

Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler ile Oral İnsülin Tedavisinde Son Gelişmeler: Sistematik Derleme

Recent Advances in Oral Insulin Therapy by Nanoparticulate Drug Delivery Systems: Systematic Review

^{id} Tuğçe TURAN^a, ^{id} N. Başaran MUTLU AĞARDAN^a

^aGazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji ABD, Ankara, Türkiye

ÖZET Diabetes mellitus, yüksek kan glukoz seviyeleri ile karakterize kronik, metabolik bir hastalıktır. Tedavisinde kullanılan en önemli molekül insülin dir. İnsülin, pankreasın Langerhans adacıklarının β hücreleri tarafından üretilen, kan glukoz seviyesini düzenleme etkisini monomerik formunun insülin reseptörüne bağlanmasıyla gösteren bir hormondur. İnsülinin vücutta subkütan yoldan verilmektedir fakat bu yol ile hasta uyuncu oldukça düşüktür. Ayrıca subkütan uygulama, enjeksiyon bölgesinde lipodistrofiye, alerjik reaksiyonlara ve enfeksiyona neden olmaktadır. İnsülin oral yol ile uygulandığında gastrointestinal (GI) kanalda proteolitik enzimler ile hızla parçalanmakta, yapısı dolayısıyla da düşük absorpsiyon göstermektedir. İnsülinin GI kanalda parçalanmasını önlemek ve oral biyoyararlanımını artırmak için birçok çalışma yapılmakta; bu çalışmalar nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Doğal (kitosan, aljinat, dekstran) veya sentetik (poli-laktik-ko glikolik asit, poli-laktik asit) polimerler ile hazırlanan nanopartiküllerin; çözünürlük artırma, modifiye salım sağlama, emilimi artırma ve oral biyoyararlanımı iyileştirme gibi pek çok faydası bulunmaktadır. İnsülin taşıyan bir nanopartiküler sistemin, insülini mide asidinden ve proteazlardan koruması, GI kanalda kalış süresini uzatması ve absorpsiyonunu artırması beklenir. Bu amaçla, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarına, insülinin bağırsak absorpsiyonunu artırmak için absorpsiyon artırıcılar, insülinin proteazlarla parçalanmasını engellemek için enzim inhibitörleri ilave edilebilir. Ayrıca insülinin midede parçalanmasını engellemek için enterik kaplama yapılabilmektedir. Bu derlemede diyabet hastalığı, insülin ve insülinin oral yoldan verilmesiyle ilgili kısaca genel bilgiler verilerek, insülin yüklü nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ile ilgili güncel literatür örneklerine odaklanılmıştır.

ABSTRACT Diabetes mellitus is a chronic, metabolic disease characterized by high blood glucose levels. The most important molecule used in its treatment is insulin. Insulin is a hormone produced by the β cells of the islets of Langerhans of the pancreas, which shows its blood glucose level regulation effect by binding its monomeric form to the insulin receptor. Insulin is applied subcutaneously, but patient compliance is very low by this route. In addition, subcutaneous administration causes lipodystrophy, allergic reactions and infection at the injection site. When insulin is administered orally, it is rapidly degraded by proteolytic enzymes in the gastrointestinal (GI) tract, and has low absorption due to its structure. Many studies are carried out to prevent the degradation of insulin in the GI tract and to increase its oral bioavailability; these studies focus on nanoparticulate drug delivery systems. Nanoparticles prepared with natural (chitosan, alginate, dextran) or synthetic (poly-lactic-co-glycolic acid, poly-lactic acid) polymers, have many benefits such as increasing solubility, providing modified release, increasing absorption and improving oral bioavailability. An insulin-encapsulated nanoparticulate system is expected to protect insulin from both harsh acidic conditions of stomach and degradation by proteases, prolong its residence time in the GI track and enhance its intestinal uptake. Nanoparticulate systems can also be formulated using penetration enhancers to increase intestinal penetration of insulin and enzyme inhibitors to inhibit the insulin degradation by proteases. Furthermore, enteric coating could be applied to prevent the breakdown of insulin in the stomach. In this review, brief general information about diabetes, insulin and oral administration of insulin is presented and recent literature about insulin loaded nanoparticulate drug delivery systems is focused on.

Anahtar Kelimeler: Diabetes mellitus; oral uygulama; ilaç taşıyıcı sistem; nanopartikül; insülin

Keywords: Diabetes mellitus; oral administration; drug delivery system; nanoparticle; insulin

DIABETES MELLİTUS

Diabetes mellitus (DM), pankreasın yeterli insülin üretememesi veya vücudun üretilen insülini verimli

kullanamaması nedeniyle artan kan glukoz seviyeleri ile karakterize, mikro ve makrovasküler komplikasyonlara yol açan kronik ve metabolik bir endokrin hastalığı olarak tanımlanmaktadır.¹⁻⁴ DM, Tip 1, Tip

Correspondence: N. Başaran MUTLU AĞARDAN

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji ABD, Ankara, Türkiye

E-mail: bmutlu@gazi.edu.tr

Peer review under responsibility of Journal of Literature Pharmacy Sciences.

Received: 08 Dec 2021

Received in revised form: 21 Mar 2022

Accepted: 03 Apr 2022

Available online: 14 Apr 2022

2630-5569 / Copyright © 2022 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



2 ve gebelik (gestasyonel) diyabeti olmak üzere temel olarak 3 grupta incelenmekle birlikte daha az görülen tipleri de bulunmaktadır. Pankreasın Langerhans adacıklarının insülin üreten β hücrelerinin otoimmün yıkımı nedeniyle oluşan Tip 1 DM'de insülin yetersizliğinden dolayı dışarıdan insülin uygulanması şarttır. İnsüline yanıt veren dokularda insülin direncine bağlı olarak gelişen ve Dünya Sağlık Örgütüne göre diyabetli kişilerin %95'ten fazlasını oluşturan Tip 2 DM'de diyet ve fiziksel aktivitenin artırılması ile yaşam tarzının değiştirilmesi gerekirken tedavide, alınan yanıtla göre tekli veya kombine olarak oral anti-diyabetikler kullanılmaktadır. Ayrıca tedaviden beklenen yanıtların alınmadığı durumlarda tedaviye subkütan insülin uygulaması eklenebilmekte ya da sadece insülin uygulaması ile tedavi sağlanabilmektedir.¹⁻¹² Zamanla insülin direnci gelişmesi veya insülin yetersizliği; dokularda hasara neden olarak böbrek yetersizliği, kardiyovasküler hastalık, ketoasidoz, sinir hasarı, alt uzuv ampütasyonu, retinopati ve nöropati gibi ciddi sorunlara neden olmaktadır. Bu gibi sorunların oluşumunu engellemek veya yavaşlatmak için tüm diyabet tiplerinin erken aşamada teşhis edilmesi ve uygun tedaviye başlanması gerekmektedir.^{4,7,9}

İNSÜLİN

İnsülin, pankreasın Langerhans adacıklarının β hücreleri tarafından üretilen, kan glukoz seviyelerini düzenlemesini monomerik formunun insülin reseptörüne bağlanmasıyla gösteren bir hormondur.^{2,9,13} 5,8 kDa molekül ağırlığına sahip insülin; 21 amino asitlik bir A zinciri ve 30 amino asitlik bir B zincirinin stabilizeyi sağlamak için 2 disülfid bağı ile bağlanmasıyla oluşmaktadır. Ayrıca A zinciri içerisinde de bir disülfid bağı bulunmaktadır.^{7,9}

İnsülin, karbonhidrat ve lipid metabolizmasını düzenlemenin yanı sıra protein yıkımını ve hepatic glukoneogenezi baskılamakta, böbreklerden sodyumun geri emilimini ve periferik dokularda potasyum alımını artırmaktadır.^{2,9} İnsülin, 1922 yılında Banting ve Best tarafından keşfinden günümüze kadar diyabetli kişilerde kan glukoz seviyelerini düşürmek için sıkça reçetelendirilmektedir. 1982 yılında dünyanın ilk rekombinant DNA ürünü olan Humulin (Eli Lilly

and Company, A.B.D.) (insan insülini) onaylanmış, 1996 yılında ise ilk ticari insülin analogu olan insülin lispro geliştirilmiştir.^{7,14,15}

İnsülin preparatları sırasıyla saflaştırılmış hayvan insülinlerinden, insan insülinlerinden daha sonra ise insülin analoglarından geliştirilmiştir. Her gelişme, "istenilen niteliğe" ulaşmak için bir öncekinden daha başarılı olmuştur. İnsülin analoglarının geliştirilmesindeki temel amaç; β hücrelerinde üretilen insülini daha iyi taklit eden insülin formülasyonları geliştirerek, hipergliseminin önlenmesini ve hastanın daha düşük HbA1c seviyelerine ulaşmasını sağlamaktır. İnsülin analogları; glisemik profilleri iyileştirmek, daha düşük hipoglisemi riski yaratmak ve bunlara bağlı olarak yaşam kalitesini artırmak gibi pek çok üstünlüğe sahip olmalarına rağmen maliyetlerinin yüksek olması başlıca sakıncalarındandır.¹⁴

İnsülin replasman tedavisi bolus, bazal ve hazır karışım insülin analogları kullanılarak yapılmaktadır. Bolus insülin analogları, hızlı etkili insülin analogları (insülin glulisin, insülin aspart, insülin lispro) ve kısa etkili insülin analogları (regüler insan insülini) olarak 2'ye ayrılmakta ve yemek sırasında kan glukozu seviyelerini düzenlemek amacıyla kullanılmaktadırlar. Bolus insülin analogları egzersiz sonrası hipoglisemi riskini azaltmakta oldukça başarılı olmalarına rağmen dozlama sıklıklarının fazla olması kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Tokluk kan glukoz seviyelerini düzenleyen bazal insülin analogları, orta etkili insülin analogları (nötral protamin insülin) ve uzun etkili insülin analogları (insülin glarjin, insülin detemir, insülin degludek) olarak incelenmekte ve hastaya dozlama esnekliği sunarken enjekte edilen insülinin farmakokinetik özelliklerini değiştirmektedir. Hazır karışım insülin analoglarının (kısa ve orta etkili insülin analogu karışımı) ise günlük dozlama sıklığı azken hazırlanmaları zordur.¹⁶

ORAL İNSÜLİN UYGULAMASI

İnsülinin subkütan yola alternatif olarak oral, pulmoner, bukkal, transdermal, nazal, rektal ve oküler yollar ile vücuda verilmesine yönelik pek çok çalışma yapılmıştır.¹⁷ İnsülin diğer yollarla vücuda verildiğinde düşük biyoyararlanım gösterdiğinden dolayı subkütan yol ile vücuda verilmektedir. Fakat sık ve uzun süreli subkütan insülin uygulaması; enjeksiyon

yerinde enfeksiyona, lipodistrofiye, alerjik reaksiyonlara, kilo artışına, hiperinsülinemiye ve hipoglisemiye neden olmaktadır.^{9,18,19} Bu problemlere ek olarak hastanın ömür boyu, günde birkaç kez enjeksiyon yapmasının zahmetli olması, bu durumun hastayı strese sokması nedeniyle subkütan insülin uygulamasının hasta uyuncu oldukça düşüktür.^{1,5} İnsülinin oral yoldan verilmesi, hastaya kolaylık sağlanması, ağrı oluşturmaması, uygun glukoz homeostazı sağlanması ve hem kısa hem de uzun vadeli tedavide iyi hasta uyuncu oluşturması nedeniyle tercih edilmektedir.^{20,21} Ayrıca oral insülin uygulamasının, pankreastan salgılanan endojen insülinin yolağını taklit etmede subkütan yola göre daha üstün olduğu bildirilmiştir.²² Ancak insülin gibi terapötik proteinlerin fiziksel dayanıklılıkları; asidik pH, yüksek sıcaklık, organik kimyasal, iyon ve çözücü ortamı gibi pek çok parametreden etkilenerek yapısal değişikliğe uğramaları nedeniyle düşüktür. Terapötik proteinler oral yoldan vücuda verildiğinde gastrointestinal (Gİ) kanalda gastrik pH ve proteolitik enzimler tarafından degradasyona uğramaları, yüksek molekül ağırlıkları ve hidrofilik yapıları nedeniyle emilimlerinin düşük olması, yetersiz oral biyoyararlanım dolayısıyla da yetersiz terapötik etkinlik ile sonuçlanmaktadır.^{2,21,23} İnsülin çözeltisinin oral biyoyararlanımının %1'den az olduğu bilinmektedir.²⁴

İnsülin oral yoldan verildiğinde karşılaştığı engeller 3 ana başlıkta incelenmektedir.⁹

Fiziksel Engeller

Oral yoldan verilen insülin, kan dolaşımına ulaşmadan önce mide ve sonra yüksek emilim yüzeyine sahip ince bağırsağa ulaşır. Erişkin insanlarda 250 m²lik bir emilim yüzeyi oluşturan, Gİ kanal yüzeyini kaplayan intestinal epitelyum; besinlerinin emilimini sağlayan enterositler, bağırsağın emici yüzeyini artıran mikrovilluslar, goblet hücreleri, Paneth hücreleri, bağırsak epitelinin fiziksel bütünlüğünü sağlayan sıkı bağlantılardan oluşmaktadır.^{17,21} Bağırsak epitelyumu insülin gibi yüksek molekül ağırlığına ve hidrofilik özelliğe sahip moleküllerin geçişine izin vermemektedir.⁹ Bunun yanı sıra goblet hücreleri, epitelyumu koruyan ve örten mukus tabakasını üretmektedir. Mukus tabakası; müsinler, enzimler, immünglobulinler ve inorganik tuzlar içeren negatif yüklü viskoz

bir karışımdır. İnsülin gibi yüksek molekül ağırlığına ve düşük geçirgenliğe sahip moleküller ile pozitif yüklü hidrofobik yüzey özelliğine sahip molekülleri hapsetmektedir. Nötral ve hidrofilik yüzeye sahip nanopartiküller mukus geçirgenliği açısından ideal görülmektedir.²¹

Kimyasal Engeller

Gİ sistem, geniş bir pH aralığına sahiptir. İnsülin molekülünün Gİ sistem boyunca pH değişikliklerine karşı dayanıklı kalması, yapısını koruması ve biyolojik aktivitesini kaybetmemesi gerekmektedir.⁹ İnsülinin izoelektrik noktası 5,3-5,4'tür ve insülin dâhil çoğu protein nötr pH'de stabil kalmaktadır.¹⁷ İnsülin, 5'in altındaki ve 8'in üzerindeki pH değerlerinde, hızlı bir şekilde degrade olur. Asit pH'de, kalıntı A21'de deamidasyon ve kovalent insülin dimerizasyonu baskın iken alkali ortamda kovalent polimerizasyona ve A- ve B-zincirlerinin oluşumuna yol açan disülfid reaksiyonları hâkimdir.²⁵

Enzimatik Engeller

Midede pepsin, ince bağırsakta ise tripsin, kimotripsin ve elastaz gibi enzimler protein yapısındaki molekülleri amino asitlere parçalayarak; insülin gibi protein yapıdaki maddelerin Gİ kanaldan geçişinde enzimatik bir bariyer oluşturmaktadır. Ayrıca bu engelleri geçebilen az bir miktarda insülin ise karaciğerde ilk geçiş etkisine uğrayıp karaciğer enzimleri tarafından parçalanabilmektedir.²⁶

İnsülinin oral biyoyararlanımını iyileştirmek ve buna bağlı olarak yeterli terapötik etkinin sağlanması amacıyla; enterik kaplama, formülasyona enzim inhibitörü ve/veya absorpsiyon artırıcıların eklenmesi, insülinin nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlere yüklenmesi gibi stratejiler benimsenmektedir.¹

İNSÜLİNİN ORAL YOLDAN VERİLMESİYLE İLGİLİ YAKLAŞIMLAR

ENTERİK KAPLAMA

Enterik kaplama, oral farmasötik dozaj formlarının geliştirilmesinde yaygın olarak yararlanılan bir stratejidir. Enterik kaplamanın temel amacı, etkin maddenin asidik pH'sinden ve enzimatik degradasyondan korumak ve bazı ilaçların istenme-

yen etkilerinden midenin korunmasıdır.²⁷ Bu yaklaşımda, yaygın olarak metakrilik asit ve selüloz türevi polimerlerden (hidroksipropil metil selüloz ftalat) yararlanılmaktadır. Enterik kaplama, insülin-yüklü nanopartikülleri midenin asidik ortamından korumakta, emilim bölgesi olan ince bağırsakta açılarak insülinin salımını ve böylece insülinin biyoyararlanımının artmasını sağlayabilmektedir.¹ Enterik kaplama bir etkin maddenin emilimini iyileştirebiliyorken, mide boşalması gibi süreçlerdeki bireyler arası değişiklikler nedeniyle emilim sürecini değiştirerek etkin maddenin farmakokinetik davranışını ve farmakolojik yanıtın ortaya çıkışını da etkileyebilmektedir. Ek olarak, enterik kaplama ile meydana gelebilen gecikmiş bağırsak emilimi; azalmış biyoyararlanıma, gecikmiş terapötik yanıtı veya terapötik yanıtın oluşmamasına da neden olabilmektedir.²⁷

Li ve ark., insülin-soya fosfatidilkolin kompleksi yüklü kendiliğinden nanoemülsifiye olan (kendinden mikroemülsifiye edici ilaç dağıtım sistemi) bir formülasyon geliştirmiş ve geliştirdikleri formülasyonu enterik kaplı (Eudragit L100, Evonik, Almanya) kapsüllere doldurarak etkinliğini karşılaştırmalı olarak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla değerlendirmişlerdir. *İn vitro* salım çalışmalarında, Eudragit L100 kaplı kendinden mikroemülsifiye edici ilaç dağıtım sistemi içeren kapsüller ile midenin asidik ortamında ani insülin salımının önlediği, yapay bağırsak ortamında ise kontrollü salım sağlandığı ifade edilmiştir. *İn vivo* çalışmalar sonucunda, oral uygulanan insülin çözeltisi ile kıyaslandığında geliştirilen formülasyon ile iyileştirilmiş biyoyararlanım ve uzun süreli hipoglisemik etki elde edilmiştir.²⁸

Başka bir çalışmada ise enzim inhibitörü (sodyum glikokolat) ve absorpsiyon artırıcı (kitosan) içeren enterik (selüloz asetat hidrojen ftalat) kaplı insülin tablet formülasyonu geliştirilmiştir. Kaplama prosesi 3, 5 ve 8 tabaka hâlinde yapılarak değerlendirilmiştir. *İn vitro* salım çalışmalarında asidik pH'de enterik kaplamanın 5 ve 8 tabaka hâlinde yapıldığı tabletlerin 3,5 saat süresince insülinin %85'ini koruduğu, 3 katlı tabakanın ise insülin salımını engellemediği ve insülinin %70'inin salımını sağladığı görülmüştür. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılan salım çalışmalarında, 5 kat enterik kaplı ve enterik kaplı olmayan tablet formülasyonları kıyaslanmış,

2 formülasyonun da 2 saatte insülinin %80'inin salımını sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca iskelet kası hücrelerinde en çok görülen insülin taşıyıcılarından olan Glut-4 translokasyonu incelendiğinde, enterik kaplı tabletlerin Glut-4 translokasyonunu %60 artırırken, plasebo ve kaplı olmayan tabletlerde artış izlenmediği sonucuna varılmıştır.²⁹

ENZİM İNHİBİTÖRLERİ KULLANIMI

Midedeki sindirim enzimleri tarafından kolaylıkla inaktive edilen protein yapısındaki insülini bu istenmeyen durumdan korumak için formülasyona söz konusu enzimleri inaktive eden proteaz inhibitörleri ilave edilmektedir.¹ Ovomukoid, leupeptin ve sodyum kolat enzim inhibitörü olarak insülinin parçalanmasını önlemek amacıyla kullanılmaktadır.³⁰ Ancak enzim inhibitörlerinin sistemik toksisiteye neden olabilmesi ve gıdalardaki proteinlerin de sindirimini bozabilmeleri kullanımlarını sınırlandırmaktadır.³¹

Krauland ve ark., kitosanın mukoadesif ve absorpsiyon artırıcı özelliğini artırmak amacıyla tiyol-lenmiş türevini [kitosan-4-tiyobutilamid (TBA) konjugatı] sentezlemişler, sentezledikleri polimere Bowman-Birk inhibitör ve elastatinali kovalent bağlayarak enzim inhibisyonu sağlamayı amaçlamışlardır. Sentezlenen kitosan-TBA ile hazırlanan insülin içeren tabletler direkt basım ile basılmış, Eudragit L 100-55 (Röhm, Almanya) ile kaplanmıştır. Çalışmada geliştirilen tabletler modifiye edilmemiş kitosan ve insülin içeren, Eudragit L 100-55 kaplı tabletler ile kıyaslanmıştır. Mukoadesyon çalışmalarında kitosan-TBA tabletlerinin 168 saat boyunca adezyon sağladığı, modifiye edilmemiş kitosan ile hazırlanan kontrol tabletlerinin ise 2,7 saat sonunda mukozadan ayrıldığı gözlenmiştir. Kitosan-TBA tabletlerinin, kitosan tabletlerine göre 3 kat fazla farmakolojik etki gösterdiği, ayrıca daha iyi farmakokinetik profil elde edildiği bildirilmiştir.³²

Bir diğer çalışmada ise intestinal epiteldeki sıkı bağlantıları açarak ve intestinal metaloproteazları yapılarındaki metal iyonlarını şelatlayarak inhibe eden dietilen triamin pentaasetik asit (DTPA) ve anyonik bir peptid olan poli(γ -glutamik-asit) (γ -PGA) ile konjuge edilerek kitosan nanopartikül hazırlanmasında kullanılmıştır. *İn vivo* çalışmalarda sıçanlardan taze

izole edilmiş proksimal bağırsak kullanılarak DTPA, γ PGA ve DTPA- γ PGA enzim inhibisyonu aktiviteleri serbest insülinle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Serbest insülin, mukus tabakasındaki proteolitik enzimler tarafından hızla bozunmuştur (2 saat içinde yaklaşık %90 bozunma, $p < 0,05$). Bununla birlikte, formülasyona DTPA veya γ PGA-DTPA eklenmesi, bağırsak proteazlarına karşı önemli bir koruyucu etki göstermiştir. Caco-2 hücreleriyle yapılan çalışmada; hücrelerin transepitelial rezistans (TEER) değerleri ölçülerek, DTPA ve γ PGA-DTPA'nın sıkı bağlantıları açma üzerine oldukça etkili olduğu, γ PGA'nın ise tek başına etki göstermediği gözlenmiştir. Ratlara formülasyonların oral yolla uygulanmasıyla gerçekleştirilen biyodağılım çalışmasında, CS/ γ PGA-DTPA nanopartikülleri tüm ince bağırsak boyunca insülin emilimini önemli ölçüde artırmış ve uzun süreli hipoglisemik etki sağlamıştır.³³

ABSORPSİYON ARTIRICILARIN KULLANIMI

İnsülinin GI sistemdeki emilimi; hücreler arası sıkı bağlantıları açarak ve/veya membran fosfolipidlerinin yapısını bozarak bağırsak geçirgenliğini artıran yardımcı maddeler ile iyileştirilmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla en yaygın olarak safra tuzları, yağ asitleri, yüzey etkin maddeler ve Ca^{+2} iyonu ile şelat yapıcı maddeler kullanılmaktadır. Sodyum kaprat gibi yağ asitleri, sıkı bağlantıları geçici olarak açarak, şelatlayıcı maddeler Ca^{+2} iyonları ile kompleksler oluşturup sıkı bağlantıları bozarak ve sürfaktanlar ise membran fosfolipidleri ile etkileşerek (transselüler taşımam açısından) insülin geçirgenliğini ve dolayısıyla insülinin emilimini artırmaktadır. Fakat protein yapıları maddelerin hücre içine alınmasını kolaylaştıran bu maddeler, membran yapısına zarar verebilmekte ve GI sistem enfeksiyonları riskinde artışa neden olabilmektedir. Bu yaklaşımı değerlendirirken uzun vadeli toksisite de göz önüne alınmalıdır.^{1,10}

Yapılan bir çalışmada, absorpsiyon artırıcı olarak Capryol 90 (Gattefossé, Fransa), benzer yağ asidi içeriği olan pek çok yardımcı madde [Labrasol® (Gattefossé, Fransa), Lauroglycol 90 (Gattefossé, Fransa), Labrafil M (Gattefossé, Fransa) vb.] kullanarak insülinin bağırsaktan emilimin artırılması amaçlanmıştır. Belirlenen miktarlarda insülin, 0,01 M HCl içinde çözülmüş, ardından pH 7,4 fosfat tamponunda absorp-

siyon artırıcılarla (%10 h/h) karıştırılarak sıçanların bağırsaklarına direkt uygulanmıştır. Çalışma sonuçları Capryol 90'ın en etkili absorpsiyon artırıcı olduğunu ortaya koymuştur. Capryol 90 %0,25 h/h derişimde kullanıldığında TEER değerlerinde anlamlı azalma, intestinal permeabilitede ise yüksek artış sağlamıştır. Laktat dehidrogenaz seviyeleri incelenmiş ve sitotoksosite izlenmemiştir. Sonuçlar Capryol 90'ın özellikle asidik koşullarda paraselüler bir mekanizma ile sıkı bağlantıların gevşemesine ve dolayısıyla insülin emilimini iyileştirmesine, bunu yaparken de bağırsakta ciddi bir hasara neden olmadığını göstermiştir.³⁴

Başka bir çalışmada ise absorpsiyon artırıcı olan sodyum kaprata göre daha güvenli olarak önerilen propilen glikol kaprilatın absorpsiyon artırıcı etkisi incelenmiştir. Sonuçlar propilen glikol kaprilatın, membran akışkanlığını artırdığını ve sıkı bağlantı proteini olan klaudin 4'ün ekspresyonunu azaltarak sıkı bağlantıları açabildiğini böylece hem transselüler hem de paraselüler insülin emilimini iyileştirdiğini göstermiştir.³⁵

NANOPARTİKÜLER İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER

Nanopartiküller; küçük boyutları ve geniş yüzey alanları sayesinde çözünürlüğü artırma, biyoyararlanımı iyileştirme, değiştirilmiş salım sağlama ve yan etkileri azaltma gibi pek çok faydaya sahiptir. Nanopartiküller sentetik [poli-laktik-ko glikolik asit (PLGA), poli-laktik asit (PLA)] ve doğal (kitosan, aljinat, jelatin) polimerler ile hazırlanabilmektedir.³⁶ Doğal polimerler ile hazırlanan nanopartiküller daha biyoyumlu ve güvenli olmaları, hem depolama hem de fizyolojik dayanıklılıklarının iyi olması nedeniyle insülinin oral yoldan verilmesi için oldukça önem taşımaktadırlar.²⁰

Polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin şu özellikleri taşınması beklenir:^{37,38}

- Nanopartiküllerin boyutu, şekli ve dağılımı istenen duruma uygun olmalı,
- Etkin madde yükleme etkinliği yüksek olmalı,
- Amaca uygun değiştirilmiş etkin madde salımı sağlamalı,
- Etkin maddeleri enkapsüle edebilmeli ve sindirim sistemi enzimlerinden koruyabilmeli,

- Etkin maddelerin GI sistemden emiliminde artış sağlamalı,
- Toksik olmamalı,
- Biyolojik olarak parçalanabilir olmalıdır.

Polimerik nanopartiküllerin sitotoksik özelliklerinin partikül boyutu, partikül şekli, yüzey yükü ve kararlılık gibi çeşitli parametrelere bağlı olduğu bilinmektedir.¹ Ayrıca polimerik nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemlerin düşük oral biyoyararlanıma sahip olabilmeleri ve insülin emiliminde bireysel farklılıkların fazla olması bu sistemlerin kullanımını sınırlandırmaktadır.⁵

Kitosan Nanopartikülleri

Kitosan, bazı böcek ve deniz canlılarının kabuklarında bulunan kitinin deasetilasyonu sonucunda elde edilen, ana bileşenleri glukozamin ve N-asetil glukozamin olan doğal polimerik bir polisakkariddir. Biyoyumlu ve mukoadezif olması, toksik olmaması, biyolojik olarak parçalanabilmesi ve geçirgenliği artırıcı özellikleri sayesinde oldukça fazla tercih edilmektedir. Kitosanın fizikokimyasal özellikleri deasetilasyon derecesine, molekül ağırlığına ve pH'ye bağlı olarak değişmektedir.^{9,39} Kitosan ve polianyonlar sulu ortamda, organik çözücü ve ısıya gerek duyulmaksızın etkileştiğinde nanopartiküller kendiliğinden oluşmaktadır. İyonik jelleşme adı verilen bu yöntemde nanopartiküller sistemin kendiliğinden oluşması, organik çözücü ve ısıya gerek duyulmaması, hazırlama koşullarına/kullanılan organik çözücülere bağlı olarak ortaya çıkabilecek sitotoksikite ve/veya insülinin parçalanma ihtimalini azaltması insülin-kitosan nanopartiküllerinin hazırlanmasında yaygın olarak tercih edilmesinin başlıca sebepleridir. Bu yöntemde nanopartiküller, genellikle kitosanın, tripolifosfat, lesitin ve PGA gibi anyonik polielektrolitlerle çapraz bağlanması ile hazırlanmaktadır.^{21,30} Pozitif yüklü kitosan ile müsin içerisindeki negatif yüklü siyalik asitin etkileşimiyle oluşan mukoadezif özellik sayesinde kitosan, hazırlanan nanopartiküller sistemin bağırsakta kalma süresini artırmaktadır. Caco-2 hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, kitosanın sıkı bağlantıların yapısında bulunan bir protein olan CLDN4'ün yapısındaki değişiklikleri indükleyerek sıkı bağlantıların açılmasına ve dolayısıyla parasetolün geçirgenliğinin artışına katkıda bulunduğu bildirilmiştir.⁴⁰

Song ve ark. yaptıkları çalışmada, siklodekstrin türevlerinin üstünlüklerinden yararlanmak amacıyla insülini yüksek verimle enkapsüle edebilen ve pH-duyarlı insülin-yüklü karboksimetil- β -siklodekstrin-kitosan nanopartikülleri hazırlamışlardır. Yapay mide ortamında nanopartiküllere yüklenen insülinin %40'ı salınırken, pH 7,4'te 6 saat boyunca salım gözlenmiştir. Caco-2 hücreleriyle yapılan floresan görüntüleme çalışmaları nanopartiküllerin sıkı bağlantıları geri dönüşlü olarak açtığını gösterirken, farelerin karaciğer enzim aktiviteleri incelenerek yapılan karaciğer fonksiyon testleri nanopartiküllerin toksisiteye neden olmadığını göstermiştir. Diyabetik farelere nanopartiküllerin oral yolla verilmesi ile kan glukoz seviyelerinde düşüş gözlenmiş ve kademeli olarak artan hipoglisemik etki ile 12 saat sonra kan glukoz seviyeleri başlangıç seviyelerinin %51,22'sine düşmüş, ayrıca serum insülin konsantrasyonu da eş zamanlı olarak en yüksek değere ulaşmıştır.⁴¹

Başka bir çalışmada ise folat-kitosan konjugatı kullanılarak, partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli değerleri sırasıyla $288 \pm 5,11$ nm ve $+21,90 \pm 1,69$ mV olan nanopartiküller iyonik jelleşme yöntemi ile hazırlanmıştır. Folat-kitosan konjugatı, yapısında bulunan karboksilik asit gruplarından dolayı negatif yüklü olduğundan, bağırsakta bulunan proteolitik enzimler için temel bir yardımcı faktör olan kalsiyum gibi katyonları şelatlama yeteneğinin yüksek olacağı, böylece insülinin parçalanmasını engelleyebileceği düşünülmüştür. Yapay mide ortamında, düşük insülin salımı gözlenmiş ve bu durum asidik pH'de folatın karboksilik gruplarının protonlanarak hidrojen bağı oluşturma eğiliminde olduğu şeklinde açıklanmıştır. Yapay bağırsak ortamında ise folat konjugasyonunun bağırsakta folat reseptörlerinin fazlaca bulunması nedeniyle endositozu teşvik ettiği ifade edilmiştir. Ayrıca folat-kitosan yapısının yüksek kalsiyum bağlama kapasitesi nedeniyle hücrel yüzey proteinlerini bozarak ve protein kinaz aktivitesini tetikleyerek sıkı bağlantıları açabildiği bildirilmiştir. Pepsin, tripsin ve kimotripsin varlığında yapılan çalışmalarda nanopartiküllerin insülini %85 oranında koruduğu; aynı şartlardaki insülin çözeltisinin ise %80'inin bozunduğu gözlenmiştir.⁴²

Sudhakar ve ark., kitosan ve pentaeritritol tetra-kis kullanarak asidik koşullar altında schiff bazı olu-

şumu reaksiyonunu da içeren reaksiyonlar ile insülin-yüklü tiyollenmiş kitosan nanopartiküllerini sentezlenmiştir. Çalışmada tiyomerlerin, mukus glikoproteinlerinin sistein açısından zengin bölgelerinde güçlü disülfid bağı oluşumu yoluyla daha iyi mukoadezif özelliklere sahip olması gerekçesiyle tiyollenmiş kitosan kullanılmıştır. Nanopartiküllerin protein tirozin fosfatazın inhibisyonu yoluyla sıkı bağlantıların açılmasını desteklediği ve ayrıca karaciğer, pankreas ve böbreklerde patolojik değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir. Oral yoldan uygulanan nanopartiküllerin kan glukoz seviyelerinde sürekli ve uzun süreli düşüşe, plazma insülin seviyelerinde ise artışa neden olduğu bildirilmiştir.⁴³

Cheng ve ark. da insülinin oral yoldan etkinliğini iyileştirmek adına bağırsak hücrelerine hedeflendirilen, mukoadezif bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirmek amacıyla insülin yüklü poli(n-bütilsiyanoakrilat) nanopartiküllerini, pozitif yüklü folik asit-CS kopolimeri ve negatif yüklü hyaluronik asit ile kaplamış virüs taklit eden çekirdek-kabuk yapısında nanopartiküller geliştirmişlerdir. Bu yaklaşımla geliştirilen dayanıklılığı yüksek nanopartiküllerin mukus tabakasına absorpsiyonunda artış gözlenirken, çalışmada folik asit miktarının bağırsak geçirgenliğinde ve hipoglisemik etkide değişikliğe neden olabileceği ifade edilmiştir. Araştırmacılar bu nanopartiküllerin geliştirilmiş insülin absorpsiyonu sağladığına işaret ederken aktif ligand olarak kullanılan folik asidin modifikasyon oranının optimizasyona ihtiyacı olduğunu vurgulamışlardır.⁴⁴

Fan ve ark. ise safra asidi yolunu kullanarak bağırsaktaki engelleri aşabilmek için deoksikolik asit ile modifiye edilmiş, insülin-yüklü kitosan nanopartiküllerini geliştirmişlerdir. Nanopartiküller diyabetik sıçanlara oral yoldan verilmek amacıyla enterik kaplı kapsüllere yüklenmiş ve Caco-2 hücrelerinde yapılan çalışmalar bu nanopartiküller sistemin iyi mukus penetrasyonu sağlayabileceğini ve bağırsak epitelindeki engelleri aşabileceğini doğrulamıştır.⁴⁵

Aljinat Nanopartikülleri

Aljinat, β -D mannuronik asit ve α -L guluronik asidin birleşmesiyle oluşan mukoadezif, biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen bir polisakkariddir. Al-

jinatın etkin madde yükleme kapasitesi düşük olduğundan, bu istenilmeyen özelliği kitosan, dekstran sülfat, pektin ve metil selüloz gibi polimerler ile birlikte kullanılarak giderilmeye çalışılmıştır.^{30,46}

Chen ve ark.nın yaptığı çalışmada, insülini enzimatik yıkımdan korumak, insülinin oral yoldan etkinliğini iyileştirmek ve artmış biyoaktivite sağlamak amacıyla Cp1-11 peptid/insülin kompleksi yüklü pH-duyarlı kitosan-aljinat nanopartikülleri geliştirilmiştir. Çalışmada Cp1-11 peptidi, insülin ve Cp1-11 peptidi arasında insülinin agregasyonunu engelleyebilecek ve biyoaktivitesini iyileştirebilecek supramoleküler etkileşimin varlığından dolayı seçilmiştir. *İn vitro* salım çalışmaları, pH-duyarlı insülin/Cp1-11 yüklü nanopartiküllerin insülini yapay mide ortamında ilk 2 saatte sadece %4,58'ini salarak koruduğunu göstermiştir. Yapay mide ortamında, aljinat-kitosan çözünmeyerek sıkıca bir araya toplanma eğiliminde olup kapalı jel sistemi oluşturduğu ifade edilmiştir. Bu nedenle pozitif yüklü kitosan kabuğunun, aljinat çekirdeğinin sıkı ağı ile birleştiğinde insülinin salımını zorlaştırıp, insülini midenin asidik pH'sinden koruduğu düşünülmüştür. Yapay bağırsak ortamında ise nanopartiküller insülin salımını kolaylaştıracak gözenekli bir yapı oluşturmuş ve insülinin yaklaşık %63,5'inin salımı sağlanarak sürekli ve uzun süreli salım profili elde edilmiştir. *İn vivo* çalışmalar, nanopartiküllerin oral yolla verildikten 2 saat sonra kan glukoz seviyelerini başlangıç seviyesinin yaklaşık %55,1'ine düşürdüğünü ve 8 saat boyunca başlangıç seviyesinin yaklaşık %60'ı olarak kaldığını göstermiştir.⁴⁷

Başka bir çalışmada ise aljinatın pH-duyarlı olması ve etkin maddeleri midede enzimatik bozunmadan koruyabilmesi nedeniyle 100-200 nm partikül boyutuna ve yaklaşık %85 enkapsülasyon etkinliğine sahip pH-duyarlı kitosan-aljinat çekirdek-kabuk nanopartikülleri hazırlanmıştır. Yapılan *in vitro* salım çalışmalarında nanopartiküllerin yapay mide ortamında enkapsüle edilen insülinin neredeyse hepsini koruduğu, yapay bağırsak ortamında ise sürekli salım profili gösterdiği görülmüş ve böylece ilaç taşıyıcı sistemin pH'ye duyarlılığı kanıtlanmıştır. *İn vivo* çalışmalarda belirgin hipoglisemik etki gözlenmiş ve akut toksisite çalışmaları ile nanopartiküllerin güvenli olduğunu gösterilerek geliştirilen nanoparti-

küllerin oral uygulama için uygun olduğu bildirilmiştir.⁴⁸

İnsülin emilimini artırmak amacıyla hücrelere nüfuz eden bir peptid [cell penetrating peptide (CPP)] olan oktaarjinin ile modifiye edilmiş insülin-yüklü aljinat nanopartikülleri hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin; insülin emilimini, bağırsak geçirgenliğini ve villuslardan alımını artırdığı kanıtlanmış ve insülin emilimini desteklediği daha önce bildirilen endojen bir sinyal molekülü olan nitrik oksidin üretimini destekleyebileceğini gösterilmiştir. Araştırmacılar, nitrik oksidin insülin emilimini nasıl artırdığı hakkında daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyduğunu vurgulamıştır. Ek olarak, *in vivo* çalışmalarda nanopartiküllerin sıçanlarda glisemik düşüş sağlaması ve sitotoksisite çalışmalarında güvenli bulunmaları, nanopartiküllerin oral uygulama için uygun olabileceğini göstermiştir.⁴⁹

Dekstran Nanopartikülleri

Dekstran, α -D-glukoz moleküllerinin birbirlerine glikozidik bağları ile bağlanmasıyla oluşan toksik olmayan, suda iyi çözünen bir polisakarittir.^{30,46}

Yapılan bir çalışmada, Chalasani ve ark. tarafından dekstran nanopartikülleri hazırlanmış ve spesifik hedeflendirme ligandı olan B₁₂ vitamini ile konjuge edilmiştir. Bu nanopartiküller insülini proteazlara karşı korurken, *in vivo* çalışmalarda ise 20 IU/kg dozun oral yoldan verilmesi ile kan glukoz seviyelerini %70-75 oranında düşürdüğü ve bu hipoglisemik etkinin ise 54 saat kadar sürdüğü gözlenmiştir. B₁₂ vitamini konjuge edilen dekstran nanopartiküllerin biyoyararlanımlarının sadece dekstran ile hazırlanan nanopartiküllerden önemli ölçüde daha yüksek, subkütan insülin enjeksiyonu yapılan gruba kıyasla ise %29,4 daha yüksek olduğu bildirilmiştir.⁵⁰

Woitiski ve ark.nın yaptıkları çalışmada, aljinat ve dekstran sülfatın kalsiyum etrafında çekirdeklenmesi ve poloksamere bağlanması ile 396 nm çapında nanopartiküller hazırlanmış, hazırlanan bu nanopartiküller kitosan ile stabilize edilerek albumin ile kaplanmıştır. Çok katmanlı nanopartiküllerin oluşumu; aljinat ve dekstran sülfata kalsiyum iyonlarının eklenmesiyle iyonik jelleşmenin sağlanmasını, poloksamer varlığında koloidal dispersiyon oluşumunu

ayrıca kitosan ve albumin ile polielektrolit kompleksi oluşumunu içermektedir. Polielektrolitlerin kompleksleşmesi insülini enkapsüle etmek, proteolitik bozulmaya karşı korumak ve bağırsak geçirgenliğini kolaylaştırmak amaçlarıyla tercih edilmiş, kalsiyum çapraz bağlı aljinat ve dekstran sülfat ağı, insülini midenin asidik ortamından koruyacağı düşünülmüştür. Albumin kaplamanın ise insülini proteolitik enzimlerden koruyarak insülin stabilitesini ve dolayısıyla insülin emilimini artıracığı öngörülmüştür. Poloksamer eklenerek stabilitenin artırılmaya çalışılması ise bu çalışmanın yeniliği olmuştur. Sonuç olarak hazırlanan nanopartiküller insülini enzimatik bozunmadan korumuş ve insülinin bağırsaktan geçişini kolaylaştırmıştır. Nanopartiküller diyabetik sıçanlara oral yoldan verildiğinde, 24 saat boyunca hipoglisemik etki sağlamış ve plazma glukoz seviyelerini başlangıç seviyelerinin %40'ına kadar düşürdüğü gözlenmiştir.⁵¹

Jamwal ve ark., glukoz oksidazın akrilasyonu, oksidasyonu ve immobilizasyonu yoluyla oluşan uyarıcı duyarlı dekstran nanopartiküllerini sentezlemiştir. Glukoza duyarlı bu sistem yapay bağırsak sıvısında 4 mg/mL glukoz varlığında yaklaşık %90'a varan insülin salımı gerçekleştirmiştir.⁵²

Bao ve ark. ise insülinin oral emilimini ve hipoglisemik etkisini artırmak için insülin ve kolik asit yüklü zein/kazein dekstran nanopartiküllerini geliştirmişlerdir. Dekstran, insülini Gİ kanalda hidrolizden korurken; insülinin mukus geçirgenliğini de artırmıştır. Kolik asit ise safra asidi taşıyıcıları yoluyla insülinin emilimine katkı sağlamıştır. Zein, hidrofobik etkileşimlerle insülin, kolik asit ve kazeini bir arada tutmak için tercih edilmiştir. Kazein kullanımı ile nanopartiküllerin agregasyonu önlenmiştir. *In vivo* çalışmalarda, nanopartiküllerin Tip 1 diyabetli farelerde insülinin oral biyoyararlanımını %20,5'e yükselttiği, ayrıca nanopartiküllerin yaklaşık yarısının, lenfatik yol ile diğer yarısının ise kan yoluyla taşındığı kanıtlanmıştır.⁵³

PLGA Nanopartikülleri

PLGA, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi onaylı, biyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen sentetik bir polimerdir. PLGA nanopartikülleri yüklenen etkin maddelerinin değiştirilmiş salımına olanak sağladığı ve düşük sitotoksisite potansiyeline sahip olduğu için

polimerik nanopartiküller içinde oldukça önemli bir yere sahiptir.^{5,54}

Jain ve Jain, ince bağırsakta amino asitlerin L formlarının derişim gradyanına karşı taşınabilmesi ve L-valin konjuge edilmiş etkin maddelerin bağırsakta oligopeptid aracılı taşıma sistemi ile taşınmasından esinlenerek, çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile L-valin PLGA (50:50) nanopartikülleri hazırlamışlardır. Bağırsakta yapılan *ex vivo* incelemeler; L-valin ile konjuge edilen nanopartiküllerin, konjuge edilmeyenlere kıyasla insülin emilimini anlamlı oranda artırdığını göstermiştir. Hazırlanan nanopartiküller enterik kaplı sert jelatin kapsüller içinde sıçanlara uygulanmış, PLGA nanopartiküllerine kıyasla L-valin PLGA nanopartikülleri ile daha geç başlayan, daha uzun süren etki gözlenmiş ayrıca daha düşük kan glukoz seviyeleri elde edilmiştir.⁵⁵

Jaradat ve ark. ise mukus tabakasında insülin absorpsiyonunu artırmak için heparin sülfat kullanarak, 200 nm partikül boyutuna sahip insülin-yüklü PLGA nanopartikülleri geliştirmişlerdir. Heparin içeren insülin-yüklü PLGA nanopartiküllerinin epitel hücreler ve mukus salgılayan hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermediği bildirilmiştir. Geçirgenlik çalışmalarında, heparin sülfat içeren nanopartiküllerin, içermeyenlere göre geçirgenliğinin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Nedeni tam anlaşılabilen bir mekanizma ile heparin sülfat varlığının insülin-yüklü nanopartiküllerin mukus absorpsiyonunu ve insülin difüzyonunu kolaylaştırdığı gözlenmiş ve bu durum da emilim bölgesinin yakınında salımı gerçekleşen insülin miktarının artması ile sonuçlanmıştır. Fakat araştırmacılar, tüm bu üstünlüklere rağmen heparin sülfat kullanımından kaynaklanacak maliyetin göz önünde bulundurulması gerektiğini vurgulamışlardır.⁵⁶

Akhavan Farid ve ark. ise hazırladıkları insülin-yüklü PLGA (70:30) nanopartiküllerini jelatin kapsüllere doldurmuş ve kapsülleri Eudragit® FS 30 D (Evonik, Almanya) ile kaplamışlardır. Hazırlanan nanopartiküller homojen partikül büyüklüğü dağılımı göstermiş ve insülinin PLGA nanopartiküllerine enkapsülasyon işlemi insülinin termal stabilitesini artırmıştır. *In vitro* salım çalışmaları ise bu ilaç taşıyıcı sistem ile nanopartiküllerin 3-4 saate kadar mide or-

tamında korunduğunu, bağırsak ortamında ise insülinin salındığını göstermiştir.⁵⁷

HYALURONİK ASİT NANOPARTİKÜLLERİ

Sinoviyal sıvının ana bileşenlerinden biri olan hyaluronik asit; D-glukuronik asit ve N-asetil-D-glukozamin birimlerinden oluşan biyoyumlu, biyoparçalanabilir, güvenli ve modifikasyona uygun yapısı nedeniyle doku mühendisliği ve ilaç/gen taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında oldukça fazla araştırılan doğal bir glikozaminoglikandır.^{58,59}

Yapılan bir çalışmada, insülin-yüklü pH-duyarlı hyaluronik asit nanopartikülleri ters emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmış ve daha sonra dondurarak kurutma yöntemi ile nanopartiküller kuru hâlde elde edilmiştir. Çapraz bağlı hyaluronik asit nanopartiküllerinde hapsolmuş hidrofilik insülinin sürekli yağ fazında dağıtılması ile yüksek yükleme etkinliği elde edilmiştir. Çalışmalar nanopartiküllerin Caco-2 hücre tek tabakaları boyunca esas olarak transselüler yolu tercih ettiğini ve Papp (geçirgenlik katsayısı) değerini insülin çözeltisine kıyasla 2 kat artırdığını göstermiştir. *In vitro* çalışmalarda; yapay mide sıvısında hyaluronik asidin (pKa=3) pH 1,2'de düşük iyonlaşma derecesine bağlı olarak salım hızının yavaş ve salımı gerçekleşen insülin miktarının %10'dan az olduğu ve böylece nanopartiküllerin insülini mide ortamına karşı koruyabileceği belirtilmiştir. Yapay bağırsak sıvısında ise 60 dk'da insülinin %60'tan fazlasının salımı sağlanmıştır. *In vivo* çalışmalarda diyabetik sıçanlara uygulanan nanopartiküller; hipoglisemik profillerde 2 saatte %24, 3-8 saatte ise %32-39 düşüş gösterirken, aynı şartlardaki insülin çözeltisi oral yoldan uygulandığında herhangi bir düşüş gözlenmemiştir.⁵⁹

Tian ve ark. tarafından tiyollenmiş hyaluronik asit (HA-SH) çekirdek-kabuk nanopartiküllerinin tasarlanması; ilk olarak insülin ve N-(2-hidroksipropil)-3-trimetil amonyum klorür ile modifiye edilmiş kitosan (HTCC) arasında elektrostatik kompleksleşme ile pozitif bir nanopartikül çekirdeği oluşturulması, ardından da tiyollü hyaluronik asit ile kaplanması ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar; insülin-HTCC nanokompleksleri, tiyollenmiş hyaluronik asit kaplı nanopartiküller (NP_{HA-SH}) ve hyaluronik asit kaplı nanopartiküller (NP_{HA}) ile kıyaslamalı ola-

rak yapılmıştır. *In vitro* ve *ex vivo* çalışmalarda nanopartiküllerin yüksek mukus absorpsiyonu sağladığı ayrıca HA-SH kaplamanın mukozal tabaka boyunca nanopartikül yüzeyinden ayrılma kabiliyeti nedeniyle transepitelyal taşıma özelliği sağladığını göstermiştir. Tüm formülasyonlar kan glukoz seviyelerini düşürürken; NP_{HA-SH}'nin mukusa iyi absorpsiyon ve transepitelyal taşıma özelliği sayesinde daha iyi biyoyararlanım sağladığı gözlenmiştir.⁶⁰

Nişasta Nanopartikülleri

Doğal ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerden biri olan nişasta, jelleşme ve film oluşturma özellikleri nedeniyle oldukça ilgi görmektedir.⁶¹

Yapılan bir çalışmada, hidrofobik nişasta asetat ve hidrofilik polietilen glikol (PEG) ile amfifilik bir polimer hazırlanmış, hazırlanan polimer insülin sulu çözeltisi ile inkübe edilerek insülin yüklü nanopartiküller hazırlanmıştır. *In vitro* salım çalışmalarında, yapay mide ortamında 2 saatte %20 salım gerçekleşmiş, bu durum nişasta asetatın hidrofobik çekirdeğinin insülini mide ortamından koruduğu şeklinde açıklanmıştır. Yapay bağırsak ortamında ise %60 salım gerçekleşmiştir. Nanopartiküllerden salımı gerçekleşen insülinin herhangi bir konformasyonel değişikliğe uğramadığı ve MTT testinde ise formülasyonun sitotoksik olmadığı bildirilmiştir. Çalışmada ayrıca partikül boyutu küçük nanopartiküllerin büyük nanopartiküllere göre daha fazla emildiği için hipoglisemik etkiyi uzattığı bildirilmiş ve geliştirilen nanopartiküler sistemin insülin gibi protein yapılı etken maddelerin oral yolla verilmesi için kullanılabilirliği belirtilmiştir.⁶²

Başka bir çalışmada ise hidrofobik nişasta nanopartikülü çekirdeği ile hidrofilik PGA kabuğunun kendi kendine birleşmesiyle pH-duyarlı amfifilik agregatlar insülinin değiştirilmiş salımı için tasarlanmıştır. *In vitro* çalışmalarda, yapay mide sıvısında insülin salımının yavaş olduğu yani nanopartiküller tarafından insülinin korunduğu gösterilmiştir. Yapay bağırsak sıvısında ilk 15 dk'da yüzeyde bulunan insülinin kaynağından kaynaklandığı düşünülen %15-20'lik ani bir salım gerçekleşmiş daha sonra ise insülinin salım profili esas olarak agregatlardan insülin difüzyonu tarafından kontrol edildiği düşünülmüştür.⁶³

Katı Lipid Nanopartikülleri

Katı lipid nanopartikülleri (KLN), oda sıcaklığında katı olan lipidlerden hazırlanan, yaklaşık 50-1000 nm çapında, kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerdir. KLN'nin biyoparçalanabilir olmaları, kanda uzun süre kalabilmeleri, biyoyararlanımı artırabilmeleri, tolere edilebilirliklerinin yüksek olması ve büyük ölçekli üretime uygun olması bu ilaç taşıyıcı sistemin en büyük üstünlüklerini oluşturmaktadır.⁵

Yapılan bir çalışmada Zhang ve ark., CPP ile modifiye ettikleri insülin-yüklü KLN geliştirmişlerdir. İnsülin emilimini artırmak için CPP olarak oktarjinin kullanıldığı bu çalışmada, pH 6,8 ortamında yapılan *in vitro* salım çalışmalarında ilk dakikalarda ani salım ardından sürekli salım gerçekleşmiştir. *In vivo* çalışmalarda oral yolla uygulanan insülin çözeltisiyle kıyaslamalı olarak yapılmış, insülin ve oktarjinin yüklü KLN'lerin oral yolla uygulandığı grupta kan glukoz seviyelerinin 15 dk'da başlangıç seviyelerinin %89'una düştüğü ve 3 saatte de maksimum hipoglisemik etkiye ulaşıldığı bildirilmiştir.⁶⁴

Muntoni ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, insülin glarjin yüklü nano yapılı lipid taşıyıcılar incelenmiştir. İnsülin glarjinin, modifiye edilmiş amino asit dizilimi ve farklı izoelektrik noktası sayesinde insan regüler insülinine göre lipid nanopartiküllere daha iyi yüklenme, müsin ile daha iyi etkileşme ve artmış parasetol geçirgenlik gibi birçok üstünlüğe sahip olduğu ifade edilmiştir. *In vivo* çalışmalarda, sağlıklı sıçanlarda sıvı ve katı oral dozaj şekillerinin uygulanmasının ardından her iki dozaj şeklinde de hipoglisemik etki gözlenirken, diyabetik sıçanlarda sadece kapsül formunun uygulanmasının ardından hipoglisemik etki gözlenmiştir. Bunun nedeni, streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda streptozotosinin Gİ sistemde farklılık oluşturması ve bağırsaklarda emilimi etkilemesi olabileceği şeklinde açıklanmıştır.⁶⁵

Bir diğer çalışmada ise insülin fosfolipid [phospholipid (PC)] kabuğu içine enkapsüle edilmiş, sonrasında yağda çözündürülerek "yağda çözünür" ters lipid nanopartiküller ["oil-soluble" reversed lipid nanoparticles (ORLN)] hazırlanmıştır. PC konsantrasyonu değiştirilerek hem salımı gerçekleşen insülin miktarı hem de stabilite değerlendirilmiştir.

PC/insülin oranı 500:1 olduğunda bağırsak sıvısında nanopartiküllerden salınan insülin miktarı %80'in üzerinde iken bu oran 50:1'e düştüğünde ise salınan insülin miktarı %40'a kadar düşmüştür. İnsülin yüklü ORLN sisteminin, bağırsak sıvısında PC vezikülleri oluşturarak insülin moleküllerini koruduğu ve böylece insülinin tripsin ile temasının önlediği ifade edilmiştir. Ayrıca *in vivo* farmakokinetik çalışmalar bu sistemin subkütan enjeksiyon ile insülin uygulanan gruba göre bağıl biyoyararlanımının %28,7 olduğu bildirilmiştir.⁶⁶

Koland ve ark., insülini Gİ kanal sıvılarından ve enzimlerinden korumak amacıyla, Peyer plakları yoluyla sistemik dolaşıma katılabilecek sodyum aljinat ile kaplı KLN geliştirmişlerdir. Gliseril behenat ve gliseril monostearat kullanılarak hazırlanan KLN'lerin mukoadeziv bir polimer olan sodyum aljinat ile kaplanmasıyla, homojen partikül dağılımına, serbest insüline göre daha iyi bağırsak emilimine ve değiştirilmiş salım özelliklerine sahip sistemin kaplı olmayan KLN'lere göre daha iyi hipoglisemik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Keçi bağırsak mukozasında yapılan *ex vivo* çalışmalarda kaplı KLN'ler, kaplı olmayan KLN'lere ve insülin çözeltisine göre daha üstün insülin geçirgenliği sağlamıştır ve bu durum sodyum aljinatın mukoadeziv özellikleri ile açıklanmıştır.⁶⁷

Silika Nanopartikülleri

Silika nanopartikülleri, büyük gözenek hacmi ve gözenek boyutları sayesinde insülin gibi yüksek molekül ağırlığına ve büyüklüğe sahip protein ve polipeptid yapıları moleküllerin yüklenmesine olanak sağlaması, gözenek duvarları ve nanopartiküllerin geniş yüzeylerindeki silanol grupları ile işlevsel özelliklerinin düzenlenebilmesi, dayanıklı yapıları ile Gİ sistemin zorlu koşullarına karşı yüklenen molekülleri koruması, biyoyumlu olması, değiştirilmiş salım sağlaması ve düşük toksisiteli olması nedeniyle oldukça üstün görülen bir ilaç taşıyıcı sistemdir.¹⁹

Juère ve ark., dendritik mezo gözenekli silika nanopartiküllerinin; küçük partikül boyutu, gözenekli yapısı ve negatif yüklü yüzeyleri ile yüksek miktarda insülin yüklenmesine olanak verirken bağırsak zarından insülin geçişine de izin verdiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca bu formülasyonun protein yapıdaki

β -laktoglobulin ile birleştirildiğinde insülin moleküllerini gözeneklerine hapsederek insülinin mide ortamında erken salımını önleyip insülinin midede bozunmadan korunmasına aracılık ettiğini gözlemlemişlerdir.⁶⁸

Tan ve ark. ise mezo gözenekli silika nanopartiküllerini sentezlemiş ve PLA-PEG ve ardından CPP ile modifiye ederek hücresel alımlarının iyileştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada PEG'in; hidrofilikliği artırarak, CPP'nin ise yüzey yükünü nötral bir değere indirerek mukus ile etkileşimi azalttığı vurgulanmıştır. Oluşturulan hidrofilik ve elektronötral nanopartiküllerin mukus ile zayıf etkileşiminin; mukus tutulmasını azalttığı ve nanopartiküllerin hücresel alımını artırdığı bildirilerek nanopartiküllerin oral insülin taşınması için umut vadettiği bildirilmiştir.⁶⁹

Yapılan başka bir çalışmada, Gİ engellerin üstesinden gelebilmek için mezo gözenekli silika nanopartikülleri deoksikolik asit (DC) ile modifiye edilmiş, mukus geçirgenliğini ve transepitelyal emilimi artırmak için sülfobetain 12 (SB12) ile kaplanmıştır. SB12 kaplama, mukus geçirgenliği için uygun olan hidrofilik ve nötral partikül yüzeyini sağlamak için seçilmiş, mukusla temas ettiğinde SB12 kaplamanın açılacağı böylece DC tabakasının açığa çıkarak, nanopartiküllerin epitelyal absorpsiyon için uygun olan katyonik ve hidrofobik yüzeye sahip olacağı öngörülmüştür. Ayrıca bu nanopartiküllerin DC ile modifiye edilmeyen ve SB12 kaplı olmayan nanopartiküllerin aksine lizozomların içine girmediği, böylece lizozomal yıkımdan kaçtığı gözlenmiştir. Geliştirilen nanopartiküller tüm bağırsak segmentlerinde insülinin emilimi artırmış ve *in vivo* çalışmalarda çok iyi hipoglisemik etki sağlamıştır.⁷⁰

Altın Nanopartikülleri

Çapı 1-100 nm arasında değişen altın nanopartiküllerinin biyoyumlu olduğu bilinse de geleneksel indirgenme tepkimelerinin ortamda toksik maddelerin oluşumuna neden olması ciddi bir sakınca olarak görülmektedir.^{71,72}

Kumari ve ark., modifiye elma polisakkaridi [modified apple polysaccharide (MAP)] ile kloroaurik asidin indirgenmesi reaksiyonuyla ($Au^{+3} \rightarrow Au^0$) altın nanopartikülleri geliştirilmiştir. Çalışmada ya-

pılan MTT testine göre MAP içeren nanopartiküllerin, MAP'ın antioksidan, hepatoprotektif ve antiülser etkilerinden dolayı MAP içermeyen nanopartiküllere göre nispeten daha az sitotoksik olduğunu gösterilmiştir. Oral uygulamadan sonra insülinin stabilitesini koruması ise MAP içeren nanopartiküllerin matrisinde insülinin kompleks hâlde bulunması sayesinde olduğu şeklinde açıklanmıştır. *In vivo* çalışmalarda diyabetik sıçanlarda nanopartiküllerin, 4 saatte kan glukoz seviyelerinde 3,36 kat azalma sağladığı görülmüştür. Ayrıca polisakkaridlerin, uzun süre bağırsak ile teması sağlaması ve nanopartiküller ile bağırsak membranı arasındaki konsantrasyon gradyanı nedeniyle insülinin absorpsiyonunu artırması ile insülinin oral biyoyararlanımını iyileştirdiği gözlenmiştir.⁷³

Başka bir çalışmada ise biyolojik olarak uyumlu bir indirgenme ajanı olan kondroitin sülfat kullanılarak negatif zeta potansiyeline sahip altın nanopartiküller hazırlanmıştır. Uzun süreli stabilite testlerinde nanopartiküllerin stabilitesini koruduğu ve çalışmalarda Caco-2 hücrelerinde ihmal edilebilir sitotoksikite oluşturduğu görülmüştür. Nanopartiküllerin diyabetik sıçanlara oral yoldan uygulanmasını takiben plazma insülin konsantrasyonu, oral yolla uygulanan insülin çözeltisine göre 6,61 kat yüksek bulunmuştur. Nanopartiküllerin insülinin oral yoldan verilmesi için uygun taşıyıcılar olabileceği bildirilmiştir.⁷⁴

SONUÇ

Günümüzde ülkemizde ve dünyada birçok kişiyi bedenen ve psikolojik olarak olumsuz etkileyen diyabet; ileri yıllar için ise ciddi tehdit oluşturan bir hastalık olup, kişilerin yaşam kalitesini de fazlaca düşürebilmektedir. Diyabeti kontrol altına almanın en etkili yolu olan insülinin oral yoldan verilmesi, hasta uyuncunu artırma yönünden, diyabet tedavisinin geleceğinde muazzam bir potansiyele sahiptir ancak

doğal biyolojik bariyerler konudaki en büyük engeli teşkil etmektedir. Son 10 yılda, nanoteknolojinin hızla gelişmesiyle, çeşitli oral insülin platformları ve formülasyonları önerilmiş, pek çok ilaç taşıyıcı sistemde patentlenmiştir. Mukoadezif polimerler, absorpsiyon artırıcılar, proteaz inhibitörleri ve ayrıca nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler gibi bazı yenilikçi yaklaşımların artması ile Gİ sistemde doğal olarak var olan engellerin ve zorlu koşulların üstesinden gelinmesine dair bulgular insülinin oral yoldan verilmesi konusundaki araştırma kapsamını artırmıştır. Ek olarak akıllı ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi, hücreye penetre olan peptidlerin de kullanılması gibi stratejiler de araştırmalara yeni bir yön kazandırmıştır. Yakın gelecekte, ilk oral insülin preparatının piyasaya çıkması olası olarak düşünülmekte, bu gelişmenin diyabet tedavisinde çığır açacağı öngörülmektedir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: N. Başaran Mutlu Ağardan; **Tasarım:** N. Başaran Mutlu Ağardan, Tuğçe Turan; **Denetleme/Danışmanlık:** N. Başaran Mutlu Ağardan; **Analiz ve/veya Yorum:** N. Başaran Mutlu Ağardan, Tuğçe Turan; **Kaynak Taraması:** N. Başaran Mutlu Ağardan, Tuğçe Turan; **Makalenin Yazımı:** N. Başaran Mutlu Ağardan, Tuğçe Turan; **Eleştirel İnceleme:** N. Başaran Mutlu Ağardan.

KAYNAKLAR

- Alai MS, Lin WJ, Pingale SS. Application of polymeric nanoparticles and micelles in insulin oral delivery. *J Food Drug Anal.* 2015;23(3):351-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Mutlu-Agardan NB, Han S. In vitro and in vivo evaluations on nanoparticle and phospholipid hybrid nanoparticles with absorption enhancers for oral insulin delivery. *Pharm Dev Technol.* 2021;26(2):157-66. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Las G, Oliveira MF, Shiriha OS. Emerging roles of β -cell mitochondria in type-2-diabetes. *Mol Aspects Med.* 2020;71:100843. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Tan SY, Mei Wong JL, Sim YJ, Wong SS, Mohamed Elhassan SA, Tan SH, et al. Type 1 and 2 diabetes mellitus: a review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. *Diabetes Metab Syndr.* 2019;13(1):364-72. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Sharma G, Sharma AR, Nam JS, Doss GP, Lee SS, Chakraborty C. Nanoparticle based insulin delivery system: the next generation efficient therapy for Type 1 diabetes. *J Nanobiotechnology.* 2015;13:74. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Dong H, Woo SL. Hepatic insulin production for type 1 diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12(10):441-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Easa N, Alany RG, Carew M, Vangala A. A review of non-invasive insulin delivery systems for diabetes therapy in clinical trials over the past decade. *Drug Discov Today.* 2019;24(2):440-51. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Domon A, Katayama K, Tochigi Y, Suzuki H. Characterization of novel nonobese type 2 diabetes rat model with enlarged kidneys. *J Diabetes Res.* 2019;8153140. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Wong CY, Al-Salami H, Dass CR. Potential of insulin nanoparticle formulations for oral delivery and diabetes treatment. *J Control Release.* 2017;264:247-75. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Iyer H, Khedkar A, Verma M. Oral insulin - a review of current status. *Diabetes Obes Metab.* 2010;12(3):179-85. Erratum in: *Diabetes Obes Metab.* 2010;12(3). Erratum in: *Diabetes Obes Metab.* 2010;12(10):928. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Garber AJ, Handelsman Y, Grunberger G, Einhorn D, Abrahamson MJ, Barzilay JI, et al. Consensus Statement by the American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology on the Comprehensive Type 2 Diabetes Management Algorithm-2020 Executive Summary. *Endocr Pract.* 2020;26(1):107-39. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- World Health Organization [Internet]. © 2022 WHO [Cited: January 25, 2022]. Diabetes. Available from: [[Link](#)]
- Jiráček J, Záková L, Antolíková E, Watson CJ, Turkenburg JP, Dodson GG, et al. Implications for the active form of human insulin based on the structural convergence of highly active hormone analogues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(5):1966-70. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Mathieu C. Minimising hypoglycaemia in the real world: the challenge of insulin. *Diabetologia.* 2021;64(5):978-84. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Pillai O, Panchagnula R. Insulin therapies-past, present and future. *Drug Discov Today.* 2001;6(20):1056-61. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Sharma AK, Taneja G, Kumar A, Sahu M, Sharma G, Kumar A, et al. Insulin analogs: glimpse on contemporary facts and future prospective. *Life Sci.* 2019;219:90-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Damgé C, Reis CP, Maincent P. Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin. *Expert Opin Drug Deliv.* 2008;5(1):45-68. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Gedawy A, Martinez J, Al-Salami H, Dass CR. Oral insulin delivery: existing barriers and current counter-strategies. *J Pharm Pharmacol.* 2018;70(2):197-213. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Tan X, Liu X, Zhang Y, Zhang H, Lin X, Pu C, et al. Silica nanoparticles on the oral delivery of insulin. *Expert Opin Drug Deliv.* 2018;15(8):805-20. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Ji N, Hong Y, Gu Z, Cheng L, Li Z, Li C. Chitosan coating of zein-carboxymethylated short-chain amylose nanocomposites improves oral bioavailability of insulin in vitro and in vivo. *J Control Release.* 2019;313:1-13. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Hu Q, Luo Y. Recent advances of polysaccharide-based nanoparticles for oral insulin delivery. *Int J Biol Macromol.* 2018;120(Pt A):775-82. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Arbit E, Kidron M. Oral insulin delivery in a physiologic context: review. *J Diabetes Sci Technol.* 2017;11(4):825-32. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Niu M, Lu Y, Hovgaard L, Guan P, Tan Y, Lian R, et al. Hypoglycemic activity and oral bioavailability of insulin-loaded liposomes containing bile salts in rats: the effect of cholate type, particle size and administered dose. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;81(2):265-72. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Lee VHL, Dodda-Kashi S, Grass GM, Werner R. Oral route of peptide and protein drug delivery. In: Lee VHL, ed. *Peptide and Protein Drug Delivery.* 1st ed. New York: Marcel Dekker Inc; 1991. p.691-738.
- Brange J, Langkjaer L. Chemical stability of insulin. 3. Influence of excipients, formulation, and pH. *Acta Pharm Nord.* 1992;4(3):149-58. [[PubMed](#)]
- Zhang T, Tang JZ, Fei X, Li Y, Song Y, Qian Z, et al. Can nanoparticles and nano-protein interactions bring a bright future for insulin delivery? *Acta Pharm Sin B.* 2021;11(3):651-67. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Maderuelo C, Lanao JM, Zarzuelo A. Enteric coating of oral solid dosage forms as a tool to improve drug bioavailability. *Eur J Pharm Sci.* 2019;138:105019. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Li P, Tan A, Prestidge CA, Nielsen HM, Müllertz A. Self-nanoemulsifying drug delivery systems for oral insulin delivery: in vitro and in vivo evaluations of enteric coating and drug loading. *Int J Pharm.* 2014;477(1-2):390-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Wong CY, Martinez J, Carnagarin R, Dass CR. In-vitro evaluation of enteric coated insulin tablets containing absorption enhancer and enzyme inhibitor. *J Pharm Pharmacol.* 2017;69(3):285-94. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Fonte P, Araújo F, Silva C, Pereira C, Reis S, Santos HA, et al. Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: revisited approaches. *Biotechnol Adv.* 2015;33(6 Pt 3):1342-54. Erratum in: *Biotechnol Adv.* 2016;34(1):64. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Sharma G, Wilson K, van der Walle CF, Sattar N, Petrie JR, Ravi Kumar MN. Microemulsions for oral delivery of insulin: design, development and evaluation in streptozotocin induced diabetic rats. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;76(2):159-69. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Krauland AH, Guggi D, Bernkop-Schnürch A. Oral insulin delivery: the potential of thiolated chitosan-insulin tablets on non-diabetic rats. *J Control Release.* 2004;95(3):547-55. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Su FY, Lin KJ, Sonaje K, Wey SP, Yen TC, Ho YC, et al. Protease inhibition and absorption enhancement by functional nanoparticles for effective oral insulin delivery. *Biomaterials.* 2012;33(9):2801-11. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Ukai H, Iwasa K, Deguchi T, Morishita M, Katsumi H, Yamamoto A. Enhanced intestinal absorption of insulin by capryol 90, a novel absorption enhancer in rats: implications in oral insulin delivery. *Pharmaceutics.* 2020;12(5):462. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]

35. Ukai H, Kawagoe A, Sato E, Morishita M, Katsumi H, Yamamoto A. Propylene glycol caprylate as a novel potential absorption enhancer for improving the intestinal absorption of insulin: efficacy, safety, and absorption-enhancing mechanisms. *J Pharm Sci.* 2020;109(4):1483-92. [Crossref] [PubMed]
36. Ağardan NBM. Studies on the formulation optimization and controlled ionic gelation of chitosan nanoparticles using TPP-HP- β -CD inclusion complex. *Istanbul J Pharm.* 2020;50(1):54-9. [Link]
37. Cao SJ, Xu S, Wang HM, Ling Y, Dong J, Xia RD, et al. Nanoparticles: oral delivery for protein and peptide drugs. *AAPS PharmSciTech.* 2019;20(5):190. [Crossref] [PubMed] [PMC]
38. Lundquist P, Artursson P. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;106(Pt B):256-76. [Crossref] [PubMed]
39. Chen MC, Sonaje K, Chen KJ, Sung HW. A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. *Biomaterials.* 2011;32(36):9826-38. [Crossref] [PubMed]
40. Yeh TH, Hsu LW, Tseng MT, Lee PL, Sonjae K, Ho YC, et al. Mechanism and consequence of chitosan-mediated reversible epithelial tight junction opening. *Biomaterials.* 2011;32(26):6164-73. [Crossref] [PubMed]
41. Song M, Wang H, Chen K, Zhang S, Yu L, Elshazly EH, et al. Oral insulin delivery by carboxymethyl- β -cyclodextrin-grafted chitosan nanoparticles for improving diabetic treatment. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46(sup3):S774-S82. [Crossref] [PubMed]
42. El Leithy ES, Abdel-Bar HM, Ali RA. Folate-chitosan nanoparticles triggered insulin cellular uptake and improved in vivo hypoglycemic activity. *Int J Pharm.* 2019;571:118708. [Crossref] [PubMed]
43. Sudhakar S, Chandran SV, Selvamurugan N, Nazeer RA. Biodistribution and pharmacokinetics of thiolated chitosan nanoparticles for oral delivery of insulin in vivo. *Int J Biol Macromol.* 2020;150:281-8. [Crossref] [PubMed]
44. Cheng H, Guo S, Cui Z, Zhang X, Huo Y, Guan J, et al. Design of folic acid decorated virus-mimicking nanoparticles for enhanced oral insulin delivery. *Int J Pharm.* 2021;596:120297. [Crossref] [PubMed]
45. Fan W, Xia D, Zhu Q, Li X, He S, Zhu C, et al. Functional nanoparticles exploit the bile acid pathway to overcome multiple barriers of the intestinal epithelium for oral insulin delivery. *Biomaterials.* 2018;151:13-23. [Crossref] [PubMed]
46. Sonia TA, Sharma CP. An overview of natural polymers for oral insulin delivery. *Drug Discov Today.* 2012;17(13-14):784-92. [Crossref] [PubMed]
47. Chen X, Ren Y, Feng Y, Xu X, Tan H, Li J. Cp1-11 peptide/insulin complex loaded pH-responsive nanoparticles with enhanced oral bioactivity. *Int J Pharm.* 2019;562:23-30. [Crossref] [PubMed]
48. Mukhopadhyay P, Chakraborty S, Bhattacharya S, Mishra R, Kundu PP. pH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery. *Int J Biol Macromol.* 2015;72:640-8. [Crossref] [PubMed]
49. Li M, Sun Y, Ma C, Hua Y, Zhang L, Shen J. Design and investigation of penetrating mechanism of octaarginine-modified alginate nanoparticles for improving intestinal insulin delivery. *J Pharm Sci.* 2021;110(1):268-79. [Crossref] [PubMed]
50. Chalasani KB, Russell-Jones GJ, Jain AK, Diwan PV, Jain SK. Effective oral delivery of insulin in animal models using vitamin B12-coated dextran nanoparticles. *J Control Release.* 2007;122(2):141-50. [Crossref] [PubMed]
51. Woitiski CB, Neufeld RJ, Veiga F, Carvalho RA, Figueiredo IV. Pharmacological effect of orally delivered insulin facilitated by multilayered stable nanoparticles. *Eur J Pharm Sci.* 2010;41(3-4):556-63. [Crossref] [PubMed]
52. Jamwal S, Ram B, Ranote S, Dharela R, Chauhan GS. New glucose oxidase-immobilized stimuli-responsive dextran nanoparticles for insulin delivery. *Int J Biol Macromol.* 2019;123:968-78. [Crossref] [PubMed]
53. Bao X, Qian K, Yao P. Insulin- and cholic acid-loaded zein/casein-dextran nanoparticles enhance the oral absorption and hypoglycemic effect of insulin. *J Mater Chem B.* 2021;9(31):6234-45. [Crossref] [PubMed]
54. Malathi S, Nandhakumar P, Pandiyan V, Webster TJ, Balasubramanian S. Novel PLGA-based nanoparticles for the oral delivery of insulin. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:2207-18. [Crossref] [PubMed] [PMC]
55. Jain A, Jain SK. L-Valine appended PLGA nanoparticles for oral insulin delivery. *Acta Diabetol.* 2015;52(4):663-76. [Crossref] [PubMed]
56. Jaradat A, Macedo MH, Sousa F, Arkill K, Alexander C, Aylott J, et al. Prediction of the enhanced insulin absorption across a triple co-cultured intestinal model using mucus penetrating PLGA nanoparticles. *Int J Pharm.* 2020;585:119516. [Crossref] [PubMed]
57. Akhavan Farid E, Davachi SM, Pezeshki-Modaress M, Taranejoo S, Seyfi J, et al. Preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolic acid)/insulin nanoparticles encapsulated in methacrylate coated gelatin with sustained release for specific medical applications. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2020;31(7):910-37. [Crossref] [PubMed]
58. Lei C, Liu XR, Chen QB, Li Y, Zhou JL, Zhou LY, et al. Hyaluronic acid and albumin based nanoparticles for drug delivery. *J Control Release.* 2021;331:416-33. [Crossref] [PubMed]
59. Han L, Zhao Y, Yin L, Li R, Liang Y, Huang H, et al. Insulin-loaded pH-sensitive hyaluronic acid nanoparticles enhance transcellular delivery. *AAPS PharmSciTech.* 2012;13(3):836-45. [Crossref] [PubMed] [PMC]
60. Tian H, He Z, Sun C, Yang C, Zhao P, Liu L, et al. Uniform core-shell nanoparticles with thiolated hyaluronic acid coating to enhance oral delivery of insulin. *Adv Healthc Mater.* 2018;7(17):e1800285. [Crossref] [PubMed]
61. Luo YY, Xiong XY, Tian Y, Li ZL, Gong YC, Li YP. A review of biodegradable polymeric systems for oral insulin delivery. *Drug Deliv.* 2016;23(6):1882-91. [PubMed]
62. Minimol PF, Paul W, Sharma CP. PEGylated starch acetate nanoparticles and its potential use for oral insulin delivery. *Carbohydr Polym.* 2013;95(1):1-8. [Crossref] [PubMed]
63. Zhang Z, Shan H, Chen L, He C, Zhuang X, Chen X. Synthesis of pH-responsive starch nanoparticles grafted poly (L-glutamic acid) for insulin controlled release. *Eur Polym J.* 2013;49(8):2082-91. [Crossref]
64. Zhang Z, Lv H, Zhou J. Novel solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. *Pharmazie.* 2009;64(9):574-8. [PubMed]
65. Muntoni E, Anfossi L, Milla P, Marini E, Ferraris C, Capucchio MT, et al. Glargine insulin loaded lipid nanoparticles: oral delivery of liquid and solid oral dosage forms. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2021;31(2):691-8. [Crossref] [PubMed]
66. Wang T, Shen L, Zhang Y, Li H, Wang Y, Quan D. "Oil-soluble" reversed lipid nanoparticles for oral insulin delivery. *J Nanobiotechnology.* 2020;18(1):98. [Crossref] [PubMed] [PMC]
67. Koland M, Anchan RB, Mukund SG, Sindhoo S. Design and investigation of alginate coated solid lipid nanoparticles for oral insulin delivery. *Indian J Pharm Educ Res.* 2021;55(2):383-94. [Crossref]
68. Juère E, Caillard R, Marko D, Del Favero G, Kleitz F. Smart protein-based formulation of dendritic mesoporous silica nanoparticles: toward oral delivery of insulin. *Chemistry.* 2020;26(23):5195-9. [Crossref] [PubMed] [PMC]
69. Tan X, Yin N, Liu Z, Sun R, Gou J, Yin T, et al. Hydrophilic and electroneutral nanoparticles to overcome mucus trapping and enhance oral delivery of insulin. *Mol Pharm.* 2020;17(9):3177-91. [Crossref] [PubMed]

70. Gao Y, He Y, Zhang H, Zhang Y, Gao T, Wang JH, et al. Zwitterion-functionalized mesoporous silica nanoparticles for enhancing oral delivery of protein drugs by overcoming multiple gastrointestinal barriers. *J Colloid Interface Sci.* 2021;582(Pt A):364-75. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
71. Kūūnal S, Rauwel P, Rauwel E. Plant extract mediated synthesis of nanoparticles. In: Makhlof ASH, Barhoum A, eds. *Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures*. 1st ed. New York: Elsevier Inc; 2018. p.411-46. [[Crossref](#)]
72. Holkar CR, Jain SS, Jadhav AJ, Pinjari DV. Scale-up technologies for advanced nanomaterials for green energy: feasibilities and challenges. In: Bhanvese BA, Pawade VB, Dhoble SJ, Sonawane SH, Ashokkumar M, eds. *Nanomaterials for Green Energy*. 1st ed. New York: Elsevier Inc; 2018. p.433-55. [[Crossref](#)]
73. Kumari Y, Singh SK, Kumar R, Kumar B, Kaur G, Gulati M, et al. Modified apple polysaccharide capped gold nanoparticles for oral delivery of insulin. *Int J Biol Macromol.* 2020;149:976-88. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
74. Cho HJ, Oh J, Choo MK, Ha JI, Park Y, Maeng HJ. Chondroitin sulfate-capped gold nanoparticles for the oral delivery of insulin. *Int J Biol Macromol.* 2014;63:15-20. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]