı semptomları gibi sınırlı durumlarda tedavi için kullanılmıştır (5, 11, 22, 23). Burun enfeksiyonlarının tedavisinde antibiyotikler, dekonjestan olarak vazokonstrüktörler, sprey veya merhemler içindeki antihistaminikler, ve antiallerjik bileşikler bunlara örnek gösterilebilir (5, 22, 24). Son yıllarda nazal yola artan ilgi, etkin madde uygulamasında uygun ve güvenilir bir yol olduğundan dolayıdır (25). Hussain ve ark. (26) propranolol ve progesteron gibi etkin maddelerin nazal uygulama ile insan ve hayvanda etkili ve tamamen absorpsiyonunun sağlandığını bildirmişlerdir. Son zamanlarda ise bu yol peptid ve protein yapısındaki ilaçların taşınması için olası bir yol olarak öne sürülmektedir (24). Vazokonstrüktör ve antihistaminik ilaçların yerel kullanımı sırasında sistemik yan etkilerinin görülmesi, nazal yolun sistemik etki sağlamak amacıyla da kullanılabileceğini ortaya çıkarmıştır (5).

2.2.2. Nazal Uygulama

Nazal membranın, sistemik veya lokal etki sağlamak için etkin madde emiliminde uygun bir alan olabileceği görülmektedir (22, 27). Nazal yol ile ilaç taşınmasında, etkin madde, karaciğerde ilk geçiş etkisine uğramadan direkt olarak genel dolaşıma girer (14, 15). GI bölgedeki parçalanma, yaygın mukozal veya hepatik metabolizasyondan dolayı düşük oral biyoyararlanımı olan ilaçların sistemik taşınması için nazal yola gittikçe artan bir ilgi vardır (23).

Peptid bileşiklerinin parenteral uygulanmasına alternatif olan rektal, vajinal ve bukkal yollara oranla, nazal yol daha uygun ve güvenilir bir yol olarak gösterilmiştir (25). Bununla birlikte, genelde, birçok peptid ve protein yapısındaki maddenin rektal, vajinal ve bukkal gibi diğer non-parenteral yolların yanısıra nazal mukozadan emilimi de nispeten azdır (23). Transmukozal penetrasyonu arttırmak için birçok farklı ajan denenmişse de bunların tümünün kullanımı uygulama bölgesinde neden oldukları histolojik değişikliklerden dolayı sınırlandırılmıştır (28).

Nazal uygulama yoluna olan ilgi, aşağıdaki özellikleri ile açıklanmaktadır (10):

- Geçirgen özelliğe sahip yüksek damarlanma özelliğindeki mukoza ve yüksek damarlanma gösteren subepitelyal tabaka (5, 14),
- Mikrovillilerden dolayı, etkin madde emilimi için geniş yüzey alan (5, 10, 11, 12, 14, 15),
- Karaciğerden ilk geçiş etkisinin olmaması (5, 14, 15),
- Uygulamanın kolaylığı ve kabul edilebilirliği (23, 29).

2.2.2.1. Nazal uygulama yolunun diğer uygulama yolları ile karşılaştırılması

Nazal mukozanın sahip olduğu özelliklerden dolayı birçok etkin madde bu bölgeden etkin olarak emilim göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, pH 4.0 tampon çözeltisinde, etkin maddenin nazal uygulamadan sonraki biyoyararlanımının (% 17.1) oral uygulamadan sonrakine (% 0.8) oranla 21 kez daha fazla olduğu bulunmuştur (30).

Lipofilik bir etkin madde olan propranolol'un, sıçanlarda, köpeklerde ve insanlardaki nazal uygulaması, i.v. uygulamayı izleyen ilaç-kan düzeyi sonuçları ile benzer olarak sonuçlanmıştır. Sıçanlarda, polar katerner amonyum bileşikleri ve klofilyum tosilat kullanılarak yapılan çalışmada, nazal uygulamadan sonraki kan düzeylerinin i.v. uygulamadan sonra gözlenenler ile benzer olduğu bulunmuştur. Oral biyoyararlanım ise i.v. biyoyararlanımın % 1.3'ü kadar bulunmuştur (25).

Hirai ve ark., nazal yol ile insülin uygulanmasının, uzun süreli tedavi için, diğer non-parenteral yollara göre daha etkili ve yararlı olduğunu bildirmişlerdir (18).

Intramusküler enjeksiyonun dezavantajları tüm dünyaca bilinmektedir. Genellikle enjeksiyonları uygulamak için, sağlık personeline ihtiyaç vardır ve bazen uygulama çok acı verebilir (31). Dolayısıyla, enjeksiyon ile oluşan acı, hastanın kabul edebilmesinde azalmayla sonuçlanmakta ve kronik tedavi gerektiğinde, olası komplikasyonları uzaklaştırmak için hastanın uygulamayı dikkatli yapması ve kendi kendine uygulamasına yeterli olacak şekilde yetiştirilmesi gerekmektedir (23). Ayrıca enjeksiyon, rahatsızlık, allerjik reaksiyon ve doku lezyonlarına yol açabilir (18). Bunların tam tersine, nazal yol hasta tarafından kolaylıkla kabul edilebilir (23). İntranazal uygulama, intramusküler uygulamaya alternatif olarak gösterilmektedir (31).

2.2.2.2. Nazal emilime etki eden faktörler

Nazal emilime etkili faktörleri iki grupta toplamak mümkündür (5):

- Etkin maddeye ait fizikokimyasal faktörler,
- Sistemik absorpsiyonu etkileyen diğer faktörler.

a) Etkin maddeye ait fizikokimyasal faktörler :

Nazal mukozanın emilim özellikleri GI kanaldan farklıdır (5). Her iki mukozanın geçirgenliğinin molekül ağırlığına bağımlılığı incelenmiş ve bu mukozaların geçirgenlik özelliklerindeki farklılıkların her iki yolun kütle transport karakteristiklerinin kantitatif değerlendirilmesi ile ortaya çıktığı gösterilmiştir (32). Harris ve ark., nazal biyoyararlanımda, konsantrasyon ve uygulanan hacmin etkili olduğunu göstermişlerdir (5). Aynı araştırmacılar, bir başka çalışmada vizkozite, nazal klerens ve partikül büyüklüğünün nazal taşıyıcı sistemlerin tasarımında önemli olduğunu belirtmişlerdir (5, 33). Mukozadan çözeltinin hızlı klerensi önemlidir. Nazal klerensi önlemek için bir yol da biyoadhezif mikrokürelerin hazırlanmasıdır (33). Mukosiliar klerensi etkileyen faktörler arasında, mukusun viskoelastisitesi, mukus tabakasının kalınlığı, yerçekimi ve geriye dönen hava akımı sayılabilir. Yapılan bir çalışmada, mukosiliar klerens ile siliar titreşim frekansı arasında önemli bir korelasyon olduğu bulunmuştur (5).

Düşük oral biyoyararlanımlı ilaçların sistemik olarak taşınması için birkaç transmukozal yoldan birisi olan nazal yol uygulaması araştırmaları sürmektedir (28). Skopolamin, hidralazin ve propranolol gibi geleneksel olarak peroral uygulanan maddelerden, insülin gibi yalnızca parenteral dozaj şekli olan büyük polipeptid bileşiklerine kadar farklı bileşikler için nazal boşluktan sistemik emilim bildirilmiştir (14). Antidiüretik ajan olan oksitosin veya desmopresin asetat gibi etkin maddelerin sistemik uygulaması için de nazal yolun geçerli olduğu belirtilmiştir (25).

Donovan ve ark. (32), farklı fizikokimyasal özellikte bileşikler kullanarak molekül büyüklüğünün membran geçirgenliği üzerine etkisini incelemişler ve molekül ağırlığı 300 daltondan küçük oligomerler için emilimin yaklaşık %60'tan neredeyse %30'a düştüğünü bildirmişlerdir. Hirai ve ark. hayvanlarda yaptıkları çalışmalarda molekül ağırlığı büyük olan polar maddelerin emiliminin fazla olduğunu göstermişlerdir (5). Birçok büyük moleküler ağırlıklı bileşikler, formülasyona sadece emilim arttırıcı eklendiğinde anlamlı nazal emilim gösterirler (14). Fisher, hidrofilik bileşiklerin molekül ağırlığı ile emilimi arasındaki ilişkiyi incelemiş ve molekül ağırlığı arttıkça emilimin azaldığını gözlemiştir (5). Düşük moleküler ağırlıklı lipofilik bileşikler nazal epitelden genellikle kolay emilir, hidrofilik ve makromoleküllü bileşikler ise az emilir (29).

b) Sistemik emilimi etkileyen diğer faktörler :

Bu faktörleri üç gurup altında toplamak mümkündür (5, 12, 27):

- i. Etkin Madde Etkisi : Molekül büyüklüğü, hidrofilik /lipofilik karakter, enzimatik bozunma.
- ii. Nazal Etki : Nezle, lokal patolojik değişiklikler, soğuk, membran geçirgenliği, pH.
- iii. Taşıyıcı Etkisi : Formülasyon, taşıyıcı sistem, dağılım ve klerens.

Bahsedilen faktörlerden pH değeri, çalışmamızda detaylı olarak incelenmiştir. Hazırlanan formülasyonların nazal pH'ya uygun olması hedeflendiğinden, bu konudaki çalışmalar gözden geçirilmiştir.

USP 24'e göre nazal mukozanın yüzey pH'sı 4.5-7.4 arasındadır (34). Nazal yoldan etki sağlanması için yapılan çalışmalarda pH 2-7.4 arasında değişmektedir. [pH 6.45-6.74 (15), pH 4.0, 5.1, 6.3 (30), pH 2.4, 3.8, 4.75, 6.0 ve 7.20 (25), pH 2-7.1

(18), pH 7.0 (33), pH 7.2 (5, 22), pH 6.5-7.5 (20), pH 7.4 (11, 17, 35, 36, 37), pH 4-5-7 (38)]. pH 7.2'de etkin maddenin iyonizasyon derecesi, ilgili maddenin pKa'sına göre gerçekleşir. Bu da pasif difüzyonla emilecek etkin maddenin miktarını etkiler (5). Sekretin formülasyonunun pH değeri 7 den 2.94'e doğru indikçe nazal mukozadan sekretin emilimi doğrusal olarak artmış ve pH 2.1 ve 2.94'te ise yaklaşık olarak aynı kalmıştır (18).

2.2.2.2.1. Nazal olarak uygulanabilecek maddeler

Her ne kadar nazal taşınma, etkin maddenin sistemik emilimi için alternatif ve geçerli bir yol olabilir ise de, partiküllerin nazal boşlukta dağılılabirliği ve pozisyon kaybının önceden nasıl kontrol edilebileceği; ilaç ve partikülün mukus ile nasıl etkileştiği; mukozanın hastalık durumlarının ilaç emilim oranı ve kapsamı açısından nasıl etkilediğinin daha iyi anlaşılması gerekir (11).

Nazal yol:

- 1- Oral yoldan emilimi güç olan etkin maddeler,
- 2- Gastrointestinal (GI) kanalda metabolize olan etkin maddeler,
- 3- Karaciğerde ilk geçiş etkisine uğrayan etkin maddeler,
- 4- Özellikle biyoteknoloji alanında peptid ve proteinlerin taşınması konusunda, kullanılmaktadır (5).

2.2.2.2.2. Nazal formülasyonda kullanılan maddeler ve özellikleri

Bukkal, oküler, rektal, vajinal ve nazal yollardan emilimi arttırmak için, özellikle peptidler ve proteinler gibi büyük, hidrofilik ilaçların terapötik kan düzeylerine ulaşmalarını sağlamak amacı ile yardımcı maddeler gerekmektedir (28). Nazal uygulamada, nazal mukoza ile temas süresinin, siliar ve mukus hareketleri nedeniyle kısa olmasına bağlı olarak, etkin maddeden beklenen biyoyararlanım da azalmaktadır. Temas süresini arttırmak amacıyla, sıvıyla temas edince şişen hidrofilik ve mukoz tabakaya yapışan adhesif, jelle benzeyen ve ilacı kontrollü salan

“biyoadhesif maddeler”den yararlanılmıştır. Biyoadhesif polimer maddeler, mukus salgısının yapısındaki glukoproteinlere ve jel yapısındaki uzun zincirli oligosakkaritlere doğru yayılır. Biyoadhesif polimerle dokunun ara yüzeyinde yer alan mukus tabakasının salgıladığı münde şişen polimer, bir jel oluşturur ve etkin madde bu jelden difüzyonla serbestleşir. Biyoadhesif maddelerden, Carbopol 934[®], Carbopol 941[®], albumin, nişasta-sfereks ve (dietilamino) etil eter-Sefadeks polimerleri nazal uygulamada kullanılmıştır (5).

Nazal uygulamada, özellikle molekül ağırlığı büyük olan etkin maddelerin emilim yetersizliği problemini çözmek için emilim artırıcı maddelerden yararlanılmıştır (5, 14). Peptid ve proteinlerin nazal emilimini arttırmaya yönelik olarak, çoğu çalışmada, safra tuzları ve safra tuzları türevleri, anyonik ve noniyonik yüzey etkin maddeler, yağ asitleri ve şelat yapıcı ajanlar gibi penetrasyonu artırıcı maddeler kullanılmıştır (12, 39). Nazal emilime yardımcı olarak bildirilen diğer bileşikler; fusidik asit ve türevleri, basitrasin gibi lokal antibiyotikler, orta zincirli yağ asidi tuzları, yağ asidi ve safra tuzları kombinasyonları, siklodekstrin ve fosfolipidlerdir (12, 14, 40). Saponin ve safra tuzları en çok kullanılan yüzey etkin maddelerdir (5). Noniyonik ester tipi yüzey etkin maddelerin, eter tipi yüzey etkin maddelere göre daha az etkili olduğu ve propilen glikol, polioksietilen 100 gibi maddelerin ise etkisiz olduğu saptanmıştır (41).

Birçok emilim artırıcı madde mukoz membrana iritan etki gösterir (23). Genelde, emilim artırıcılar nazal membranın geçirgenliğini veya membran akışkanlığını değiştirirler. Ayrıca safra tuzları gibi bazı maddeler de mukusun viskozitesini azaltmaktadır (5).

Özellikle, ilaç taşıyıcı sistem kronik bir hastalığın tedavisinde kullanılıyorsa, silia içeren membranın devamlı şekilde zarar görmesi mümkündür. Emilim artırıcı olarak kullanılan yüzey etkin maddenin nazal mukozada neden olduğu hasar konusunda çok az çalışma vardır. Hirai ve ark., Lauret 9 adlı emilim artırıcı yüzey etkin madde ile mukozada oluşan zararın, uygulamanın sonlandırılmasından 24 saat sonra bile var olduğunu göstermişlerdir (5).

Yapılan diğler çalışmalarda, etkin maddenin dozunu arttırarak, burundaki klerens mekanizmasını mukoadhesif sistemlerle azaltarak, ve safra tuzları ve türevlerini içeren yüzey etkin maddeler, şelat yapıcılar ve enzim inhibitörleri gibi emilim arttırıcı yardımcı uygulayıcılar ile nazal emilimin arttırılması başarılmıştır (23, 37).

Formüle edilen etkin maddelerin mikrobiyal bozunmaya karşı korunması için tek ajandan çok kombinasyon halinde koruyucu kullanılması yaygınlaşmaktadır. Bu değişimin sebebi bir antimikrobiyalin tek başına geniş spektrum üzerine etkili olamamasıdır (42). Koruyucu olarak çok sık ve yaygın olarak nazal formülasyonlara eklenen benzalkonyum klorürün (BAC), sıçanların nazal boşluğuna % 0.1, 0.05 ve 0.01 (a/h) uygulanması sonucu mukoz membranda oluşan lezyonlar incelenmiştir (40, 43). % 0.01 (a/h) BAC uygulanmış guruplarda BAC kaynaklı nazal lezyon veya patolojik semptom gözlenmezken, % 0.05 ve 0.1 (a/h) BAC uygulanmış guruplarda nazal boşluğun anterior kısmında BAC kaynaklı lezyonlar gözlenmiştir (43). Nazal olarak uygulanan BACün başlıca solunum epitelyumunu etkilediği saptanmıştır (40, 43). BAC, yüksek konsantrasyonlarda nazal boşluğun mukus membranını uyarır (43). BACün nazal ilaç formülasyonlarında kullanımı dünya çapında kabul edilmiştir (40). Bir ürünün etkili olarak korunduğunu belirlemek için USP 23'e göre, 14 gün kültür ortamına ekilmesi ile çeşitli bakteri konsantrasyonlarının 1000 kat azalması ve maya-küf konsantrasyonlarının ilk 14 gün boyunca baştaki seviyede kalması veya aşağısına düşmesi gerekmektedir (42). USP 24'e göre kullanılan tüm antimikrobiyal ajanlar toksik maddelerdir ve hastaların maksimum güvenliği için bitmiş preparatlardaki etkili koruyucu konsantrasyonu insana toksik olabilecek düzeyin aşağısında olmalıdır (34).

2.3. SINÜZİT

Sinüzit, sinüs hava boşluklarının veya paranasal sinüs mukozasının enflamasyonu olarak tanımlanabilir (44, 45, 46). Buruna açılan sinüslerin tıkanmasıyla burunun şişmesi sonucunda, sinüs boşluğundaki doku tabanının enfekte

olmasıyla oluşur (47). Sinüslerin drenaj deliğinin tıkanmasına bağlı olarak uzun süren iltihabi bir olaydır (8).

Sinüzit üç tipte sınıflandırılır: akut, subakut ve kronik sinüzit. Akut sinüzit 3 haftadan daha az süre devam eden, subakut sinüzit 3 hafta ile 3 ay arasında devam eden enfeksiyondur (44). Kronik sinüzit ise 3 aydan daha uzun süre devam eden enfeksiyon veya enflamasyon durumudur (44, 47). Akut sinüzitte hastaların en sık şikayeti baş ağrısıdır. Ağrı genellikle basınç hissi ile birlikte. Kronik sinüzitte baş ağrısının şiddeti daha az ancak süresi daha uzundur. Başta ağırlık hissi vardır. Nazal sekresyon ve burun tıkanıklığı akut sinüzite göre daha hafiftir. Akut sinüzitte genellikle hastalığı başlatan üst solunum yolu viral enfeksiyonlarıdır (44).

Sinüzit, bakteri, virüs veya hastalığa neden olan mikropların karışımı nedeniyle olabilir, bulaşıcı bir hastalık değildir (45). Akut sinüzitte en sık rastlanan bakteriler, ise *pnömokoklar*, *Hemofilus influenza*, *Branhamella kataralis* ve nadiren de *Staphylococcus aureus*'tur. Kronik sinüzitte ise *Bakteroides* ve *Peptokokus* gibi anaerobik patojenlere akut sinüzite oranla daha sık rastlanır. Erişkin hastaların % 20'sinde etken, *rinovirüs*, *influenza virüsü* veya *parainfluenza virüsüdür* (44).

Baş ağrısı, diş ağrısı, burun tıkanıklığı, yoğun, renkli mukus, sinüs hassaslığı ve rahatsızlığı, koku ve tad duyusu yokluğu veya azalması, çığnerken ağrı ve kötü solunum sinüzit semptomlarıdır. Sinüzit astıma neden olabilir. Sinüs enfeksiyonunu tedavi etmek astımı iyileştirebilir veya yok edebilir (47).

Mukus, bakteriler için üreme yeri haline gelen sinüslerde tutsak kalır (47). Sinüzitin tedavisi tıbbi ve cerrahi olmak üzere ikiye ayrılır (44). Tıbbi tedavinin temelini antibiyotikler oluşturmaktadır. Antibiyotiklerin yanında ağrının kontrolü için analjezikler, mukus inceltici ajanlar, alerjik insanlarda antihistaminikler, dekonjestanlar, veya steroid burun spreyleri kullanılabilir (44, 46, 47).

2.4. ECBALLIUM ELATERIUM BİTKİSİ

2.4.1. Genel Özellikleri

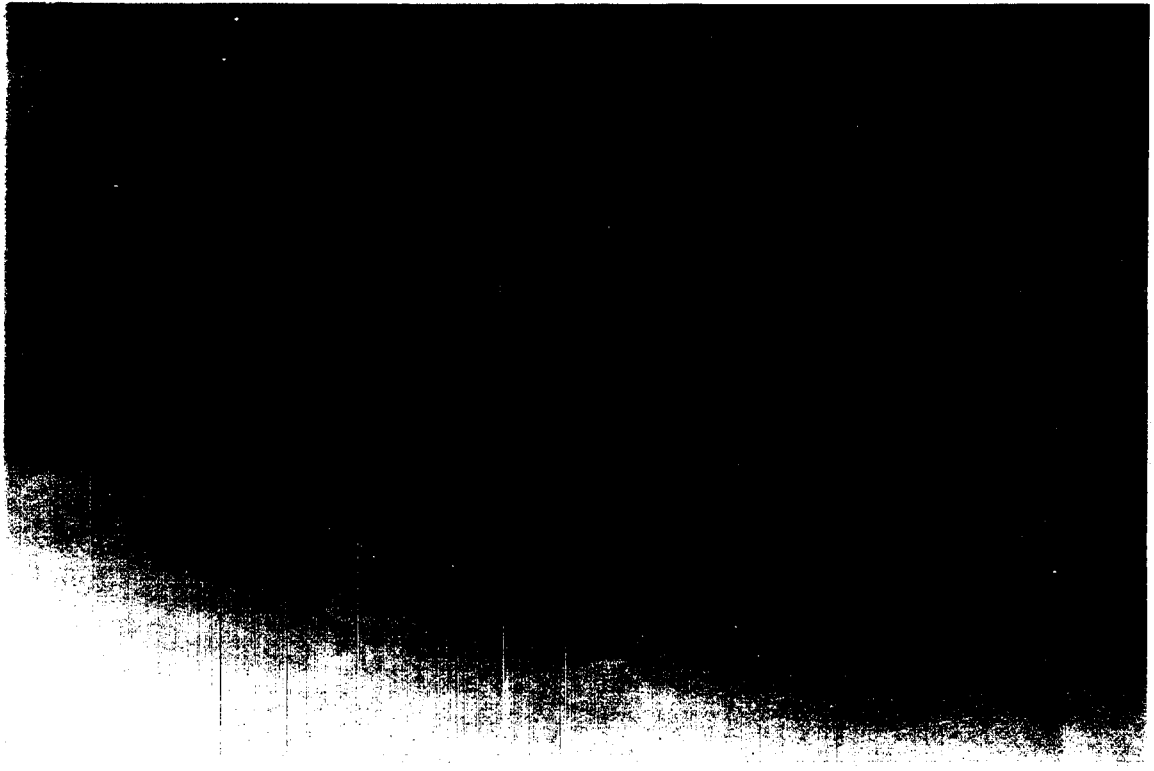
Ecballium elaterium A. Richard bitkisi Cucurbitaceae familyasına aittir. Şehir ve kasaba yakınlarındaki viraneliklerde, arsa ve yol kenarlarında yetişir. Mayıs-Eylül ayları arasında açık sarı renkli çiçek açan, çok yıllık, tüylü, otsu, monoik ve sürünücü bir bitkidir (48, 49, 50). Yazın sonlarında, bol miktarda, olgunlaşan meyve taşır (51).

Ecballium elaterium, Akdeniz Bölgesi'nde yaygın olarak yetişen bir bitkidir (52, 53). Yeşilada ve ark. (54) tarafından yapılan çalışmada, bitkinin Toros Dağları'nın iç kısımlarında bulunduğu, halk arasında "kedikeleği" adı ile bilindiği ve suyunun buruna çekilerek sarılık tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir. Fujita ve ark. da (55), Orta ve Batı Karadeniz Bölgelerindeki halk ilaçlarını ve kullanılışlarını incelemişler ve bunlar arasında *Ecballium elaterium* A. Rich meyvelerinin suyunun buruna direkt uygulanmak suretiyle sarılığa karşı kullanıldığını göstermişlerdir. Honda ve ark. ise (56), Batı Anadolu'daki geleneksel ilaçları incelemişler, bunlar arasında *Ecballium elaterium* A. Rich meyvelerinin, cırtatan, şeytan keleş adı ile bilindiğini ve sarılık ve sinüzit tedavisinde kullanıldığını belirtmişlerdir (56).

Meyve 3-5 cm uzunluğunda, oval biçimli, üzeri sert tüylerle örtülü, sarımsı-yeşil renkli bir bakkadır (49). Halk arasındaki isimleri, acıdülek, acıdüvelek, acıkavun, cırtlak, cırtatan, hıyarcık, kargadüveleş, şeytankeleş, yabani hıyar'dır (48, 55). Olgun meyve, içinde oluşan basınç yüzünden, sapa bağlandığı yerden kopar ve bu sırada içindeki tohumları oldukça uzak mesafelere fırlar (49, 57). Tohumlarla birlikte dışarı fıskıran usare özellikle gözler için çok tahriş edicidir. Olgun meyvelere dokunarak bu olay gözlenebilir (50). *Ecballium elaterium* meyve ve çiçeklerinin genel görünüşü Şekil 2.2.'de, *Ecballium elaterium* meyvelerinin görünüşü ise Şekil 2.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.2. *Ecballium elaterium* meyve ve çiçeklerinin genel görünüşü



Şekil 2.3. *Ecballium elaterium* meyvelerinin görünüşü

2.4.2. Kimyasal İçeriği

Cucurbitaceae, kurbitanlar veya kurbitasinler olarak adlandırılan tetrasiklik triterpenoidler içerir. Bunlar farmakolojik olarak çok etkili bileşiklerdir. Genellikle memeli hücrelerine toksik olan maddelerdir ve meyvelerin acı tadından sorumludurlar (58).

a) *Kurbitasinler*: *Ecballium elaterium*'dan ilk izole edilen kurbitasin, 1831'de Morris ve Hennel'in izole ettiği α -elaterin (Kurbitasin E)'dir. Molekülün kesin formülü ve molekül ağırlığı 1957'de Rivett ve Herbstein tarafından $C_{32}H_{44}O_8$ olarak kanıtlanmıştır (50). 1909'da, Power ve Moor, bitkiden β -elaterin'i (Kurbitasin B) izole etmişlerdir (50, 59). Bitkiden ayrıca Kurbitasin D, I, G, H, R de elde edilmiştir (50, 60, 61). Kurbitasin E, B, C, I, D, G, H, bitkinin meyvelerinde, yapraklarında ve köklerinde bulunmuştur (61).

b) *Steroller*: Bitkiden elde edilen başlıca sterol elasteroldür. 1967 yılında Gonzalez ve Panino tarafından izole edilmiştir. Ayrıca dihidroelasterol ve stigmasterol bulunduğu da 1979'da Hyland ve Oskoui tarafından saptanmıştır. Meyvenin olgunlaşması sırasında sterollerin miktarı düşmektedir (50).

c) *Fenolik Bileşikler*: Miktarları azdır. Bunlar hidrokinon 2-nitrokinol, nitrokinon, 4-hidroksi asetofenon, 4-hidroksi-3-metoksi asetofenon ve 4-hidroksifenil-diepoksilignan ve kafeik asittir (50).

d) *Aminoasitler*: Tohumlarda m-karboksi fenilalanin (62) ve β -pirazolilalanin, gövdede n-etil asparagin bulunur. Köklerde allantoin vardır (50). *Ecballium elaterium*'dan N-etil-L-asparagin izole edilmiştir (63). Az miktarda β -pirazol-1-ilalanin ve peptidleri bulunur (62). *Ecballium elaterium* meyve suyundan elateraz izole edilmiş ve meyvelerde serbest elaterin, elaterinid ve diğer üç glikozidin doğal olarak bulunduğu gösterilmiştir (64).

e) *Yağ Asitleri*: Kök, yaprak ve meyvede bulunmuştur. Bunlar laurik, miristik, palmitik, linoleik ve linolenik asitlerdir (50).

Diğer bir çalışmada, *Ecballium* ekstresinde, sisteik asit, aspartik asit, glutamik asit, serin, glisin, asparagin, treonin, alanin, glutamid, α -aminoadipik asit, γ -aminobutirik asit, valin, lösin, N-etil-L asparagin bulunmuştur (63).

Olgun meyvelerin sıkılmasıyla elde edilen sıvı, 24 saat bekletildiğinde yeşilimsi kahverengi bir çözelti haline gelir ve yeşil bir çökelek oluşur. Kahverengi çözelti çeşitli çözücülerle ekstre edilirse, alifatik asit karışımı (genellikle linolik, linoleik, palmitik ve stearik asit) elde edilir. Meyvenin suyu amilaz, proteaz ve elateraz enzimlerini içerir (59). *Elaterium* adı ile bilinen bu ürün tıbbi özelliklerinden dolayı çok uzun yıllardır kullanılmaktadır (52). 1949'dan bu yana British Pharmacopeia ve British Pharmaceutical Codex'te yer almaktadır (52, 61).

2.4.3. Farmakolojik Özellikleri

Ecballium elaterium meyvelerinin sıkılması ile elde edilen sıvı, halk ilacı olarak, yaygın bir şekilde sinüzite karşı kullanılmaktadır (57, 65). Sıvı uygun dozlarda aerasyon azalması, başağrısı, postnazal akıntı ve burun tıkanması gibi sinüzit belirtilerine karşı etkilidir (57). *Ecballium elaterium* suyunun buruna damlatılmasıyla kronik sinüzitli olgularda subjektif şikayetlerin büyük oranda ortadan kalktığı ve sinüs aerasyonunun sağlandığı saptanmıştır. Usarenin burun mukozasında ödem, irritasyon ve venlerde dilatasyon yaptığı ayrıca damar permeabilitesini artırma ile sonuçlanan parasempatik etki yaptığı belirlenmiştir. Bu nedenle veya katartik etkisi nedeniyle NaCl ile hazırlanan çözeltisinin yüzey gerilimini azaltarak ve/veya difüzyon kabiliyetini artırarak, burun sekresyonunu arttırdığı ve sinüs aerasyonunun düzelmesini sağladığı bulunmuştur. Çözeltiler burun mukozasına damlatıldıktan bir süre sonra seröz ve serömukoz burun akıntısı başlamakta ve 3-4 saat devam etmektedir. Bu sırada burun mukozasında hiperemi, ödem ve buna bağlı olarak hafif nazal obstrüksiyon oluşmaktadır (66).

Ecballium elaterium meyvelerinin suyu farelerde antienflamatuar etkisinden dolayı incelenmiştir (65, 67, 68). Güçlü antienflamatuar etki prostaglandin-mediatör mekanizması varlığında 3-5 saat arasında gözlenmiştir (67, 68, 69). 200 mg/kg dozda

görülen yüksek antienflamatuar etkiye karşılık toksik etki gözlenmemiştir (65). LD₅₀ dozun 1/8 ve 1/6'i oranda, i.p. uygulanan *elaterium*, % 60'a yaklaşan güçlü antienflamatuar etki göstermiştir ki bu değer aspirin (200 mg/kg) kadar güçlüdür (69).

Elaterium, "hotplate testi" ile anlamlı analjezik etki göstermemektedir; ancak ağrı, kimyasal bir ajan veya herhangi bir dozda karagenin tarafından oluşturulduğunda analjezik etki görülmüştür (69). i.p. uygulanan *elaterium*, asetik asit uygulaması ile oluşturulan ağrıya karşı standart aspirin tedavisinden daha yüksek analjezik etki göstermiştir. Dioscorides, toz *elateriumun* (meyvelerin suyunun çökeleği) süt ile karışımının, burun deliklerine uygulanmasının, *ikterus*'u gidermiş olduğunu ve uzun süreli baş ağrısını tedavi ettiğini açıklamıştır (65).

Meyvelerin suyu, Ürdün, Lübnan ve Hindistan'da sarılıklı hastalıkların tedavisinde halk ilacı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *E. elaterium* meyvelerinin suyu doza bağlı olarak serum bilirübin konsantrasyonunu düşürür. Suyun serumdaki bilirübini azaltma mekanizması, nazal membran yoluyla klerensinin oranının artması ile açıklanabilir. Bu gözlem, tüm tedavi edilmiş sıçanlarda gözlenen sarımsı nazal boşaltım ile desteklenmektedir. Abu-Char ve Ades tarafından sarılıktan şikayeti olan ve bitkinin suyu ile tedavi edilmiş hastalarda bu boşaltım belirlenmiş ve nazal mukoza yoluyla olan bilirübin kaybına dikkat çekilmiştir (51). Bitkinin taze meyvelerinin suyunun birkaç damlasının buruna uygulanması sarılıktan şikayeti olan insanlarda birkaç günde olumlu sonuç vermiştir (70). Meyvenin suyu güçlü bir katartik ilaçtır (67).

Ecballium çeşitli tip tümörlerin tedavisinde kullanıldığı bilinen bitkilerdendir (71). Usarenin mukoza kalınlaşması ve sinüs içindeki kistik polipoit oluşumlara etkili olmadığı saptanmıştır (66). Kukulbitasinlerin, tümör hücrelerine karşı sitotoksik ve antitümör özelliğinin bulunduğu *invivo* ve *invitro* olarak ortaya konmuştur (71). Kukulbitasin X-ışını ile birlikte uygulandığında, tümör büyüme inhibisyonunun daha iyi olduğu ve etkinin arttığı gözlenmiştir. α -elaterin ve β -elaterin tümör nekroz kapasiteli maddelerdendir. Kukulbitasin B, E, O, P ve Q insan nazofarinks karsinomasından türetilen hücre kültürlerinde sitotoksik etki göstermiş, Kukulbitasin D ise insan lenfositlerinde *in vitro* olarak morfolojik değişiklikler göstermiştir (61).

Sıvı uygulanmasından önce röntgende görülmeyen veya az görünen kistler, uygulamadan sonra belirgin hale geçtiğinden kistlerin tanısı için, sıvı uygulanması uygundur (57).

Kukurbitasin bileşenleri uzun yıllardır purgatif etkinlikleri ile bilinmektedir. Laksatif etki için ise, çifte bağların varlığında OH guruplarının asetillenmesi gibi koşulların sağlanması gerekir (61).

Ecballium doza bağlı olarak antipiretik etkiyi arttırmıştır (69). Dişi farelerde kısırlık giderici etkisi, sıçanlarda oluşan siroz ve hepatite karşı koruyucu etkisi ve sıçanlarda kapiler geçirgenliği arttırdığı bildirilmiştir (51). *E. elaterium*'un kökleri kronik dermatit tedavisinde de kullanılmıştır (72).

Meyve usaresi Akdeniz Bölgelerinde halk arasında bilinçsiz olarak taze halde veya meyveden elde edilen kuru elaterin şeklinde, sinüzitin yanısıra romatizma, konstipasyon, hepatit ve alopesi gibi hastalıklarda tedavi amacıyla kullanılmaktadır (66, 69).

E.Elaterium meyvelerinin suyunun öldürücü etkisi doza bağlıdır (51). Meyve suyu seyreltilmeden kullanıldığında yüksek toksisite gösterir. Vlachos, Kanitsakis ve Kokonas, Yunanistan'da bu bitkinin sıvısının kullanılması sonucu bir ölümü rapor etmişlerdir. Bitkinin suyunun toksik olmayan dozunun saptanması için sinüzitli 49 gönüllüde çalışma yapılmıştır. Hastaların %71'inde iyileşme gözlenmiş, %20'sinde sinüslerin tamamen boşalmadığı görülmüştür. Şikayetlerin %91'inde iyileşme gerçekleşmiştir (73).

Meyve suyunun akut toksisitesi deney hayvanlarında çalışılmıştır. Mikroskopik gözlemler, tavşanlarda büyük patolojik değişiklikler göstermiştir. Bunlar, pulmoner ödem, karaciğer büyümesi ve sağ ventrikülün dilatasyonudur. Ölüme neden olan en kuvvetli sebep, asfeksi nedeniyle oluşan geniş pulmoner ödem ve intraalveolar kanamadır (74). Ham *Ecballium elaterium* meyvelerinin suyunun toksik etkisi incelenmiş ve tavşanlara i.v. enjekte edildiğinde kırmızı kan hücrelerinin aglutinasyonu saptanmıştır. 0.5 mg/ml veya daha yüksek dozlarda ham meyvelerin suyunun insan plazmasının koagülasyonuna neden olabileceği ileri sürülmüştür (75). İlacın sistemik toksik etkisi olarak bir kobayın midesinde ülser saptanmıştır (66).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Cihazlar

| | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| Bilyeli çelik değirmen | Erweka |
| Buzdolabı | Arçelik |
| Derin dondurucu | Bosch |
| Etüv | Electro-Mag |
| Fotomikroskop | Olympus PM*10 |
| Hassas terazi | Scaltec |
| İklim dolabı | Aymes |
| Liyofilizatör | Edwards Freeze dryer Modulyo |
| Magnetik ısıtmalı karıştırıcı | Electro-Mag |
| Mekanik karıştırıcı | Heidolph RZR 2051 |
| pH Metre | Profi-Lab WTW pH 597 |
| Reometre | Brookfield Model DV-III |
| Santrifüj | Hettich EBA-8 |
| Su banyosu | GLF 1052 |
| | Polyscience-CFC-refrigerent |
| Ultrasonic Banyo | Elma Transsonic 470/H |
| Ultraturaks | Janke&Kunkel İKA Labor Technik |

3.1.2. Maddeler

| | |
|------------------------------|---------------------|
| Benzalkonyum klorür | Transkim, Türkiye |
| Benzil alkol | E.Merck, Almanya |
| Disodyum hidrojen fosfat | E. Merck, Almanya |
| Dioktil sodyum sülfosüksinat | Cyanamid, İngiltere |

| | |
|--|------------------------------|
| (Aerosol OT [®]) | |
| Etanol | Tekel, Türkiye |
| Etilen oksit ve propilen oksit blok kopolimeri (Synperonic PE/F 127) | ICI Surfactants, İngiltere |
| Hidroksipropil metil selüloz (HPMC) (Methocel [®]) | Dow Corning, Kuzey Amerika |
| Hidroksietil selüloz (Natrosol [®]) | Aqualon, Fransa |
| Katerner amonyum bileşiği (Arasurf TA100 [®]) | Henkel, Almanya |
| Karboksipolimetilen (Carbopol [®]) | BF Goodrich, Belçika |
| Polioksietilen yağ asidi esteri (Arlatone 983 [®]) | ICI Surfactants, İngiltere |
| Polietilenglikol 400 (PEG 400) | Seelze, Almanya |
| Propilen Glikol | Carlo Erba, İtalya |
| Polioksietilen (20) sorbitanmonooleat (Tween 80 [®]) | E. Merck, Almanya |
| Sodyum hidroksit | E. Merck, Almanya |
| Sodyum Lauret Sülfat (Texapon N 40 [®]) | Türk Henkel, Türkiye |
| Setiltrimetilamonyum klorür (Dehyquart A [®]) | Türk Henkel, Türkiye |
| Sodyum dihidrojen fosfat | E. Merck, Almanya |
| Sodyum klorür | E. Merck, Almanya |
| Vitamin E (α -Tokoferol) | Johnson & Johnson, İngiltere |

3.2. YÖNTEM VE DENEYLER

3.2.1. Bitki Ekstresinin Hazırlanması

Ağustos 1998'de sabah-öğle arası toplanan taze meyveler, özel sıkma makinesinden (Erweka GmBH) geçirilerek suyu alınmıştır. Daha sonra, tülbentten süzülerek posası atılmıştır. İnce, küçük posalarının atılması için önce pilili süzgeç kağıdından süzölmeye başlanmış, süzölmünün çok yavaş olduğunun gözlenmesi üzerine ekstrenin bozulma olasılığını ortadan kaldırmak için, huninin dip kısmına pamuk yerleştirilerek süzölmüş ve daha sonra süzgeç kağıdından vakumla süzölmüştür. İşlemler sonunda elde edilen süzüntüler, şilifli balon ve kalın kavanozlara yarısına kadar dolu olacak şekilde paylaştırılmış ve derin dondurucuya konmuştur. Derin dondurucuda tamamen donuncaya kadar bekletilen süzüntüler liyofilizatöre konmuş (-50°C, 3.2 mBar) ve böylece dondurularak kurutulmuştur. Toz hale gelen ekstre, partikül boyutunu küçölmek amacı ile önce tunç havanda daha sonra bilyeli değirmende (Erweka GmBH) öğütölmüştür. Daha sonra, bu toz ekstre, vidalı kapaklı kavanozlara konularak, 25°C' lik etüve konmuş ve kullanılıncaya dek burada korunmuştur.

3.2.1.1. Ekstre üzerinde yapılan ön çalışmalar

Ekstrenin %1, %2, %3, %4, %5 ve %10 konsantrasyonlarda (a/h), % 0.5 Tween 80 içeren sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltelerde, ekstrenin çözünürlüğü ve burun pH' sına uygunluğu araştırılmıştır.

3.2.2. Formölasyonlar

Formölasyonlar, içerdikleri maddeler ve hazırlanış yöntemleri açısından farklılık göstermektedir. Bu farklılıklara göre formölasyonlar ve kodları **Çizelge 3.1.**'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Nazal formülasyonların içerdiği maddeler ve kodları

| Maddenin Adı | F1 (g) | F2 (g) | F3 (g) | F4 (g) | F5 (g) | F6 (g) |
|--|-------------|--------|--------|-------------|--------|-------------|
| %3 Hidroksipropil metil selüloz | 30 | - | - | - | - | - |
| %0.9 Carbopol | 30 | - | - | - | - | - |
| PEG 400:Propilen glikol (1:9) | - | 98 | - | - | - | - |
| Sodyum lauret sülfat | - | 0.5 | - | - | - | - |
| Hidroksipropil metil selüloz | - | - | 1 | - | - | - |
| Etilen oksit ve propilen oksit blok kopolimeri | - | - | 0.5 | - | - | - |
| Hidroksietil selüloz | - | - | - | 0.75 | - | - |
| Dioktil sodyum sülfosüksinat | - | - | - | 0.5 | - | - |
| Sodyum dihidrojen fosfat | - | - | - | - | 1.1 | - |
| Disodyum hidrojen fosfat | - | - | - | - | 0.3 | - |
| Katerner amonyum bileşiği | - | - | - | - | 0.05 | - |
| Polioksietilen (20) sorbitan monooleat | - | - | - | - | 0.5 | - |
| Sodyum klorür | - | - | - | - | 1 | - |
| Etanol | - | - | - | - | 2 | - |
| Polioksietilen yağ asidi esteri | - | - | - | - | - | 0.4 |
| Benzil alkol | - | - | 1 | - | - | - |
| BAC:Benzil alkol (9.8:0.2) | 0.05 | 0.05 | - | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| Bitki Ekstresi | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vit E | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| Sodyum hidroksit | (pH 6.8) ym | - | - | (pH 6.8) ym | - | (pH 6.8) ym |
| Distile su | ym 100 | - | ym 100 | ym 100 | ym 100 | ym 100 |

3.2.2.1. Formülasyonların hazırlanışı:

Her bir formülasyonun içerdiği maddelerin özellikleri detaylı olarak araştırılmış ve şu yöntemlere göre hazırlanıp değerlendirilmiştir:

F1 formülasyonunun hazırlanışı:

Methocel® çözeltisi hazırlanışı: Distile su üzerine eklenen Methocel®'in, şişerek jel halini alması beklenmiştir. Bu işlem oda sıcaklığında ve sıcaklık uygulanmadan yapılmıştır. Carbopol® çözeltisinin hazırlanışı: Distile su üzerine serpiştirilen Carbopol®'ün şişerek, homojen bir hale gelmesi beklenmiştir. Oda sıcaklığında ve sıcaklık uygulanmadan yapılmıştır.

Hazırlanan her iki çözelti, oda sıcaklığında homojen oluncaya dek karıştırılmıştır. Bitki ekstresi, Vit E ve BAC:benzil alkol karışımı eklenmiş ve distile su ile 100 g'a tamamlanmıştır. Homojenizasyon için, mekanik karıştırıcıda 300 rpm'de 15-20 dk karıştırılmıştır. Daha sonra %5'lik NaOH (Sodyum hidroksit) çözeltisi ile pH 6.8'e ayarlanmıştır.

F2 formülasyonunun hazırlanışı :

Propilen glikol, su banyosunda, 400 rpm'de mekanik karıştırıcı ile karıştırılarak 80°C'ye ısıtılmıştır. Çözelti sıcaklığı 80°C olunca, sodyum lauret sülfat eklenmiş, karıştırılarak su banyosu üzerinde 70°C'ye düşmesi beklenmiştir. Bu sırada PEG 400, su banyosunda 70°C'ye ısıtılmış ve 70°C'deki çözelti ile karıştırılmıştır. Karışımın sıcaklığı su banyosu üzerinde sürekli karıştırılarak 60°C'ye düşürülmüştür. 60°C'de, ekstre, Vit E ve BAC: benzil alkol karışımı eklenmiştir. Çözelti sıcaklığı 20°C oluncaya dek karıştırma işlemine su banyosunda devam edilmiştir.

F3 formülasyonunun hazırlanışı :

HPMC, distile su ile jel halini alıncaya dek oda sıcaklığında bekletilmiştir. Synperonic[®], suyun bir kısmı ile, su banyosu üzerinde mekanik karıştırıcı kullanarak 200 rpm'de karıştırılarak, 80°C'ye ısıtılmıştır. Daha sonra karıştırılarak soğutulmuş ve oluşan jel ile karıştırılmıştır. Karışıma, bitki ekstresi, Vit E ve benzil alkol eklenmiş ve distile su ile 100 g'a tamamlanmıştır. Homojenliği tam olarak sağlamak için, sıcaklık uygulamadan, manyetik karıştırıcı ile 750 rpm hızda karıştırma sürdürülmüştür.

F4 formülasyonunun hazırlanışı :

Natrosol[®], distile su ile, su banyosu üzerinde homojen oluncaya dek baget ile karıştırılarak 70°C'ye ısıtılmıştır. Aerosol OT[®], distile su ile su banyosu üzerinde 200 rpm'de berrak bir görünüm alıncaya kadar mekanik karıştırıcı ile karıştırılarak 80°C'ye ısıtılmıştır. Aerosol OT[®] çözeltisi 70°C'ye soğutulmuş ve Natrosol[®] çözeltisiyle aynı sıcaklıkta karıştırılmıştır. Bu karışım 60°C'ye soğutulmuş ve 60°C'de, bitki ekstresi, Vit E ve benzil alkol eklenmiştir. Homojen oluncaya dek 200 rpm'de mekanik karıştırıcı ile karıştırılarak 20°C'ye soğutulmuştur.

F5 formülasyonunun hazırlanışı :

Distile su üzerine, sodyum dihidrojenfosfat, disodyum hidrojenfosfat, sodyum klorür, Tween 80[®], Arasurf TA100[®] eklenmiş ve 250 rpm'de mekanik karıştırıcı ile karıştırılarak 80°C'ye ısıtılmıştır. Karıştırılarak 60°C'ye düşürülmüş ve 60°C'de bitki ekstresi, Vit E ve benzil alkol eklenmiştir. 40°C'ye düştüğünde ise etanol eklenmiştir. Distile su ile 100 g'a tamamlanmış ve karıştırma işlemine devam edilmiştir. 15-20 dk daha karıştırarak homojenlik sağlanmaya çalışılmıştır.

F6 formülasyonunun hazırlanışı :

Distile su içine Arlatone 983[®] eklenmiş ve su banyosunda, mekanik karıştırıcı ile 250 rpm'de karıştırılarak 80°C'ye ısıtılmıştır. Karıştırılarak 60°C'ye soğutulan çözeltiye bitki ekstresi, Vit E ve BAC:benzil alkol karışımı eklenmiş ve distile su ile 100 g'a tamamlanmıştır. Çözelti sıcaklığı, karıştırılarak 20°C'ye düşürülmüş ve pH 6.8'e ayarlanmıştır.

3.2.2.2. Karakterizasyon

Hazırlanan formülasyonların fiziksel, kimyasal özellikleri incelenmiş, in vivo histolojik etkinliği araştırılmıştır. Fiziksel özellikleri uygun görülmeyen formülasyonlarda daha ileri testler yapılmamıştır.

3.2.2.2.1. Fiziksel özellikler

Hazırlanan formülasyonların hazırlandıktan hemen sonraki ve 24 saat sonraki özellikleri incelenmiştir. Renk ve kıvam değişiklikleri, zamanla çökelti veya faz ayrışması olup olmadığı gözlenmiştir.

Hazırlanan formülasyonlarda santrifüjleme testi ile yerçekimi koşulu hızlandırılmıştır. Yeni hazırlanan ve 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiş örnekler, 25°C' de, 5 dk 10000 rpm'de santrifüj edilmiş ve faz ayrışması ve çökelti durumu izlenmiştir.

3.2.2.2.2. Kimyasal özellikler

Hazırlanan formülasyonların kimyasal özelliklerini saptamak için aşağıda belirtilen çalışmalar yapılmıştır:

i. Sıcaklık etkisinin belirlenmesi

Ön çalışmalar sonucu kararlı oldukları saptanan F1, F3 ve F4 formülasyonları hazırlandıktan sonra, 4 ± 1 °C (buzdolabında), 25 ± 1 °C (oda sıcaklığı) ve 40 ± 1 °C (etüvde) tutularak hergün izlenmiş ve faz ayrışması olup olmadığı incelenmiştir.

ii. Yüksek nem ve sıcaklık etkisinin belirlenmesi

Ön çalışmalar sonucu kararlı oldukları belirlenen F1, F3 ve F4 formülasyonları hazırlandıktan sonra, 40 ± 1 °C sıcaklık ve % 60 relatif neme sahip iklim dolabında bekletilerek değişiklikler hergün izlenmiş, faz ayrışması, çökelti ve renk değişimi olup olmadığı kontrol edilmiştir.

iii. pH ölçümü

Hazırlanan formülasyonların tümünde burun mukozasına uygulanabilirliğini araştırmak amacı ile pH ölçümü yapılmıştır. pH'sı uygun olmayan preparatların pH'ları sodyum hidroksit çözeltisi ile uygun pH'ya ayarlanmıştır.

Taze hazırlanmış, 4°C, 25°C, 40°C ve 40°C %60 relatif nemde bekletilen F1 formülasyonununun 24 saat sonra ve 15 gün sonra pH ölçümü yapılmıştır. Her ölçüm üçer kez (n=3) tekrarlanmıştır.

3.2.2.2.3. Reolojik analiz

Reolojik çalışmalar için stabilitesi en yüksek olan F1 formülasyonununun yaklaşık 0.2 g'lık taze hazırlanmış, 24 saat ve 15 gün etüvde (40 ± 1 °C), oda sıcaklığında (25 ± 1 °C), buzdolabında (4 ± 1 °C) ve iklim dolabında (40°C ve %60 rölatif nem) bekletilmiş olan örnekleri üzerinde akış testleri yapılmıştır. Bu çalışmalarda koni-tabla (Brookfield) reometresi kullanılmıştır. Örnek üzerine sabit sıcaklıkta (20 ± 0.1 °C) artan kayma kuvveti uygulanmış, kayma hızı ve vizkozite parametrelerindeki değişimler izlenmiş ve grafiklenmiştir.

3.2.2.2.4. İn vivo histolojik çalışmalar

Bu çalışmalar için 250 ± 20 g ağırlığında 15 adet dişi sıçan kullanılmıştır. Deneye katılan sıçanlara standart diyet uygulanmış ve çalışma süresince kafeslerde tutulup, gün ışığından yeterince yararlanmaları sağlanmıştır. Histolojik çalışmalarda, stabilitesi yüksek bulunan F1 formülasyonu kullanılmıştır. Ekstre içermeyen formülasyon, aynı şekilde hazırlanmış ancak bitki ekstresi eklenmemiştir. Bu preparat koyu jel kıvamında olduğundan sulandırılması için serum fizyolojik çözeltisi kullanılmış ve pH 6.8'e ayarlanmıştır.

A) Uygulama şekli

Formülasyonlar, insülin enjektörlerine çekilip ucundaki ince kanül yardımıyla bilinci yerinde olan sıçanlara kafalarını yukarıya doğru kaldırarak damla damla uygulanmıştır. **Ekstre içeren preparat sıçanların sağ burun deliğine iki damla olarak, ekstresiz preparat ise kontrol amacı ile sıçanların sol burun deliğine yine iki damla (yaklaşık 54.4 mg) şeklinde uygulanmıştır.**

Sıçanlar beşerli üç guruba ayrılmıştır:

1. Gurup: (n=5)

Ekstreli ve ekstresiz formülasyonlar bir gün, günde bir kez uygulanmıştır. İkinci günün sonunda eterle öldürülen sıçanlar dekapite edilmiştir.

2. Gurup: (n=5)

Ekstreli ve ekstresiz formülasyonlar üç gün, günde birer kez uygulanmıştır. Dördüncü günün sonunda eterle öldürülen sıçanlar dekapite edilmiştir.

3. Gurup: (n=5)

Ekstreli ve ekstresiz formülasyonlar altı gün, günde birer kez uygulanmıştır. Yedinci günün sonunda eterle öldürülen sıçanlar dekapite edilmiştir.

Çalışmada kullanılan sıçanların kafaları, yumuşak dokulardan, kas ve deriden temizlenerek %10'luk formalin çözeltisinde 24 saat tespit edilmiştir.

B) Histolojik yöntem

24 saatlik tespit işleminden sonra kafalar bütün halde dekalsifikasyon çözeltisine atılmıştır. Kafalar nitrik asit-formalin içeren asit çözeltisi (10 cc konsantre nitrik asit, 100 cc %10'luk formalin) içine atılmış ve dekalsifiye edilmiştir. 12 saatte bir dokuların uygun yumuşaklığa gelip gelmediği el ile ve iğne batırılarak kontrol edilmiştir. Dekalsifikasyon 3 günde tamamlanmıştır. Bu süre boyunca çözeltiler her gün yenilenmiştir. İstenen yumuşaklığa gelen kafalar dekalsifikasyon çözeltisinden çıkarılarak çeşme suyu altında 8-10 saat yıkamaya ve rutin histolojik doku takibine alınmışlardır. %70'lik alkolden sonra %80'liğe alınırken yumuşamış olan dokunun istenmeyen bölgeleri bistüri yardımıyla ufaltılarak kafada sadece nazal bölgenin kalması sağlanmıştır. %70'lik alkolden başlayarak birer saat aralıklarla artan derecelerdeki alkol serilerinden geçirilen parçalar ksilol ile şeffaflandırılıp, 56°C deki parafine gömülmüştür.

Parafin bloklardan alınan 5 µm'lik kesitler, Hematoksilen-eozin (HE) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) ile boyanıp, Olympus PM*10 Fotomikroskop ile renkli fotoğrafları çekilerek değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. BİTKİ EKSTRESİNİN HAZIRLANMASI

Toplanan 15.200 kg *Ecballium elaterium* meyvesinden 5.4 kg süzölmüş halde meyve suyu elde edilmiştir. Buna göre meyveden elde edilen verim %35.5'tir. 5.4 kg meyve suyundan ise 0.161 kg liyofilize toz elde edilmiştir. Meyve suyundan elde edilen toz ekstre verimi ise %2.98'dir.

4.1.1. Ekstre Üzerinde Yapılan Ön Çalışma Sonuçları

Bölüm 3.2.1.1.'de anlatılan deneylerin sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Ekstre üzerinde yapılan ön çalışma sonuçları

| % Ekstre Konsantrasyonu | Görünüm | pH |
|-------------------------|---------------------------------|------|
| 1 | Eser miktarda çökelek var. | 6.85 |
| 2 | Az miktarda çökelek var. | 6.85 |
| 3 | Çökelek var. | 6.80 |
| 4 | Çökelek miktarında artış var. | 6.77 |
| 5 | Fazla miktarda çökelek var. | 6.74 |
| 10 | Çok fazla miktarda çökelek var. | 6.60 |

4.2. FORMÜLASYONLARIN HAZIRLANIŞI VE KARAKTERİZASYON SONUÇLARI

Liyofilize toz halinde hazırlanan *Ecballium elaterium* meyve suyunun nazal formölasyonunun hazırlanması sırasında birtakım ön formölasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu ön formölasyonların sonuçları Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Ön formülasyon sonuçları

| ÖN FORMÜLASYONLAR | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-----------------------------|------------------|---------------------------|---------------------------------|--|------|-----------|--|------|----------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Hazırlanış Şekilleri | | | | | Karakterizasyon Sonuçları | | | | | | | |
| Formülasyon No: | Kullanılan maddeler | % Miktarları (g) | Karıştırma sıcaklığı (°C) | Karıştırma cihazı ve hızı (rpm) | Görünüm | pH | Stabilite | | | | Taze Preparatın Santrifüj Sonucu | 24 saatlik santrifüj Sonucu |
| | | | | | | | 4°C | 25°C (Oda Sıcaklığı) | 40°C | 40°C %60 Relatif Nem | | |
| F1 (a) | %3 Methocel | 30 | 25 | Ultraturaks (8000) | Bol miktarda köpük ve hava kabarcığı. | 6.73 | - | Ertesi gün hava kabarcığı ve köpük azalması. | - | - | - | - |
| | %0.9 Carbopol | 30 | | | | | | | | | | |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | NaOH (pH 6.8) | ym | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | BAC | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Distile su | ym 100 | | | | | | | | | | |
| F1 (b) | %3 Methocel | 30 | 25 | Baget | Homojen, mat yeşil renkli, koyu kıvamlı, az miktarda çözünmeyen ekstre parçacıkları. | - | - | Ertesi gün değişiklik yok. | - | - | - | - |
| | %0.9 Carbopol | 30 | | | | | | | | | | |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | BAC: Benzil alkol (9.8:0.2) | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | NaOH (pH 6.8) | ym | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Distile su | ym 100 | | | | | | | | | | |

(-): Deneysel olarak bakılmadığı anlamındadır.

Çizelge 4.2. (Devam) Ön formülasyon sonuçları

| Hazırlanış Şekilleri | | | | | Karakterizasyon Sonuçları | | | | | | | |
|----------------------|--------------------------------|------------------|---------------------------|---------------------------------|--|------|-----------|-----------------------------------|------|----------------------|---|---|
| Formülasyon No: | Kullanılan maddeler | % Miktarları (g) | Karıştırma sıcaklığı (°C) | Karıştırma cihazı ve hızı (rpm) | Görünüm | pH | Stabilite | | | | Taze Preparatın Santrifüj Sonucu | 24 saatlik santrifüj Sonucu |
| | | | | | | | 4°C | 25°C (Oda Sıcaklığı) | 40°C | 40°C %60 Relatif Nem | | |
| F1 (c) | %3 Methocel | 30 | 25 | Mekanik karıştırıcı (300) | Homojen, mat yeşil renkli, koyu kıvamlı, az miktarda çözünmeyen ekstre parçacıkları. | 6.80 | - | Ertesi gün değişiklik yok. | - | - | Çökelek ve faz ayrışması yok. | Çökelek ve faz ayrışması yok. Değişiklik yok. |
| | %0.9 Carbopol | 30 | | | | | | | | | | |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | BAC: Benzil alkol (9.8:0.2) | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | NaOH (pH 6.8) | ym | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Distile su | ym 100 | | | | | | | | | | |
| F2 (a) | PEG 400: Propilen glikol (1:1) | 98 | 80 | Mekanik karıştırıcı (400) | Kıvamı gliserine benzeyen çözelti. Dipte beyaz-sarı arası renkte çökelek. | 6.34 | - | Ertesi gün homojen şekilde donma. | - | - | İnce beyaz partiküller halinde şeffaf, jelimsi çökelek. Tüpün duvarına yapışık. | - |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Sodyum lauret sülfat | 0.5 | | | | | | | | | | |
| | BAC: Benzil alkol (9.8:0.2) | 0.05 | | | | | | | | | | |

(-): Deneysel olarak bakılmadığı anlamındadır.

Çizelge 4.2. (Devam) Ön formülasyon sonuçları

| Hazırlanış Şekilleri | | | | | Karakterizasyon Sonuçları | | | | | | | |
|----------------------|--------------------------------|------------------|---------------------------|---------------------------------|---|------|-----------|--|------|----------------------|---|---|
| Formülasyon No: | Kullanılan maddeler | % Miktarları (g) | Karıştırma sıcaklığı (°C) | Karıştırma cihazı ve hızı (rpm) | Görünüm | pH | Stabilite | | | | Taze Preparatın Santrifüj Sonucu | 24 saatlik santrifüj Sonucu |
| | | | | | | | 4°C | 25°C (Oda Sıcaklığı) | 40°C | 40°C %60 Relatif Nem | | |
| F2 (b) | PEG 400: Propilen glikol (1:9) | 98 | 80 | Mekanik karıştırıcı (400) | Kıvamı gliserine benzeyen çözelti. Çökelek yok. | 4.99 | - | Dört gün sonra dip kısmında beyaz-sarı arası renkte çökelek. | - | - | Az miktarda ince beyaz partiküller halinde şeffaf, jelimsi çökelek. Tüpün duvarına yapışık. | Az miktarda ince beyaz partiküller halinde şeffaf, jelimsi çökelek. Tüpün duvarına yapışık. |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | - | | | | | | | | | | |
| | Sodyum lauret sülfat | 0.5 | | | | | | | | | | |
| | BAC: Benzil alkol (9.8:0.2) | 0.05 | | | | | | | | | | |
| F2 (c) | PEG 400: Propilen glikol (1:9) | 98 | 80 | Mekanik karıştırıcı (400) | Kıvamı gliserine benzeyen çözelti. Dipte beyaz-sarı arası renkte çökelek. | 5.27 | - | Donma yok. Tortu miktarında taze hazırlanmışa göre artış. | - | - | İnce beyaz partiküller halinde şeffaf, jelimsi çökelek. Tüpün duvarına yapışık. | İnce beyaz partiküller halinde şeffaf, jelimsi çökelek. Tüpün duvarına yapışık. |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Sodyum lauret sülfat | 0.5 | | | | | | | | | | |
| | BAC: Benzil alkol (9.8:0.2) | 0.05 | | | | | | | | | | |
| F2 (d) | PEG 400: Propilen glikol (1:9) | 98 | 80 | Mekanik karıştırıcı (400) | Kıvamı gliserine benzeyen çözelti. Dipte beyaz-sarı arası renkte çökelek. Bulanıklık. | 6.00 | - | Berraklaşma var. Dipte beyaz renkli tabaka halinde çökelek. | - | - | İnce beyaz partiküller halinde şeffaf çökelek. Tüpün duvarına yapışık. | İnce beyaz jelimsi çökelek. Tüpün duvarına yapışık. |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Sodyum lauret sülfat | - | | | | | | | | | | |
| | BAC: Benzil alkol (9.8:0.2) | 0.05 | | | | | | | | | | |

(-): Deneysel olarak bakılmadığı anlamındadır.

Çizelge 4.2. (Devam) Ön formülasyon sonuçları

| Hazırlanış Şekilleri | | | | | Karakterizasyon Sonuçları | | | | | | | |
|----------------------|-----------------------------|------------------|---------------------------|---|--|------|---|---|--|--|---|---|
| Formülasyon No: | Kullanılan maddeler | % Miktarları (g) | Karıştırma sıcaklığı (°C) | Karıştırma cihazı ve hızı (rpm) | Görünüm | pH | Stabilite | | | | Taze Preparatın Santrifüj Sonucu | 24 saatlik santrifüj Sonucu |
| | | | | | | | 4°C | 25°C (Oda Sıcaklığı) | 40°C | 40°C %60 Relatif Nem | | |
| F3 (a) | Synperonic® | 10 | 60 | Mekanik karıştırıcı (200) | Çok miktarda köpük. Çözelti kıvamında. | - | - | Ertesi gün şeffaf, jel tabaka oluşumu. Kıvamında sıvılaşma. | - | - | - | - |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | HPMC | 1 | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Benzil alkol | 1 | | | | | | | | | | |
| | Distile su | ym 100 | | | | | | | | | | |
| F3 (b) | Synperonic® | 0.5 | 80 | Mekanik karıştırıcı (200) ve manyetik karıştırıcı (750) | Yüzeyinde şeffaf partiküller ve dağılmış haldeki ekstre parçacıkları. | 6.85 | 15 gün aynı şekilde sonra çökelek miktarında artış. | Dipteki yeşil çökelek miktarında artış. 10 gün aynı, sonra renk değişimi ve çökelek artışı. | 10 gün aynı sonra çökelek miktarında artış ve renk değişimi. | 10 gün aynı sonra çökelek miktarında artış ve renk değişimi. | Tüpün duvarına yapışık halde ekstre parçacıkları. | Tüpün dip kısmında ekstre parçacıkları. |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | HPMC | 1 | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Benzil alkol | 1 | | | | | | | | | | |
| | Distile su | ym 100 | | | | | | | | | | |
| F4 (a) | Natrosol® | 0.75 | 60 | Mekanik karıştırıcı (200) | Çözeltide homojen dağılmış şekilde ekstre parçacıkları. Kıvamı gliserine benzer. | - | - | Ertesi gün dipte beyaz renkli çökelek. İki fazlı görünüm. Renk değişimi. | - | - | Faz ayrışması ve yeşil renkli çökelek. | - |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Aerosol OT® | 0.5 | | | | | | | | | | |
| | NaOH (pH 6.8) | ym | | | | | | | | | | |
| | BAC: Benzil alkol (9.8:0.2) | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Distile Su | ym 100 | | | | | | | | | | |

(-): Deneysel olarak bakılmadığı anlamındadır.

Çizelge 4.2. (Devam) Ön formülasyon sonuçları

| Hazırlanmış Şekilleri | | | | | Karakterizasyon Sonuçları | | | | | | | |
|-----------------------|-----------------------------|------------------|---------------------------|------------------------------------|--|------|--|--|---|--|--|--|
| Formülasyon No: | Kullanılan maddeler | % Miktarları (g) | Karıştırma sıcaklığı (°C) | Karıştırma cihazı ve hızı (rpm) | Görünüm | pH | Stabilite | | | | Taze Preparatın Santrifüj Sonucu | 24 saatlik santrifüj Sonucu |
| | | | | | | | 4°C | 25°C (Oda Sıcaklığı) | 40°C | 40°C %60 Relatif Nem | | |
| F4 (b) | Natrosol® | 0.75 | 60 | Mekanik karıştırıcı (200) ve baget | Çözeltide homojen dağılmış şekilde ekstre parçacıkları. Kıvamı gliserine benzer. | - | 10 gün değişiklik yok. Daha sonra beyaz çökelek oluşumu. | Ertesi gün değişiklik yok. 5. günden sonra çökelek miktarında artış. | 2. günden sonra beyaz renkli çökelek oluşumu ve gittikçe artış. | 2. günden sonra çok miktarda beyaz renkli çökelek. | Tüpün dip kısmında çok miktarda yeşil renkli çökelek ve faz ayrışması. | Çökelek ve faz ayrışması. |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Aerosol OT® | 0.5 | | | | | | | | | | |
| | NaOH (pH 6.8) | ym | | | | | | | | | | |
| | BAC: Benzil alkol (9.8:0.2) | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Distile Su | ym 100 | | | | | | | | | | |
| F4 (c) | Natrosol® | 0.75 | 50 | Baget | Çözeltide homojen dağılmış şekilde ekstre parçacıkları. Kıvamı gliserine benzer. | 6.60 | - | Ertesi gün dipte çökelek ve renk değişimi. | - | - | Tüpün duvarına yapışık halde yeşil renkli çökelek. | Çökelek miktarında artış. |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Aerosol OT® | - | | | | | | | | | | |
| | NaOH (pH 6.8) | ym | | | | | | | | | | |
| | BAC: Benzil alkol (9.8:0.2) | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Distile Su | ym 100 | | | | | | | | | | |
| F4 (d) | Natrosol® | 0.75 | 60 | Baget ve ultrasonik banyo | Çözeltide homojen dağılmış şekilde ekstre parçacıkları. Kıvamı gliserine benzer. | 6.85 | - | Ertesi gün renk değişimi ve dipte yeşil çökelek. Dört gün sonra beyaz çökelek. | - | - | Tüpün duvarına yapışık halde yeşil renkli çökelek. | Tüpün dip kısmında çökelek miktarında artış. |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Texapon N40® | 0.5 | | | | | | | | | | |
| | NaOH (pH 6.8) | ym | | | | | | | | | | |
| | Benzil alkol | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Distile Su | ym 100 | | | | | | | | | | |

(-): Deneysel olarak bakılmadığı anlamındadır.

Çizelge 4.2. (Devam) Ön formülasyon sonuçları

| Hazırlanış Şekilleri | | | | | Karakterizasyon Sonuçları | | | | | | | |
|----------------------|---------------------|------------------|---------------------------|----------------------------------|--|------|-----------|---|------|----------------------|--|-----------------------------------|
| Formülasyon No: | Kullanılan maddeler | % Miktarları (g) | Karıştırma sıcaklığı (°C) | Karıştırma cihazı ve hızı (rpm) | Görünüm | pH | Stabilite | | | | Taze Preparatın Santrifüj Sonucu | 24 saatlik santrifüj Sonucu |
| | | | | | | | 4°C | 25°C (Oda Sıcaklığı) | 40°C | 40°C %60 Relatif Nem | | |
| F4 (e) | Natrosol® | 0.75 | 60 | Baget ve ultrasonik banyo | Çözeltide homojen dağılmış şekilde ekstre parçacıkları. Kıvamı gliserine benzer. | - | - | Ertesi gün renk değişimi ve çökelek artışı. | - | - | Tüpün duvarına yapışık halde yeşil renkli çökelek. | Tüpün dip kısmında yeşil çökelek. |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Aerosol OT® | 2 | | | | | | | | | | |
| | NaOH (pH 6.8) | ym | | | | | | | | | | |
| | Benzil alkol | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Distile Su | ym 100 | | | | | | | | | | |
| F4 (f) | Natrosol® | 0.75 | 60 | Mekanik karıştırıcı (400 ve 200) | Çözeltide homojen dağılmış şekilde ekstre parçacıkları. Kıvamı gliserine benzer. | 6.85 | - | Ertesi gün değişiklik yok. Yedi gün sonra sarı-beyaz arası renkte çökelek. Faz ayrışması. | - | - | Tüpün duvarına yapışık halde az miktarda yeşil renkli çökelek. | Tüpün dip kısmında yeşil çökelek. |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Aerosol OT® | 2 | | | | | | | | | | |
| | NaOH (pH 6.8) | ym | | | | | | | | | | |
| | Benzil alkol | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Distile Su | ym 100 | | | | | | | | | | |

(-): Deneysel olarak bakılmadığı anlamındadır.

Cizelge 4.2. (Devam) Ön formülasyon sonuçları

| Hazırlanış Şekilleri | | | | | Karakterizasyon Sonuçları | | | | | | | |
|----------------------|-----------------------------|------------------|---------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----|-----------|---|------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Formülasyon No: | Kullanılan maddeler | % Miktarları (g) | Karıştırma sıcaklığı (°C) | Karıştırma cihazı ve hızı (rpm) | Görünüm | pH | Stabilite | | | | Taze Preparatın Santrifüj Sonucu | 24 saatlik santrifüj Sonucu |
| | | | | | | | 4°C | 25°C (Oda Sıcaklığı) | 40°C | 40°C %60 Relatif Nem | | |
| F5 (a) | Sodyum dihidrojen fosfat | 1.1 | 60 | Manyetik karıştırıcı (750) | Ekstre parçacıkları. Kıvamı sıvı. | - | - | - | - | - | - | - |
| | Disodyum hidrojen fosfat | 0.3 | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | BAC | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Etanol | 0.06 | | | | | | | | | | |
| | Arasurf TA100 | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | NaCl | 0.2 | | | | | | | | | | |
| | Tween 80 | 0.5 | | | | | | | | | | |
| | Distile su | ym 100 | | | | | | | | | | |
| F5 (b) | Sodyum dihidrojen fosfat | 1.1 | 50 | Ultrasonik banyo | Ekstre parçacıkları. Kıvamı sıvı. | - | - | Ertesi gün dipte beyaz renkli çökelek. Renk değişimi. | - | - | Az miktarda yeşil renkli çökelek. | - |
| | Disodyum hidrojen fosfat | 0.3 | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | BAC: Benzil alkol (9.8:0.2) | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Etanol | 0.06 | | | | | | | | | | |
| | Arasurf TA100 | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | NaCl | 0.2 | | | | | | | | | | |
| | Tween 80 | 0.5 | | | | | | | | | | |
| | Distile su | ym 100 | | | | | | | | | | |

(-): Deneysel olarak bakılmadığı anlamındadır.

Çizelge 4.2. (Devam) Ön formülasyon sonuçları

| Hazırlanış Şekilleri | | | | | Karakterizasyon Sonuçları | | | | | | | |
|----------------------|-----------------------------|------------------|---------------------------|---------------------------------|---|------|-----------|--|------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Formülasyon No: | Kullanılan maddeler | % Miktarları (g) | Karıştırma sıcaklığı (°C) | Karıştırma cihazı ve hızı (rpm) | Görünüm | pH | Stabilite | | | | Taze Preparatın Santrifüj Sonucu | 24 saatlik santrifüj Sonucu |
| | | | | | | | 4°C | 25°C (Oda Sıcaklığı) | 40°C | 40°C %60 Relatif Nem | | |
| F5 (c) | Sodyum dihidrojen fosfat | - | 50 | Ultrasonik banyo | Dipte ekstre parçacıkları. Kıvamı sıvı. | 6.54 | - | - | - | - | Yeşil renkli çökelek. | Çökelek miktarında artış. |
| | Disodyum hidrojen fosfat | - | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | BAC: Benzil alkol (9.8:0.2) | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Etanol | 0.06 | | | | | | | | | | |
| | Arasurf TA100 | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | NaCl | 0.2 | | | | | | | | | | |
| | Tween 80 | 0.5 | | | | | | | | | | |
| | Distile su | ym 100 | | | | | | | | | | |
| F5 (d) | Sodyum dihidrojen fosfat | 1.1 | 80 | Mekanik karıştırıcı (250) | Dipte ekstre parçacıkları. Kıvamı sıvı. | 6.78 | - | Ertesi gün dipte beyaz renkli çökelek. | - | - | Az miktarda yeşil renkli çökelek. | Az miktarda beyaz renkli çökelek. |
| | Disodyum hidrojen fosfat | 0.3 | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | BAC: Benzil alkol (9.8:0.2) | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Etanol | 2 | | | | | | | | | | |
| | Arasurf TA100 | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | NaCl | 1 | | | | | | | | | | |
| | Tween 80 | 0.5 | | | | | | | | | | |
| | Distile su | ym 100 | | | | | | | | | | |

(-): Dencysel olarak bakılmadığı anlamındadır.

Çizelge 4.2. (Devam) Ön formülasyon sonuçları

| Hazırlanış Şekilleri | | | | | Karakterizasyon Sonuçları | | | | | | | |
|----------------------|-----------------------------|------------------|---------------------------|---------------------------------|---|------|-----------|--|------|----------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Formülasyon No: | Kullanılan maddeler | % Miktarları (g) | Karıştırma sıcaklığı (°C) | Karıştırma cihazı ve hızı (rpm) | Görünüm | pH | Stabilite | | | | Taze Preparatın Santrifüj Sonucu | 24 saatlik santrifüj Sonucu |
| | | | | | | | 4°C | 25°C (Oda Sıcaklığı) | 40°C | 40°C %60 Relatif Nem | | |
| F5 (e) | Sodyum dihidrojen fosfat | 1.1 | 60 | Ultrasonik banyo | Çok miktarda ekstre parçacıkları. Kıvamı sıvı. | 5.62 | - | Çok miktarda yeşil renkli çökelek. Çözelti kısmı berrak. | - | - | - | - |
| | Disodyum hidrojen fosfat | 0.3 | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | BAC: Benzil alkol (9.8:0.2) | - | | | | | | | | | | |
| | Etanol | 2 | | | | | | | | | | |
| | Arasurf TA100 | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | NaCl | 1 | | | | | | | | | | |
| | Tween 80 | - | | | | | | | | | | |
| | Distile su | ym 100 | | | | | | | | | | |
| F5 (f) | Sodyum dihidrojen fosfat | 1.1 | 50 | Ultrasonik banyo | Dipte çok miktarda yeşil renkli ekstre parçacıkları. Kıvamı sıvı. | 5.36 | - | Çökeleğin rengi kahverengi. | - | - | - | - |
| | Disodyum hidrojen fosfat | 0.3 | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | Benzil alkol | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Etanol | 0.06 | | | | | | | | | | |
| | Arasurf TA100 | - | | | | | | | | | | |
| | NaCl | 0.2 | | | | | | | | | | |
| | Tween 80 | 0.5 | | | | | | | | | | |
| | Distile su | ym 100 | | | | | | | | | | |

(-): Deneysel olarak bakılmadığı anlamındadır.

Çizelge 4.2. (Devam) Ön formülasyon sonuçları

| Hazırlanış Şekilleri | | | | | Karakterizasyon Sonuçları | | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|------------------|---------------------------|---------------------------------|--|------|-----------|---|------|----------------------|--|------------------------------------|
| Formülasyon No: | Kullanılan maddeler | % Miktarları (g) | Karıştırma sıcaklığı (°C) | Karıştırma cihazı ve hızı (rpm) | Görünüm | pH | Stabilite | | | | Taze Preparatın Santrifüj Sonucu | 24 saatlik santrifüj Sonucu |
| | | | | | | | 4°C | 25°C (Oda Sıcaklığı) | 40°C | 40°C %60 Relatif Nem | | |
| F5 (g) | Sodyum dihidrojen fosfat | 1.1 | 60 | Mekanik karıştırıcı (250) | Beyaz çökelek. | 5.43 | - | Çok miktarda beyaz renkli çökelek. | - | - | Tüpün duvarına yapışık halde beyaz renkli çökelek. | Çok miktarda beyaz renkli çökelek. |
| | Disodyum hidrojen fosfat | 0.3 | | | | | | | | | | |
| | Ekstre | 1 | | | | | | | | | | |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | Benzil alkol | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Etanol | 1 | | | | | | | | | | |
| | Arasurf TA100 | - | | | | | | | | | | |
| | NaCl | 0.5 | | | | | | | | | | |
| | Tween 80 | 0.5 | | | | | | | | | | |
| | Distile su | ym 100 | | | | | | | | | | |
| F6 (a) | Ekstre | 1 | 60 | Ultrasonik banyo | Ekstre parçacıkları. Kıvamı sıvı. | 7.24 | - | - | - | - | - | - |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | BAC | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Arlatone 983 | 0.4 | | | | | | | | | | |
| | NaOH (pH 6.8) | ym | | | | | | | | | | |
| | Distile su | ym 100 | | | | | | | | | | |
| F6 (b) | Ekstre | 1 | 60 | Ultraturax (8000) | Çok miktarda köpük ve hava kabarcığı. Kıvamı sıvı. | 6.83 | - | Ertesi gün dipte beyaz tortu oluşumu. Hava kabarcığı azalmış, köpük kalmamış. | - | - | - | - |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | BAC | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Arlatone 983 | 0.4 | | | | | | | | | | |
| | NaOH (pH 6.8) | ym | | | | | | | | | | |
| | Distile su | ym 100 | | | | | | | | | | |

(-): Deneysel olarak bakılmadığı anlamındadır.

Çizelge 4.2. (Devam) Ön formülasyon sonuçları

| Hazırlanış Şekilleri | | | | | Karakterizasyon Sonuçları | | | | | | | |
|----------------------|----------------------------|------------------|---------------------------|---------------------------------|--|------|-----------|--|------|----------------------|--|--|
| Formülasyon No: | Kullanılan maddeler | % Miktarları (g) | Karıştırma sıcaklığı (°C) | Karıştırma cihazı ve hızı (rpm) | Görünüm | pH | Stabilite | | | | Taze Preparatın Santrifüj Sonucu | 24 saatlik santrifüj Sonucu |
| | | | | | | | 4°C | 25°C (Oda Sıcaklığı) | 40°C | 40°C %60 Relatif Nem | | |
| F6 (c) | Ekstre | 1 | 60 | Manyetik karıştırıcı (750) | Ekstre parçacıkları. Kıvamı sıvı. | - | - | - | - | - | - | - |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | BAC | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Arlatone 983 | 0.4 | | | | | | | | | | |
| | NaOH (pH 6.8) | ym | | | | | | | | | | |
| | Distile su | ym 100 | | | | | | | | | | |
| F6 (d) | Ekstre | 1 | 60 | Ultrasonik banyo | Ekstre parçacıkları. Kıvamı sıvı. | 6.83 | - | - | - | - | - | - |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | BAC:Benzil alkol (9.8:0.2) | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Arlatone 983 | 0.4 | | | | | | | | | | |
| | NaOH (pH 6.8) | ym | | | | | | | | | | |
| | Distile su | ym 100 | | | | | | | | | | |
| F6 (e) | Ekstre | 1 | 80 | Mekanik karıştırıcı (250) | Krem renkli çözelti. Ekstre parçacıkları. Kıvamı sıvı. | - | - | Renk krem-yeşil arası. | - | - | Yeşil ve beyaz renkli iki çökelek. | Tüpün dip kısmında yeşil renkli çökeleğin etrafında çok miktarda beyaz renkli çökelek. |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | BAC | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Arlatone 983 | 2 | | | | | | | | | | |
| | NaOH (pH 6.8) | ym | | | | | | | | | | |
| | Distile su | ym 100 | | | | | | | | | | |
| F6 (f) | Ekstre | 1 | 80 | Mekanik karıştırıcı (250) | Çok miktarda ekstre parçacıkları. Kıvamı sıvı. | 6.60 | - | Renk kahverengi. Dipte koyu kahve renkli çok miktarda çökelek. | - | - | Tüpün dip kısmında ve duvarında çok miktarda kahverengi çökelek. | Dip kısmında çok miktarda kahverengi çökelek. |
| | Vit E | 0.02 | | | | | | | | | | |
| | BAC:Benzil alkol (9.8:0.2) | 0.05 | | | | | | | | | | |
| | Montanox 80 | 1 | | | | | | | | | | |
| | NaOH (pH 6.8) | ym | | | | | | | | | | |
| | Distile su | ym 100 | | | | | | | | | | |

(-): Dencysel olarak bakılmadığı anlamındadır.

Yapılan ön formülasyon çalışmaları sonucunda, mekanik karıştırıcı (300 rpm) kullanılarak oda sıcaklığında hazırlanan F1 (c) formülasyonu en uygun formülasyon olarak seçilmiştir.

F1 formülasyonuna ait pH analiz sonuçları ve istatistiksel değerlendirme **Çizelge 4.3.**'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. F1 formülasyonu pH analiz sonuçları

| F1 formülasyonunun bekletildiği koşullar ve bekleme süreleri | pH |
|---|-------------|
| Taze hazırlanmış | 6.77 ± 0.05 |
| Oda sıcaklığı 24 saat | 6.73 ± 0.09 |
| Oda sıcaklığı 15 gün | 6.63 ± 0.03 |
| 4°C sıcaklıkta 24 saat | 6.74 ± 0.04 |
| 4°C sıcaklıkta 15 gün | 6.70 ± 0.07 |
| 40°C sıcaklıkta 24 saat | 6.71 ± 0.06 |
| 40°C sıcaklıkta 15 gün | 6.54 ± 0.06 |
| 40°C sıcaklık ve %60 relatif nemde 24 saat | 6.71 ± 0.08 |
| 40°C sıcaklık ve %60 relatif nemde 15 gün | 6.58 ± 0.02 |

n=3

4.2.1. Reolojik Analiz Sonuçları

Seçilen F1 formülasyonunun, reogramları Şekil 4.1., Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.'te, hesaplanan reolojik analiz sonuçları ise Çizelge 4.4.'te verilmiştir.

F1 formülasyonunun reolojik özelliklerinin saptanmasında kullanılan "Üslü Yasa"ya ait eşitlik aşağıda verilmiştir (76):

$$\tau = k \cdot \epsilon^n$$

Burada, τ , kayma kuvvetini ($D \cdot cm^{-2}$)

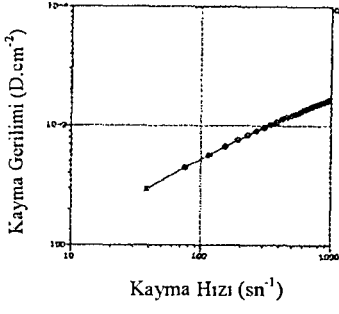
ϵ , kayma hızını (sn^{-1})

k , dayanıklılık katsayısını

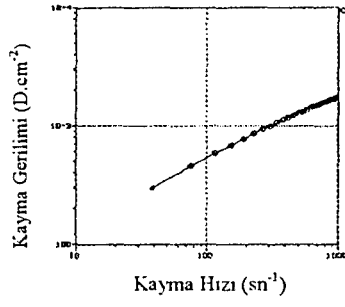
n , akış indisini göstermektedir.

Çizelge 4.4. Farklı ortamlarda bekletilmiş F1 formülasyonunun reolojik analiz sonuçları

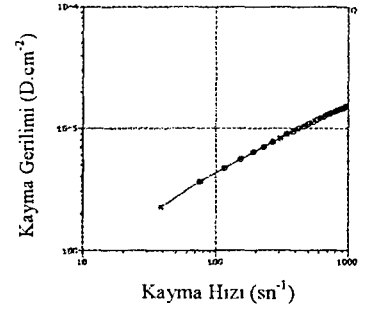
| Nazal Preparatın Bekletildiği Koşullar ve Bekleme Süreleri | Kaymaya Bağlı İncelme İndisi | Üslü Yasaya Uyum Güvenilirliği (%) | Üslü Yasaya Göre Akış İndisi | 10 rpm'deki Vizkozite (mPas.s) |
|--|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Taze hazırlanmış | 1.88 | 97.5 | 0.520 | 827.9 |
| Oda sıcaklığında 24 saat | 1.83 | 97.8 | 0.533 | 837.0 |
| Oda sıcaklığında 15 gün | 1.69 | 98.0 | 0.573 | 643.5 |
| 4°C sıcaklıkta 24 saat | 1.82 | 97.4 | 0.529 | 854.0 |
| 4°C sıcaklıkta 15 gün | 1.73 | 97.4 | 0.559 | 726.0 |
| 40°C sıcaklıkta 24 saat | 1.86 | 97.8 | 0.522 | 853.7 |
| 40°C sıcaklıkta 15 gün | 1.74 | 98.3 | 0.567 | 661.1 |
| 40°C sıcaklık % 60 Relatif nemde 24 saat | 1.82 | 97.9 | 0.539 | 716.7 |
| 40°C sıcaklık % 60 Relatif nemde 15 gün | 1.67 | 98.4 | 0.588 | 507.6 |



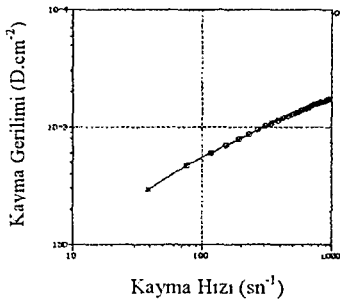
a



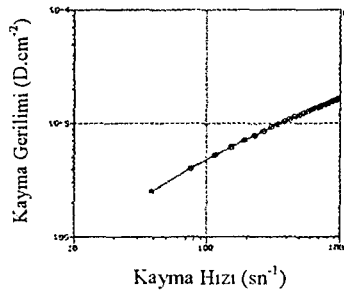
b



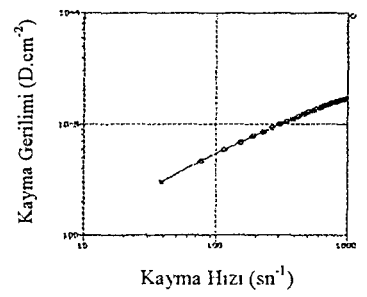
c



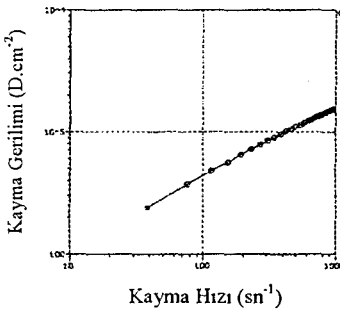
d



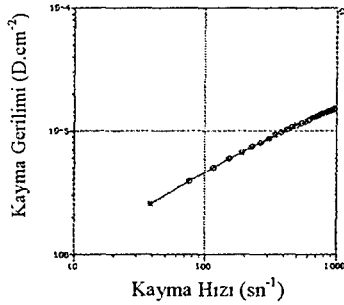
e



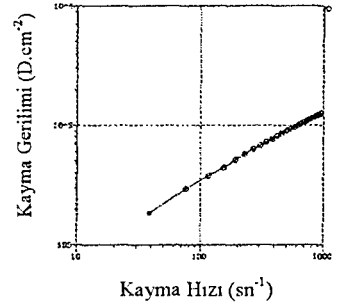
f



g



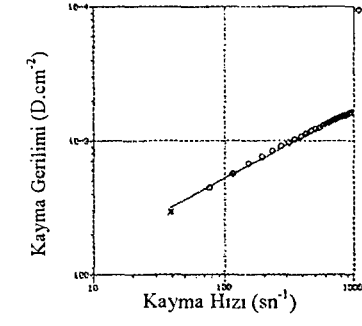
h



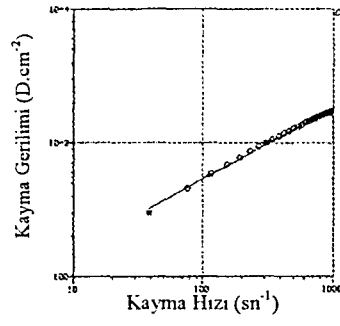
i

Şekil 4.1. F1 formülasyonuna ait kayma hızı-kayma gerilimi eğrileri

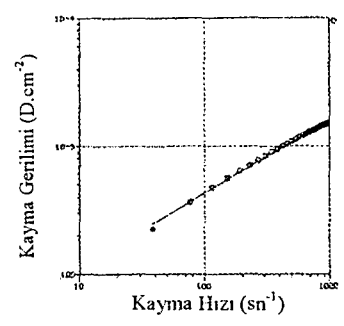
- | | |
|---|--|
| a) Taze hazırlanmış | f) 40°C 24 saat bekletilmiş |
| b) Oda sıcaklığı 24 saat bekletilmiş | g) 40°C 15 gün bekletilmiş |
| c) Oda sıcaklığı 15 gün bekletilmiş | h) İklim dolabı 24 saat bekletilmiş |
| d) 4°C 24 saat bekletilmiş | i) İklim dolabı 15 gün bekletilmiş |
| e) 4°C 24 saat bekletilmiş | |



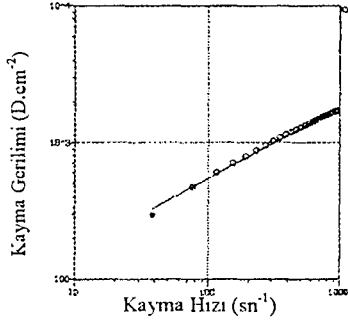
a



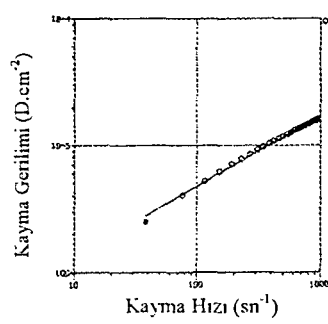
b



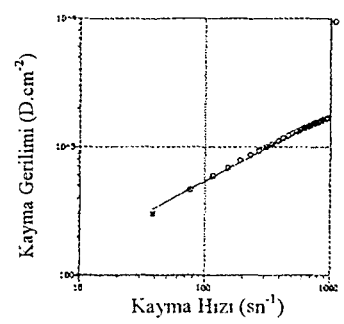
c



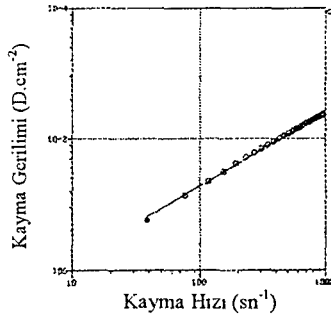
d



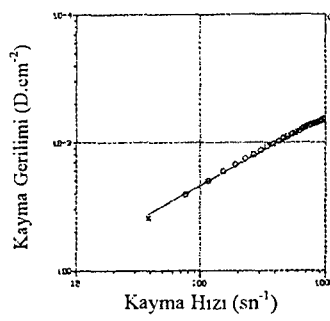
e



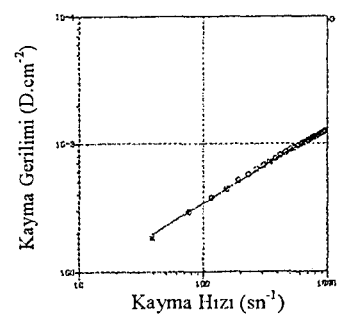
f



g



h

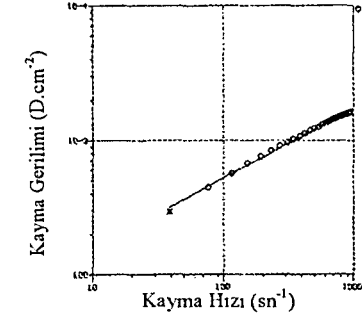


i

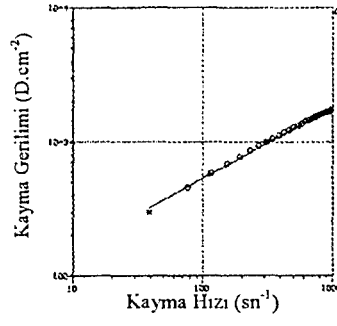
Şekil 4.3. F1 formülasyonunun uyum gösterdiği Üslü Yasa'ya göre, kayma geriliminin logaritmasına karşı, kayma hızının logaritması eğrileri

- a) Taze hazırlanmış
- b) Oda sıcaklığı 24 saat bekletilmiş
- c) Oda sıcaklığı 15 gün bekletilmiş
- d) 4°C 24 saat bekletilmiş
- e) 4°C 24 saat bekletilmiş

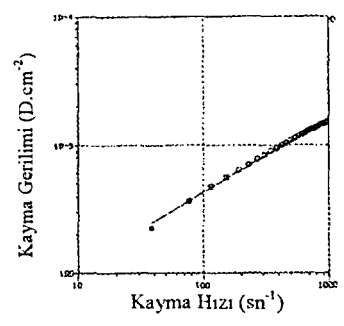
- f) 40°C 24 saat bekletilmiş
- g) 40°C 15 gün bekletilmiş
- h) İklim dolabı 24 saat bekletilmiş
- i) İklim dolabı 15 gün bekletilmiş



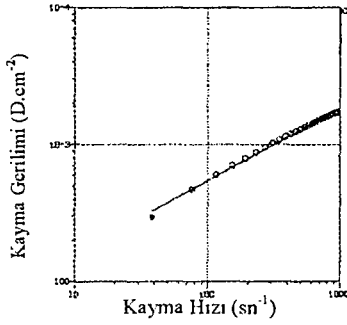
a



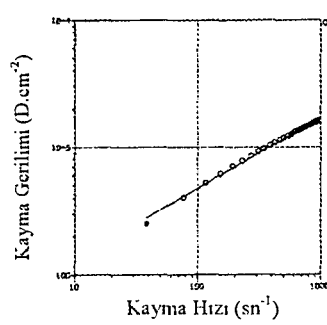
b



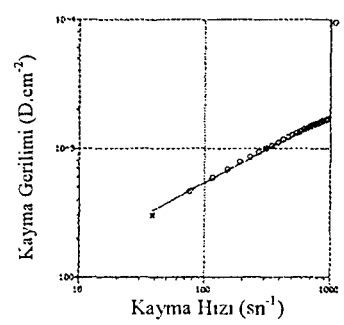
c



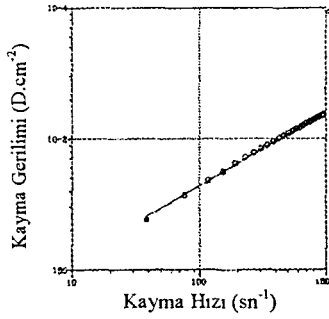
d



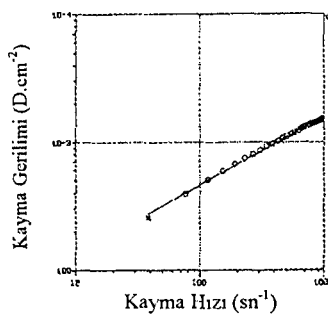
e



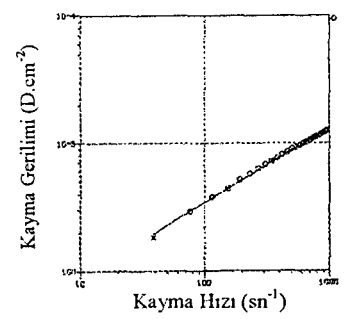
f



g



h



i

Şekil 4.3. F1 formülasyonunun uyum gösterdiği Üslü Yasa'ya göre, kayma geriliminin logaritmasına karşı, kayma hızının logaritması eğrileri

- a) Taze hazırlanmış
- b) Oda sıcaklığı 24 saat bekletilmiş
- c) Oda sıcaklığı 15 gün bekletilmiş
- d) 4°C 24 saat bekletilmiş
- e) 4°C 24 saat bekletilmiş

- f) 40°C 24 saat bekletilmiş
- g) 40°C 15 gün bekletilmiş
- h) İklim dolabı 24 saat bekletilmiş
- i) İklim dolabı 15 gün bekletilmiş

4.2.2. İn Vivo Histolojik Etkinlik

Histolojik incelemeler için hazırlanan dokular HE ve PAS ile boyanarak F1 formülasyonu uygulanmış sıçanların nazal mukozasının solunum bölgesindeki değişiklikler incelenmiştir. Guruplara göre farklılık gösteren bulgular HE ve PAS için şöyle bulunmuştur:

1. GURUP

HE: Her iki burun boşluğunun görüldüğü histolojik preparatlarda, etkin maddesiz sol burun deliğinin solunum epiteli ve mukozal yapılarında belirgin bir bozukluk olmadığı ve dokunun normal histolojik görünümünü koruduğu belirlenmiştir. F1 formülasyonu uygulanmış sağ burun deliğinin solunum bölgesi epiteli ve silia yapılarının normal olduğu görülmüştür. Bunun yanısıra özellikle epitelin hemen altındaki bölgede hücre infiltrasyonu belirgin olarak gözlenmiştir. (Şekil 4.4-4.6)

PAS: Yapıdaki salgı bezlerinin ve salgılarının boyanması amaçlandığından sadece salgının PAS pozitifliği ve bölgedeki salgı hücrelerinin yoğunluğu gözlenmiştir. Sol burun deliği mukozasında ve epitelinde yapısal bir fark görülmemiştir. Epitel içindeki Goblet hücreleri ve lamina propriadaki Bowman bezleri salgıyla dolu olarak PAS pozitif boyanmışlardır. Sağ burun deliği solunum epitelinde Goblet hücreleri salgılarında ve buna paralel olarak yüzey mukusunda yer yer azalma gözlenmiştir. (Şekil 4.7-4.9)

2. GURUP

HE: F1 formülasyonu uygulanmamış sol tarafta epitel, silia ve lamina propriadaki bezlerin normal histolojik yapıda olduğu gözlenmiştir. F1 formülasyonu verilmiş sağ tarafta ise gerek epitelde, gerek mukozadaki değişiklikler belirgin olarak gözlenmiştir. Epitel katında yer yer atrofi ve silia kaybı yoğun bir şekilde görülmüştür. Lamina propria'da hücre infiltrasyonu ileri derecede artmıştır. Hiperemi gözlenmektedir. Goblet hücrelerinde belirgin bir azalma olduğu belirlenmiştir. (Şekil 4.10-4.13)

PAS: F1 formülasyonu verilmiş sağ tarafta sayıları oldukça azalmış Goblet hücreleri, buna paralel olarak mukus reaksiyonunun azlığı dikkat çekmiştir. Ancak sağlam kalmış Gobletlerin PAS pozitif boyandığı görülmüştür. Mukozada yer alan bezlerin zayıf boyandığı da görülmüştür. (Şekil 4.14).

3. GURUP

HE: Silialı epitel ve mukusla dolu Goblet hücrelerinin yanısıra lamina propria'da kontrole benzer histolojik yapı saptanmıştır. Bu gruptaki tipik bulgu, yüzeydeki yoğun sero-mukoz salgının görülmesidir (Şekil 4.15-4.17).

PAS: Goblet hücrelerinde artış ve mukus içeriğinde de belirgin yoğunluk saptanmıştır. (Şekil 4.18-4.19).

Histolojik bulgular Çizelge 4.5.'te özetlenmiştir.

Çizelge 4.5. Nazal mukozadaki histolojik bulguların skorlanması (n=5)

| Nazal Mukozadaki Değişiklikler | 1. Gurup | | 2. Gurup | | 3. Gurup | |
|---|----------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| | Kontrol (Sol burun deliği) | Deney (Sağ burun deliği) | Kontrol (Sol burun deliği) | Deney (Sağ burun deliği) | Kontrol (Sol burun deliği) | Deney (Sağ burun deliği) |
| Epitel hasarı | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | 0 |
| Sil Kaybı | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | 0 |
| Hücre İnfiltrasyonu | 0 | + | 0 | +++ | 0 | 0+ |
| Goblet hücresi ve mukus içeriğindeki azalma | 0 | + | 0 | +++ | 0 | 0 |
| Sero-mukoz SIVI | 0 | + | 0 | 0 | 0 | +++ |

0 Yok veya önemsiz

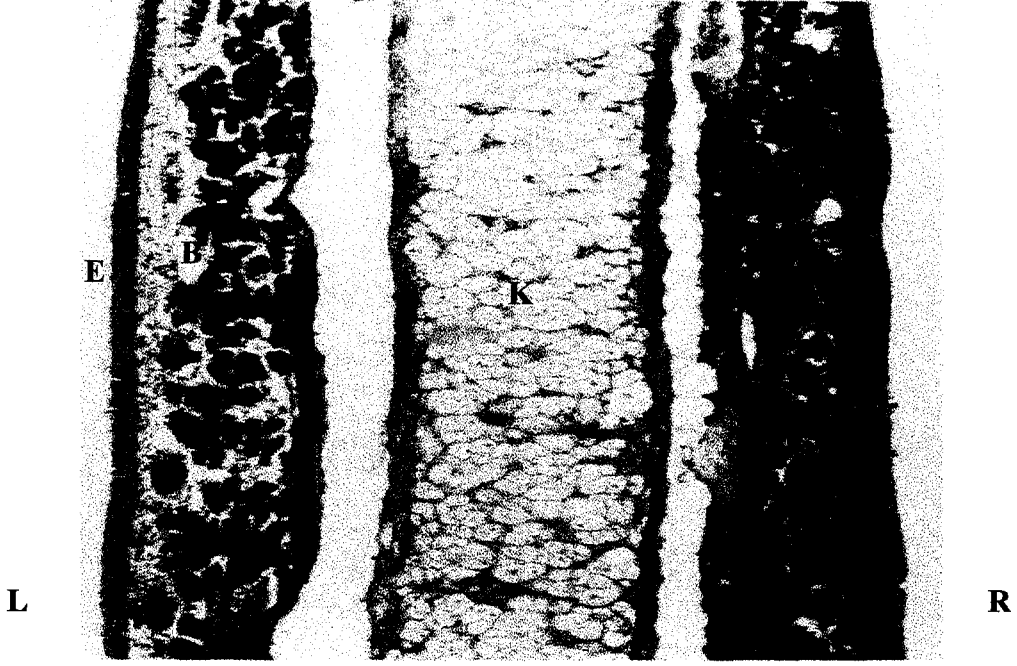
+ Hafif

++ Orta şiddette

+++ Yoğun

0+ Bazı hayvanların dokularında var

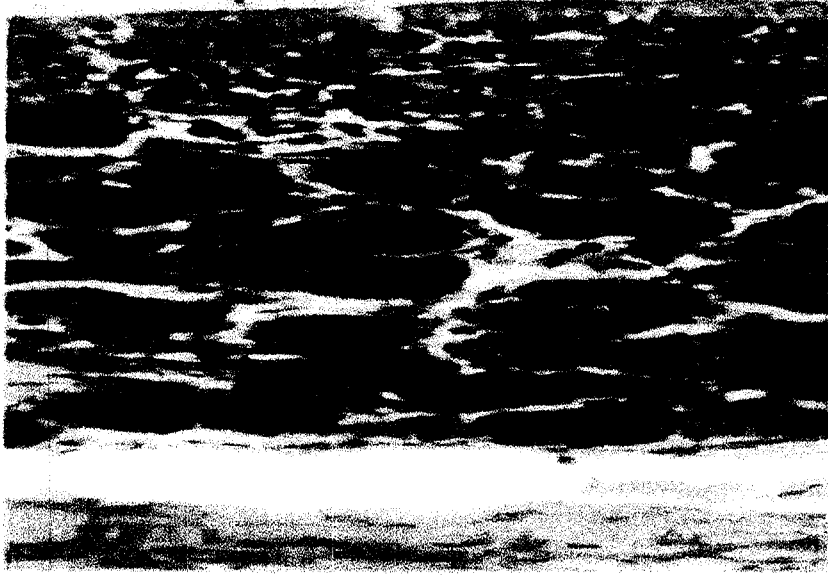
1. GRUP



Şekil 4.4. Sağ (R) ve sol (L) taraf burun boşluğu solunum bölgesi
E: Epitel, B: Lamina propria bezleri, K: Kıkırdak (HE, X12)



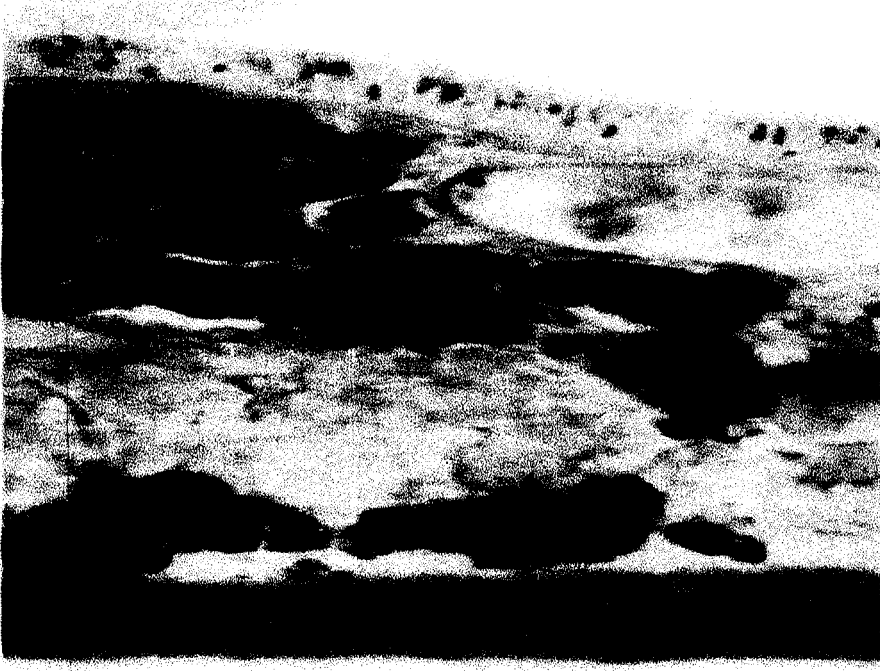
Şekil 4.5. Sol taraf burun boşluğu solunum bölgesi
Normal yapıda epitel ve mukoza (HE, X66)



Şekil 4.6. Sağ taraf burun boşluğu solunum bölgesi
Minimal mukus salgısı (↓) Normal yapıda epitel, sil ve mukozal bezler
B: Lamina propria bezleri (HE, X66)



Şekil 4.7. Sağ (R) ve sol (L) taraf burun boşluğu solunum bölgesi
(⇐): Sağ tarafta zayıf mukus reaksiyonu, S: Septum, E: Epitel (PAS, X12)

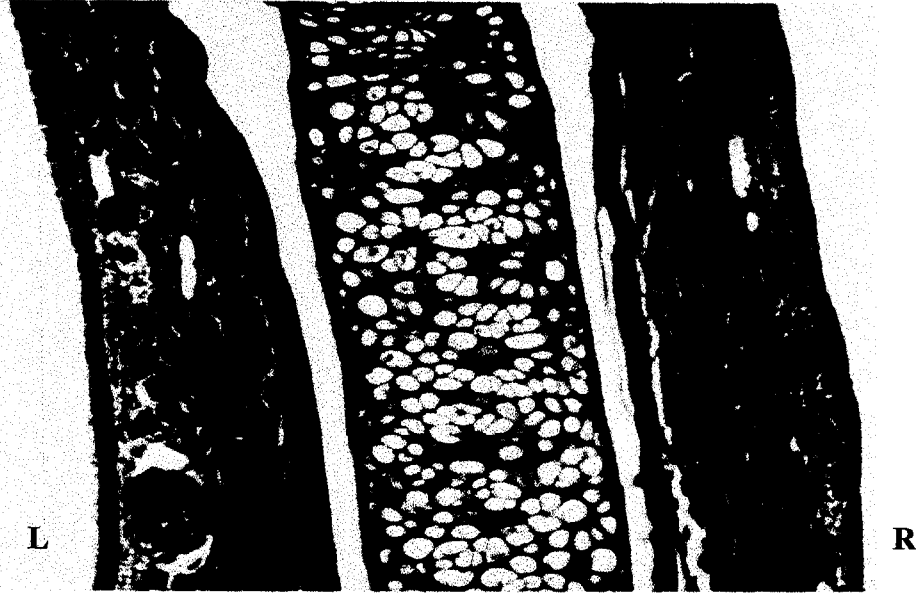


Şekil 4.8. Sol taraf burun boşluğu solunum epiteli ve mukoz Goblet salgıları Mukozada yoğun PAS (+) boyanan bezler (B) (PAS, X66)



Şekil 4.9. Sağ taraf burun boşluğu solunum bölgesi Azalmış Goblet salgısı (↑) (PAS, X66)

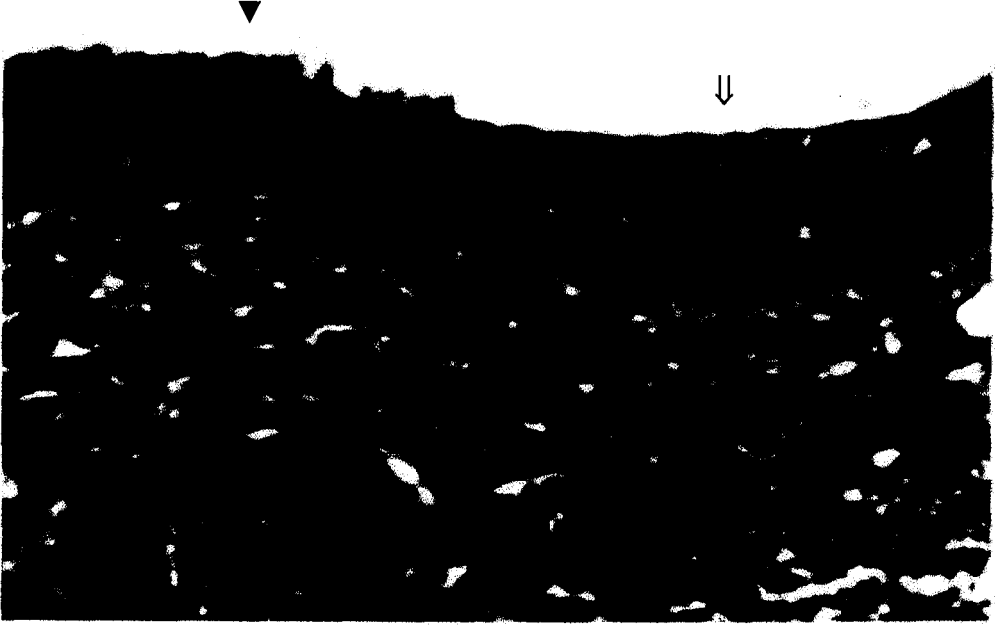
2. GRUP



Şekil 4.10. Sağ (R) ve sol (L) taraf burun boşluğu solunum bölgesi
Sağ tarafta yoğun hücre infiltrasyonu (*), K: Kıkırdak (HE, X12)



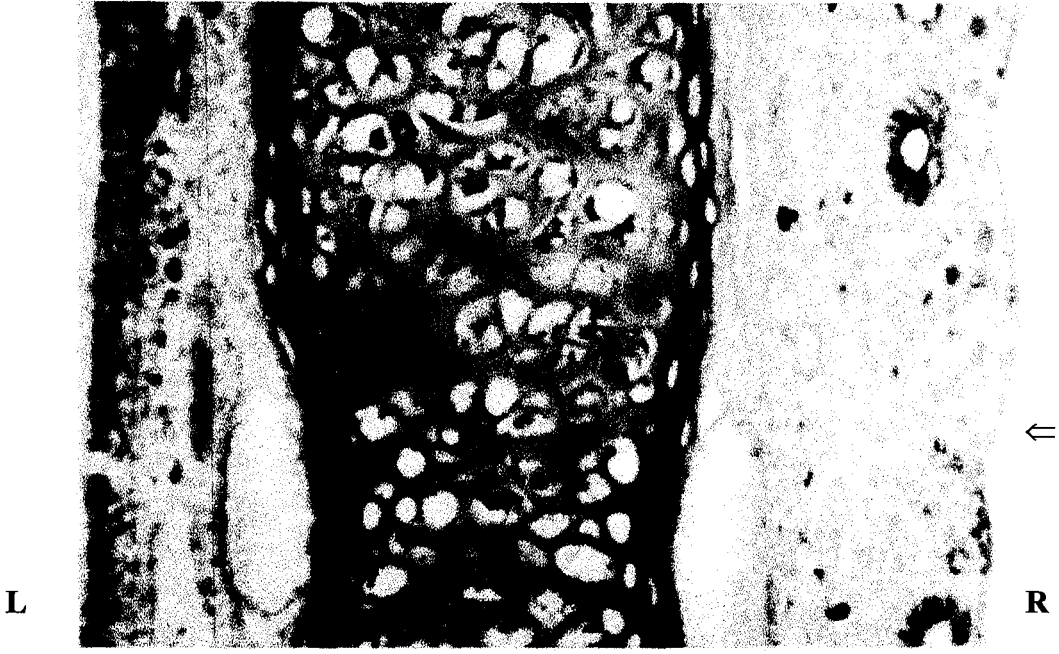
Şekil 4.11. Sol taraf burun boşluğu solunum bölgesi
Normal yapıda solunum epiteli ve diğer yapılar (HE, X66)



Şekil 4.12. Sağ taraf burun boşluğu solunum bölgesi
Yoğun hücre infiltrasyonu Sağlam kalmış siller (▼) yanında sil kaybı (⇓)
(HE, X66)



Şekil 4.13. Sağ taraf burun boşluğu solunum bölgesi
Sil kaybı ve normal görünümünü kaybetmiş epitel (*) (HE, X66)

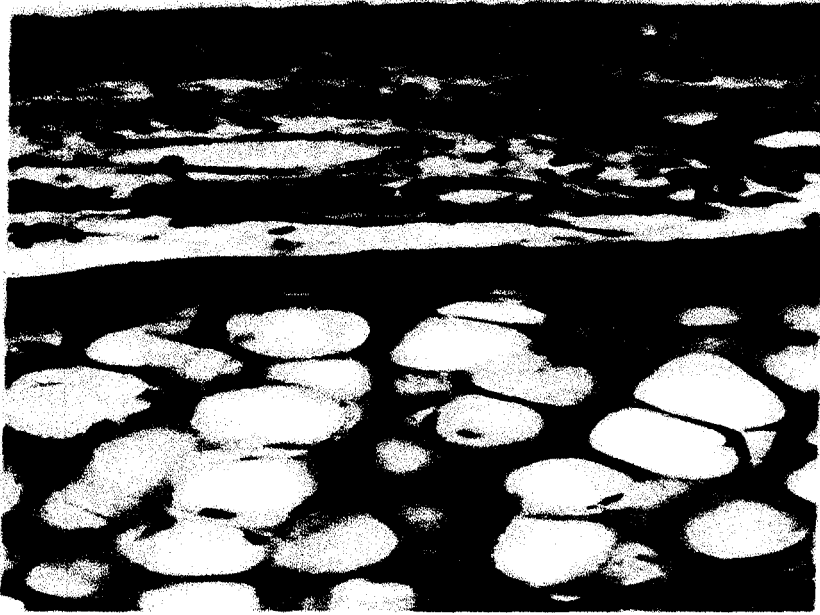


Şekil 4.14. Sağ (R) ve sol (L) taraf burun boşluğu solunum bölgesi
Sağ tarafta epitel atrofisi ve mukus azalması (⇐)
Sol taraf normal yapıda (PAS, X33)

3. GRUP



Şekil 4.15. Sağ (R) ve sol (L) taraf burun boşluğu solunum bölgesi
Sağ tarafta belirgin mukus artışı (⇔) (HE, X33)



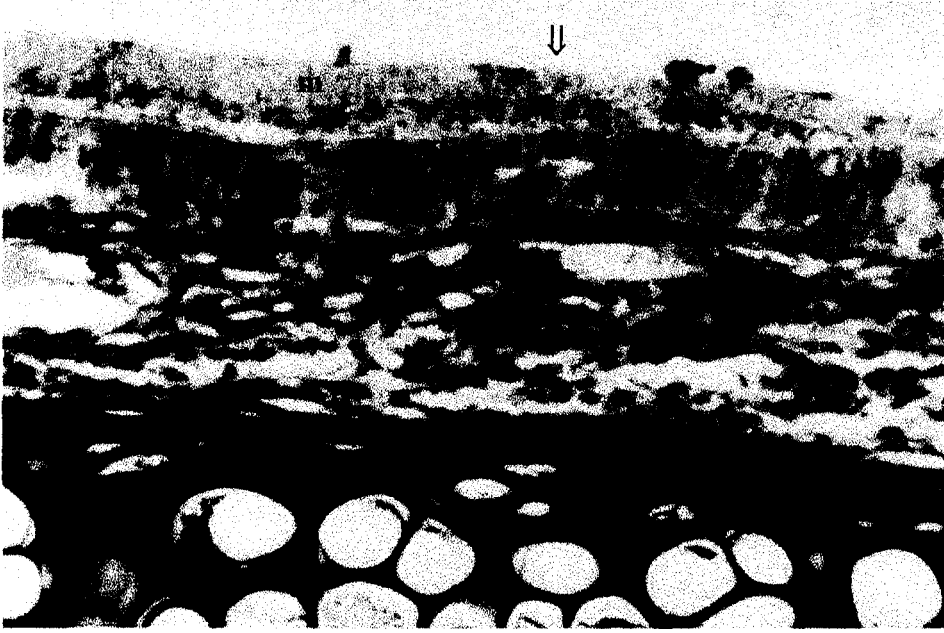
Şekil 4.16. Sol taraf burun boşluğu solunum bölgesi
Normal yapıda epitel (HE, X66)



Şekil 4.17. Sağ taraf burun boşluğu solunum bölgesi
Normal yapıda epitel ve yoğun mukus salgısı (m) (HE, X66)



Şekil 4.18. Sağ (R) ve sol (L) taraf burun boşluğu solunum bölgesi
Sağ taraf epiteli ve Goblet'lerdeki mukus kontrole benzer yapıda (⇐)
(PAS, X33)



Şekil 4.19. Sağ taraf burun boşluğu solunum bölgesi
Yüzey mukusu artışı ve normal yapıdaki solunum epiteli (↓), m: Mukus
(PAS, X66)

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

5.1. BİTKİ EKSTRESİNİN HAZIRLANMASI

Bitki meyvelerinin suyunun süzülmesi işlemi sırasında süzme işleminin süzgeç kağıdıyla çok yavaş olduğu ve meyve suyunun yeşil olan renginin süzme işleminden sonra kahverengiye dönüştüğü gözlenmiştir. Bu gözlemler Cingi ve ark.'nın (66) bulguları ile uyumludur. Süzme işleminin vakum altında yapılması bu süreyi hızlandırmış ve ekstrenin bozulma olasılığını azaltmıştır. Liyofilize toz hale gelen bitki ekstresinin çok kısa süre bile olsa hava ile teması sonucunda havadan nem çektiğinin gözlenmesi üzerine toz haldeki bitki ekstresinin kullanılıncaya kadar ağzı vidalı kapaklı kavanozlarda, oda sıcaklığındaki etüvde saklanması uygun bulunmuştur. Liyofilize toz haldeki bitki ekstresinin formülasyonlarda daha homojen dağılmasını sağlamak amacıyla önce tunç havanda, daha sonra ise bilyeli çelik değirmende partikül boyutu ufaltılmıştır.

5.1.1. Bitki Ekstresi Üzerinde Yapılan Ön Çalışmalar

Formülasyon çalışmalarına başlamadan önce ekstrenin uygun olan konsantrasyon yüzdesini saptamak amacıyla farklı konsantrasyonların sudaki çözünürlüğü ve burun pH'sına uygunluğu araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda konsantrasyon arttıkça çökeltinin arttığı, dolayısıyla bitki ekstresinin suda tamamen dağılmadığı saptanmıştır. Burun mukozasına en uygun pH (6.85) ve formülasyonlarda homojenliğin en iyi şekilde sağlanabilmesi açısından formülasyon çalışmalarında %1'lik konsantrasyonda bitki ekstresi kullanımı tercih edilmiştir.

5.2. FORMÜLASYONLARIN HAZIRLANIŞI VE KARAKTERİZASYON SONUÇLARI

Ön formülasyon çalışmaları sırasında formülasyonların hazırlanışında farklı karıştırıcı tipleri denenmiştir. Böylece formülasyonlarda en uygun homojenliğin sağlanmasına çalışılmıştır. Maddelerin sıcakta veya soğukta çözünme özelliklerine göre farklı karıştırma sıcaklıkları denenmiş bu sıcaklık farklılıklarından formülasyonları fiziksel olarak etkilenip etkilenmediği gözlenmiştir. Formülasyonun homojenliği ve stabilitesi açısından en uygun olan karıştırma sıcaklığı bu şekilde saptanmıştır.

F1

Formülasyon çalışmaları sırasında ultraturaks kullanımı aşırı köpük ve hava kabarcığı oluşumuna neden olduğundan, hem homojen preparat hazırlanması, hem de köpük ve hava kabarcığı oluşmadan güzel görünümlü bir hal alması için manyetik karıştırıcının uygun olduğu saptanmıştır. Ekstre eklenmeden hazırlanan formülasyonun pH ayarının yapılması için NaOH çözeltisi eklendiğinde gözlenen koyu jel oluşumunun, ekstre ile hazırlanan formülasyonda gözlenmemesi ekstrenin formülasyonu sıvılaştırmış olabileceğini düşündürmüştür. F1 formülasyonu, stabilitesi, vizkozluğu, santrifüj sonuçları dolayısı ile en uygun formülasyon olarak seçilmesi nedeniyle histolojik çalışmalar için ekstreli ve ekstresiz olarak hazırlanmıştır. Ekstresiz formülasyonun sıvılaştırılmasında, pH'sı 6.81 olan ve burun mukozası için kullanımının uygun olduğu Kuboyama ve ark. (43) ve Sezik ve ark. (57) önerisi ile de desteklenen serum fizyolojik kullanılmıştır. Formülasyonun içerdiği maddelerden Methocel[®], soğuk suda yavaşça çözünen sıcak suda ise çözünmeyen özellikte bir madde olduğundan hazırlanışı sırasında oda sıcaklığındaki distile su kullanılmıştır. Ayrıca Methocel[®] farmasötik kullanımda vizkozite arttırıcı bir ajandır (77). Vizkoz polimer çözeltiler, ilaç ve nazal mukoza arasındaki temas süresini arttırırlar (78). Dolayısı ile Methocel[®] kullanımı ile formülasyonun nazal mukozada daha uzun süre kalmasının ve böylece etkin maddenin daha etkili

olmasının sağlandığı düşünülmektedir. Carbopol® ise jel oluşturucu olarak formülasyona eklenmiştir. NaOH ile nötralizasyonu sonucu jel oluşturduğu belirtilmiştir. Yazan ve ark. (79), nazal taşıyıcı sistemlerden verapamil hidroklorürün biyoyararlanımının araştırıldığı çalışmalarında taşıyıcı sistem olarak metil selüloz ve Carbopol®'ü ayrı ayrı kullanmışlardır. Carbopol® ve hidroksipropil selülozun birlikte kullanılarak mukozal adhesif dozaj formları hazırlandığı da bildirilmiştir (80).

Koruyucu olarak BAC:benzil alkol karışımı (9.8:0.2) kullanılmıştır. Koruyucu olarak kullanılan BAC'ün nazal ilaç formülasyonlarında kullanımı tüm dünyaca kabul edilmiştir (40). Formüle edilen ilaçların mikrobiyal bozunmaya karşı korunması için tek ajandan çok kombinasyon halinde kullanılması yaygınlaşmaktadır. Bu değişimin sebebi ajanın tek başına antimikrobiyal etkinliğinin geniş bir spektrum üzerinde başarı sağlayamamasıdır. Kullanılagelen koruyucular arasındaki potansiyel sinerjistik etkileşimleri gözönünde bulundurarak, aynı zamanda da ters etki riskini minimuma indirerek yüksek konsantrasyon kullanımı engellenebilir. BAC ve fenil etil alkol arasında sinerjik etki rapor edilmiştir (42). Bir başka çalışmaya göre ise, BAC'ün (%0.03) antimikrobiyal etkinliği, benzil alkol (%0.175), fenilpropanol veya feniletıl alkol kullanılarak artırılmıştır (80). Kolay bulunur ve ekonomik olması nedeniyle BAC:benzil alkol karışımı tercih edilmiştir. Formülasyonlara ayrıca antioksidan özelliğinden dolayı Vitamin E eklenmiştir.

F1 formülasyonunda; santrifüjleme testi ve stabilite deneyleri sırasında (4°C, 25°C, 40°C, 40°C ve %60 relatif nemde) çökelek ve faz ayrışması, renk değişimi gibi fiziksel değişiklikler, 40°C ve %60 relatif nemde ve 40°C'de yaklaşık 4 ay süresince gözlenmediğinden, hazırlanan formülasyonun kararlı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu süre sonunda hafif bir renk değişmesi görülmüştür. 4°C ve 25°C'de ise yaklaşık bir yıl değişiklik gözlenmemiştir.

F2

Ön formülasyon çalışmalarında kullanılan sodyum lauril eter sülfat anyonik bir yüzey etkin maddedir. Bitki ekstresinin formülasyon içinde tekdüze dağılımını sağlamak üzere formülasyona eklenmesi düşünülmüştür. Cilt ve her türlü vücut dokusu ile geçimlidir. Biyolojik olarak kolay parçalanmayan bir yapıya sahiptir (81).

PEG, hidrofilik, vizkoz, su ile karışabilen bir maddedir. Kararlı bir madde olduğundan ve de cilde irritan etkisi olmaması nedeniyle tercih edilmiştir. Propilen glikol ise higroskopik, vizkoz bir sıvı olduğundan dolayı formülasyona taşıyıcı olarak eklenmiştir.

PEG 400:propilen glikol karışımının 1:1 oranında kullanılması sonucu formülasyonda donma gözlenmiştir. PEG 400'ün donma noktası 4-8°C, propilen glikol'ün ise 59°C olarak bulunmuştur (77). Bu araştırmadan sonraki formülasyonlar 1:9 oranında hazırlanmıştır. Formülasyon çalışmaları sırasında tüm denemelerde dipte beyaz çökelek oluşumu gözlenmiştir. Oluşan beyaz çökeleğin sebebinin araştırılması safhalarında, hazırlanış yöntemleri, eklenen maddeler ve miktarları gözden geçirilmiştir. Bu çalışmalar sırasında distile su içerisine %1'lik konsantrasyondan başlayıp %5'e kadar ekstre eklenerek, propilen glikol içerisine eklenen %1'lik konsantrasyondan başlayan ve %5'e kadar çıkan ekstreli çözelti ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda ekstrenin propilen glikol gibi su ile karışan daha vizkoz bir madde içerisinde daha iyi dağıldığı saptanmış ancak bu çalışmada da beyaz çökelek gözlenmiştir. Sonuç olarak beyaz çökeleğin neden olduğu hakkında somut bir açıklama yapılamamıştır ancak sadece propilen glikol ve ekstre ile hazırlanan çözeltide de görüldüğünden ekstre ile propilen glikol arasında bir geçimsizliğin söz konusu olabileceği düşünülmüştür.

Santrifüjleme testi sonuçlarına göre faz ayrışması ve çökelek gözlendiğinden, formülasyonun fiziksel özellikleri daha ileri deney safhalarının yapılması için uygun görülmemiştir.

F3

Synperonic® suda çözünen noniyonik yüzey etkin madde olarak formülasyona eklenmiştir. HPMC, soğuk suda koloidal bir çözelti oluşturan bir maddedir (80). Vizkozite arttırıcı ajan olarak formülasyona eklenmiştir.

%10'luk Synperonic® ile hazırlanan formülasyonda dipte toplanmış çok miktarda jel şeklinde çökelek bulunduğunda, miktarı düşürülmüş ve %0.5'lik Synperonic® ile formülasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu şekliyle formülasyonun istenen fiziksel görünümü sağlanmış ancak stabilite dolaplarında uzun süre stabil kalmaması ve santrifüjleme testi deneylerinde çökelek gözlenmesi nedeniyle formülasyona ileri deneyler uygulanmamıştır.

F4

Natrosol® sıcak veya soğuk suda çözünebilen selüloz türevi bir maddedir. Vizkozite arttırıcı olarak formülasyona eklenmiştir. Aerosol OT® suda yavaş çözünen anyonik bir yüzey etkin maddedir (80). Texapon N40® da anyonik yüzey etkin madde olarak formülasyona eklenmiştir. Farklı yüzey etkin maddeler formülasyona eklenerek, hem bitki ekstresinin etkinliğini arttırmak, hem de bitki ekstresinin formülasyonda dağılımını sağlamak amacı ile farklılık incelenmiştir.

Ön formülasyon çalışmaları sırasında değişik karıştırma cihazları denenmiş ve en uygun karıştırma şeklinin baget ve mekanik karıştırıcı ile olduğu bulunmuştur. Formülasyon taze hazırlandığında, fiziksel özellikleri açısından kullanım için uygun görülmüş ancak stabilite dolaplarına konduktan sonra 7 gün gibi kısa süre içerisinde bozunması nedeniyle farklı çalışmalar yapılmıştır. Formülasyonun stabilite dolaplarındaki deneysel süresi içerisinde beyaz çökelek gözlenmesinin sebebini araştırmak için yüzey etkin maddesiz denenilen formülasyonda çok miktarda yeşil renkli çökelek gözlendiğinden, yüzey etkin madde ile etkileşen maddenin BAC olduğu düşünülmüştür. BACün anyonik yüzey etkin maddelerle etkileştiği ve beyaz çökelek oluşumu gözlendiği literatür ile de desteklenmiştir (77). Sadece benzil alkol ile farklı bir yüzey etkin madde denenmiş ancak çökelek oluşumu engellenememiştir.

Yüzey etkin madde miktarı arttırıldığında ise 7. günün sonunda sarı-beyaz arası renkte çökelek gözlenmiştir. Tüm bu çalışmaların sonucunda F4 formülasyonunun fiziksel özellikleri ve santrifüjleme testi sonuçları uygun olmadığından dolayı ileri deney safhalarına geçilmemiştir.

F5

NaH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 suda çözünebilir ve buldukları ortamı tamponlayan maddelerdir. Arasurf TA 100[®] katyonik bir yüzey etkin madde iken Tween 80[®] hidrofilik noniyonik bir yüzey etkin maddedir. NaCl, suda çözünen bir maddedir ve %0.9'luk sulu çözeltisi isoosmotiktir. Alkol, su ile karışabilen bir maddedir ve farmasötik preparatlarda çözücü veya koruyucu olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (80).

Sıcaklık uygulanmadan manyetik karıştırıcı kullanarak hazırlanan formülasyonun kıvamının çok sıvı olduğu ve çökelek varlığı gözlenmiştir. Sıcaklık uygulanarak ultrasonik banyoda hazırlandığında beyaz çökelek, tampon maddeler eklenmeden hazırlandığında ise yeşil çökelek belirlenmiştir. Vizkoziteyi biraz arttırmak ve çökmeyi engelleyebilmek amacı ile NaCl ve alkol miktarları arttırıldığında beyaz çökelek gözlenmiştir. Maddelerde ve miktarlarında değişiklik yaparak çökelek oluşumunu engellemeye ve vizkoziteyi arttırmaya yönelik yapılan çalışmalar sonuçsuz kalmış ve formülasyonun ileri deney safhaları yapılmamıştır. Santrifüjleme testi sonuçlarında gözlenen çökelek de bu bulguyu desteklemektedir.

F6

Arlatone 983[®], HLB değeri 8.7 olan hidrofilik bir yüzey etkin maddedir. Montanox 80[®] ise su ile misel oluşturabilen noniyonik bir yüzey etkin maddedir. Formülasyona eklenen NaOH çözeltisi pH'yı ayarlamak için kullanılmıştır (80).

Değişik karıştırma yöntemleri denenerek formülasyonda gözlenen çökelek oluşumunun engellenememesi üzerine, formülasyonun içerdiği maddelerde ve madde miktarlarında çeşitli değişiklikler yapılmıştır. Beyaz, yeşil ve kahverengi olarak farklı renklerde çökelek olduğu gözlenmiştir. Buna neden olarak, ekstrenin,

formülasyonun içerdiği diğer maddeler ile etkileşim gösterebileceği düşünülmüştür. Yapılan santrifüjleme testi sonuçlarında çökelek ve faz ayrışması gözlemlendiğinden formülasyonun uygun olmadığına karar verilmiştir.

F1 formülasyonu Methocel[®], Carbopol[®], Vit E, BAC:benzil alkol karışımı (9.8:0.2), toz ekstre ve distile su kullanılarak hazırlanmıştır. Methocel[®] ve Carbopol[®] çözeltileri oda ısısında hazırlandıktan sonra bu iki çözelti karıştırılmış ve Vit E, BAC:benzil alkol karışımı (9.8:0.2) ve toz ekstre eklendikten sonra distile su ile 100 g'a tamamlanmıştır. Mekanik karıştırıcı kullanarak homojen oluncaya dek 300 rpm'de karıştırılmış ve %5'lik NaOH çözeltisi ile pH 6.8'e ayarlanmıştır. F1 formülasyonu vizkozite arttırıcı ajanlar (Methocel[®], Carbopol[®]) içerdiğinden kıvamı çok sıvı değildir ve bu özelliği ile buruna damlatıldıktan sonra mukozada bir süre kalabilecek özellik taşımaktadır. Etkin madde ve taşıyıcı sistem arasında etkileşme gözlenmemesi ve diğerlerinden daha uzun süre kararlı olarak kalması dolayısıyla diğer formülasyonlara göre daha üstün olduğu düşünülmüştür. Ayrıca damlalıktan akışı da buruna uygulanabilmesi açısından uygundur.

5.2.1. Reolojik Analiz Sonuçları

Reolojik analiz sonunda, taze hazırlanmış ve Bölüm.3.2.2.2.3'te anlatılan koşullarda saklanmış olan tüm preparatların psödoplastik akış gösterdikleri saptanmıştır. Bu tip akışta, vizkozite artan kayma hızı ile azalır (**Şekil 4.2**) ve bu akış tipini gösteren preparatlar, dururken bir ağ yapısı oluştururlar (76, 82, 83, 84, 85). Kayma kuvvetinin artması ile bu yapı parçalanır ve "kaymaya bağlı incelmeye" görülür. Kayma kuvvetinin ortadan kaldırılması ile, başlangıç koşullarına dönmüştür (**Şekil 4.1**). Bu davranışa artan ve azalan kayma hızını gösteren akış eğrilerinin çakışması sonucu karar verilmiştir. Genellikle su bazlı sistemlerde gözlenen bu davranış şekline tiksotropik davranış adı verilir (86).

Psödoplastik akış modelinin en iyi uyum sağladığı saptanan "Üslü Yasa" da, kayma gerilimi ve hızının log-log grafiği çizilmiş (**Şekil 4.3**) ve yüksek uyum

güvenilirliği gösteren (**Çizelge 4.4**) birer doğru elde edilmiştir. Bu eğrilerin eğiminden hesaplanan akış indisleri **Çizelge 4.4**'te gösterilmiştir. Akış indisi 1 olan preparatlar Newtonian akışa sahiptirler. Hazırladığımız preparatın farklı koşullarda saklanması sonucu elde edilen 0.520-0.588 arasındaki akış indisleri koşullar hızlandırıldıkça artış göstermiştir. Ancak, bu artışın çok anlamlı olmadığı düşünülmüştür.

Çizelge 4.4'te gösterilen 10 rpm'deki vizkozite değerleri karşılaştırıldığı zaman, reolojik analiz sonucunda, hazırlanan nazal preparatın reolojik kararlılığa sahip olduğu söylenebilir. Psödoplastik akış modeline sahip olması ve tiksotropik davranış göstermesi, nazal uygulama açısından da uygun görülmüştür.

5.2.2. Histolojik İnceleme Sonuçları

Nazal formülasyonların nazal mukoza üzerindeki histolojik etkilerinin incelendiği çalışmalarda, sıçan, tavşan, köpek, kobay, fare ve koyun nazal mukozalarının kullanımına oldukça sık rastlanmaktadır (23, 37, 40, 43, 87, 88, 89, 90). Sıçanda olfaktif bölgenin, insanda ise solunum bölgesinin önemli olmasına karşın, insan ve sıçanlardaki nazal mukoza özelliklerinin ve emilim derecelerinin benzer oluşu, çalışmaları bu türde ve daha çok solunum mukozasında yoğunlaştırmıştır.

Deneylerde kullanılan hayvan türlerinden ileri gelen farklılıkların yanısıra, kullanılan hayvanın bilincinin yerinde veya anestezi altında olması da ayrıca önem taşımaktadır. Anestezi altında, drenaj önlenerek, formülasyonun burunda daha uzun süre kalmasını sağlayan çalışmaların yanısıra, anestezi ve bilinci yerinde olan deneklere uygulanan histolojik çalışmalar vardır (37, 40, 89, 91). Çalışmamızda daha doğal olması açısından formülasyonun bilinci yerinde olan sıçanların burunlarına uygulanması tercih edilmiştir.

Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada, tedavi uygulanmayan hayvanlar kontrol gurubu olarak kullanılmış ve hayvanlar arasındaki farklılıklardan, dokuların dağılımı ve doğasının karmaşıklığından kaynaklanan problemler ortaya çıkmıştır.

Burnun ortasındaki septum, sıçan nazal boşluğunu anatomik olarak iki yarıya böldüğünden, aynı hayvanda bu iki yarıdan birisi deney gurubu olarak kullanılırken diğer yarısı kontrol gurubu olarak kullanılabilir. Böylece, ışık mikroskopunda, septumun her iki tarafı tek bir kesitte gözlenebilmekte ve kolaylıkla kalitatif özellikleri inceleme olanağı sağlanmış olmaktadır (23, 28, 37, 43, 88, 89, 90).

Burun solunum mukozasındaki epitel ile bu hücrelerin apikalinde yerleşik siller, Goblet hücreleri ve salgıları hayati önemi olan hücresel komponentleri oluşturmaktadırlar. Bunlar dışında, organın venöz pleksustan zengin oluşu nedeni ile damarlar da formülasyondan etkilenen önemli komponentler arasında yer almaktadır. Ancak, nazal boşluğa damlatılan formülasyonlar, ilk önce bu duvar yani epitel ile karşılaştığından bölgenin önemi daha da artmakta ve dolayısıyla formülasyon çalışmaları bu bölgede yoğunlaşmaktadır.

Solunum bölgesinde formülasyonla oluşan hasarlar, sillerin ortadan kalkmasından hücrelerin nekrozuna ve diğer tip bozukluklara kadar çeşitli şekilde olabilmektedir. Histolojik skorlamalar da, buna paralel olarak, epitel hasarı, sil kaybı, epitel katının incilmesi veya kalınlaşması, piknoz, deskuamasyon, nekroz, lamina propria'da infiltrasyon, damarlarda hiperemi, mukus artışı veya mukusun azalması, Gobletler'de bozulmalar, lümende eksuda oluşumu gibi çeşitli konularda, hiç hasar olmamasından şiddetli hasara kadar varan derecelerde yapılmaktadır. Bu hasarlar tersinirdir veya değildir. Çalışmamızda yapılan skorlama literatür ile benzerlik göstermekte ve guruplar arası farklılığın belirlenmesi için kolaylık sağlamaktadır (23, 37, 40, 43, 89).

Formülasyon değerlendirme çalışmalarında, çeşitli maddeler tek başına veya genellikle de katkı maddeleri ile birlikte kullanılmakta ve hasar dereceleri incelenmeye çalışılmaktadır. Bu çalışmalar arasında, insülinin bizim uyguladığımız formülasyonla tam olmasa da benzer hasarlar oluşturması ilginçtir. Çalışmamızdaki hasarlar arasında, burun solunum mukozası epitelinde hücre kaybı, mukus salgısı, silia toksisitesi gibi etkiler görülmüştür. İnsülin'in L- α -lisofosfotidilkolin ile birlikte kullanılmasında, mukus salgısı ve epitel hasarının devam ettiği gözlenmiş, bir diğer katkı maddesi olan dekstran'ın insülinle kombinasyonunda, mukozanın bazı

bölgelerinde epitel dökülmesi veya epitel kalınlığının azalması ve minimal düzeyde Goblet kaybı saptanmıştır (88). İnsülin ve sodyum taurodihidrofusidat kombinasyonunun, uygulamadan 1 saat sonra, oluşturduğu hasarın dekstrana oranla biraz daha ağır olduğu görülmüştür (88).

Formülasyonda histolojik önemi olan bir diğer maddenin de BAC olduğu bildirilmiştir. %0.05 BACün histolojik etkileri arasında, epitel dökülmesi, anlamlı ödem ve hafif enflamasyon özellikle bahsedilmiştir (43). Dolayısıyla, formülasyonların nazal bölgede yaptığı toksik etkide katkı maddelerinin büyük önemi olduğu ortaya çıkmaktadır (43, 88). Çalışmamızda kullanılan katkı maddelerinin etkisini ortadan kaldırmak ve yalnızca etkin maddenin etkisini saptayabilmek için kontrol bölgeye uygulanan preparata etkin madde dışında tüm maddeler eklenmiştir.

Sıçanlarda formülasyonların yaptığı hasara etki eden diğer faktörler, değişik doz ve uygulama süreleridir. Ancak, literatürde sıçanlar için genellikle 20 µl uygulandığı görülmektedir (23, 40, 43, 88). Chandler ve ark. (23), çalışmalarında 20, 50 ve 100 µl dozu sıçan nazal mukozasına uyguladıklarında, 100 ile 50 µl dozun burnun kontrol tarafına aktığını, 20 µl doz uygulandığında ise dağılımın ve yüzey ile temasın daha iyi olduğunu gözlemişlerdir. Yüksek miktarlar uygulandığında nazal boşluğun kontrol tarafında da etkileri görüldüğünden, çalışmamızda düşük bir miktar tercih edilmiş ve her bir burun deliğine her uygulamada ikişer damla formülasyon damlatılmıştır. Kullanılan preparatın miktarı 54.4 mg'dır. Bu miktar, burun deliğinden dışarı taşmayacak hacimdedir ve tümü mukozada belirli süre kalmaktadır. Bechgaard ve ark. (89), çalışmalarında burun damlası olarak çok kullanılan %1 efedrin formülasyonunun, 75 µl'sini, bilinci yerinde olan tavşanlara günde dört defa, bir hafta süresince uyguladıktan sonra, 4. saat, 1., 7. ve 21. günlerde sıçanların nazal mukoza epitelindeki değişimleri incelemişlerdir. Formülasyonun oluşturduğu bozukluklar ciddi derecededir ve büyük bir kısmı ilk 4 saat içinde yani akut bir şekilde oluşmuştur. Saptanan değişimler, dökülmeler, bozulmalar, sil kaybı, metaplazi ve nekrozun yanısıra damarlarda hiperemi, ödem ve enflamasyon gibi önemli bozukluklardır. Goblet hücrelerindeki azalma ve eksuda oluşumu da aynı çalışmada saptanmıştır. Oluşan histolojik değişikliklerin 24 saatten başlayarak önemli

ölçüde azaldığı, 7. ve 21. günlerde ise hiçbir değişiklik gözlenmediği saptanmıştır (89).

Çalışmamızda deney süresinin 6 günle kısıtlanmasındaki amaç, formülasyonun özellikle akut etkisini gözlemek içindir. Çalışmamızın bulguları arasında, 1 gün formülasyon uygulanan grupta görülen etkilerin tümü hafif olup, hücre infiltrasyonu, Goblet hücresi ve mukus içeriğinde azalma ve burun boşluğundaki sero-mukoz salgı şeklindedir. 3 gün uygulanan grupta orta şiddette, epitel hasarı ve sil kaybı, yoğun hücre infiltrasyonu, Goblet hücresi ve mukus içeriğinde azalma görülürken, 6 gün uygulanan grupta sadece yoğun sero-mukoz sıvı gözlenmesi, epitel ve mukoza yapısının kontrol gurubu ile aynı olması, Bechgaard ve ark.'nın (89) bulgularına benzerlik göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmada, uygulamadan 4 saat sonra gözlenen yoğun hasarın, 24 saat sonra kaybolmasının, dokulardaki 24 saat hatta 60 dakikadan az bir sürede yenilenme kapasitesinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (87, 89). Yaptığımız çalışmada da, 3. günde görülen etkilerin 6. günde gözlenmemesi, dokuların yenilenme özelliğini düşündürmektedir, yani oluşan hasarlar tersinirdir. Burada kullanılan HE boyası dokunun genel karakterlerini ortaya çıkarmada, PAS boyası ise mukus salgısının saptanmasında kullanılmıştır.

Formülasyonların nazal mukozada gösterdiği lokal toksisite kronik tedavi uygulamasında pek kabul görmemektedir. Akut tedavide, hayati bir durum ve minimal toksisite olması halinde formülasyonun kullanılması, ancak kronik tedavi için güvenlik önlemlerinin daha da artırılması önerilmektedir (37, 89).

Sonuç olarak, bu çalışmada hazırlanan nazal formülasyonun histolojik etkileri literatür ile uyumlu bulunmuştur. Akut evrede toksik etki göstermekle birlikte, yaklaşık 1 haftada tüm hasarın ortadan kalkması formülün güvenli kullanılabileceğini, ancak yine de bu ilk bulgularımızın ışığı doğrultusunda çalışmalara devam edilmesinin uygun olduğu kanısına varılmıştır.

5.3. SONUÇ

Yapılan önformülasyon çalışmaları sonucunda diğerlerinden daha üstün özelliklere sahip olduğu saptanan F1 formülasyonu ile halk arasında uzun yıllardır kullanılagelen *Ecballium elaterium* meyvelerinin suyunun kararlı ve histolojik olarak etkin bir nazal preparatı hazırlanmıştır. Seçilen formülasyon Methocel®, Carbopol®, Vit E, BAC:benzil alkol karışımı (9.8:0.2), toz ekstre ve distile su kullanılarak hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında hazırlanan formülasyonda homojenliğin sağlanabilmesi için mekanik karıştırıcı kullanılmış ve pH, %5 NaOH çözeltisi ile 6.8'e ayarlanmıştır. Formülasyon 40°C ve 40°C %60 relatif nemde yaklaşık 4 ay kararlı kalmış; 4°C ve 25°C'de ise gözlenen 1 yıllık süre boyunca fiziksel değişim gözlenmemiştir. Histolojik çalışmaların sonucunda, bitki ekstresi içeren F1 formülasyonunun 3 günlük uygulamada sıçanlarda gözlenen histolojik etkilerin 6 gün uygulanan grupta gözlenmemesi, dokularda ekstreya karşı kompensasyon mekanizması nedeniyle bu süre içerisinde dokuların yenilenmiş olabileceğini ve gözlenen etkilerin tersinir olduğunu düşündürmüştür.

KAYNAKLAR

1. FOWLER, I., *Human Anatomy*, p. 462-470. Wadsworth Publishing Company, California, 1984.
2. YAMAN, K., *Fizyoloji*, p. 367-369 545-549. Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa, 1996.
3. SEMİZ, B.D., *İnsan Anatomisi ve Fizyolojisi*, p. 195-197. Marmara Üniversitesi Yayınları No. 476, İstanbul, 1990.
4. NOYAN, A., *Fizyoloji Ders Kitabı*, p. 286-291. Meteksan, Ankara, 1984.
5. ÖZER, Y., *Nazal Yolu İlaç Uygulamalarındaki Önemi ve Nazal İlaç Taşıyıcı Sistemler*, *Pharmacia JTPA*, **30**, 136-147 (1990).
6. VANDER, A.J., SHERMAN, J.H. ve LUCIANO, D.S., *Human Physiology*, 6 th Ed., p. 266-267. McGraw-Hill Inc., San Francisco, 1994.
7. KAHYA, E., *Şemseddin-i İtaki'nin Resimli Anatomi Kitabı*, p. 166-208. Atatürk Kültür Dil ve Tarih Yüksek Kurumu Atatürk Kültür Merkezi Yayını, Ankara, 1996.
8. AYTEKİN, Y. ve SOLAKOĞLU, S., *Temel Histoloji 7th Ed.*, JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. ve KELLEY, R.O. (ed.), p. 397-404. Barış Kitabevi/Appleton & Lange, İstanbul, 1992.
9. THOMAS, S.L., ROLAND, L.C. ve ANTHONY, A.P., *Text/Atlas of Histology*, p. 503-508. Harcourt Brace Jovanovich, Philadelphia, 1988.
10. WÜTHRICH, P., MARTENET, M. ve BURI, P., *Effect of Formulation Additives upon the Intranasal Bioavailability of a Peptide Drug: Tetracosactide*, *Pharmaceutical Research*, **11 (2)**, 278-282 (1994).
11. LIN, V.H.K., ROBINSON, J.R. ve LEE, V.H., *Influence of Drug Properties and Routes of Drug Administration on the Design of Sustained and Controlled Release Systems*, in *Controlled Drug Delivery*, ROBINSON, J.R. ve LEE, V.H. (ed.), p. 44-45. Marcel Decker Inc., New York, 1987.
12. VERHOEF, J.C., ve MERKUS, F.W.H.M., *Nasal Absorption Enhancement: Relevance to Nasal Drug Delivery*, in *Drug Absorption Enhancement*, DE BOER, A.B.G. (ed.), p. 119-153. Harwood Academic Publishers, Switzerland, 1994.
13. CROMMELIN, D.J.A. ve MIDHA, K.K., *Topics in Pharmaceutical Sciences*, p. 71-92, 139-147. Medpharm, Stuttgart, 1992.

14. DONOVAN, M.D., FLYNN, G.L. ve AMIDON, G.L., *The Molecular Weight Dependence of Nasal Absorption: The Effect of Absorption Enhancers*, *Pharmaceutical Research*, 7 (8), 808-815 (1990).
15. KILIAN, N., MÜLLER, D.G., *The Effect of a Viscosity and an Absorption Enhancer on the Intra Nasal Absorption of Metaprolol in Rats*, *International Journal of Pharmaceutics*, 163, 211-217 (1998).
16. MAITANI, Y., UCHIDA, N., NAKAGAKI, M. ve NAGAI, T., *Effect of Bile Salts on the Nasal Mucosa: Membrane Potential Measurement*, *International Journal of Pharmaceutics*, 69, 21-27 (1991).
17. KARARLI, T., NEEDHAM, T.E., SCHOENHARD, G., BARON, D.A., SCHMIDT, E.R., KATZ, B. ve BELONIO, B., *Enhancement of Nasal Delivery of a Renin Inhibitor in the Rat Using Emulsion Formulations*, *Pharmaceutical Research*, 9 (8), 1024-1028 (1992).
18. OHWAKI, T., ANDO, H., WATANABE, S. ve MIYAKE, Y., *Effect of Dose, pH, and Osmolarity on Nasal Absorption of Secretin in Rats*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74 (5), 550-552 (1985).
19. FARJ, A.J., HUSSAIN, A.A., ARAMAKI, Y., ISEKI, K., KAGOSHIMA, M. ve DITTERT, L.W., *Mechanism of Nasal Absorption of Drugs. III: Nasal Absorption of Leucine Enkephalin*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79 (8), 698-702 (1990).
20. GÜVEN, K.C., *Eczacılık Teknolojisi, Cilt 1*, p. 133-137. Modern Reprodüksiyon, İstanbul, 1987.
21. AVERY, R., BEZMEZ, S., EDMONTS, A.G. ve YAYLALI, M., *Redhouse Sözlüğü, İngilizce-Türkçe*, p. 648. Redhouse Yayınevi, İstanbul, 1985.
22. GÜRSOY, A., PİŞKİN, E., DORTUNÇ, B. ve PEPPAS, N.A., *Kontrollü İlaç Serbestleştirilen Sistemler*, p. 317-321. Tekno Grafik & Ada Ofset, İstanbul, 1989.
23. CHANDLER, S.G., ILLUM, L. ve THOMAS, W.N., *Nasal Absorption in the Rat. I: A Method to Demonstrate the Histological Effects of Nasal Formulations*, *International Journal of Pharmaceutics*, 70, 19-27 (1991).
24. JIAN, L. ve LI WAN PO, A., *Effects of Insulin and Nasal Absorption Enhancers on Ciliary Activity*, *International Journal of Pharmaceutics*, 93, 101-104 (1993).
25. HUANG, C.H., KIMURA, R., NASSAR, B.R. ve HUSSAIN, A., *Mechanism of Nasal Absorption of Drugs I: Physicochemical Parameters Influencing the Rate of In Situ Nasal Absorption of Drugs in Rats*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74 (6), 608-611 (1985).

26. HUSSAIN, A.A., KIMURA, R. ve HUANG, C.H., *Nasal Absorption of Testosterone in Rats*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **73(9)**, 1300-1301 (1984).
27. YAZAN, Y., ÖZER, A.Y. ve EROL, K., *Pharmacodynamic Comparison of a Nasal Formulation of Verapamil and Intravenous and Oral Dosage Forms*, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **22 (3)**, 281-284 (1996).
28. CHANDLER, SG., THOMAS, N.W. ve ILLUM, L., *Nasal Absorption in the Rat: IV. Membrane Activity of Absorption Enhancers*, *International Journal of Pharmaceutics*, **117 (2)**, 139-146 (1995).
29. SHAO, Z., PARK, G-B., KRISNAMOORTHY R. ve MITRA, A.K., *The Physicochemical Properties, Plasma Enzymatic Hydrolysis, and Nasal Absorption of Acyclovir and Its 2'- Ester Prodrugs*, *Pharmaceutical Research*, **11 (2)**, 237-242 (1994).
30. KAGATANI, S., INABA, N., FUKUI, M. ve SNOBE, T., *Nasal Absorption Kinetic Behavior of Azetirelin and Its Enhancement by Acylcarnitines in Rats*, *Pharmaceutical Research*, **15 (1)**, 77-78 (1998).
31. SLOT, W.B., MERKUS, F.W.H.M., DEVENTER, J.H.S.V. ve TYTGAT, J.N.G., *Normalization of Plasma Vitamin B₁₂ Concentration by Intranasal Hydroxocobalamin in Vitamin B₁₂-Deficient Patients*, *Gastroenterology*, **113 (2)**, 430-433 (1997).
32. DONOVAN, M.D., FLYNN, G.L. ve AMIDON, G.L., *Absorption of Polyethylene Glycols 600 Through 2000: The Molecular Weight Dependence of Gastrointestinal and Nasal Absorption*, *Pharmaceutical Research*, **7 (8)**, 863-868 (1990).
33. CONTE, U., GIUNCHEDI, P., MAGGI, L., SANGALLI, M.E. ve LA MANNA, A., *Spray Drying as Preparation Method of Albumin Microspheres for Nasal Delivery of Nicardipine-Preliminary Studies*, *Abstract Book of Second European Symposium on Controlled Drug Delivery (Posters)*, p. 113-116. Noordwick Aan Zee, 1991.
34. *The United States Pharmacopeia USP 24.*, United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, 1999.
35. VIVIEN, N., BURI, P., BALANT, L. ve LACROIX, S., *Nasal Absorption of Metoclopramide Administered to Man*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **40 (4)**, 228-231 (1994).

36. YAMAMOTO, A., MORITA, T., HASHIDA, M. ve SEZAKI, H., *Effect of Absorption Promoters on the Nasal Absorption of Drugs with Various Molecular Weights*, *International Journal of Pharmaceutics*, **93**, 91-99 (1993).
37. GILL, I.J., FISHER, A.N., HINCLIFFE, M., WHETSTONE, J., FARRAJ, N., DE PONTI, R. ve ILLUM, L., *Cyclodextrins as Protection Agents Against Enhancer Damage in Nasal Delivery Systems II. Effect on In Vivo Absorption of Insulin and Histopathology of Nasal Membrane*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1 (5)**, 237-248 (1994).
38. MORIMOTO K., YAMAGUCHI H., IWAKURA Y., MORISAKA K., OHASHI Y. ve NAKAI Y., *Effects of Viscous Hyaluronate-Sodium Solutions on the Nasal Absorption of Vasopressin and an Analogue*, *Pharmaceutical Research*, **8 (4)**, 471-474 (1991).
39. GILL, I.J., ILLUM, L., FARRAJ, N. ve DE PONTI, R., *Cyclodextrins as Protection Agents Against Enhancer Damage in Nasal Delivery Systems I. Assessment of Effect by Measurement of Erythrocyte Haemolysis*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1 (5)**, 229-236 (1994).
40. MARTTIN, E., VERHOEF, J.G., ROMEIJN, S.G., ZWART, P. ve MERKUS, F.W.H.M., *Acute Histopathological Effects of Benzalkonium Chloride and Absorption Enhancers on Rat Nasal Epithelium In Vivo*, *International Journal of Pharmaceutics*, **141 (1-2)**, 151-160 (1996).
41. HIRAI, S., YASHIKI, T. ve MIMA, H., *Effect of Surfactants on the Nasal Absorption of Insulin in Rats*, *International Journal of Pharmaceutics*, **9**, 165-172 (1981).
42. HODGES, N.A., DENYER, S.P., HANLON, G.W. ve REYNOLDS, J.P., *Preservative Efficacy Tests in Formulated Nasal Products: Reproducibility and Factors Affecting Preservative Activity*, *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology*, **48**, 1237-1242 (1996).
43. KUBOYAMA, Y., SUZUKI, K. ve HARA, T., *Nasal Lesions Induced by Intranasal Administration of Benzalkonium Chloride In Rats*, *Journal of Toxicological Sciences*, **22 (2)**, 153-160 (1997).
44. OKSAY, B., *Kronik Sinüzitli Olgularda Ecballium Elaterium Burun Damlasının Etkinliğinin Oksimetazolin ve Serum Fizyolojik ile Karşılaştırılması*, Uzmanlık Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 1998.
45. *Sinusitis*, URL: <http://www.sleh.com/fact-n03-sinus.html>. (Modified: February 09, 1999).

46. *Acute and Chronic Sinusitis: What is Sinusitis?*, Health Fact Sheet, St. Luke's Episcopal Hospital, (09.02.1999) URL: <http://www.sleh.com/fact-n03-sinus.html>.
47. ROBERT, A., ve NATHAN, M.D., *Sinusitis, Healthline Magazine*, 2 (1), (1993). URL: <http://www.healthline.com/articles/a930ctoc.html>
48. BAYTOP, T., *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi*, p. 231. İstanbul Üniversitesi Yayınları No. 3255, İstanbul, 1984.
49. BAYTOP, T., *Türkiye'nin Tıbbi ve Zehirli Bitkileri*, p. 404-405. İstanbul Üniversitesi Yayınları No. 1039, İstanbul, 1963.
50. ATASU, E. ve CİHANGİR, V., *Ecballium Elaterium Bitkisinin Farmakognozide Yeri, Pharmacia JTPA*, 55 (3), 391-395 (1985).
51. ELAYAN, H.H., GHARAIBEH, M.N., ZMEILI, S.M. ve SALHAB, A.S., *Effects of Ecballium Elaterium Juice on Serum Bilirubin Concentration in Male Rats, International Journal of Crude Drug Research*, 27 (4), 227-234 (1989).
52. LAVIE, D. ve SZINAI, S., *The Constituents of Ecballium Elaterium L. II. α -Elaterin, Journal of American Chemical Society*, 80, 707-711 (1958).
53. LE-NGUYEN, D., NALIS, D. ve CASTRO, B., *Solid Phase Synthesis of a Tripsin Inhibitor Isolated from the Cucurbitaceae Ecballium Elaterium, International Journal of Peptide Protein Research*, 34, 492-497 (1989).
54. YEŞİLADA, E., HONDA, G., SEZİK, E., TABATA, M., FUJIDA, T., TANAKA, T., TAKEDA, Y. ve TAKAISHI, Y., *Traditional Medicine in Turkey. V. Folk Medicine in the Inner Taurus Mountains, Journal of Ethnopharmacology*, 46, 133-152 (1995).
55. FUJIDA, T., SEZİK, E., TABATA, M., YEŞİLADA, E., HONDA, G., TAKEDA, Y., TANAKA, T. ve TAKAISHI, Y., *Traditional Medicine in Turkey. VII. Folk Medicine in Middle and West Black Sea Regions, Economic Botany*, 49 (4), 406-422 (1995).
56. HONDA, G., YEŞİLADA, E., TABATA, M., SEZİK, E., FUJIDA, T., TAKEDA, Y., TAKAISHI, Y. ve TANAKA, T., *Traditional Medicine in Turkey. VI. Folk Medicine in West Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın Provinces, Journal of Ethnopharmacology*, 53, 75-87 (1996).
57. SEZİK, E., KAYA, S. ve AYDAN, N., *Ecballium Elaterium Meyvalarının Sinüzite Etkisi, IV. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiri Özetleri*, 33-36, Eskişehir, 1982.

58. BAR-NUN, N. ve MAYER, M.A., *Cucurbitacins Protect Cucumber Tissue Against Infection By Botrytis Cinerea*, *Phytochemistry*, **29** (8), 787-791 (1990).
59. BAYKUT, S., BİRAN, M. ve OKÇUOĞLU, N., *Some Investigations on the Properties of Ecballium Elaterium and its Constituents*, *Chimica Acta Turcica*, **7** (1), 57-85 (1979).
60. AKPOYRAZ, M., *Ecballium Elaterium Meyva Usaresinin Kimyasal Analizi*, *Ankara Tıp Mecmuası*, **35**, 695-700 (1982).
61. OSKUI, T.M., *Triterpenes of Brynoia Dioicanol Ecballium Elaterium*, Ph.D. Thesis, University of London, London, July, 1979.
62. DUNNİL, P.M. ve FOWDEN, L., *The Amino Acids of Seeds of the Cucurbitaceae*, *Phytochemistry*, **4**, 933-944 (1965).
63. GRAY, D.O. ve FOWDEN, L., *N-Ethyl-L-Asparagine: A New Amino-Acid Amide From Ecballium Elaterium*, *Nature*, February 4, No:4762, 400-401 (1961).
64. ENSLIN, P.R., JOUBERT. F.J. ve REHM, S., *Bitter Principles of the Cucurbitaceae. III. Elaterase, an Active Enzyme for the Hydrolysis of Bitter Principle Glycosides*, *Journal of Science, Food and Agriculture*, **7**, 646-655 (1956).
65. YEŞİLADA, E., TANAKA, S., SEZİK, E. ve TABATA, M., *Isolation of an Antiinflammatory Principle from the Fruit Juice of Ecballium Elaterium*, *Journal of Natural Products*, **51** (3), 504-508 (1988).
66. CİNGİ, İ., ERKUŞ, S., CİNGİ, E., BAŞER, H.C., KEÇİK, C. ve ÖNER, Ü., *Kronik Sinüzitlerde Ecballium Elaterium'un Etikilerinin Araştırılması*, *Anadolu Tıp Dergisi*, **5**, 123-136 (1983).
67. YEŞİLADA, E., TANAKA, S., TABATA, M. ve SEZİK, E., *Antiinflammatory Effects of the Fruit Juice of Ecballium Elaterium on Edemas in Mice*, *Phytotherapy Research*, **3** (2), 75-76 (1989).
68. YEŞİLADA, E., ÜSTÜN, O., SEZİK, E., TAKAISHI, Y., ONO, Y., ve HONDA, G., *Inhibitory Effects of Turkish Folk Remedies on Inflammatory Cytokines: Interleukin-1 α , Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor α* , *Journal of Ethnopharmacology*, **58**, 59-73 (1997).
69. AGİL, M.A., RISCO, S., MIRO, M., NAVARRO, M.C., OCETE, M.A. ve JIMENEZ, J., *Analgesic and Antipyretic Effects of Ecballium Elaterium (L.) A. Richard Extract in Rodents*, *Phytotherapy Research*, **9**, 135-138 (1995).

70. ELAYAN, H., SALHAB, A. ve GHARAIBEH, M., *Effect of The Crude Juice of Ecballium Elaterium (L.) A. Rich. On Bilirubin Level in the Main Bile Duct Ligated Rats, Pharmacologist*, **27(3)**, 286 (1985).
71. YEŞİLADA, E., *Saponozit ve Kukurbitasinler, VII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildirileri*, 101-113 (1988), Ankara.
72. BAŞARAN, A., ÇAKMAK, E.A., DEĞİRMENCİ, İ., GÜNEŞ, H.V., BAŞARAN, N., ARTAN, S. ve SOLAK, M., *The Effects of Aflatoxin B₁ and Ecballium Elaterium on Serum Enzyme Levels and some Urine Excreta in Rats, Fitoterapia*, **LXIII (6)**, 493-496 (1992).
73. SEZİK, E. ve YEŞİLADA, E., *Clinical Effects of The Fruit Juice of Ecballium Elaterium in the Treatment of Sinusitis, Clinical Toxicology*, **33 (4)**, 381-382 (1995).
74. GHARAIBEH, M., SALHAB, A., ELAYAN, H. ve AMR, S., *The Acute Toxicity of The Juice of The Plant Ecballium Elaterium (L.)A. Rich, Pharmacologist*, **27 (3)**, 156 (1985).
75. KHALIL, A.M., ve QAOUD, K.M., *Toxicity and Partial Characterization of Ecballium Elaterium Fruit Juice, International Journal of Pharmacognosy*, **31 (2)**, 135-141 (1993).
76. PORE, J., *Rheologie-Thixotropie in Emulsions, Microemulsions, Emulsions Multiples*, PORE, J. (ed.), p. 175-240. Tec&Doc Lavoisier, Paris, 1996.
77. BUDAVARI, S., *The Merck Index*, 11 th Ed., Merck & Co., Inc., New Jersey, 1989.
78. RYDEN, L. ve EDMAN, P., *Effect of Polymers and Microspheres on the Nasal Absorption of Insulin in Rats, International Journal of Pharmaceutics*, **83**, 1-10 (1992).
79. YAZAN, Y., ÖZER, A.Y., BOZAN, B. ve ÖZDEMİR, M., *Bioavailability of Verapamil Hydrochloride From Nasal Delivery Systems, In Vitro and Ex Vivo Test Systems to Rationalize Drug Design and Delivery*, European Symposium, Paris, 13-14 December (1993).
80. REYNOLDS, J.E.F., *Martindale The Extra Pharmacopoeia*, 29 th Ed., The p. 1433. Pharmaceutical Press, London, 1989.
81. Dehydag Cospha, Cospha Products, Henkel, p.44, 1984
82. NAE, H.N., *Introduction to Rheology in Rheological Properties of Cosmetics and Toileteries*, LABA, D. (ed.), p. 9-33. Marcel Dekker, Inc., New York, 1993.

83. ZUBER, M., *Controles pharmacotechniques in Formes Pharmaceutics Pour Application Locale*, SEILLER, M. ve MARTINI, M.-C. (ed.), p. 129-139. Tec&Doc Lavoisier, Paris, 1996.
84. *In Introduction to Rheology. IFSCC Monograph Number 3*, p. 1-12. Micelle Press, Dorset, 1997.
85. IDSON, B., *Rheology: Fundamental Concepts, Cosmetics & Toileteries*, **93**, 23-30 (1978).
86. CHENG, D.C.H., *Thixotropy, International Journal of Cosmetic Science*, **9**, 151-191 (1987).
87. YAMAMATO, T., MAITANI, Y., ISOWA, K. ve NAGAI, T., *Morphologic Examination of Rabbit Nasal Mucosa after the Nasal Administration of Insulin Peanut Oil Suspension and a Powder Dosage Form with Soybean-Derived Sterylglucoside*, *Biological&Pharmaceutical Bulletin*, **18 (6)**, 887-890 (1995).
88. CHANDLER, S.G., ILLUM, L. ve THOMAS, N.W., *Nasal Absorption in Rats. II. Effect of Enhancers on Insulin Absorption and Nasal Histology*, *International Journal of Pharmaceutics*, **76**, 61-70 (1991).
89. BECHGAARD, E., BINDSEIL, E., BAGGER, M. ve NIELSEN, H.W., *Reversibility and Clinic Relevance of Morphological Changes after Nasal Application of Ephedrine Nasal Drops 1%*, *International Journal of Pharmaceutics*, **152**, 67-73 (1997).
90. YAMAMATO, T., MAITANI, Y., ANDO, T., ISOWA, K., TAKAYAMA, K. ve NAGAI, T., *High Absorbancy and Subchronic Morphologic Effects on the Nasal Epithelium of a Nasal Insulin Powder Dosage Form with a Soybean-derived Sterylglucoside Mixture in Rabbits*, *Biological&Pharmaceutical Bulletin*, **21 (8)**, 866-870 (1998).
91. MERKUS, F.W.H.M., SCHIPPER, N.G.M., HERMENS, W.A.J.J., ROMEIJN, S.G. ve VERHOEF, J.C., *Absorption Enhancers in Nasal Drug Delivery*, *Abstract Book of Second European Symposium on Controlled Drug Delivery (Posters)*, p. 113-116. Noordwick Aan Zee, 1991.