

Kalsitonin ve Kalsitoninin Uygulanmasında Yeni Yaklaşımlar

Gülay YETKİN*, Nevin ÇELEBİ*^o

Kalsitonin ve Kalsitoninin Uygulanmasında Yeni Yaklaşımlar

Özet : Kalsitonin, 32 aminoasit içeren ve klinikte hiperkalsemi, Paget's hastalığında ve daha çok son zamanlarda osteoporozda kullanılan polipeptit bir hormondur. Kalsitoninin genel uygulama yolu parenteral enjeksiyondur. Günlük enjeksiyonlar, fiziksel ve sosyal rahatsızlıklarla birlikte hasta şikayetlerine neden olmaktadır. Bu nedenle, son zamanlarda kalsitoninin uygulanması için parenteral olmayan yollar araştırılmaktadır. Kalsitonin, birçok peptit ve proteinler gibi, oral olarak absorbe olmamaktadır. Çünkü peptitler fazlası ile ilk geçiş metabolizmasına uğramakta, gastrointestinal kanaldaki proteolitik enzimler tarafından parçalanmaktadır. Kalsitoninin sistemik etkisi için vajinal, rektal, bukkal, pulmoner ve özellikle nazal mukoza gibi transmukozal yollar yaygın bir şekilde incelenmiştir. Ayrıca kalsitoninin, nanokapsül ve biyolojik olarak parçalanabilen mikroküre çalışmaları da bulunmaktadır. Bu derlemede kalsitoninin uygulanmasındaki yeni yaklaşımlar incelenecek ve tartışılacaktır.

Anahtar kelimeler: Kalsitonin, vajinal, rektal, bukkal, pulmoner, nazal, nanokapsül, mikroküre

Calcitonin and New Routes of Administration of Calcitonin Summary : Calcitonin is a polypeptide hormone containing 32 amino acids, and is used clinically for the treatment of hypercalcemia, Paget's disease and more recently, osteoporosis. The common route of administration of calcitonin is by parenteral injection. The daily injections are caused with physical and social discomfort, which may lead to patient complaints. Therefore, recently non-parenteral routes have been investigated for calcitonin administration. Calcitonin, like most peptides and proteins, is not absorbed when administered orally, as peptides undergo an extensive first-pass metabolism and are degraded by proteolytic enzymes in gastrointestinal tract. Transmucosal routes such as vaginal, rectal, buccal, pulmonary, and especially nasal mucosa has been extensively examined for the systemic effects of calcitonin. Also, there are nanocapsules and biodegradable microspheres studies on calcitonin present in literature. The new routes of calcitonin administration will be examined and discussed in this review article.

Key words: Calcitonin, vaginal, rectal, buccal, pulmonar, nasal, nanocapsules, microspheres.

Geliş Tarihi : 5.3.1998

Kabul Tarihi : 4.5.1998

GİRİŞ

Kalsitonin (CT), memelilerin tiroid bezinin parafoliküler veya C hücrelerinden salınan, salımı kandaki iyonize kalsiyum ve gastrin, kolesitokinin gibi barsak hormonları tarafından düzenlenen, 32 amino asitin dizilmesiyle oluşan tek zincirli bir hormondur¹. Salmon kalsitoninin kimyasal yapısı Şekil 1'de görülmektedir.

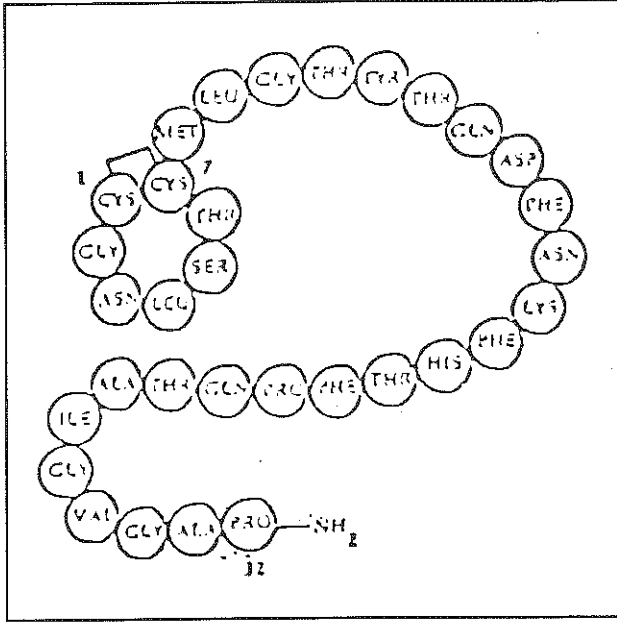
Plazma CT düzeyi, normal insanlarda 30-90 pg/mL

arasında olup, yaşa ve cinsiyete göre değişmektedir². Erkeklerde, kadınlara göre belirgin olarak daha yüksektir. Kadınlarda menapoz döneminde veya overektomi sonucunda, östrojen düzeyinin azalması nedeniyle, plazma CT konsantrasyonu daha da düşer³.

Kalsitonin, plazmadaki kalsiyum konsantrasyonunu düşürür ve yükselmesini baskılar. Kalsiyum metabolizmasını, kemikler üzerindeki etkisiyle yaşılatır, esas etkisi kemikler üzerinedir. Kemik do-

* Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 06330 Etiler/ANKARA

^o Yazışma Adresi



Şekil 1. Salmon Kalsitoninin Kimyasal Yapısı⁴.

kusunu tahrip eden osteoklastların etkisini inhibe ederek kemik dokusunun rezorpsiyonunu azaltır: Bunu kalsiyumun kemikten kana geçişini önleyerek sağlar. Ayrıca kalsitonin yeni kemik dokusu oluşumu sağlayan osteoblast hücrelerin etkisini artırarak, kemiklerde kalsiyum toplanmasını ve çökmesini hızlandırır. Somon balığından rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilen salmon kalsitoninin (sCT), farmakolojik etkisinden dolayı, kemiğin Paget hastalığında, hiperkalsemi ve postmenopozal osteoporoz tedavisinde kullanımı için FDA tarafından onay verilmiştir⁴.

Çok kısa biyolojik yarı ömre sahip olması ve gastrointestinal kanalda çabuk metabolize olması nedeniyle oral yoldan uygulanamayan CT'nin, parenteral yol dışında uygun yolla verilmesi amacıyla son yıllarda, vajinal^{5,6}, rektal⁷⁻⁹, bukkal¹⁰, nazal¹¹⁻¹⁵, pulmoner^{16,17}, intestinal^{18,19} mukozadan uygulamalarıyla ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca oral yolla uygulanabilen nanokapsüllerinin²⁰, sürekli salım yapan mikrokürelerinin²¹ ve biyolojik olarak parçalanabilen mikrokürelerinin²² hazırlanmasıyla ilgili çalışmalar da vardır. Günümüzde, sCT'nin klinik tedavide nazal yolla uygulanan ticari sprey ve parenteral yolla uygulanan çözelti şekilleri bulunmaktadır.

KALSİYUM METABOLİZMASININ BOZUKLUĞUNDAN KAYNAKLANAN VE KALSİTONİNİN KULLANILDIĞI HASTALIKLAR

Hiperkalsemi, hiperparatiroidizm, hipertiroidizm, malign tümör, D hipervitaminozu gibi sebeplerden oluşur. Plazmadaki yüksek kalsiyum konsantrasyonunu düşürme mekanizmaları, böbreklerden kalsiyum itrahının artırılması (örneğin diüretiklerle), kemik rezorpsiyonunun önlenmesi (örneğin kalsitoninle), kalsiyumun kemiğe çökmesinin hızlandırılması (örneğin fosfatlarla) ve kalsiyumun mide barsak kanalından absorpsiyonunun azaltılması (örneğin glukokortikoidlerle) şeklindedir. Kalsitonin başlangıçta her 12 saatte bir 5-10 U/kg veya 6 saat süreyle infüzyon şeklinde uygulanır. Birkaç günde kalsiyum konsantrasyonunda azalma olmadığı takdirde doz artırılabilir^{23,24}.

Kemiklerin niteliğinde bir değişme olmaksızın, kitle azalması şeklinde tanımlanan osteoporoz, kemiklerin ufalmasına ve boylarının kışalmasına sebep olur. Uzun süreli glukokortikoid tedavisi, hiperparatiroidizm, kronik böbrek ve karaciğer yetersizliği, aşırı C vitamini yetersizliği, kalsiyum, potasyum, protein, C ve D vitaminlerince zayıf diyetle beslenme alışkanlığı, uzun süreli kullanılan tiroid hormonları, antikonvülsan ilaçlar, antineoplastikler, heparin, kafein ve alkol osteoporozu neden olur. Osteoporozda kalsitonin, kemik dansitesini artırarak, kırık oluşma sıklığını düşürerek ve kompresyona bağlı ağrıyı azaltarak yararlı olabilir. Yapılan bir çalışmada, osteoporoz tedavisinde günde 200 IU (intranazal) kalsitonin kullanımı yararlı bulunmuştur²⁵.

Paget hastalığı, genellikle 40 yaşın üzerinde görülen ve sebebi tam olarak bilinmeyen, kronik bir kemik hastalığıdır. Bazı kemiklerde lokal olarak, osteoblast ve osteoklast hücre sayısı artar, yani hem kemik yapımı hem de rezorpsiyonu artar. Sonuç olarak, kemik yapım ve yıkımı hızlanır ve kolay kırılabilen kemik dokusu oluşur. Başlangıçta 100 IU/gün (subkütan veya intramüsküler) olan kalsitonin dozu daha sonra gün aşırı veya haftada 3 kez 50-100 IU'ye indirilebilir. Kalsitonin tedavisi en az 12 ay sürer^{23,26}.

Kalsitoninin aktivitesi, tripsin, kimotripsin, pepsin,

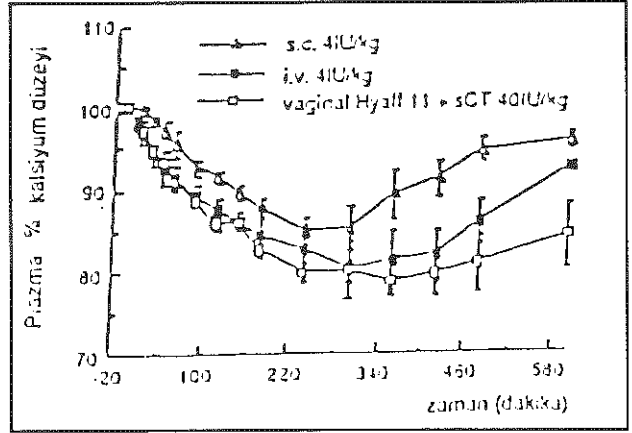
polifenol oksidazlar gibi protein inhibitörleriyle, hidrojen peroksit oksidasyonu ve fotooksidasyonla azalır. Ayrıca N-bromo süksinimidlerle beraber kullanıldığında da CT aktivitesi azalmaktadır²⁷.

Kalsitonin uygulandıktan sonra hızla metabolize olur. Esas yıkım yeri olan böbreklerden başka, kan ve periferel dokularda da yıkılır. Derlemenin bu bölümünde kalsitoninin parenteral yol dışında, çeşitli mukozal yollarla verilmesi incelenecektir.

KALSİTONİNİN VAJİNAL YOLLA UYGULANIŞI

Richardson ve arkadaşları sCT'nin mikroküre dozaj formundaki vajinal absorpsiyonunu değerlendirmişlerdir⁵. Hiyalüronik asitin kısmen esterleştirilmesinden Hyaff 11 p75, tamamen esterleştirilmesinden Hyaff 11 elde edilmiş ve çözücü ekstraksiyon yöntemiyle mikroküreleri hazırlanmıştır. Sıçanlara, 100 IU/kg sCT (20 mg mikroküre içinde) vajinal yolla, 5 IU/kg sCT intravenöz (i.v.) ve 10 IU/kg sCT subkütan (s.c.) yolla uygulanarak oluşan hipokalsemik etki karşılaştırılmıştır. Sırasıyla en güçlü hipokalsemik etki, i.v. uygulamayla % 29, s.c. uygulamayla % 24, vajinal uygulamayla % 10 bulunmuştur. Çözelti ve mikroküre dozaj formları kıyaslandığında, aynı dozda (100 IU/kg) sCT içeren Hyaff mikrokürelerinin, çözelti formuna göre daha iyi absorplandığı, dolayısıyla hipokalsemik etkinin arttığı görülmüştür⁵ (Şekil 2). Bu artışın mekanizması tam

olarak açıklanamasa bile, mikrokürelerin, peptit yapılı etken maddenin parçalanmasını önleyerek ve vajina mukozasına temasını artırarak etkili olduğu düşünülmüştür. Ayrıca bu çalışmada, koyunlara 4 IU/kg sCT'nin i.v., 4 IU/kg sCT'nin s.c. ve 40 IU/kg sCT içeren Hyaff 11 mikrokürelerinin vajinal uygulanmasıyla da benzer hipokalsemik etki elde edilmiştir⁵ (Şekil 3).



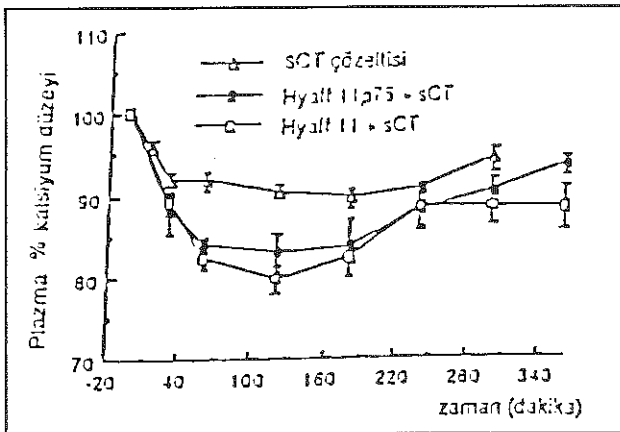
Şekil 3. sCT formülasyonlarının, koyunlara vajinal yolla uygulandıktan sonra elde edilen plazma kalsiyum düzeyleri (Ortalama ± Standart hata; n=4)⁵.

Nakada ve arkadaşları ise sıçan vajinasından, insan kalsitonininin (human calcitonin-hCT) absorplanmasına pH'nın, osmotik basıncın, ayrıca absorpsiyon arttırıcı ve enzim inhibitörlerinin etkisini incelemişlerdir. Değişik pH değerlerine sahip sitrat ve sodyum fosfat tamponları kullanılarak hazırlanmış hCT (6.4 mg) çözeltisi vajinal yoldan uygulanarak, plazma kalsiyum seviyesindeki azalma saptanmıştır. Üç değişik pH'da yapılan çalışma sonunda, en iyi absorpsiyonun pH 3'te olduğu, bunu pH 5 ve pH 7.4'ün takip ettiği bulunmuştur⁶. Plazma kalsiyum düzeylerindeki % total azalma (ΔA) Hirai ve arkadaşlarının kullandığı şu eşitlikle hesaplanmıştır²⁸.

$$\Delta A = \frac{AUC_C - AUC_H}{AUC_C} \times 100 \quad \text{Eşitlik 1}$$

AUC_C = Sadece absorpsiyon arttırıcı maddenin uygulanmasıyla elde edilen eğri altında kalan alan

AUC_H = Absorpsiyon arttırıcı madde ve hCT'nin uygulanmasıyla elde edilen eğri altında kalan alan



Şekil 2. 100 IU/kg dozda sCT içeren formülasyonların, sıçan vajinasına uygulandıktan sonra elde edilen plazma kalsiyum düzeyleri (Ortalama ± Standart hata; n=4-8)⁵.

Buna göre ΔA , pH 3'te % 30.6 iken, pH 5'te % 27.0 ve pH 7.4'de % 17.7 bulunmuştur⁶. Sonuçta herhangi bir absorpsiyon arttırıcı madde içermeyen hCT'nin vajinal absorpsiyonu, asit ortamda artarken, bazik pH'da azaldığı saptanmıştır. Ayrıca farklı pH değerlerinde (pH 3 ve 7.4'te), değişen osmotik basıncın (120 mOsm/kg, 280 mOsm/kg ve 590 mOsm/kg) absorpsiyona etkisi incelenmiştir. Her iki pH değerinde de osmotik basıncın plazma kalsiyum seviyesini etkilemediği bulunmuştur⁶. Aynı çalışmada sodyum deoksikolat (22.5 mg/mL), sükröz palmitat (22.5 mg/mL), quillaja saponin (22.5 mg/mL) ve sitrik asit (% 10 a/h) gibi maddelerin hCT'nin vajinal absorpsiyonuna etkisi incelenmiştir. pH 7.4'te hCT'nin 6.4 mg dozda tek başına uygulanmasıyla (kontrol) plazma kalsiyum seviyesinde % 12.3 ± 3.1 'lik bir azalma elde edilirken, sodyum deoksikolat (22.5 mg/mL) ile birlikte uygulanmasıyla % 21.1 ± 1.9 'luk bir azalma elde edilmiştir. Bu da sodyum deoksikolatın hCT'nin vajinal absorpsiyonunu arttırdığını göstermektedir. Kullanılan diğer maddeler, absorpsiyonu arttırmada etkili olmamış, kontrol grubuyla benzer kalsiyum seviyesi izlenmiştir⁶. Histolojik özelliklerinin benzerliğine rağmen, quillaja saponin hCT'nin oral mukozadan absorpsiyonunu arttırmada etkili olduğu halde¹⁰, vajinal absorpsiyonu arttırmada etkili olmayışı dikkat çekicidir. Bu, kullanılan absorpsiyon arttırıcıların kimyasal yapılarından ve etki mekanizmalarından kaynaklanmaktadır.

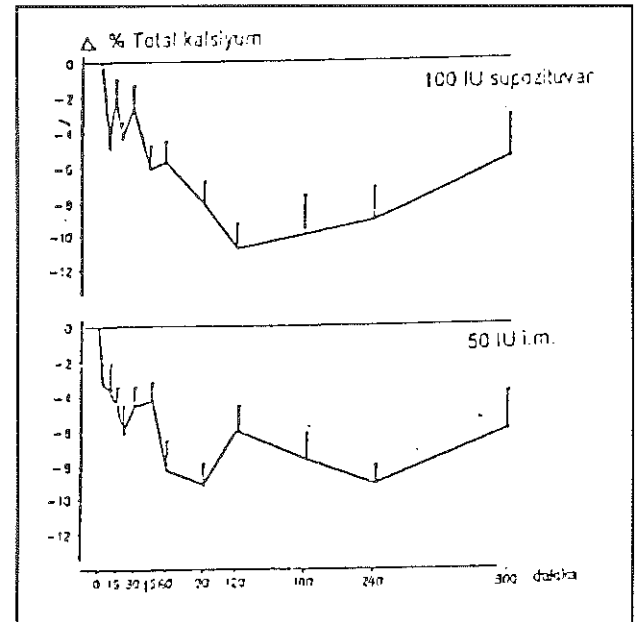
Yine aynı çalışmada pH 7.4'te, bestatin, amastatin gibi ekzopeptidaz ve leupeptin, pepstatin A gibi endopeptidaz inhibitörlerinin etkisi araştırılmıştır. Buna göre tripsin inhibitörü olan pepstatin A optimum 5 mg/mL konsantrasyonda (% 22.2 ± 1.8), aminopeptidaz inhibitörü olan bestatin 50 mg/mL konsantrasyonda (% 22.8 ± 1.8) ve tripsin inhibitörü olan leupeptin 500 mg/mL konsantrasyonda (% 20.5 ± 0.8), peptidaz inhibitörü içermeyen kontrol (% 12.3 ± 3.2) grubuna göre plazma kalsiyum seviyesinde % total azalma (ΔA) belirgin olarak artmıştır⁶.

KALSİTONİNİN REKTAL YOLLA UYGULANIŞI

Morimoto ve arkadaşları, sıçanlarda, CT'nin sentetik bir analogu olan yılan balığı kalsitoninin (eel

calcitonin-eCT) rektal absorpsiyonunu incelemişlerdir. eCT'nin, değişik pH (pH 5.5, 6.5, 7.5 ve 8.5) ve konsantrasyona sahip (% 0.01, % 0.1 ve % 1.0) poliakrilik asit jeli içinde, 1 IU/kg dozda uygulanmasıyla oluşan hipokalsemik etki incelenmiştir. Buna göre, maksimum hipokalsemik etki, pH 5.5'da ve % 0.1'lik konsantrasyondaki poliakrilik asit jel ortamında elde edilmiştir⁷. Kalsiyum düzeyi, uygulamadan 30 dakika sonra başlangıç düzeyine göre % 18 kadar azalma göstermiştir⁷. Ayrıca çalışmada histolojik örnekler incelendiğinde, jelin, rektal mukoza üzerinde herhangi bir toksik etki göstermediği bulunmuştur⁷.

Yapılan bir başka çalışmada on sağlıklı gönüllüde sentetik sCT'nin rektal absorpsiyonu, intramüsküler (i.m.) uygulamayla karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. 50 IU sCT i.m. yolla, 100 IU sentetik sCT içeren supozitivar rektal yolla tek doz halinde uygulanarak total kalsiyum düzeyleri incelenmiştir. 100 IU rektal yolla uygulama ile i.m. uygulama sonucunda total kalsiyum düzeylerinde benzer şekilde azalma görülmüştür⁸ (Şekil 4).



Şekil 4. Sağlıklı gönüllülere rektal yolla 100 IU sentetik sCT içeren supozitivar ve intramüsküler yolla 50 IU sentetik sCT çözeltisi uygulandıktan sonra elde edilen plazma total kalsiyum düzeyleri (Ortalama \pm Standart hata; n=10)⁸.

Diğer bir çalışmada ise, sCT'nin rektal absorpsiyonu nazal yolla karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Di-

yetleri standardize edilmiş 8 gönüllüye 3 saat arayla iki defa 200 IU sCT içeren spreyi intranasal (i.n.) yolla, 9 gönüllüye yine 3 saat arayla iki defa 200 IU sCT içeren supozituarı rektal yolla uygulayarak oluşan biyolojik cevap karşılaştırılmıştır. Zamana karşı plazma sCT konsantrasyonu grafiğe geçirildiğinde rektal uygulama sonrasında bir saat içinde hızla artan ve tekrar düşen keskin ve dar pikler, nazal uygulama sonrasında geniş ve yayvan pikler elde edilmiştir⁹. Her iki uygulama sonrası plazma sCT seviyelerinde farklılıklar bulunmasına rağmen, AUC değerleri arasında belirgin farklılık bulunamamış, dolayısıyla benzer biyolojik cevap görülmüştür (AUC_{supp}=0.82 ± 0.11 IU.saat/L, AUC_{nazal}=0.66 ± 0.12 IU.saat/L). Ayrıca plazma iyonize kalsiyum düzeyi, ilk rektal uygulama sonrası % 10'luk bir azalma gösterirken, ancak ikinci nazal uygulama sonrası % 12'lik azalma göstermiştir. Rektal uygulamanın plazma pik değeri, intranasal uygulamaya göre 2-4 kez düşük bulunmuştur, bunun sebebinin rektal emilimin tamamen olmaması olarak düşünülmüştür. Birinci nazal uygulama sonrasında absorplanan sCT miktarı ise düşük bulunmuştur, bu da nazal mukozadan hormon geçişinin yavaş olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla güçlü hipokalsemik cevap sağlanamadığı gibi idrarla kalsiyum atımındaki artış da rektal uygulamanınki kadar fazla olmamıştır. Yapılan çalışmalarda i.n. uygulanan sCT'nin postmenopozal osteoporozda²⁹, rektal uygulanan sCT'nin de malignant hiperkalsemi³⁰ etkili olduğu bulunmuştur.

KALSİTONİNİN BUKKAL YOLLA UYGULANIŞI

Nakada ve arkadaşları, sıçanlarda, hCT'nin bukkal absorpsiyonunda, sodyum deoksikolat, sodyum taurokolat, sodyum lauril sülfat, sodyum miristat, quillaja saponin ve sükroz palmitat gibi absorpsiyon arttırıcıların etkisini incelemişlerdir¹⁰. hCT'nin oral mukozadan absorpsiyonu sonucu plazma kalsiyum düzeylerindeki azalış, Hirai ve arkadaşlarının kullandığı eşitlikle değerlendirilmiştir²⁸.

Çalışmada, absorpsiyon arttırıcı içermeyen hCT'nin sıçanlara uygulanması sonucunda, plazma kalsiyum düzeylerinde değişiklik gözlenmezken, sodyum deoksikolat, sodyum taurokolat, sodyum lauril

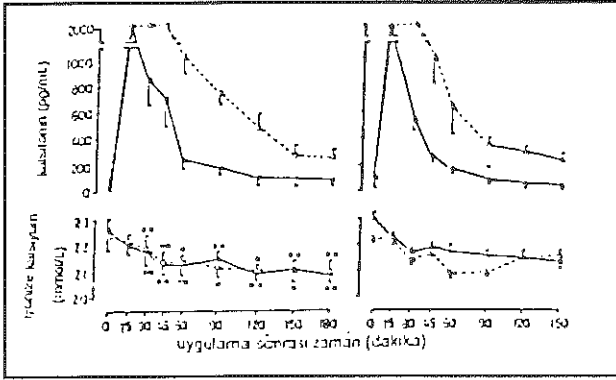
sülfat, sodyum miristat, quillaja saponin ve sükroz palmitat gibi yardımcı maddelerin ilavesiyle, plazma kalsiyum düzeylerinde anlamlı ($p < 0.05$) azalma görülmüştür. Absorpsiyon arttırıcı maddelerin, genel olarak, mukus tabakasının akış özelliklerini değiştirerek, membran akışkanlığını arttırarak, etkin maddenin membran lipid ve proteinleri ile etkileşimini kolaylaştırarak ve proteolitik aktiviteyi azaltarak, absorpsiyonu arttırmada etkili olduğu düşünülmüştür. Buna karşın, α ve β siklodekstrin, saponin, miristik asit hariç uzun zincirli yağ asitlerinin sodyum tuzları, deoksikolik ve tauroglikokolik asit hariç diğer safra tuzlarının, CT'nin oral mukozadan absorpsiyonunu arttırmada etkili olmadığı saptanmıştır¹⁰. Aynı çalışmada, HLB (hydrophilic-lipophilic balance) değerleri 11-16 arasında olan sükroz palmitat gibi şeker esterlerinin, hCT'nin oral mukozadan absorpsiyonunu arttırmada başarılı olduğu ortaya konmuştur¹⁰. Ayrıca miristik ve palmitik asidin şeker esterleri absorpsiyon arttırıcı etki sağlarken, kaprik asit, laurik ve stearik asitin şeker esterleri bu etkiyi gösterememiştir¹⁰.

KALSİTONİNİN NAZAL YOLLA UYGULANIŞI

Kalsitoninin mukozal yoldan verilmesinde en çok denenilen ve üzerinde araştırma yapılan yol nazal yoldur. Nazal yol, yüksek geçirgenliğe sahip geniş membran yüzeyinin bulunması, damarlarca zengin olması ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Kalsitoninin nazal yoldan verilmesi ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bugün kalsitoninin klinikte kullanılan ticari nazal dozaj formu bulunmaktadır.

Yapılan bir çalışmada, sağlıklı gönüllülerde hCT'nin i.n. ve i.v. absorpsiyonu karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada altı gönüllüye 500 µg hCT i.v. olarak, altı gönüllüye 500 µg hCT ve 15 µg sodyum glikokolat 0.5 mL distile suda çözülerek burun damlası şeklinde i.n. olarak ve dört gönüllüye de 1000 µg hCT ve 15 µg sodyum glikokolat yine aynı şekilde damla hazırlanarak i.n. olarak uygulanmıştır. Plazma iyonize kalsiyum ve kalsitonin düzeyleri takip edilmiştir. Sonuç olarak aynı dozda (500 µg hCT) uygulandığında i.v. plazma hCT konsantrasyonu, i.n. plazma hCT konsantrasyonundan

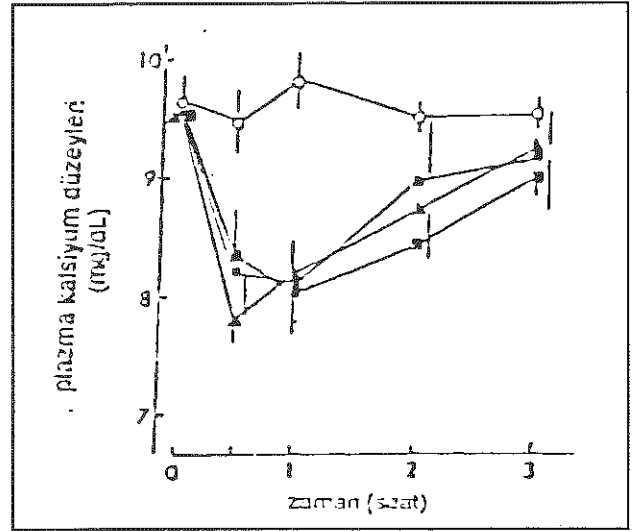
daha büyük olmasına rağmen oluşan farmakolojik cevap yani plazma kalsiyum seviyeleri her iki uygulama yolunda benzerdir³¹ (Şekil 5). Bunun yanısıra i.n. uygulanan 500 µg hCT ile 1000 µg hCT



Şekil 5. Sağlıklı gönüllülere 500 µg hCT'nin intravenöz (o---), ve intranasal (o—) uygulama sonrası elde edilen plazma kalsitonin ve iyonize kalsiyum düzeyleri. 500 µg (▲) ve 1000 µg (Δ) hCT'nin intranasal uygulama sonrası elde edilen plazma kalsitonin ve iyonize kalsiyum düzeyleri (n=6)³¹.

arasında da biyolojik cevap açısından pek fark bulunamamış, her iki dozda da plazma kalsiyum azalışı benzer bulunmuştur³¹. Ayrıca iki farklı dozun plazma kalsiyum seviyesi ile plazma hCT seviyeleri arasında çok iyi bir ilişki bulunamamıştır³¹. Bu da hCT'nin nazal uygulamada sCT kadar başarılı olmadığını göstermektedir.

Morimoto ve arkadaşları poliakrilik asit jel içerisinde eCT'nin yarı sentetik analogu olan [Asu^{1,7}] eel CT'nin nazal absorpsiyonunu incelemişlerdir. Karbopol 941 (% 0.1 a/h) 20° C'de, 15 saat süreyle distile suyla ısıtıldıktan sonra % 10'luk NaOH ile pH'sı ayarlanmıştır. Üç ayrı pH değerinde (pH 5.5, pH 6.5 ve pH 7.5) hazırlanmış [Asu^{1,7}] eel CT'nin formülasyonunun (10 U/kg) sıçanlardaki nazal absorpsiyonunu değerlendirmişlerdir. Buna göre plazma kalsiyum seviyesindeki en büyük düşüş pH 6.5'ta uygulamadan 30 dakika, diğer pH'larda uygulamadan bir saat sonra görülmüştür (Şekil 6). Ayrıca çalışmada, pH 6.5'ta üç ayrı konsantrasyonda [Asu^{1,7}] eel CT'nin etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak % 0.1 a/h Karbopol 941 jeli içinde 5 U/kg ve 10 U/kg konsantrasyonda [Asu^{1,7}] eel CT, plazma kalsiyum seviyesini belirgin şekilde düşürürken, 1 U/kg konsantrasyonda uygulaması etkili olmamıştır³².



Şekil 6. [Asu^{1,7}] eel CT'nin, sıçanlara nazal yolla uygulama sonrası plazma kalsitonin düzeyindeki değişikliklere, poliakrilik asit (PAA) jelin (%0.1 a/h) pH değerinin etkisi. ●:pH 5.5 PAA jel, ▲:pH 6.5 PAA jel, ■:pH.7.5 PAA jel, o: tuz çözeltisi (Ortalama ± Standart hata; n=5)³².

Bir başka çalışmada i.n. uygulanan sCT'ye absorpsiyon arttırıcıların etkisi i.m. uygulamayla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir³³. Çalışmada, on sağlıklı gönüllüye birinci gün 200 IU/doz sCT içeren ticari i.n. spray formu (Calcitonin Sandoz®), takip eden günlerde % 0.5 sodyumtaurodihidrofosfidat (STDHF) ile birlikte 100 IU, 205 IU ve 405 IU sCT içeren i.n. spray formu, beşinci gün 100 IU sCT içeren ticari i.m. formu (Kalsinar®) uygulanarak plazma sCT düzeyleri karşılaştırılmıştır. RIA yöntemiyle ölçülen plazma sCT düzeyleri, tüm i.n. formülasyonlarda, uygulamadan sonra 10 dk. içinde maksimuma ulaşmış ve daha sonra hızla düşmüştür³³. Buna karşın i.m. dozun davranışının daha yavaş olduğu görülmüştür. Plazma sCT profilleri maksimum konsantrasyona ulaşmada farklılık göstermekle birlikte STDHF içeren formlarda iki kişi haricinde doza bağlı artan cevap kaydedilmiştir.

STDHF ve üç ayrı dozda sCT içeren i.n. formların biyoyararlılığı, ticari formların biyoyararlılığı ile AUC değerleri kriter alınarak karşılaştırıldığında, % 0.5 STDHF ve 100 IU sCT içeren i.n. spray formunun AUC değeri, 200 IU/doz sCT içeren ticari i.n. spray formunun AUC değerinden anlamlı olarak farklı bulunmamıştır. Aynı zamanda % 0.5 STDHF ve 405 IU

sCT içeren i.n. sprey formun AUC değeri, 100 IU sCT içeren ticari i.m. formun AUC değerinden anlamlı olarak farklı bulunmamıştır ($p=0.05$). Buna karşın % 0.5 STDHF ile birlikte 205 IU sCT ve 405 IU sCT içeren i.n. sprey formun AUC değeri, 200 IU/doz sCT içeren ticari i.n. sprey formunun AUC değerinden anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Ayrıca % 0.5 STDHF ile birlikte 100 IU sCT ve 205 IU sCT içeren i.n. sprey formun AUC değeri ile 200 IU/doz sCT içeren ticari i.n. sprey formunun AUC değeri, 100 IU sCT içeren ticari i.m. formun AUC değerinden belirgin olarak farklı bulunmuştur³³. % 0.5 STDHF ile birlikte 205 IU sCT içeren intranasal formülasyonun biyoyararlılığı, 200 IU sCT içeren ticari formülasyonun biyoyararlılığından 4.7 kat fazla bulunmuştur (Tablo 1). Bu da STDHF'nin, sCT'nin nazal absorpsiyonunu arttırabileceğini göstermektedir³³.

Tablo 1. sCT^a'nin Intramüsküler (İM) ve İntranasal (İN) Uygulamasının Farmakokinetik Parametreleri³³.

Doz (µg)	AUC (pg dk/mL)	CV(%)	Cmax (pg/mL)	Tmax (dk)	%F(gruplar arası)	%F(grup içi)
İM, 100 U(25)	11.376	47	206	120	—	—
İN, 200 U(40)	294	148	4.8	10	1.6	2.9
İN, 100 U(20) ^b	355	165	16.8	5	3.9	3.1
İN, 205 U(41) ^b	1.477	68	70.7	10	7.9	9.6
İN, 450 U(90) ^b	3.041	76	154	10	7.4	10.3

a: bütün doz hacimleri 2x 100 µL dir

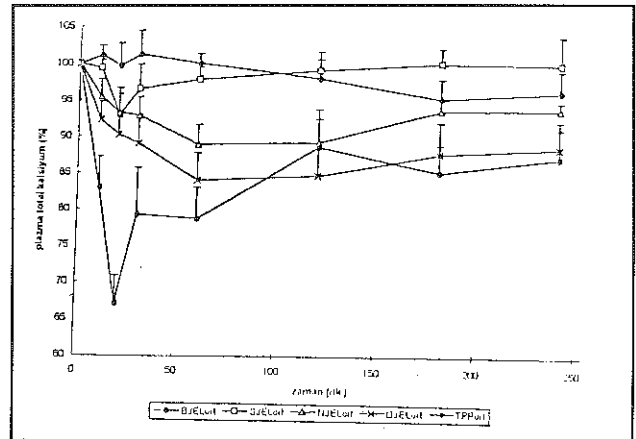
b: Nazal uygulanan formülasyonlar %0.5 STDHF içermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada sCT'nin dozuna bağlı olarak biyoyararlanımın arttığı görülmüş, bunun da nazal mukozadaki spesifik olmayan bağlanmadan, sCT'nin yüksek konsantrasyonda artan termodinamik etkisinden ve doyurulabilir proteaz etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ayrıca çalışmada, bazı deneklerde mukozal iritasyon, yüzde kızarma gibi yan etkiler görüldüğü de belirtilmiştir³³.

Bir başka çalışmada ise, tavşanlara i.n. yolla uygulanan sCT'ye dimetil-β-siklodekstrin (DMβCD) ve sodyum taurokolat (STK) gibi absorpsiyon artırıcıların etkisi, i.v. uygulamayla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir^{34,35}. Tavşanlara % 1 a/h poliakrilik asit jeli içinde 10 IU/kg dozda sCT uygulanarak oluşan hipokalsemik etki izlenmiştir. Çalışmada, birinci saatin sonunda, absorpsiyon artırıcı olarak % 5 DMβCD kullanıldığında plazma total kalsiyum düzeylerinde % 15.9±3.8'lik, %1 STK kullanıldığında ise %11±2.7'lik azalma görülmüştür

(Şekil 7). Bu sonuçlar, Schipper ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmayla benzerlik göstermektedir³⁶. Schipper ve arkadaşları, tavşanlara 12.6 IU/kg dozda sCT çözeltisini, % 5 DMβCD ile birlikte uyguladıklarında, dördüncü saatin sonunda plazma kalsiyum düzeylerinde % 9±3.9'luk bir azalma kaydetmişlerdir³⁶. Bu azalış, i.v. uygulamayla elde edilen hipokalsemik etkiyle kıyaslanabilir derecede bulunmuştur.

Yapılan diğer bir çalışmada, nazal olarak uygulanmış sentetik sCT'nin etkisi beş Page'tli hastada incelenmiştir³⁷. Yaşları 62 ile 75 arasında değişen 5 denekten üçüne günde 400 IU sCT, diğer ikisine günde 200 IU sCT uygulanmıştır. Bir hastada tedaviye başladıktan 3 ay, diğerlerinde 4 ay sonra 400 IU doz, 200 IU'ye indirilmiştir. Klinik ve laboratuvar



Şekil 7. İ.N. yolla uygulanan (10 IU/kg) sCT jel formülasyonlarının ve İ.V. yolla uygulanan (10 IU/kg) ticari preparatın (TPP) uygulanmasıyla elde edilen plazma ortalama % total kalsiyum düzeyleri (n=7) (BJEL: %1 (a/h) Karbopol 941 jeli, SJEL: %1 (a/h) Karbopol 941+sCT jeli, NJEL: %1 (a/h) Karbopol 941+sCT+%1 (a/h) Sodyum Taurokolat jeli DJEL: %1 (a/h) Karbopol 941+sCT + %5 (a/h) DMβCD jeli, TPP: 100 IU sCT)³⁵.

testler aylık olarak, radyolojik testler 3 ve 6 ay sonra değerlendirilmiştir. Günde 200 veya 400 IU dozda uygulanan nazal sentetik sCT sprey, Paget'li beş hastanın hem klinik hem de biyolojik parametrelerde düzelmeye neden olmuştur. Ortalama serum alkalen fosfataz (S-ALP) veya hidrokisprolin/kreatinin oranı (OH/Cr) düzeyleri, ilk üç ayda belirgin şekilde azalma göstermiş, daha sonra tedavinin sonuna kadar sabitlenmiştir. Nazal sprey iyi tolere edilmiş, sentetik sCT uygulamasıyla görülebilen yan etkiler görülmemiştir. Mukozal irritasyonun oluşmaması, yan etkilerin görülmeşi ve ilacın klinik ve biyolojik etkisi nedeniyle, tüm hastalara 5 aylık tedavi uygulanabilmiş, ayrıca günlük uygulanan 200 IU ile 400 IU dozlar arasında, biyolojik açıdan belirgin farklılık bulunamamıştır. Sonuç olarak, Paget hastalığında, sentetik sCT'nin 200 IU/gün dozu yeterli olmaktadır. Ayrıca sentetik sCT'nin, parenteral uygulanmasıyla görülen alışılmış yan etkiler nazal sprey ile taşınmasıyla görülmediği gibi uygulanabilirliği de daha kolaydır. Yapılan bu çalışma, hasta sayısının az olmasına rağmen, sentetik sCT'nin nazal spreyi, etkisinin derecesi, sürekliliği ve tolere edilebilirliği açısından parenteral yola alternatif olabileceğinden, ümit verici bulunmuştur³⁷.

Bir başka çalışmada, sıçanlarda, sCT'nin nazal absorpsiyonuna proteolitik enzim inhibitörlerinin etkisi incelenmiştir³⁸. Enzim inhibitörü olarak, bestatin, diprotinin, leupeptin, aprotinin, soya yağı tripsin inhibitörü ve kamostat mesilat kullanılmıştır. sCT'nin nazal absorpsiyonu, hipokalsemik etki ölçülerek değerlendirilmiştir. Sıçan nazal mukoza dokusunun peptidaz aktiviteleri yüksektir ve peptitaz aktivitesi sırasıyla şöyle bulunmuştur: Leusin aminopeptidaz (her 1 mg protein için 2.72 nmol/dk.), dipeptidil aminopeptidaz (her 1 mg protein için 1.84 nmol/dk.), katapsin (her 1 mg protein için 650 pmol/dk.) ve tripsin (her 1 mg protein için 4.61 pmol/dk.). pH 7.0'de 10 IU/kg uygulanan sCT düşük (% 3.2) biyoyararlanım göstermiştir. Bestatin (aminopeptidaz inhibitörü, 0.01-1 mM) veya diprotinin A (dipeptidil peptidaz inhibitörü, 0.1-1 mM) ile uygulama, hipokalsemik etkiyi değiştirmemiştir. Aprotinin (tripsin inhibitörü, 10³ ve 10⁴ KIU/mL ile kamostat mesilat (aminopeptidaz ve tripsin inhibitörü, 0.1-10⁻¹⁰ mM) veya leupeptin (tripsin ve katapsin B inhibitörü, 0.1-1 mM) ile uygulama sonucu

sCT'nin nazal absorpsiyonu, böylece hipokalsemik etkide artış bulunmuştur³⁸. Çeşitli pH değerlerinde (4.0, 7.0 ve 8.0) sCT'nin hipokalsemik etkisi en yüksek pH 4.0'te bulunmuştur. 10⁴ KIU/mL aprotinin varlığında, pH 4.0 ve 7.0'te 10 IU/kg sCT'nin nazal uygulamasından sonra biyoyararlılık, pH 4.0 ortamında % 5.4'ten % 7.5'e; pH 7.0 ortamında % 3.2'den % 6.9'a artmıştır. Böylece, tripsin inhibitör aktivitesine sahip inhibitörlerin, sCT'nin nazal absorpsiyonunu arttırmada, etkili olduğu belirtilmiştir³⁸.

KALSİTONİNİN PULMONER YOLLA UYGULANIŞI

Peptit ve protein yapılı maddelerin pulmoner yoldan verilmesi son zamanlarda önem kazanmıştır. Patton ve arkadaşları, sıçanlarda, sCT ve hCT'nin pulmoner absorpsiyonunu incelemişlerdir. 50 µg sCT ve hCT içeren 100 µL sitrat tampon çözeltisi önce kuyruk veninden uygulanmış, daha sonra aynı dozda intratekal uygulama yapılmıştır. Kandaki kalsitonin düzeyi Radioimmunoassay (RIA) yöntemiyle tayin edilmiştir. Çalışmada hCT ve sCT'nin intratekal absorpsiyonu benzer şekilde; mutlak biyoyararlılıkları yaklaşık % 17 bulunmuştur¹⁶.

Okumura ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise sıçanlara intratekal yolla uygulanan eCT'nin biyoyararlılığı i.m. uygulama ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada plazma CT düzeyleri RIA yöntemiyle değerlendirilmiştir. 20 U/kg ve 40 U/kg dozda toz eCT'nin, sıçanlara intratekal yolla uygulanması sonucu i.m. uygulamaya göre bağıl biyoyararlılık % 10.6 ve % 11.5 bulunmuştur¹⁷. Aynı çalışmada dört sağlıklı gönüllüye 300 ve 600 U toz eCT oral inhalasyon yoluyla uygulanmış ve bağıl biyoyararlılık % 1.98 ve % 2.0 bulunmuştur¹⁷. Bu sıçanlarda elde edilen bağıl biyoyararlılığın yaklaşık % 20'si kadardır. Bunun nedeninin, toz kalsitoninin büyük kısmının orofarenkste depolanmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bunun üzerine orofarenks tutulmasının gerçekleşemeyeceği laringotomize edilmiş kişilerde aynı deney tekrarlandığında, benzer sonuçlarla karşılaşılmıştır. Bunun üzerine toz eCT'nin büyük kısmının trakeada tutulmasından dolayı absorpsiyonun gerçekleşemediği sonucuna varılmıştır¹⁷.

KALSİTONİNİN İNTESTİNAL YOLLA UYGULANIŞI

Son zamanlarda, kalsitoninin intestinal yolla uygulanışıyla ilgili çalışmalar yapılmış, ancak çok başarılı sonuçlar elde edilememiştir. hCT'nin barsaktaki proteolitik parçalanmasını azaltmak amacıyla, poliizobutil akrilat ile enkapsüle edilerek nanopartikülleri hazırlanmıştır. Böylece hCT nanopartiküllerinin, çözelti formuna göre, daha yavaş salım yapması sağlanmıştır. Wistar sıçanlara 0.2 mg/kg dozda CT içeren nanopartiküller uygulandığında, uzun süre boyunca barsakta kalması sağlanmıştır. Ancak nanopartiküller, peptitin adsorpsiyonunu arttırmada etkili olamamıştır¹⁸.

Bir başka çalışmada ise yine hCT'nin intestinal adsorpsiyonu ve stabilitesi üzerine yardımcı maddelerin etkisi incelenmiştir. Polimerik boncuklara hCT yüklenerek, Sprague-Dawley sıçanların duodenum ve kolonuna uygulanmıştır. Ayrıca çalışmada dodesil maltosit ve sodyum dodesil sülfat gibi yardımcı maddelerin, hCT'nin adsorpsiyonuna ve stabilitesine olan etkisi incelenmiştir. Sonuçta dodesil maltosit kullanılan ve duodenuma uygulanan hCT'nin en iyi hipokalsemik etki sağladığı bulunmuştur¹⁹. Ayrıca çalışmada en dayanıklı formülasyonun % 1 sodyum dodesil sülfat içeren boncuklar olduğu ortaya konmuştur¹⁹.

KALSİTONİNİN NANOKAPSÜL, BONCUK ve MİKROKÜRE FORMÜLASYONLARINDA UYGULANIŞI

Kalsitoninin parenteral yoldan verilmesinde kontrollü salımını sağlamak ve biyoyararlanımını arttırmak amacıyla mikroküre, nanokapsül ve boncuk formülasyonları hazırlanmıştır. Vranckx ve arkadaşları tarafından yapılmış çalışmada, sCT'nin nanokapsülleri hazırlanarak, sıçanlarda oral adsorpsiyonu incelenmiştir. Hazırlanan 50 nm. çapına sahip nanokapsüller her sıçana 100 IU/kg dozda oral yolla uygulanırken, aynı dozda sCT'nin sulu çözeltisi i.v. ve oral yolla uygulanarak karşılaştırma yapılmıştır. Buna göre sCT'nin sulu çözeltisi uygulanan sıçanların kalsiyum düzeylerinde herhangi bir değişiklik gözlenmezken, nanokapsül formunun mutlak biyoyararlılığı % 45.9 bulunmuştur²⁰.

Aydın ve arkadaşları, tripolifosfat çözeltisine, kitozanın sCT içeren çözeltisini damlatarak sCT yüklü kitozan boncukları hazırlamışlardır. pH 6.0'da en iyi kaplanan boncukların çapı 0.9 mm ve etken madde miktarı % 54-59 arasında bulunmuştur. Yüklü boncuklardan sCT'nin salım özellikleri incelendiğinde, ilk gün % 20'den az bir patlama etkisinin görüldüğü ve salımın 27. güne kadar devam ettiği saptanmıştır. Çalışmada yüklenen sCT konsantrasyonunun salıma etki etmediği de görülmüştür. Sonuç olarak kitozan boncuklar kullanılarak sCT'nin kontrollü salımının sağlanabileceği saptanmıştır³⁹.

Bir diğer çalışmada ise, sCT'nin poliglikolik asit mikroküreleri hazırlanmıştır. Üç farklı yükleme dozunda (% 0.3, % 4.5 ve % 7.5) Wistar sıçanlara uygulanan mikrokürelerin oluşturdukları hipokalsemik etki arasında belirgin farklılık gözlenmemiştir²¹. Bunun üzerine, sıçanlara 0.4 U/kg, 1.2 U/kg ve 3.6 U/kg dozda sCT içeren % 0.3 yüklü mikroküreler ve 0.4 U/kg dozda toz sCT uygulanmış ve toz sCT'nin sadece 2-3 saat hipokalsemik etki göstermesine karşın, mikroküre formülasyonlarının 24 saat boyunca etkili olduğu bulunmuştur. 3.6 U/kg dozda uygulama yapılan sıçanların plazma sCT düzeyleri, uygulamadan beş gün sonra bile toz sCT'nin oluşturduğu plazma sCT düzeyi ile karşılaştırılabilir düzeyde bulunmuştur²¹.

Peptitlerin biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerle etkileşmesi, mikrokürelerin hazırlanmasında oldukça önemlidir. sCT'nin biyolojik olarak parçalanabilen polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) ve poliglikolik-ko-laktik asit (PGLA) gibi polimerlerle etkileşmesi incelenmiş ve bu polimerlerin sCT'nin salım özelliklerini değiştirdiği bulunmuştur⁴⁰. Yapılan diğer bir çalışmada sCT'nin parenteral yolla taşınabilmesi için parçalanabilen mikroküre formları hazırlanmıştır. Sentetik polilaktik glikolikasit (PLGA) polimeri kullanılarak çözücü ekstraksiyon yöntemiyle boş mikroküreler hazırlanmış ve bu mikrokürelere sCT'nin adsorpsiyonu veya tutulması sağlanmıştır²². Çalışmada ayrıca çeşitli miktarda kalsitonin içermeyen mikrokürelerin (2.5, 5 ve 10 mg) % 1 mg/mL sCT çözeltisiyle muamelesi sonunda sCT'nin adsorpsiyon kinetiği de incelenmiştir. Buna göre 10 mg mik-

roküre kullanıldığında 12.saatte, 5 mg mikroküre kullanıldığında 24. saatte ve 2.5 mg mikroküre kullanıldığında 48. saatte maksimum adsorpsiyona ulaştığı gözlenmiştir²². Hazırlanan sCT mikrokürelerinin in vivo değerlendirilmesi, dişi sıçanlara s.c. uygulanarak yapılmıştır. Uygulama sonrası, serum sCT konsantrasyonları günlük olarak, 14 gün boyunca izlenmiş, miktar tayini RIA yöntemiyle yapılmıştır. Buna göre sıcaklığın kontrolü yöntemiyle hazırlanan ve % 3.5 sCT içeren mikrokürelerin sıçanlara 40 U/kg subkütan (s.c.) yolla uygulanmasıyla, ilk dört gün boyunca düşük, beş ile dokuzuncu günler arasında yüksek ve onuncu gün tekrar düşen plazma sCT konsantrasyonları izlenmiştir. PLGA mikrokürelerinin yüzeyine sCT'nin adsorplanması ve tutulmasıyla hazırlanan formların karışımının sıçanlara 40 U/kg s.c. uygulanmasıyla iki aşamalı salım gözlenmiştir. Başlangıçtaki salım hızı düşük fakat ölçülebilir, dördüncü günden sonra yüksek konsantrasyon sağlayan sürekli salım görülmüştür. Sonuç olarak, peptitlerin parçalanabilen mikrokürelerinin hazırlanmasında sentetik PLGA polimerinin uygun olduğu ve polimerin parçalanma hızının, molekül ağırlığı ve matris yapısı seçilerek kontrol edilebileceği, ayrıca mikrokürelerin çözücü ekstraksiyon yöntemiyle hazırlanabileceği bulunmuştur²².

SONUÇ

Yapılan çalışmalarda kalsitoninin değişik mukozalardan absorpsiyonu değerlendirilmiştir. Çalışmalara göre CT'nin vajinal, rektal, bukkal ve nazal mukozalardan absorpsiyonunun gerçekleştiği, ancak bunun enzim inhibitörleri veya absorpsiyon arttırıcı maddelerle daha da arttırılarak parenteral yolla kıyaslanabilecek düzeye getirileceği gözlenmiştir. sCT'nin vajinal veya nazal absorpsiyonunu değerlendiren çalışmalarda, enzim inhibitörlerinden tripsin, pepstatin, bestatin ve leupeptinin, peptit yapılı maddenin absorpsiyonunu arttırmada başarılı olduğu bulunmuştur. Enzim inhibitörleri, enzimatik reaksiyonlara karşı CT'yi stabilize ederek absorpsiyonu arttırmada etkili olmaktadır. Ayrıca safra tuzları, dihidrofusidatlar ve kompleks yapıcı ajanlar gibi absorpsiyon arttırıcı maddeler kullanılarak CT'nin mukozal yollardan ab-

sorpsiyonunun arttırılabileceği görülmüştür. Yapılan çalışmalarda sodyum deoksikolat, sodyum turokolat, sodyum lauril sülfat, sodyum miristat ve quillaja saponinin CT'nin bukkal absorpsiyonu; siklodekstrin türevlerinden DM β CD ve sodyumtaurodihidrofusidat ise nazal absorpsiyonu arttırmada etkili olduğu saptanmıştır. Bunun yanısıra pulmoner ve intestinal mukozalardan uygulanan CT'nin absorpsiyonunun vajinal, nazal, rektal ve bukkal uygulamaya kıyasla daha az olduğu görülmüştür. İntestinal mukozaya uygulamanın, CT'nin absorpsiyonunu arttırmada pek fazla başarılı olmadığı bulunmuştur.

Sonuç olarak mukozal yollardan rektal, vajinal, bukkal ve özellikle nazal yoldan uygulanan CT'nin absorpsiyonunun uygun olduğu bunun yanısıra pulmoner ve intestinal yoldan çok iyi sonuçlar alınmadığı ve çalışmaların sürdürülmesi gerektiği bulunmuştur. Nazal yoldan uygulamanın parenteral yola bir alternatif olabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Albert, LL, Biological Aspects of Hormone Action, Biochemistry Lehninger, Newyork, Worth Publishers, Inc., pp.826-827, 1976.
2. Deftos, LJ, Weisman, MH, Williams, GW, Karpf, DB, Frumar, AM, Davidson, BJ, Parthemore, JG, Judd, HL, Influence of Age and Sex on Plasma Calcitonin in Human Beings, *N.Eng.J.Med.*, 302, 1351-1353, 1980.
3. Atik, Ş, Şatana, T, Sarban, S, Hersekli, MA, Osteoporoz, G.Ü. Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji A.B.D., Seminer, Ankara, pp 44-47,1995.
4. Sayani, AP, Chien, YW, Systemic Delivery of Peptides and Proteins Across Absorptive Mucosae, *Crit. Rev. Therap. Drug. Carr. Syst.*, 13, 85-184, 1996.
5. Richardson, JL, Miglietta, M, Vaginal Administration of Calcitonin in Rats in Sheep Using Microspheres of Hyaluronane Esters, *Proceed Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 20, 103-104, 1993.
6. Nakada, Y, Awata, N, Some Factors Affecting the Vaginal Absorption of Human Calcitonin in Rats, *Int.J.Pharm.*, 89, 169-175, 1993.
7. Morimoto, K, Akatsuchi, H, Enhanced Rectal Absorption of (Asu1,7)-eel Calcitonin in Rats Using Polyacrylic Acid Aqueous Gel Base, *J.Pharm.Sci.*, 73, 1366-1368, 1984.
8. Pagani, G, Pagani, MD, Gianola, D, Pedroncelli, A, Cortesi, L, Gherardi, F, Gualteroni, L, Tengattini, F, Montini, Hypocalcemic Effects of Rectal and Intramuscular Administration of Synthetic Salmon Calcitonin, *Int.J.Clin.Pharm.Ther.Toxicol.*, 29, 329-332, 1991.

9. Buclin, T, Randin, JP, The Effect of Rectal and Nasal Administration of Salmon Calcitonin in Normal Subjects, *Calcif Tissue Int.*, 41, 252-258, 1987.
10. Nakada, Y, Awada, N, The Effect of Additives on the Oral Mucosal Absorption of Human Calcitonin, *J. Pharmabio. Dyn.*, 11, 394-401, 1988.
11. Fiore, CE, Romagnoli, A, Foti, R, Coppini, A, Assessment of the Biological Activity of Synthetic Salmon Calcitonin by Intranasal Administration in Healthy Volunteers, *Drugs.Exptl. Clin. Res.*, 17, 537-542, 1991.
12. Kurose, H, Seino, Y, Intranasal Absorption of Salmon Calcitonin, *Calcif. Tissue Int.*, 41, 249-251, 1987.
13. Gonzalez, D, Vega, E, Ghiringhelli G, Mautalen, C, Comparison of the Acute Effect of the Intranasal and Intramuscular Administration of Salmon Calcitonin in Paget's Disease, *Calcif Tissue Int.*, 41, 313-315, 1987.
14. Pontiroli, AE, Intranasal Administration of Calcitonin and of Other Peptides: Studies With Different Promoters, *J. Control Rel.*, 13, 247-251, 1990.
15. Kagatani, S, Shinoda, T, Enhancement of Nasal Salmon Calcitonin Absorption by Lauroylcarnitine Chloride in Rats, *Pharm.Res.*, 13, 739-743., 1996.
16. Patton, JS, Trincherro, P, Platz, RM, Bioavailability of Pulmoner Delivered Peptides and Proteins a-Interferon, Calcitonin and Parathyroid Hormones, *J.Cont.Rel.*, 28, 79-85, 1994.
17. Okumura, K, Komada, S, Intratracheal Delivery of Calcitonin Dry Powder in Rats and Human Volunteers, *S.T.P.Pharm.Sci.*, 4, 45-49, 1994.
18. Lowe, PJ, Temple, CS, Calcitonin and Insulin in Isobutylcyanoacrylate Nanocapsules: Protection Against Proteases and Effect on Intestinal Absorption in Rats, *J.Pharm.Pharmacol.*, 46, 547-552, 1994.
19. Baudys, M, Serres, A, Mix, D, Kim, SW, Stabilization and Intestinal Absorption of Human Calcitonin, Seventh Int. Symp. on Ree. Adv. in Drug Del. Symp., 15-19, 1995.
20. Vranckx, H, Demoustier, M, Deleers, A New Nanocapsule Formulation with Hydrophilic Core: Application to the Oral Administration of Salmon Calcitonin in Rats, *Eur.J.Pharm.Biopharm.*42, 345-347, 1996.
21. Lee, KC, Soltis, EE, Newman, PS, Burton, KW, Mehta, RC, DeLuca, PP, In Vivo Assessment of Salmon Calcitonin Sustained Release from Biodegradable Microspheres, *J.Cont. Rel.*, 17, 199-206, 1991.
22. Mehta, RC, Jeyanthi, R, Calis, S, Thanoo, BC, Burton, WK, DeLuca, PP, Biodegradable Microspheres as Depot System for Parenteral Delivery of Peptide Drugs, *J.Cont.Rel.*, 29, 375-384, 1994.
23. Kayaalp, OS, Kalsiyotropik İlaçlar: Paratiroid Hormonu, D Vitamini, Kalsitonin ve Diğerleri, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Cilt 3, Ankara, Toraman ve Ulucan Matbaası, pp.2579-2610, 1987.
24. Brobeck, JR, Control of Calcium Homeostasis by Parathyroid Hormone, Calcitonin, and Vitamin D, Physiological Basis of Medical Practice, 9th. Ed., Baltimore, The Williams & Wilkins Company, pp 42-49, 1973.
25. Ellerington, MC, Hillard, TC, Whitcroft, SIJ, Marsh, MS, Lees, B, Banks, LM, Whitehead, MI, Stevenson, JC, Intranasal Salmon Calcitonin for the Prevention and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis, *Calcif.Tissue Int.*, 59, 6-11, 1996.
26. Altman, RD, Yudiskas, BC, Synthetic Human Calcitonin in Refractory Paget's Disease of Bone, *Arch. Intern. Med.*,147, 1305-1308, 1987.
27. Merck Index, Eleventh Edition, Merck & Co., Inc., New Jersey, p 249, 1989.
28. Hirai, S, Yoshiki, T, Mima, H, Effect of Surfactants on the Nasal Absorption of Insulin in Rats, *Int.J.Pharm.*, 9, 165-172, 1981.
29. Thamsborg, G, Storm, TL, Sykulski, R, Brinch, E, Nielsen, HK, Effect of Different Doses of Nasal Salmon Calcitonin on Bone Mass, *Calcif Tissue Int.*, 48, 302-307, 1991.
30. Azria, M, Jaeger, P, Effectiveness of Salmon Calcitonin Administered as Suppositories in Tumor Induced Hypercalcemia, *Am.J.Med.*, 82, 745-750, 1987.
31. Pontiroli, A, Alberetto, M, Pozza, G, Intranasal Calcitonin and Plasma Concentrations in Normal Subjects, *Br.Med.J.*, 290, 1390-1391, 1985.
32. Morimoto, K, Morisaka, K, Kamada, A, Enhancement of Nasal Absorption of Insulin and Calcitonin Using Polyacrylic Acid Gel, *J.Pharm.Pharmacol.*, 37, 134-136, 1985.
33. Lee, WA, Ennis, RD, Bengtsson, P, The Bioavailability of Intranasal Salmon Calcitonin in Healthy Volunteers with and without a Permeation Enhancer, *Pharm.Res.*, 11, 747-750, 1994.
34. Yetkin, G, "Kalsitoninin Nazal Emilimi Üzerine Absorpsiyon Arttırıcıların Etkisinin İncelenmesi", G.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 1997.
35. Yetkin, G, Çelebi, N, Özogul, C, Demiryürek, T, The Effect of Absorption Enhancers on Nasal Absorption of Salmon Calcitonin in Rabbits, *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 24, 419-420, 1997.
36. Schipper, NGM, Verhoef, JC, Romeijn, SG, Merkus, FWHM, Methylated β -Cyclodextrins Are Able to Improve the Nasal Absorption of Salmon Calcitonin, *Calcif. Tissue Int.*, 56, 280-282, 1995.
37. Reginster, JY, Albert, A, Salmon Calcitonin Nasal Spray in Paget's Disease of Bone: Preliminary Results in Five Patients, *Calcif. Tissue Int.*, 37, 577-580, 1985.
38. Morimoto, K, Miyazaki, M, Kakemi, M, Effects of Proteolytic Enzyme Inhibitors on Nasal Absorption of Salmon Calcitonin in Rats, *Int.J.Pharm.*, 113, 1-8, 1995.
39. Aydın, Z, Akbuğa, J, Chitosan Beads for the Delivery of Salmon Calcitonin: Preparation and Release Characteristics, *Int. J. Pharm.*, 131, 101-103, 1996.
40. Çelebi, N, Hazrati, AM, Lee, KC, Mehta, RC, Carli, F, DeLuca, PP, Interaction of Salmon Calcitonin With Hydrophobic Biodegradable Polymers, *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 17, 461A-461B, 1990.