Yrd. Doç. Dr.
Elif ATABEK YİĞİT

# KESIN RAPOR

**Çalışma konusu:**

N-Asetil sistein (NAC) ve N-asetil sisteinamidin (NACA) kontakt lenslerden salınımının incelenmesi

**Çalışmanın teorisi:**

Tiyol içeren bir antioksidan olan N-asetil sistein (NAC), solunum yolları rahatsızlıkları, HIV, kalp hastalıkları, asetominofen doz asimi ve kursun zehirlenmesinin tedavisinde kullanımı yıllardır pek çok klinik çalışmanın konusu olmuştur [1]. Çok çeşitli çevresel etkiler, metabolizmanın normal ürünleri olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) fazlasiyla üretimine neden olmakta, bu durum ise oksidatif zarara ve en nihayetinde hücre ölümlerine yol açmaktadır. NAC, -SH grupları sayesinde GSH sentezini uyarmakta ve serbest radikal süpürücüsü olarak görev yapmaktadır [1,4].

NAC'in amit formu olan N-asetil sitein amid (NACA) de önemli bir antioksidandır. NACA, NAC'a göre hücre zarından daha rahat geçebilmektedir. NACA, katarakt, retinal dejenerasyon, yasa bağlı makuller dejenerasyon ve iltihaplı ciğer yaraları gibi çeşitli klinik vakalarda kullanılmaktadır [5-9].

Kontakt lensler gözün kornea tabakasına yerleştirilen ve göz bozukluklarının düzeltilmesinde veya kozmetik amaçlarla kullanılan araçlardır. 2012 yılında kontakt lenslerin tüm dünyada 7.1 milyar dolarlık bir piyasa değerinin olduğu ve yaklaşık olarak 125 milyon kontakt lens kullanıcısı olduğu rapor edilmiştir [10]. Son zamanlarda göz ile ilgili ilaçların (oftalmik) kontrollü bir şekilde salınımında kontakt lenslerin kullanıldığı çalışmalar dikkat çekmektedir. Örneğin, Karlgard ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada hem kontakt lens materyalinin hem de ilacın, yükleme ve salınım davranısını

önemli ölçüde etkilediğini belirtmişlerdir [11]. Schultz ve Morck [12] epidermal büyüme faktörünün bazı kontakt lensler aracılığıyla salınımının mümkün olabildiğini göstermişlerdir. Hsiue, Guu ve Chend [13], göz tansiyonunun tedavisinde kullanılan pilokarbin isimli ilacın kontakt lensler aracılığıyla salınımının mümkün olduğunu ve hatta ilacın gözün kornea tabakasında kalış suresinin uzatıldığını ifade etmişlerdir. Benzer şekilde White ve arkadaşları [14], hidriksipropil metilselulozun, Ali ve arkadaşları [15], ketotifen fumeratin, Chauhan ve Jung [16] ise timololun kontakt lenslerden başarıyla salınabildiğini gösteren çalışmalar yapmışlardır.

Bu çalışmada pek çok göz rahatsızlığıyla ilgili olarak olumlu etkilere sahip olduğu bilinen NAC ve NACA'nin kontakt lensler aracılığıyla salınımı incelenmiştir.

**Çalışmada kullanılan deneysel teknik:**

**Malzeme ve cihazlar:**

Bu çalışmada üç çeşit kontakt lens; Soflens Multi-Focal (hilafilcon B, from Bausch&Lomb, Rochester, NY, base curve is 8.8 mm, lens diameter is 14.5 mm); 1-Day Acuvue TruEye (narafilcon A, from Johnson&Johnson Vision Care, Inc., Jacksonville, FL, base curve is 8.5 mm, lens diameter is 14.2 mm); and Frequency 55 (methafilcon B, from CooperVision Inc., Scottsville, NY, base curve is 8.4 mm, lens diameter is 14.4 mm) kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan diğer kimyasallar ise: Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS), N-acetylcysteine (NAC) and hydrochloric acid (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO). Acetonitrile, methanol, o-phosphoric acid and acetic acid (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), N-(1-pyrenyl)-maleimide (NPM) (Aldrich, Milwaukee, WI, USA), N-acetylcysteine amide (NACA) (David Pharmaceuticals, USA)'dir.

Kontakt lenslerden NAC ve NACA'nin salınımı ise HPLC cihazı (Shimadzuu, auto Sampler Plus, LC Pump Plus, FL Plus Detector, and a Reliasil ODS-1 $C_{18}$ column with 250 Å ~4.6 mm i.d.) kullanılarak belirlenmiştir.

**Yöntem:**

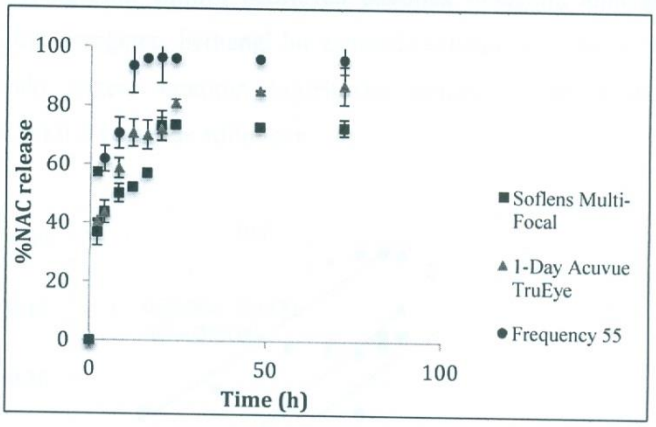
NAC ve NACA hava ve isik ile temas ettiğinde kolaylıkla okside olduğundan dolayı, deneylere başlamadan önce NAC ve NACA'nin okside olması ile ilgili bir on çalışma yapılmış ve ayrıca kontakt lenslerin sıvı içerisinde şişme yüzdeleri de hesaba katılarak optimum yükleme ve salınım suresi tespit edilmiştir. Bu çalışmaların sonuçlarından hareketle, her iki madde için de optimum yükleme ve salınım suresi 72 saat olarak belirlenmiştir.

NAc ve NACA'nin her ikisinin de 3mM 10 mL çözeltileri (PBS içinde) falkon tupleri içerisinde hazırlanmış ve ışıktan etkilenmemeleri için alüminyum folyo ile sarilmis ve yükleme ve salınım deneylerinde kullanılmıştır. Yükleme için; kontakt lensler paketlerinden çıkarılarak distile su ile yıkandıktan sonra, belirtilen çözeltiler içerisine alinmiş ve 72 saat bekletilmiştir. Salınım deneylerinde ise, NAC ve NACA ile yüklenmiş kontakt lensler bu çözeltilerden çıkartılarak PBS içerisine alinmis ve 2,4,8,12,16,20,24,48 ve 72. saatlerde çözeltilerden numuneler alınarak HPLC ile analiz edilmiştir. HPLC ile NAC ve NACA'nin bilinen derişimlerine ait analizleri neticesinde elde edilen ve başlangıçta hazırlanan standart eğriler, numunelerin derisimlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Her bir deneme için 3 kontakt lens kullanılmış ve daha sonra sonuçlar ortalama değer ± standart sapma olarak verilmiştir.

**Sonuçlar:**

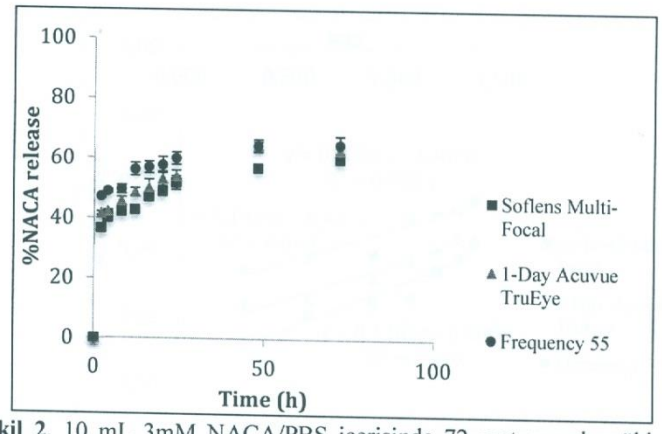
Kontakt lenslerin 10 mL 3 mM NAC çözeltisinde 72 saat bekletildikten sonra PBS içerisine alınması ve belirli zamanlarda alınan numunelerin HPLC ile analiz edilip derisimlerinin hesaplanmasıyla Sekil 1'de gösterilen grafik elde edilmiştir. Buna göre Frequency 55, 72 saatte yüklenen NAC'in %96.0±0.7 'sini, 1-Day Acuvue TruEye % 87.1±3.4'unu ve Soflens Multi-Focal ise %73.5±0.6'sini salmıştır. Sekil 1'den tüm lenslerin yaklaşık olarak 24 saat içerisinde dengeye ulaştıkları görülmektedir. Bu sure

içerisinde Frequency 55, yüklenen NAC'in %95.9±2.7'sini, 1-Day Acuvue TruEye %80.9±1.2'sini ve Soflens Multi-Focal ise %72.8±2.8'ini salmaktadır.



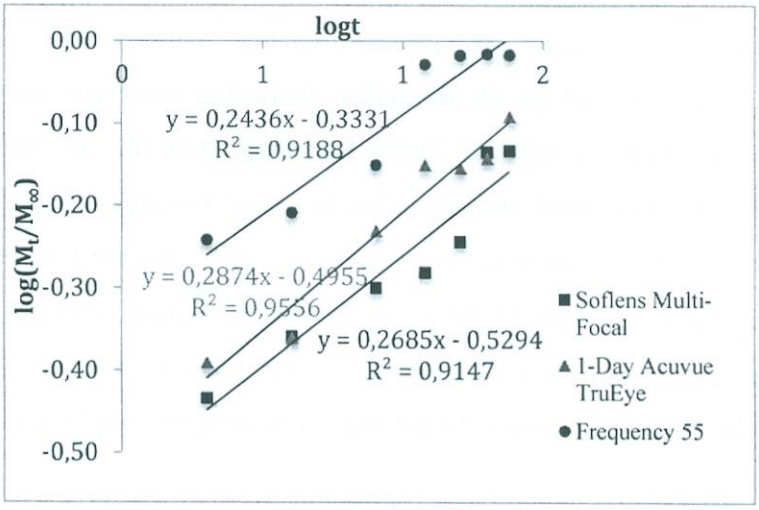

**Sekil 1.** 10 mL 3mM NAC/PBS içerisinde 72 saat sureyle yüklenen kontakt lenslerin PBS içerisinde salınım profilleri. Veriler ortalama değer ± standart sapma olarak verilmiştir (n=3).

Sekil 2'de NACA'nin kontakt lenslerden salınım profilleri görülmektedir. Buna göre 72 saatte Frequency 55 yüklenen NACA'nin %64.9±2.9'unu, 1-Day Acuvue TruEye %63.0±2.2'sini ve Soflens Multi-Focal ise %60.0±0.6'sini salmaktadır. 24 saat sonunda ise Frequency 55 yüklenen NACA'nin %60.0±2.1'ini, 1-Day Acuvue TruEye %54.0±1.9'unu ve Soflens Multi-Focal ise %51.9±2.3'unu salmıştır.

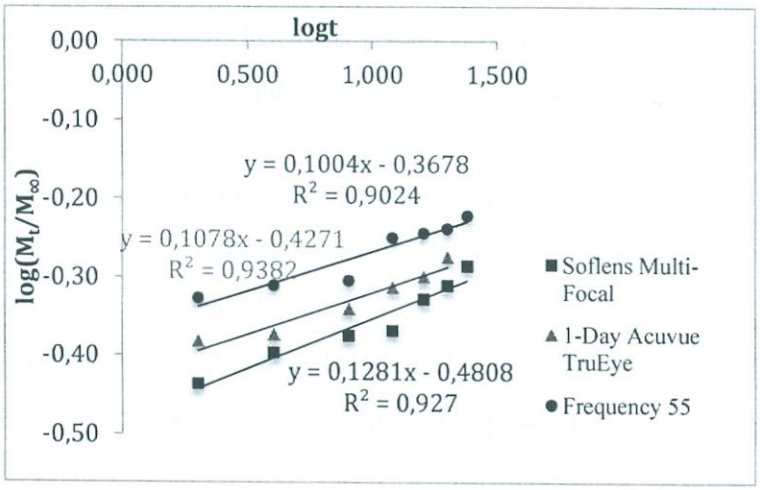



**Sekil 2.** 10 mL 3mM NACA/PBS içerisinde 72 saat sureyle yüklenen kontakt lenslerin PBS içerisinde salınım profilleri. Veriler ortalama değer ± standart sapma olarak verilmiştir (n=3).

Elde edilen salınım profilleri salınımın nasıl gerçekleştiğini anlayabilmek için değerlendirilmiştir. Kontakt lenslerden ilaç salınımını belirleyen iki mekanizma difüzyon ve şişmedir. Hangisinin kontrol belirleyen basamak olduğunu anlayabilmek amacıyla difüzyon eşitliği gereğince, herhangi bir zamanda salınan NAC veya NACA miktarının denge anındaki değere oranının logaritması zamanın logaritmasına karşı grafiğe geçirilmiş ve Sekil 3 ve 4 elde edilmiştir.




**Sekil 3.** NAC ile yüklenen kontakt lenslerden NAC salinimi için log ($M_t/M_\infty$) değerlerine karşılık log t değerleri. Grafik 24 saat sure ile kaydedilen veriler ile çizilmiştir ve tüm $R^2$'ler 0.91'den büyüktür.




**Sekil 4.** NACA ile yüklenen kontakt lenslerden NACA salinimi için log ($M_t/M_\infty$) değerlerine karşılık log t değerleri. Grafik 24 saat sure ile kaydedilen veriler ile çizilmiştir ve tüm $R^2$'ler 0.91'den büyüktür.

Sekil 3 ve 4'ten hem NAC hem de NACA için salinimin difüzyon ile kontrol edildiği, ancak Fick yasası gereği 1 olması gereken n değerlerinin 1'den uzak oldukları fakat yine de durumun 'daha az Fickian' davranışı olarak nitelendirilebileceği anlaşılmaktadır.

**Değerlendirme:**

Bu çalışma ile pek çok göz hastalığının tedavisinde yararlı etkileri olduğu bilinen NAC ve NACA'nin kontakt lensler aracılığıyla salinimi incelenmiştir. Çalışmanın sonuçlarından hareketle çalışmada kullanılan üç tip kontakt lensin NAC ve NACA'yi salabildikleri ve 24 saat içerisinde NAC ve NACA değerlerinin dengeye ulaştığı belirlenmiştir. Bu sure (24 saat) kullanılan kontakt lenslerin önerilen kullanma suresidir. Böylelikle bu lenslerin NAC ve NACA'nin salinimi için kullanılabilecekleri sonucu ortaya çıkmaktadır. Her iki madde ve her üç tip kontakt lens için salinim mekanizmasını belirleyen difüzyondur. Bu salinimin kontrollü bir şekilde daha uzun sureler içerisinde gerçekleştirilebilmesi ise gelecek çalışmaların konusu olarak düşünülebilir.

**Kaynaklar**


1. Gregory S, Kelly ND. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev.* 1998; 3, 2:114-127.
2. Agnihotri N, Mishra PC. Mechanism of scavenging action of N-Acetyl Cysteine for the OH radical: A quantum computational study. *J. Phys. Chem. B.* 2009; 113: 12096-12104.
3. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot.* 2012; article ID 217037: 1-26.
4. Gurer H, Ozgunes H, Neal R, et al. Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead-exposed rats. *Toxicology.* 1998; 128: 181-189.
5. Aydin B, Yagci R, Yilmaz FM, et al. Prevention of selenite-induced cataractogenesis by N-acetylcysteine in rats. *Curr Eye Res.* 2009; 34, 3:196-201.

6. Chen W, Ercal N, Huynh T, et al. Characterizing N-acetylcysteine (NAC) and N-acetylcysteine amide (NACA) binding for lead poisoning treatment. *J Colloid Interface Sci,* 2012; 371:144–149.
7. Carey JW, Yaman-Pinarci E, Penugonda S, et al. In vivo inhibition of l-buthionine-(S,R)-sulfoximine-induced cataracts by a novel antioxidant, N-acetylcysteine amide. *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 50: 722–729.
8. Schimel AM, Abraham L, Cox D, et al. N-acetylcysteine amide (NACA) prevents retinal degeneration by up-regulating reduced glutathione production and reversing lipid peroxidation. *Am. J. Pathol.* 2011; 178, 5: 2032–2043.
9. Ozdemir G, Tolun FI, Gul M, et al. Retinal oxidative stress induced by intraocular hypertension in rats may be ameliorated by brimonidine treatment and N-acetyl cysteine supplementation. *J Glaucoma.* 2009; 18: 662–665.
10. Nichols JJ. Contact lenses 2012. June 1, 2013. Available at: http://www.clspectrum.com/articleviewer.aspx?articleID=107853. Accessed June 12, 2013.
11. Karlgard CCS, Wong NS, Jones LW, et al. In vitro uptake and release studies of ocular pharmaceutical agents by silicone containing and pHEMA hydrogel contact lens materials. *Int J Pharm.* 2003; 257: 141-151.
12. Schultz CL, Morck DW. Contact lenses as a drug delivery device for epidermal growth factor in the treatment of ocular wounds. *Clin. Exp. Optom.* 2010; 93, 2: 61-65.
13. Hsiue GH, Guu JA, Cheng CC. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) film as a drug delivery system for pilocarpine. *Biomaterials.* 2001; 22: 1763-1769.
14. White CJ, McBride MK, Pate KM, et al. Extended release of high molecular weight hydroxypropyl methylcellulose from molecularly imprinted, extended wear silicone hydrogel contact lenses. *Biomaterials.* 2011; 32: 5698-5705.
15. Ali M, Horikawa S, Venkatesh S, et al. Zero order therapeutic release from imprinted hydrogel contact lenses within in vitro physiological ocular tear flow. *J Control Release.* 2007; 124: 154-162.
16. Chauhan A, Jung HJ. Temperature sensitive contact lenses for triggered ophthalmic drug delivery. *Biomaterials.* 2012; 33: 2289-2300.