
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

(-) - EPİKATEKİN MİKROKÜRE ÜRETİMİ VE KONTROLLÜ SALIMI

Ali ÖZTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
İLERİ TEKNOLOJİLER ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEMMUZ 2019

Ali ÖZTÜRK tarafından hazırlanan "(-)-EPİKATEKİN MİKROKÜRE ÜRETİMİ VE KONTROLLÜ SALIMI" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi İleri Teknolojiler Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Adviye Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP

Beslenme ve Diyetetik Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum. ...……

Başkan: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum. ……...

Üye: Doç. Dr. Ebru KONDOLOT SOLAK

Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum. ……...

Tez Savunma Tarihi: 05/07/2019

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

……..…….

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ali ÖZTÜRK
05/07/2019

(-) - EPİKATEKİN MİKROKÜRE ÜRETİMİ VE KONTROLLÜ SALIMI

(Yüksek Lisans Tezi)

Ali ÖZTÜRK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2019

ÖZET

Yeşil çay ve kakao gibi polifenol içeriği zengin gıdalarda yüksek miktarda bulunan (-)-Epikatekin (EC), antikanser, antidiyabetik, antihipertansif ve antioksidan özellikleri nedeniyle dikkat çekmektedir. Mikroküre hazırlama tekniği, biyoaktif bileşiklerin aktivitelerinin uzun süre muhafaza edilmesini ve etken maddenin organ ya da bölge hedefli serbest bırakılmasını sağlayan önemli bir kontrollü ilaç taşıma sistemidir. Bu çalışmada doğal ve biyouyumlu bir polimer olan sodyum aljinat (NaAlg) ile polivinilpirolidon (PVP) kullanılarak mikroküreler oluşturulmuş ve küreler içerisine EC yüklenmiştir. Mikrokürelerin hazırlanmasında emülsiyon çapraz bağlama yöntemi (Su/Yağ/Su) tercih edilmiştir. Çapraz bağlayıcı olarak kalsiyum klorür ($CaCl_2$) kullanılmıştır. PVP/NaAlg mikrokürelerinden EC salımı, ortam pH'sı 7 ve sıcaklık 37 ^{0}C'de sabit tutularak 24 saat sürede gerçekleştirilmiştir. EC'nin mikrokürelerden kontrollü salımına PVP/NaAlg oranının, EC/polimer oranının ve çapraz bağlayıcı süresinin etkisi araştırılmıştır. Elde edilen mikrokürelerin denge su içerikleri belirlenmiştir. SEM, XRD ve FTIR yöntemleri kullanılarak mikrokürelerin karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve DPPH radikali yakalama testi ile antioksidan kapasiteleri belirlenmiştir. EC'nin PVP/NaAlg polimer karışımı ile enkapsüle edilmesinin, antioksidan özelliklerini koruduğu gösterilmiştir. Salım sonuçları ve tutuklama verimi değerleri, EC'nin PVP/NaAlg polimerleri ile kaplanmasında kullanılan emülsiyon çapraz bağlama yönteminin (Su/Yağ/Su) uygun olduğunu göstermektedir. EC'nin kontrollü salımı için PVP/NaAlg 1/10 ve etken madde/ polimer 1/10 formülasyonlu mikrokürelerin salım miktarı % 36,23 ile en iyi oran olarak tespit edilmiştir. Bu araştırma kapsamında elde edilen EC yüklü mikrokürelerin, doğal kaynaklı olmaları nedeni ile ilaç direnci oluşturmamaları ve düşük toksisiteye sahip özellikleri ile potansiyel ilaç olarak değerlendirilebileceği öngörülmektedir.

Bilim Kodu	:	20308
Anahtar Kelimeler	:	Epikatekin, Mikroküre, Kontrollü Salım, Sodyum Aljinat, Polivinilpirolidon
Sayfa Adedi	:	65
Danışman	:	Doç. Dr. Adviye Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP

MANUFACTURING AND CONTROLLED RELEASE OF (-) - EPICATECHIN

(M. Sc. Thesis)

Ali ÖZTÜRK

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2019

ABSTRACT

Polyphenol rich foods such as green tea and cocoa contain high amount of (-) - Epicatechin (EC) notable for its anti cancer, anti diabetic, anti hypertensive and antioxidant properties. The microsphere preparation technique is an important controlled drug delivery system that ensures that the activities of the bioactive compounds are maintained for a long time and that the active substance is targeted to the organ or region. In this study, microspheres were created using Polyvinylpyrolidon (PVP) and a natural and biocompatible polymer sodium alginate (NaAlg).The emulsion crosslinking method (Water / Oil / Water) was preferred for the preparation of the microspheres. Calcium chloride ($CaCl_2$) was used as crosslinker. EC release from PVP / NaAlg microspheres was carried out in 24 hours by holding ambient pH 7 and temperature constant at 37 ^{0}C. The effect of PVP / NaAlg ratio, EC / polymer ratio and crosslinking time on controlled release of EC from microspheres was investigated. Equilibrium swelling values of the obtained microspheres were determined. Characterization studies of microspheres were carried out using SEM, XRD and FTIR methods and antioxidant capacities were determined by DPPH radical trapping test. Encapsulation of EC with PVP / NaAlg polymer mixture has been shown to maintain its antioxidant properties. Release results and arrest efficiency values indicate that the emulsion crosslinking method (Water / Oil / Water) used to coat EC with PVP / NaAlg polymers is appropriate. For controlled release of EC, the release rate of microspheres with PVP / NaAlg 1/10 and active substance / polymer 1/10 formulation was determined as the best ratio with 36.23%. It is envisaged that the EC loaded microspheres obtained within the scope of this research can be considered as potential drugs because of their natural origin that doesnot cause drug resistance and have low toxicity.

Science Code : 20308

Key Words : Epicatechin, microsphere, controlled release, sodium alginate, polyvinylpyrrolidone

Page Number : 65

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübesi ile beni yönlendiren ve desteğini hep hissettiğim değerli hocam Sayın Doç. Dr. A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP'e çok teşekkür ederim.

Deneylerim süresince laboratuarında sağlamış olduğu cihaz desteğinden ve tez çalışmam süresince tecrübelerinden faydalandığım, manevi desteğini eksik etmeyen sevgili hocam Sayın Doç. Dr. Ebru KONDOLOT SOLAK'a göstermiş olduğu tüm ilgi ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Deneylerim süresince benden desteğini ve yardımını esirgemeyen Seçil KAYA'ya çok teşekkür ederim.

Mikrokürelerin SEM görüntülemeleri için ODTÜ Merkez Laboratuarı ve XRD ve FTIR analizileri için Gazi Fotonik Birimi çalışanlarına teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi yüksek lisans eğitimim boyunca beni destekleyen, fedakârlıklarından ve özverilerinden dolayı haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim annem Cemile ÖZTÜRK'e, eşim Rabiagül ÖZTÜRK' e ve kardeşlerim Murat ÖZTÜRK ve Samet ÖZTÜRK' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET……..... iv

ABSTRACT…….. v

TEŞEKKÜR……. vi

İÇİNDEKİLER……. vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ…… x

ŞEKİLLERİN LİSTESİ……. xi

RESİMLERİN LİSTESİ..... xii

SİMGELER VE KISALTMALAR…… xiii

1. GİRİŞ…….. 1

2. GENEL BİLGİLER……..... 3

2.1. Kontrollü Salım Sistemleri…….. 3

2.1.1. Kontrollü salım sistemlerinin sınıflandırılması……...… 4

2.1.2. Partiküler kontrollü salım sistemleri……..... 9

2.1.3. Kontrollü salım sistemlerinin avantajları……...… 9

2.1.4. Kontrollü salım sistemlerin dezavantajları…….. 10

2.2. Mikroküre……. 11

2.2.1. Mikrokürelerin avantajları…… 12

2.2.2. Mikroküre sentezinde kullanılan polimerler…… 12

2.2.3. Mikroküre sentezinde kullanılacak ideal polimer özellikleri…….…. 14

2.2.4. Mikroküre hazırlamada kontrol edilebilecek faktörler……. 14

2.2.5. Mikroküre hazırlama teknikleri…… 15

2.3. (-) – Epikatekin……..... 18

2.3.1. Yapısı……... 20

2.3.2. Stabilitesi……. 21

2.3.3. Epikatekinin sağlık üzerindeki etkileri……..... 22

Sayfa

2.4. Kullanılan Destek Materyalleri……... 29

2.4.1. Sodyum aljinat…….. 29

2.4.2. Polivinilpirolidon…….. 32

3. MATERYAL VE YÖNTEM…….. 35

3.1. Materyal…….. 35

3.1.1. Kimyasal maddeler…….. 35

3.1.2. Kullanılan cihazlar……..……. 35

3.2. Yöntem…… 36

3.2.1. EC yüklü mikrokürelerin hazırlanması……. 36

3.2.2. EC yüklü mikrokürelerden salım çalışması…….. 38

3.2.3. Mikrokürelerin denge su içeriklerinin tayini……..... 38

3.2.4. Tutuklama verimi (TV)……. 38

3.2.5. DPPH radikal süpürücü aktivite……..…… 39

4. BULGULAR VE TARTIŞMA…….. 41

4.1. Mikrokürelerin % Verim Değerleri, % Tutuklama Verimleri…… 41

4.2. EC'nin Mikrokürelerden Kontrollü Salımı…… 43

4.2.1. Etken madde/polimer oranının EC salımı üzerine etkisi…….. 43

4.2.2. PVP ilavesinin EC salımı üzerine etkisi…….. 44

4.2.3. Çapraz bağlama süresinin EC salımı üzerine etkisi……. 45

4.3. Mikrokürelere Ait Denge Su İçerikleri…… 46

4.4. Mikrokürelerin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri…… 47

4.5. Mikrokürelerin FTIR Spektrum Analizleri…….. 48

4.6. Mikrokürelerin DPPH Radikal Süpürücü Aktiviteleri…… 52

4.7. Mikrokürelerin ve EC nin X-Işını Kırınımı Eğrileri…… 53

5. SONUÇ VE ÖNERİLER…… 55

KAYNAKLAR……... 57

Sayfa

EKLER…….. 63

EK – 1. EC Kalibrasyon Eğrisi……. 64

ÖZGEÇMİŞ……. 65

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. Biyobozunur olmayan polimerler……... 13

Çizelge 2.2. Biyobozunur doğal ve sentetik polimerler……. 13

Çizelge 2.3. Mikroküre hazırlama yöntemleri ve şematik gösterimi……. 15

Çizelge 2.4. Flavonoidlerin kimyasal yapıları……... 19

Çizelge 2.5. Bazı besinlerin EC içeriği…….. 20

Çizelge 3.1. Mikroküre hazırlama koşulları……... 37

Çizelge 4.1. Mikroküre lerin % tutuklama verimleri ve % verim değerleri…….. 42

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. İlaç salım sistemleri…… 3

Şekil 2.2. Difüzyon Kontrollü Sistemler…… 6

Şekil 2.3. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması…… 18

Şekil 2.4. (-)- Epikatekin'in yapısı……. 21

Şekil 2.5. (-) - Epikatekin ve oksidasyon ürünü (-) – epikatekin-o-kinon…….. 23

Şekil 2.6. Sodyum aljinatın kimyasal yapısı:β-D-mannuronik asit (M), α-L-guluronik asit (G)..... 30

Şekil 2.7. Yumurta kafes modelinin oluşumu…… 32

Şekil 2.8. PVP'nin molekül yapısı …… 33

Şekil 3.1. DPPH radikali ile donör molekül EC'nin primer reaksiyon…….. 39

Şekil 4.1. NaAlg mikroküreler de E/P oranının salım üzerine etkisi 43

Şekil 4.2. PVP/NaAlg mikroküreler de E/P oranının salım üzerine etkisi..... 43

Şekil 4.3. PVP ilavesinin salım üzerine etkisi……. 44

Şekil 4.4. Çapraz bağlama süresinin salım üzerine etkisi 45

Şekil 4.5. Hazırlanan boş mikroküreler in % denge su içerikleri 46

Şekil 4.7. FTIR spektrumları 1 49

Şekil 4.8. FTIR spektrumları 2 51

Şekil 4.9. 1. yöntem ile belirlenen DPPH % inhibisyon değerleri 52

Şekil 4.10. 2. yöntem ile belirlenen DPPH % inhibisyon değerleri 52

Şekil 4.11. XRD spektrumları…..…… 54

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 4.1. Boş B_0 formülasyonlu mikrokürenin 5000 büyütmeli SEM görüntüsü 47

Resim 4.2. EC yüklü B_3 formülasyonlu mikrokürenin 1000 büyütmeli SEM görüntüsü..... 47

Resim 4.3. EC yüklü B_3 formülasyonlu mikrokürenin 5000 büyütmeli SEM görüntüsü..... 48

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklamalar**
NaAlg	Sodyum aljinat
PVP	Poli(vinil pirolidon)
$CaCl_2$	Kalsiyum klorür

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
ÇBS	Çapraz bağlama süresi
ÇBD	Çapraz bağlayıcı derişimi
E	Etken madde
EC	(-)- Epikatekin
FTIR	Fourier transform kızılötesi spektroskopisi
P	Polimer
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
UV	Ultraviyole
XRD	X-ışını kırınımı

1. GİRİŞ

Bitkiler biyoaktif özelliklere sahip birçok farklı sekonder metabolit üretir ve fenolik bileşikler bu metabolitlerin önemli örneklerindendir. Bu fenolik bileşikler meyvelerde, sebzelerde, bitkilerde, köklerde, yapraklarda ve tohumlarda ağırlıklı olarak bulunurlar ve sebze ve meyvelere yapısal özellikler, renk, acılık, tat, sıkılık ve lezzet gibi duyusal özellikler, doğal savunma sistemi ve üreme gibi birçok işlevde görevli önemli fizyolojik ve morfolojik özellikler kazandırırlar [1]. Fenolik bileşikler insanlar tarafından beslenme yoluyla tüketildiğinde antioksidan aktivite gibi insan vücudunda da birçok yararlı etki göstermektedirler [2]. Biyoyararlanımları birçok yönden araştırılan bu maddelerin, temel beslenme ihtiyacının ötesinde hücresel bazda insan sağlığına faydalı etkiler oluşturacağı yapılan araştırmalarla ifade edilmektedir [1, 2].

Polifenollerin bu faydalı etkilerini (kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar üzerinde koruyucu ve terapötik etkisi) destekleyen çalışmalar genellikle, insan hücre kültürlerini ve hayvan çalışmalarını kapsayan in vitro deneylerdir. Bu çalışmalarda test edilen dozlar, sıklıkla bireyin besinlerden aldığı miktarlardan çok yüksektir [3]. 2016 yılında yayınlanan bir çalışma da 20 mg/kg/gün *(-)- Epikatekin'*in (EC) ile beslenen farelerde obezite ve insülin duyarlılığı tedavi edilmiştir. Besinlerle bu çalışmadaki etkili düzeye ulaşmak için 70 kg ağırlığındaki bir bireyin 16,5 kg elma veya 882 g kakao ile beslenmesi gerekmektedir [4]. Bu miktarda gıda tüketimi mümkün olmadığı için sadece polifenol içerikli beslenmenin, polifenollerin hastalıklar üzerindeki faydalı etkilerine yeterli olmadığını düşündürmektedir [5].

Polifenoller gibi biyoaktif maddelerin kullanılan dozları, yapıları ve gıda matrisi ile etkileşimlerinin, emilim ve metabolizmalarını büyük ölçüde etkilediği, bireylerin mikrobiyotaları, bağırsak enzimleri, yaş ve cinsiyet gibi çeşitli faktörlerin biyoyararlanımları üzerinde önemli etkileri olduğu ifade edilmiştir [5]. Yüksel ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan çalışmada yeşil çayda bulunan polifenoller (flavan-3-ol) ile sütteki kazein proteini arasındaki etkileşim hidrofobik bağ şeklinde oluştuğu belirtilmektedir. Bu etkileşimde kazeinin geçici olarak polifenol biyoaktivitesi üzerinde inhibitör etki meydana getirdiği açıklanmıştır. Çalışmalar polifenollerin izole edilmiş halde plazmaya verilmesinin faydalı etkinin oluşması için büyük önem taşıdığını göstermektedir [5, 6].

Kanser tedavisinde, farklı kemoterapötik ilaç formları kullanılmaktadır. Kemoterapide kullanılan ilaçların, tedavi için oldukça önemli avantajlara sahip olmalarının yanı sıra, zayıf doku seçicilikleri, toksik yapıları ve sınırlı tedavi etkileri gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bu nedenlerle, hastayı tedavi etmek amacıyla ihtiyaç duyulan ilaç sistemlerinin, seçici olarak dokuyu hedefleyen ilaç salım sistemleri olması gerekliliği üzerinde önemle durulmaktadır. Son zamanlarda yaygın bir şekilde araştırılan bir ilaç salım sistemi olan kontrollü ilaç salım sistemleri bu ihtiyaca cevap verebilmektedir. İlaçlar kontrollü olarak belirli zaman ve dozda hedef dokuya veya organa uygulanmaktadır. Kontrollü ilaç salım sistemlerinin benzer ilaç tedavilerine kıyasla daha etkili bir tedavi yöntemi sunabileceği belirtilmiştir [7].

Hastalıkların tedavisinde ya da polifenollerin veya etken maddelerin istenilen etkileri gösterebilmesinde etkili plazma düzeyinin yakalanması ve bu seviyede sabit tutulması oldukça önemlidir. Bunun için yaygın bir şekilde araştırılan bir kontrollü salım metodu da mikroküre yöntemidir. Mikroküre yöntemi birçok açıdan avantajlıdır. Biyoaktif bileşiklerin aktivitelerini uzun süre muhafaza edilmelerini sağlaması ve hedef dokuya yönlendirilebilirlik imkânı sunması mikrokürelerin en önemli avantajlarındandır. Mikroküre ile oluşturulan salım sistemlerinde genellikle doğal polimerler kullanılmaktadır. Bu polimerler biyouyumlu yapıları nedeniyle toksik etki göstermemektedirler [8].

Polifenollerin en geniş grubu olan flavonoidlerde yer alan EC, antikanser, anti obezite, antioksidan gibi yararlı etkileri birçok araştırmada ifade edilmiştir [4, 9, 10]. Bu yararlı etkiler EC'nin potansiyel bir ilaç kapasitesi barındırdığını düşündürmektedir. EC ile yapılan çalışmalar artarak devam etmektedir.

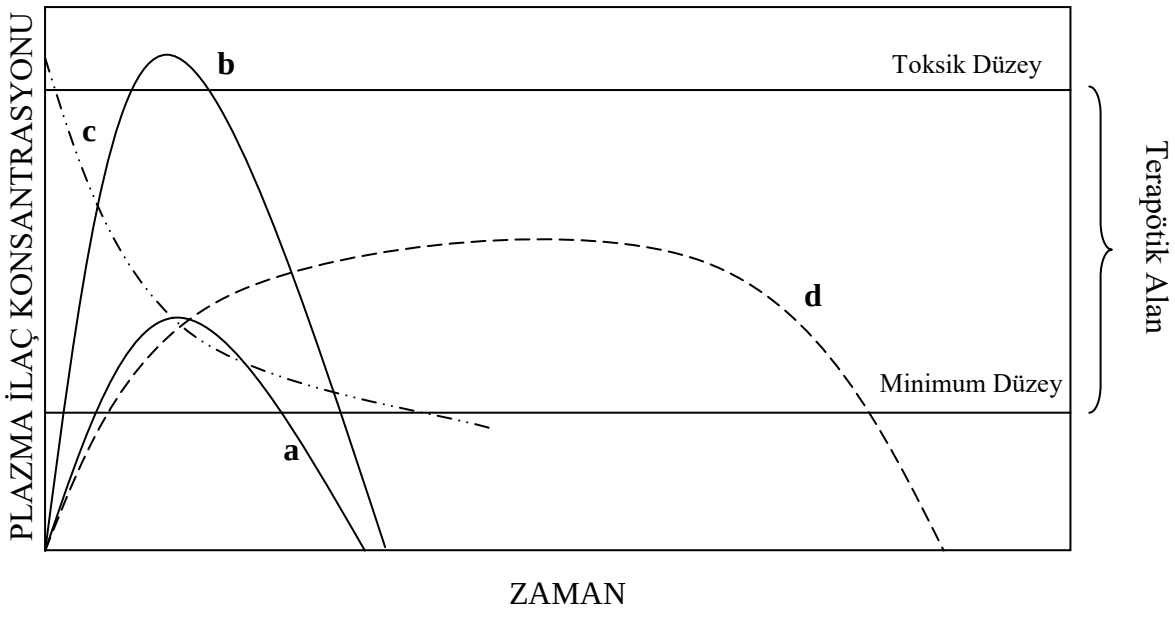
Bu çalışmada yeşil çay ve kakao da bol miktarda bulunan bir polifenol olan EC, doğal bir polimer NaAlg ve PVP ile enkapsule edilmiş ve kan plazma pH'sına yakın (pH: 7) bir pH değerinde salım değerleri araştırılmıştır. Oluşturulan küreler SEM, FTIR, XRD ve DPPH ile karakterize edilmiştir. EC yüklü mikroküreler ile ilgili bazı çalışmalar yapılmış olmasının yanında [11,12], emülsiyon çapraz bağlama yöntemi ile EC yüklü PVP/NaAlg mikroküre hazırlanmasına rastlanmamıştır. Bu nedenle bu tez alanında öncü bir çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kontrollü Salım Sistemleri

Etken bir maddenin bölgesel veya sistematik olarak önceden belirlenmiş oranlarda ve istenilen zaman aralıklarında salım yapmasını sağlayan ilaç salım sistemlerine 'kontrollü salım sistemleri' denir [6]. Kontrollü salım sistemleri, farmakolojik etkinin uzun süre devamlılığını sağlamak için etken maddeyi yavaş ve sabit hızda vücuda veren sistemler olarak da tanımlanabilir.

Klasik ilaç tedavi yöntemleri etken maddeyi hemen salıveren sistemlerdir. Bu tedavi yöntemlerinde etken madde kısa sürede maksimum kan derişimi düzeyine ulaşır ve sonra hızlı bir şekilde plazma düzeyi düşmeye başlar. Belirli aralıklarla dozlama ile plazma düzeyinin tedavi edici aralıkta kalması sağlanır. Kontrollü salım sistemlerinde ise; ilaç derişimi kanda sabit tutularak klasik yöntemlerde ortaya çıkan doz aşımı ya da doz yetersizliği gibi istenmeyen sonuçlar büyük oranda önlenmektedir (Şekil 2.1). Kontrollü ilaç salım sistemleri bu avantajının yanında, sabit aralıklı ilaç kullanımında ve enjeksiyonda olduğu gibi ani ilaç yüklemesinin hastada yaratacağı etkilerinin azaltılması, yarılanma süreci kısa olan ilaçların bozunmasının önlenmesi ve bölgesel uygulamalarda istenmeyen yan etkilerin önüne geçilmesi gibi avantajlara da sahiptir [13].



Şekil 2.1. İlaç salım sistemleri, a) Oral (normal doz), b) Oral (Yüksek doz), c) Enjeksiyon, d) Kontrollü salınım [13]

İlaç, tedavi edici etki için gerekli olan etkili maksimum düzeyin üzerinde toksik etki gösterirken, etkili minimum düzeyin altında ise gerekli etki için yetersiz kalabilmektedir.

Salım hızı, etken maddenin parçalanması ya da vücuttan atılması ile eksilen kısmı yeniden tamamlaması şeklinde düzenlenmiştir. Günümüzde kontrollü salım sistemleri incelendiğinde, salım hızının önceden belirlenmiş ve tekrarlanabilir olması, organ/bölge hedefli olması ve etki süresinin uzun olduğu sistemler anlaşılmaktadır [14].

Bir kontrollü salım sisteminde bulunması gereken temel özellikler şunlardır;

- ✓ Etken maddenin etkisinin sürekli olabilmesi ve plazmadaki sabit doz miktarı için; istenen sürede ve hızda etken madde salımı gerçekleştirebilmelidir.
- ✓ Etken madde etkisinin bölgesel kalmasını sağlamak için, tedavi ihtiyacı olan dokuya yerleştirilebilir olmalıdır.
- ✓ Etken maddeyle uyumlu ve etken maddenin hedef bölgelere ulaştırılabilmesi için uygun taşıyıcılar kullanılmalıdır.
- ✓ Sık doz alımını azaltarak, ihtiyaçların en aza indirilmesidir [15].

2.1.1. Kontrollü salım sistemlerinin sınıflandırılması

İlacın salım yolu, tedavi sürecini ve sonucunu doğrudan etkilemektedir. Kontrollü salım sistemleri için ilaç veriliş yolları oral, parenteral, transdermal ve cerrahi müdahale şeklindedir. Kontrollü ilaç salım sistemlerini teknik özelliklerine göre 3 başlık altında incelenmektedir. Bunlar; hız programlı ilaç taşıyıcı sistemler, aktivasyon kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler ve geri besleme kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerdir [16].

<u>Hız programlı ilaç taşıyıcı sistemler</u>

Hız programlı ilaç taşıyıcı sistemlerde ilaç/etken madde moleküllerinin salımı ilaç taşıyıcı sistemlerde doku ya da etken maddeye özel salım profiline uygun olarak önceden programlanmaktadır. Bu ilaç taşıyıcı sistemde yapıdaki etken maddenin uygun bölgedeki salımını difüzyonu kontrol sistemleri sağlamaktadır. Polimer membran geçiş kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler, polimer matris difüzyon kontrollü taşıyıcı sistemler, polimer membran

matris hibrid tip ilaç taşıyıcı sistemler, mikrorezervuar partisyon kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler olarak 4 gruba ayrılmaktadır [16].

Polimer membran geçiş kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler

Etken maddenin vücuda difüzyonunu kontrol edebilen kalınlık ve geçirgenlik özelliklerine sahip olduğu ifade edilmiştir. Biyobozunur olmayan bir membran tarafından çevrelenmiş, etken madde derişimi, polimer çeperinin iç yüzeyinde dengede bulunmaktadır [14] (Şekil 2.2-a). Bu tür polimer membranları biyolojik olarak parçalanmadığı için ilaç salındıktan sonra salım sisteminin vücuttan çıkarılması için cerrahi bir müdahale gerekmektedir. Bununla beraber, membranda yırtılma veya bozulma meydana geldiğinde etken maddenin aniden membran dışına çıkarak istenmeyen toksik etkiye sebebiyet verebileceği dezavantajı olarak ifade edilmiştir [17].

Polimer membran geçiş kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerin çeşitli uygulamaları yaygınlaşmıştır. Bu sistemin en bilinenlerinden biri levonorgesterol hormonu (LNG) içeren ve Norplant® olarak adlandırılan doğum kontrol sistemidir. Levonorgesterol hormonu Norplant® sisteminde silikon membran içine kapsüllenmiştir. Bu kapsül sistemi ile levonorgesterol hormonunun vücut içerisinde etkisi 5 yıla kadar sürecek olan geciktirilmiş salım işlemi gerçekleştirilmiştir [18].

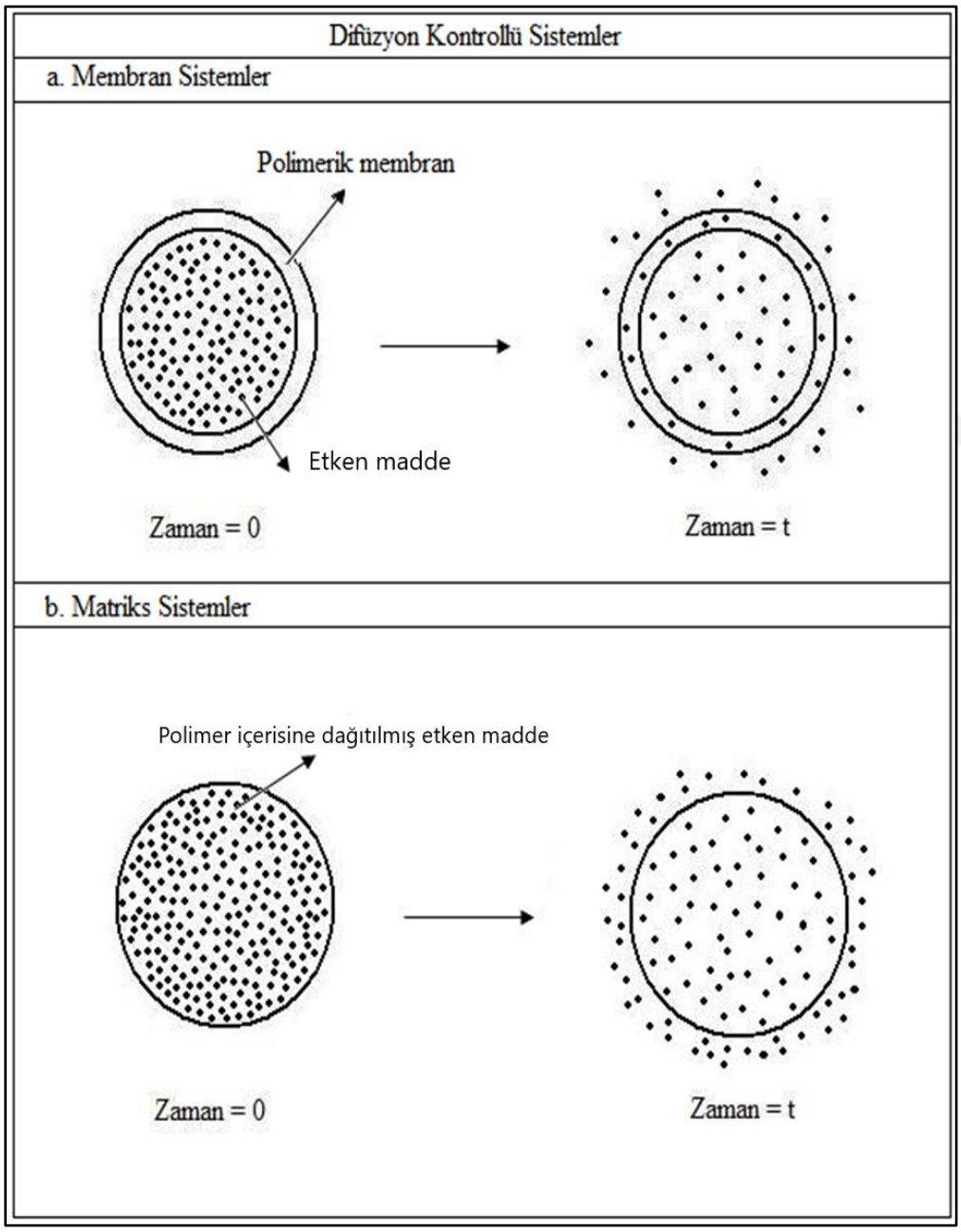
Polimer matris difüzyon kontrollü sistemleri

Biyobozunur olmayan polimer içeren, polimer matris difüzyon kontrollü sistemlerde, hidrofilik veya lipofilik yapıdaki etken madde polimer içine homojen bir şekilde dağıtılmaktadır. Bu sistemde matriksi çevreleyen sıvı, porlardan ve granüller arası boşluklardan matriksin içine sızarak ilacı çözmektedir. Çözünen ilaç difüzyonla matriksin dışına çıkmaktadır. Etken madde salımı matris sistemdeki derişime bağlıdır. Derişim ne kadar fazla ise salımda o kadar fazladır [19]. Etken maddelerin, difüzyon hızı düşük olduğunda, ilacın sistemdeki salımı gecikmektedir. Matris sistemleri implante etme ve çıkarma cerrahi operasyonlarla yapılmaktadır (Şekil 2.2-b).

Polimer membran matris tipi hibrid ilaç taşıyıcı sistemler

Polimer membran geçiş kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerdeki etken maddenin salım özellikleri sayesinde polimer matris difüzyon kontrollü sistemlerin fiziksel özellikleri geliştirilmektedir.

Bu sistemlerde salım matris içinde çözünme ile değil, membrandan etken maddenin geçişi ile kontrol edilmektedir.



Şekil 2.2. Difüzyon kontrollü sistemler, a) Membran sistemler, b) Matriks sistemler [15]

Mikrorezervuar partisyon kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler

Etken madde, şişen veya şişmeyen polimerik tabaka ile çevrili bir depoya konmaktadır. Yüksek enerjili dispersiyon yöntemiyle etken madde içeren sulu polimer çözelti, biyouyumlu, inert polimer içinde homojen şekilde kapsüllenmiştir [16].

Aktivasyon kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler

Bu tip sistemlerde uygulanan işlem veya enerji çeşidi sınıflandırma için belirleyicidir, etken madde salımı biyokimyasal, kimyasal veya fiziksel etkilerle dışarıdan enerji verilerek harekete geçirilmektedir. Salım hızı, uygulanan işlemin veya enerji girdisinin düzeyinin ayarlanması ile kontrol edilmektedir.

Fiziksel faktörlerle aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler

Manyetik kuvvet, buhar basıncı, ozmotik basınç, mekanik kuvvet, hidrodinamik basınç gibi fiziksel faktörlerle etken madde salımını harekete geçiren sistemlere denir. Buhar basıncıyla aktive olan sistemlere, vücut ısısıyla buharlaşan florokarbon ve buhar basıncıyla ilaç uygulaması sağlayan infüzyon pompası örnek olarak verilmektedir. Mekanik pompaların sağladığı itici güç ile etken madde salımını gerçekleştiren sistemler mekanik kuvvet sayesinde aktive olan ilaç taşıyıcı sistemlerin bir örneği olarak ifade edilmektedir [17].

Manyetik kuvvet ile etkinleştirilen ilaç taşıyıcı sistemde, etken madde homojen olarak manyetik boncuk yapıdaki polimer içine dağıtılmaktadır. Bu sistem biyolojik ortama entegre edildiğinde, derişim farkına dayalı bir difüzyon olayı görülmektedir. Manyetik alan etkisine maruz kalırsa, istenenden fazla miktarda etken madde hızla ortama salınmaktadır. Dolayısıyla istenmeyen manyetik alan etkisine maruz kalınmaması gerekmektedir. Bu sistemin aynı zamanda avantajı olan bu durum dışarıdan manyetik uyaran kullanarak salım hızını ayarlayabilmemize olanak sağlamaktadır [17]. Polimer tabanlı ilaç taşıyıcı sistemlerden yavaş salım yapan peptidler, makromoleküllerin salım hızını artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Hidrasyon ile aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler, hidrofilik karakterde polimer kullanılarak elde edilen şişebilen polimer matris içinde etken madde homojen olarak dağıtılmaktadır. Su eklenmesi ile birlikte polimer matrisin şişer ve etken

madde salımı gerçekleşir. Bu tür kontrollü salım sistemlerinde, suda çözünen çapraz bağlı polimerler kullanılmaktadır [19].

Kimyasal faktörlerle aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler

Kimyasal reaksiyon ile etken madde salımı gerçekleştiren sistemlere kimyasal faktörle aktive olan ilaç taşıyıcı sistem denir. Hidroliz ile aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler bu sistemlere bir örnektir. Hidroliz oranı bu sistemlerde, etken madde salımı etkileyen önemli bir etkendir. Bu sistemlerde etken maddeler genellikle mikroküre lerde, mikrokapsüllerde veya nanopartiküllerde kapsüllenmiş haldedirler. Poli(laktik-ko-glikolik asit) gibi biyobozunur veya biyolojik olarak deformasyona uğrayabilen polimerler ile elde edilirler. Hidrolizin tetiklediği polimer zincirinin parçalanması, polimer matris sistemden etken madde salımını gerçekleştirir. Bu sistemde etken maddenin salım hızı, polimer parçalanma hızı tarafından kontrol edilmektedir. Löprolid içeren derialtı olarak enjekte edilen ve mikroküre yapıda olan Lupron Depot® bu sisteme iyi bir örnektir. Vücut tarafından dışarı atılabilmesi ile ikinci bir cerrahi müdahaleye ihtiyaç oluşturmaması da avantajlarından biridir. Etken maddenin salım hızı, biyoparçalanma hızı, polimerin molekül ağırlığı, polimer bileşimi, sisteme eklenen etken madde miktarı ve polimer etken madde etkileşimi gibi etmenler tarafından etkilenmektedir [16].

Biyokimyasal faktörlerle aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler

Etken madde mikroküreler içine enkapsüle edilmiş ya da albumin ve polipeptid gibi biyouyumlu polimerlerden elde edilen polimer zincirlerine bağlı halde bulunmaktadır. Bu sistemlerde etken madde salımı, dokuda bulunan dokuya özel enzimlerin biyouyumlu polimeri hidrolizi ile gerçekleşmektedir.

Geri besleme kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler

Geri besleme mekanizması ile vücutta biyokimyasal madde gibi tetikleyici ajan olacak şekilde etken maddenin salımı harekete geçirilmektedir. Salım hızı, sisteme yerleştirilen sensör tarafından belirlenen tetikleyici ajan derişimi ile belirlenmektedir. Tetikleyici ajan ilaç taşıyıcı sistemin şişmesini sağlar ve sistem yıkıma uğrar bu yolla salım gerçekleşir [19].

2.1.2. Partiküler kontrollü salım sistemleri

Polimer tabanlı bu sistemlerde ilaç salım yapısının cerrahi müdahale gerekmeksizin enjeksiyon yoluyla vücut içine implante edilebilmeleri bu sistemlerin avantajlı noktalarından biridir. Boyutlarının küçük olması kapsüllerin, kürelerin istenen dokuya veya kan dolaşımına enjekte edilebilmesine imkân sağlamaktadır. Mikrokapsüller, mikroküreler, nanoküreler partiküler ilaç taşıyıcı sistemler sınıfında yer almaktadırlar [20].

Partiküler sistemler sayesinde etken maddenin bölgesel seçiciliği ve hedef dokuya en yakın bölgeden uygulanması sağlanmış, biyolojik direnç etkisi azaltılmış, tedavi edilmek istenen bölgeye etken maddenin taşınması kolaylaşmış, bölgeye ulaştıktan sonra uzun süreli etki oluşturulmuş ve yan etkiler azaltılmıştır [21].

Partiküler kontrollü salım sistemlerinde mikroküreler

Mikroküreler, 1-1000 μm arasındaki çaplara sahip küçük küresel parçacıklardır. Bazı durumlarda, mikroküreler, mikropartiküller olarak da ifade edilirler. Mikroküreler, çeşitli doğal ve sentetik polimer malzemelerden ve hatta inorganik malzemelerden üretilebilmektedirler. Yönteme bağlı olarak, özel amaçlı uygulamalar için katı veya gözenekli mikroküreler elde edilebilmektedirler.

Mikrokürelerin sentezi için kullanılan yöntemler, farmasötik bileşiğin tatbik edilme yönlerini kontrol etmek için birçok fırsat sunmaktadır. Mikroküreler eylem alanında istenen bir bileşen miktarının salımını ve hedef olmayan bölgelerde azaltılmasını kolaylaştırır. Bu yapıların, uygulamadan önce ve sonra bileşiklerin korunmasını sağladığı ifade edilmektedir [22].

2.1.3. Kontrollü salım sistemlerinin avantajları

- Hedeflenen, tedavi edici alandaki ilaç seviyesinin sürekli korunması,
- Önerilen ilaç rejimine hastaların uyumunu geliştirecek şekilde dozaj miktarının ayarlanabilmesi ve günde birkaç dozda ilaç alma gereksinimi ortadan kalkması, hastanın gece ilaç alımı veya ilaç almayı unutması gibi ihtimallerin önüne geçilebilmesi,

- Harcanan emek ve sürenin iyileştirilmesi, ilaç dağıtımı ve süresi minimuma indirilmesi, reçete hazırlama işlemleri azalması gibi işlem yönetimlerinin kolaylaşması ve azalmasıyla ekonomik avantajlar sağlaması,
- Salımın istenilen doku, organ veya bölgeye hedeflenebilmesi ile sistemik yan etkiler azaltılması ve bununla beraber sistemik doz ihtiyacının düşürülmesi,
- Hasta bakım işlem basamaklarının ve sürecinin kolay takip edilebilmesi tedavi sırasında etken maddenin yan ve toksik etkilerinin görülmemesi,
- Sık sık ilaç alınmasına gereksinim olmaması hastaya ve hasta bakımını yapan kişilere büyük kolaylıklar sunması,
- Uzaktan erişim sağlanabilmesi, özellikle az gelişmiş bölgelerde kontrollü salım sağlayan sistemlerinin kullanımı, tedavinin kolay ve düzenli olmasını sağlaması,
- Tedavi edici plazma düzeyinin uzun zaman aralığında sabit kalması sağlanabildiği için farmakolojik etkinin de uzun ve tekdüze olması,
- Hedeflenen sonuçların yüksek doğruluk oranlarında tekrarlanabilir olması,
- Kontrollü bir etken madde salımı gerçekleştirildiği için, yüksek derişimlerde mide bağırsak mukozasında deformasyona neden olabilecek maddelerin bu olumsuz etkileri azaltılabilmesi veya önlenebilmesi, gibi avantajları vardır [23].

2.1.4. Kontrollü salım sistemlerin dezavantajları

Bugün birçok hastalığın tedavisinde, doğum kontrol sistemlerinde, kontrollü salım sistemleri başarı ile uygulanmaktadır. Ancak bu sistemlerin önemli avantajlarının yanında bazı dezavantajları da bulunmaktadır.

- Üretim sırasında veya sonradan oluşmuş yapısal bozukluklar nedeniyle oluşturulan salım sisteminin güvenilirliğinin garanti edilememesi gibi durumlarda, sistem vücuda verildikten veya yerleştirildikten sonra istenildiği an ilaç salımının durdurulamaması klasik ilaç kullanım şekillerine göre bir dezavantajdır.
- Doz seçimi belirli ve limitlidir. Kırılamaz, toz haline getirilemez, suda çözünemez olduklarından belirli bir dozda hazırlanan tek bir ilaç şeklinin diğer bazı ilaçlarda olduğu gibi hastaya ya da kişiye göre daha alt dozlara bölünmesi mümkün olmayabilir.
- Yapısında ihtiva ettiği etken madde miktarının yüksek olmasından, kullanım sırasında herhangi bir sebeple (ilacın mekanik dayanıksızlığı, ilacın çiğnenmesi, ezilmesi,

alkolle alımı vb.) hızlı ve yoğun salım gerçekleştiğinde etken madde miktarı vücutta toksik düzeylere ulaşabilir.

- İlacın hasta veya kişi tarafından alınmasının unutulması, tedavi sırasında etkide azalma riskinin diğer ilaç şekillerine göre daha fazla olmasına neden olmaktadır.
- Kontrollü salım sistemlerinin bir kısmının temel malzemesi olan polimerlerin ve bu polimerlerin parçalanması sonucu oluşan ürünlerinin toksik etki, alerjik etki veya biyolojik uyuşmazlık göstermeleri ihtimali de ortaya çıkabilir.
- Karma moleküler yapıları sebebiyle, bazı yapı dayanıklılık sorunları oluşabilir ve bu sorunlar etken maddenin planlanandan daha yavaş ya da daha hızlı salımına neden olabilir.
- Her ilacın kontrollü salım sistemi hazırlanamayacağı gibi her ilaca uygun tek bir hazırlama yönteminin olmaması da bir dezavantajdır. Örneğin; dozu fazla olan etken maddelerin (sülfamitler) kontrollü salım sistemleri, sistem büyüklüğü sebebiyle hazırlanamaz. Aynı şekilde yarılanma ömrü çok kısa ilaçlarda (penisilin) uygun bir doz değildir. Ayrıca yarılanma ömürleri çok uzun olan ilaçların (diazepam) zaten kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasına gerek yoktur.
- Formülasyonların sentezi ve geliştirilmesi diğer ilaç salım sistemlerine göre çok daha pahalıdır [21].

2.2. Mikroküre

Mikroküreler, karakteristik olarak, 1000 μm'den küçük küresel parçacıklardan oluşan serbest akışlı tozlardır. Doğada biyolojik olarak parçalanabilir proteinler vb. gibi veya sentetik polimerler mikroküre sentezinde kullanılmaktadır. Mikroküreler, iyi tasarlanmış kontrollü bir ilaç salım sistemi olmasının yanında, geleneksel tedavinin bazı sorunlarının üstesinden gelebilmekte ve verilen bir ilacın terapötik etkinliğini artırabilmektedir [6].

Polimer mikrokürelerin, hedeflenebilir özelliği ve hücre içi dağıtımının kolay olması, hücresel düzeyde ilaç ve hedeflenebilir salım sistemi haline gelmesini sağlamıştır [11]. İlaç salımı, matris yapısının çözünmesi ya da bozulması ile kontrol edilmektedir. Hücresel düzeyde ilaç verme teknikleri, etkilenen dokularda etkili ve güvenli ilaç düzeni sağlar ve böylece seçici ilaç verme yaklaşımlarıyla hastalığı iyileştirmek için daha uygun bir yol sunar. Enkapsülasyonun önemli bir salım mekanizması olmasının nedeni, temel olarak, nano boyutlu ilaç taşıyıcı araçların, hedef hücrelere gelişmiş bir şekilde verilmesi ve

serbest ilacın hedefi olmayan organ ve doku ile minimum etkileşime geçerek büyük ölçüde bağımlı toksisiteyi azaltması olarak ifade edilmektedir [23].

Hidrofilik polimer matrislerinden ilaç salımı, polimerin hidrasyon özellikleri (şişme ve / veya erozyon) ve elde edilen polimer jel tabakasının matrisler etrafında oluşan fiziksel özellikleri ile kontrol edilir. Suda çözünür ilaçlar, esas olarak çözünmüş ilaç moleküllerinin polimer mikroküre içinden difüzyonu yoluyla serbest bırakılırken, zayıf suda çözünür ilaçlar çoğunlukla, salım ortamı ile küre içindeki ilacın arasındaki polimer tabakasının erozyonu yoluyla serbest bırakıldığı belirtilmiştir [24].

2.2.1. Mikroküre lerin avantajları

- Boyut küçültme, zayıf çözünen ilacın çözünürlüğünü artırabilen yüzey alanında artışa neden olur.
- Doz ve toksisiteyi düşürebilir.
- Daha az dozlama sıklığı daha iyi hasta uyumu sağlar.
- İlacın, hedeflenen bölgeye spesifikliği ile modifiye edilmesi ve arzu edilen konsantrasyonun istenmeyen etki olmadan sürdürülmesi için güvenilir bir yoldur.
- Biyobozunur mikroküreler, implantasyon ve sökme için cerrahi prosedürler gerektirmemeleri nedeniyle büyük polimer implantlara göre avantajlıdır.
- Daha düzenli ilaç kullanımı biyoyararlanımı iyileştirecek ve advers etkilerin görülme sıklığını veya yoğunluğunu azaltacaktır [25].

2.2.2. Mikroküre sentezinde kullanılan polimerler

Mikroküre formu hazırlanacak olan polimerlerin seçiminde, etken maddenin tipi, özellikleri, kullanılış yolu, dozu ve salım süresi dikkate alınır. Polimerler, sentetik ve doğal polimerler olarak ikiye ayrılır.

<u>Sentetik polimerler</u>

Monomerlerden sentezlenen polimerlerdir. İstenilen koşullara göre hazırlanabilmeleri, hazırlanma ve saklanma süreleri boyunca dayanıklı olmaları, yüksek miktarda ve yüksek saflıkta üretilebildikleri nedeniyle tercih edilmektedirler.

Biyobozunur olmayan polimerler

Bu tip polimerler vücutta herhangi bir değişime uğramayan inert polimerlerdir. Hidrofil veya hidrofob yapıdadırlar. Taşıdıkları etken madde tamamen serbestleştikten sonra süresiz olarak vücutta kalabilmektedirler (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Biyobozunur olmayan polimerler [15]

Silikon	Poli(hidroksi etil metakrilat)
Poliüretan	Poli(hidroksietoksi etil metakrilat)
Selüloz asetat	Poli(hidroksidietoksietil metakrilat)
Poli(bütil metakrilat)	Poli(metoksietil metakrilat)
Poli(etilen-ko-vinil asetat)	Poli(metoksietoksietil metakrilat)
Poli(iso bütilen)	Poli(metoksidietoksietil metakrilat)
Poli(akrilamid-ko-akrilikasit)	Poli(etilen glikol dimetakrilat)
Poli(N-izopropil akrilamid)	Poli(N-vinil-2-pirolidon)
Poli(vinil asetat)	Poli(akrilik asit)

Çizelge 2.2. Biyobozunur doğal ve sentetik polimerler [15]

Doğal Polimerler	*Sentetik Polimerler*
Selüloz	Psödopoliamino asitler
Kitin ve Kitosan	Poli(laktik asit)
Aljinat	Poli(glikolik asit)
Dekstran	Poli(hidroksivalerat)
Nişasta	Poli (amino asitler)
Kollajen	Poliortoesterler
Jelatin	Polianhidritler
Albumin	Polihidroksibütirat
Fibrinojen	Polikaprolakton

Biyobozunur polimerler

Bu polimerler suda çözünmezler fakat biyolojik sıvılarla temas edince hidroliz olurlar veya enzimlerle parçalanırlar. Etken maddenin salımı polimerin aşınması ile uyumlu hareket etmektedir.

Doğal polimerler

Tabiattaki canlı varlıkların bünyesinde oluşan polimerlerdir. Biyolojik olarak parçalanabilirler. Proteinler, karbonhidratlar ve kimyasal olarak değiştirilmiş karbonhidratlar olarak üçe ayrılır.

(A) Proteinler: Albumin, Jelatin ve Kollajen
(B) Karbonhidratlar: Agaroz, Karajenan, Kitosan, Nişasta, Aljinat
(C) Kimyasal olarak değiştirilmiş karbonhidratlar: Poli dekstran, Poli nişasta [26].

2.2.3. Mikroküre sentezinde kullanılacak ideal polimer özellikleri

Mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılacak polimer aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır.

- Daha uzun eylem süresi,
- Etken maddenin korunmasını sağlamak,
- Su çözünürlüğü,
- Biyolojik emilebilirlik,
- Biyolojik çevre ile uyumlu olmaları,
- Doku ile teması halinde iltihap ya da irritasyona yol açmamaları,
- Kanserojen etki göstermemeleri,
- Toksik olmamalarıdır [27].

2.2.4. Mikroküre hazırlamada kontrol edilebilecek faktörler

Polimer tabanlı mikroküre eldesi için geliştirilmiş ve kullanılmakta olan birçok teknik bulunmaktadır. Tekniğin seçimi polimerin yanı sıra etken maddenin doğasına ve tedavi süresine de bağlıdır. Mikroküre sentezinde kontrol edilebilecek önemli fiziksel ve kimyasal faktörler;

- Parçacık büyüklüğü gereksinimi,
- Polimer türü,
- Polimerin moleküler ağırlığı,
- Etken madde /polimer oranı,
- Toplam etken madde ve polimer kütlesi,
- Tekrarlanabilirlik,
- Enjeksiyon için sulu taşıtlarda kontrollü parçacık büyüklüğü ve dağılabilirlik,
- Geniş bir zaman ölçeğinde iyi bir kontrolle etken maddenin salınması,
- Kapsüllenecek etken maddenin yapısı ve dayanıklılığı,
- Nihai ürünün toksik olmaması şeklinde sıralanabilir [26].

2.2.5. Mikroküre hazırlama teknikleri

Püskürterek kurutma tekniği

Püskürterek kurutma, sıvı materyallerin sıcak kurutucu gaz ortamında püskürtülerek kuru partikül haline getirilmesi olarak tanımlanabilmektedir. Çekirdek malzemenin sıvılaştırılmış kaplama malzemesine yayılmasını ve daha sonra karışımın kaplamasının katılaşması için çevreye püskürtülmesini ve ardından çözücünün hızlı buharlaştırılmasını içermektedir. Bu yöntem hızlıdır ancak hızlı kuruma işlemi nedeniyle kristallik kaybedilebilmektedir. İlaçların üretiminde degradasyondan korumak ve daha iyi ilaç hedeflendirmesi yapabilmek için daha çok kuru dozaj formları tercih edilmektedir.

Koeservasyon

Bu yöntemde çekirdek materyali polimer çözeltisi içerisinde dispers haline getirilir. Polimer çözeltisinin çözülebilirliği, karıştırılırken sıcaklığın düşürülmesi, pH'ın değiştirilmesi vb. yöntemlerle faz ayrımı gerçekleştirilerek kabuk materyali oluşturulur.

Kompleks koaservasyonda ise farklı yüklere sahip iki kolloid kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Hidrofilik kolloidin sulu çözeltisi hazırlandıktan sonra ortama farklı yükteki ikinci kolloid ilave edilmektedir. İkinci kolloidin ilavesinden sonra kolloidler çekirdek madde etrafında toplanmaktadır. Böylece kompleks koaservasyona göre mikrokapsülasyon gerçekleşmektedir.

Lipozom

Lipozomlar katmanlı fosfolipitlerin bileşimiyle meydana gelen çok küçük (nanometre boyutunda) sulu faz içeren kabarcıklardır. Lipozomların genel yapısı Çizelge 2.3'te görülmektedir. Lipozomlar, temel olarak etken maddelerin etkinliğini arttıracak ve istenmeyen toksik özelliklerini azaltacak şekilde, çok seçici olarak maddelerin taşınmasında kullanılmaktadır.

Kokristalizasyon

Enkapsülasyon yöntemleri arasında kokristalizasyon yöntemi önemli ve çok kullanılanlardandır. Diğer yöntemlere göre daha basit, daha ucuzdur. Yapıda doğal olarak bulunan sakkaroz kristalleri bu yöntemde değerlendirilmektedir. Sakkaroza ait tipik kristaller katı formda yer almakta ve çok doymuş solüsyonlardan sakkaroz kristalize edilebilmektedir.

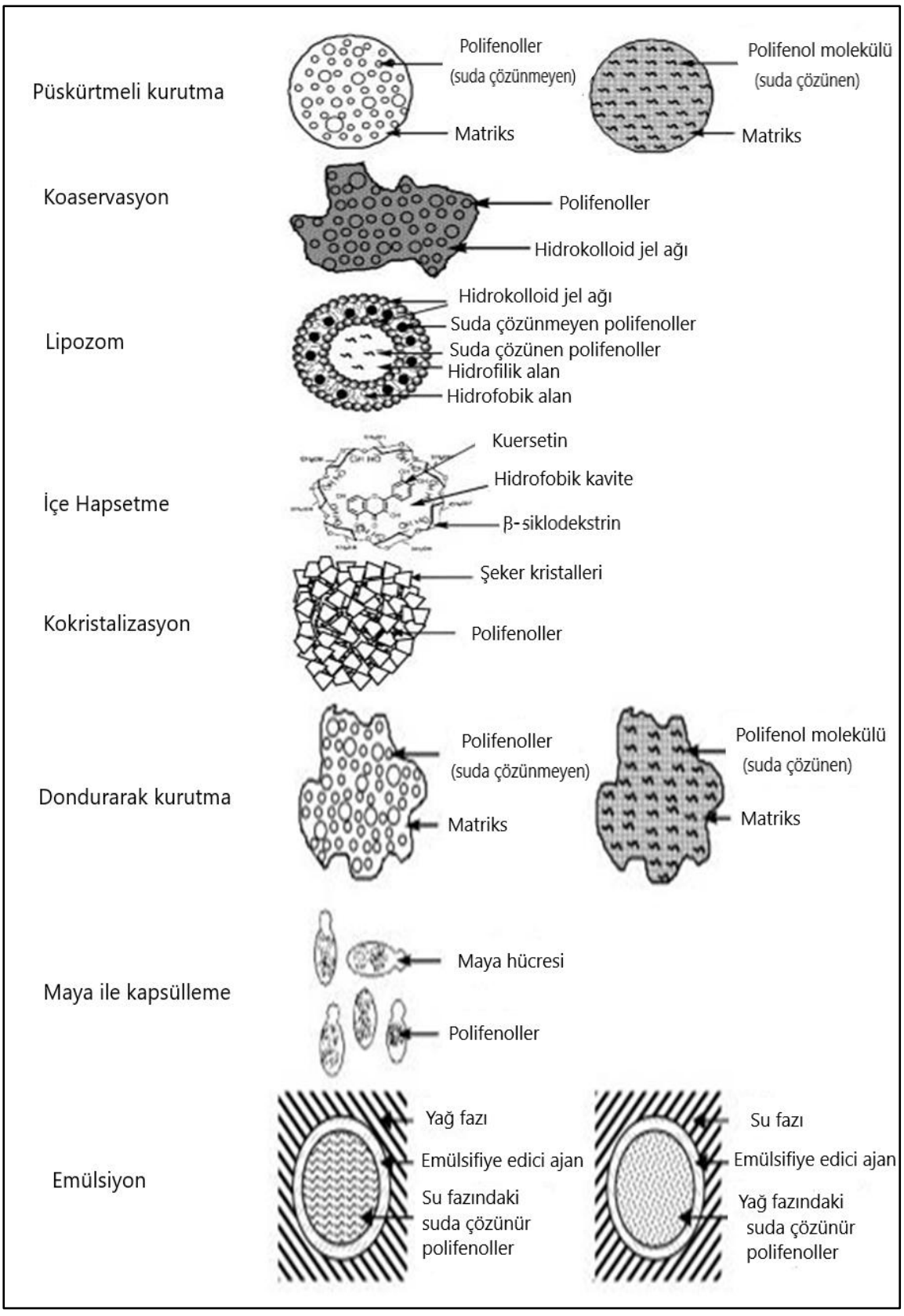
Dondurarak kurutma

Dondurarak kurutma işlemi ürünün dondurulması ve buz kristallerinin süblimasyonla üründen uzaklaştırılması temeline dayanmaktadır. Dondurarak kurutma üç aşamada gerçekleşir. Dondurma, şoklama veya derin dondurucuda gıdadaki suyun buz kristalleri haline dönüştürülmesi aşamasıdır. Temel kurutma, buz kristallerinin süblimasyonla üründen uzaklaştırılmasıdır. İkinci kuruma ise, gıdada bulunan bağlı suyun uzaklaştırılmasıdır. Dondurarak kurutma ve vakum birbirine çok benzeyen kurutma süreçleridir, ancak vakum kurutmada çözücünün donma noktasının üstündeki bir sıcaklıkta çalışıldığı için daha hızlı ve daha ucuzdur.

Emülsiyon çapraz bağlama

Çizelge 2.3'te yöntemin basit bir şematik gösterimi yer almaktadır. Bu yöntemde, polimer çözeltisi yağ fazda emülsiye edilerek w/o (water-in-oil) emülsiyonu hazırlanır. Sulu damlacıklar uygun bir yüzey aktif madde kullanılarak kararlılaştırılırlar. Kararlı emülsiyon, parçacıkları katılaştırmak için glutaraldehit, kalsiyum klorür gibi bir çapraz bağlayıcı kullanılarak çaprazbağlanır. Mikroküreler filtre edilir ve yıkanır, daha sonra ise kurutulur. [26, 28].

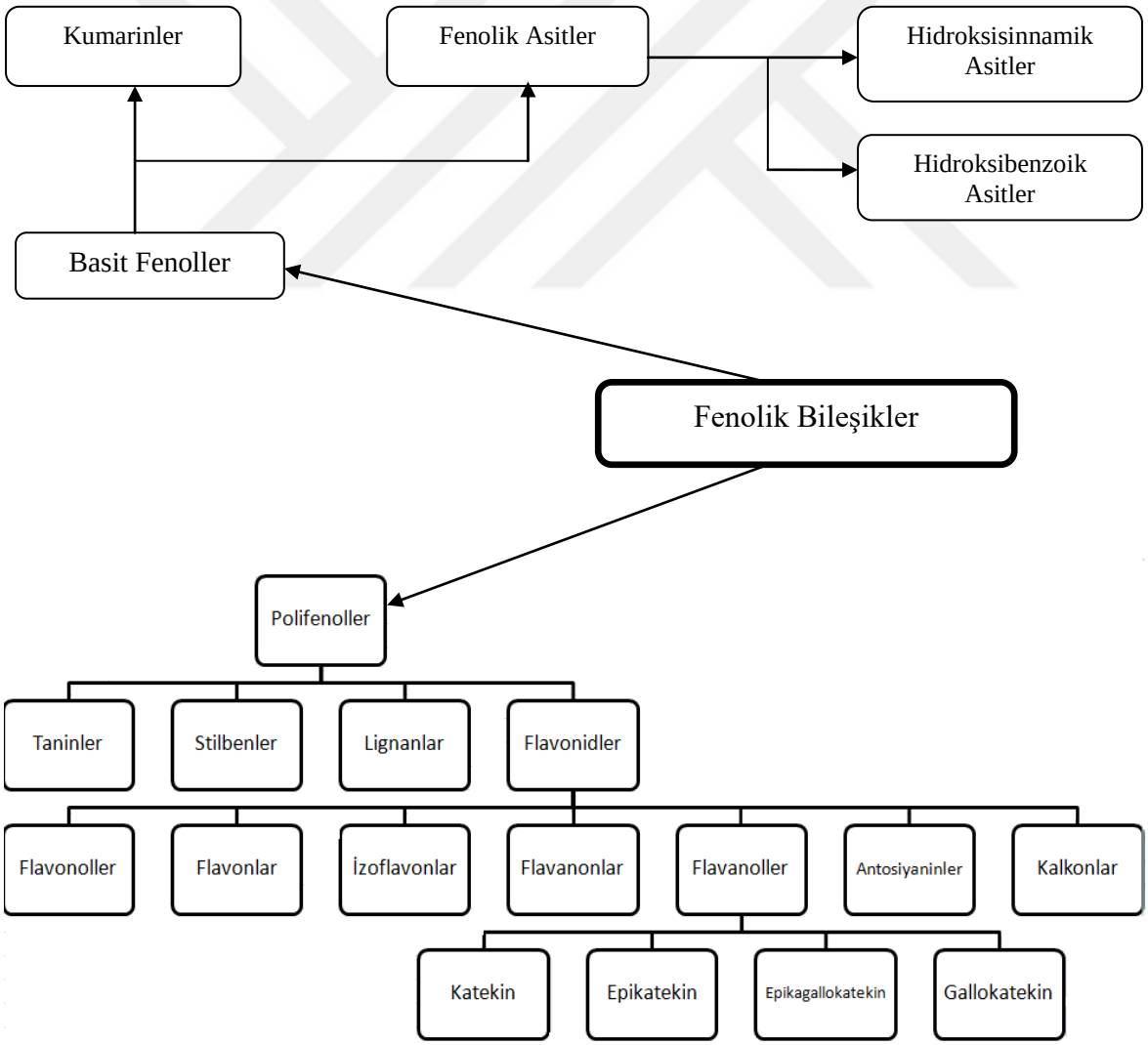
Çizelge 2.3. Mikroküre hazırlama yöntemleri ve şematik gösterimi [28]



2.3. (-) – Epikatekin

"Fenolikler" terimi, heterojen yapılara sahip çok büyük ve çeşitli kimyasal bileşikler grubunu kapsamaktadır. Sekonder metabolit olarak adlandırılan bu bileşikler özellikle bitkiler tarafından bolca üretilir [1].

Fenolik bileşikler bir veya daha fazla hidroksil grubu barındıran en az bir aromatik halkaya sahip yapılardır. Basit fenoller ve polifenoller olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.3). Kelime kökeni "çok" anlamında olan Poli- (eski Yunanca Pollus)kelimesi ile -fenol kelimelerinin birleşiminden türemiştir. Polifenol; bitkilerin içinde olan doğal kimyasallara verilen isimdir, yapısında çok sayıda fenolik birim bulundurmaktadırlar [29].



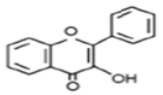
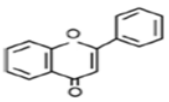
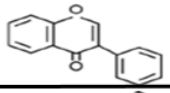
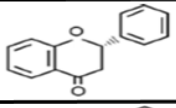
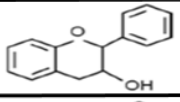
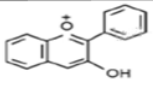
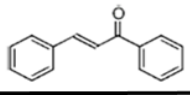
Şekil 2.3. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması [29]

Polifenol bileşikleri en çok meyve, sebze, tahıl ve içeceklerde bulunurlar. Elma, üzüm, armut, kiraz ve çilek gibi meyveler 100 gram başına 200-300 mg fenolik bileşik içermektedir [30].

Polifenol tüketiminin metabolizma, kilo, kronik hastalık ve hücre çoğalmasının düzenlenmesi yoluyla insan sağlığında önemli etkiler sağlayabileceği ifade edilmektedir [31]. Hayvan, insan ve epidemiyolojik çalışmalar, çeşitli polifenollerin kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve obezite için önleyici ve/veya terapötik etkilere sahip oldukları belirtilmiştir [31].

Yüksek antioksidan etkisi dolayısı ile kanser ve kalp hastalıklarına karşı en etkili koruyucu olarak kabul edilen ve iltihap karşıtı etkisi olan polifenollerin en geniş grubu olan flavonoidler, sebze ve meyvelere parlak ve canlı renklerini vermeleri ile de bilinmektedirler. Flavonoidler, birbirine bağlanmış iki aromatik halkalı 15 karbondan oluşan üç karbonlu bir köprü şeklindeki polifenolik bileşiklerdir (Çizelge 2.4). Bu C6-C3-C6 bileşiklerinin alt sınıfları flavonlar, flavonoller, flavanoller, izoflavonlar, flavanonlar, kalkonlar ve antosiyanidinlerdir [32].

Çizelge 2.4. Flavonoidlerin kimyasal yapıları [29]

Sınıf	Alt Sınıf	Temel İskelet	Temel Yapı
Flavonoidler	Flavonoller	C6 - C3 - C6	
	Flavonlar	C6 - C3 - C6	
	İzoflavonlar	C6 - C3 - C6	
	Flavanonlar	C6 - C3 - C6	
	Flavanoller	C6 - C3 - C6	
	Antosiyaninler	C6 - C3 - C6	
	Kalkonlar	C15	

Flavanoller, özellikle monomerik flavanoller (katekin, epikatekin, epigallokatekin, gallokatekin ve bunların gallate türevleri) ve bunların polimerizasyon ürünleri (proantosiyanidin), kakao tozu ve çikolata içerisinde dikkat çekici konsantrasyonlarda bulunmaktadır [32].

(-) - Epikatekin önemli bir antioksidan flavonoiddir. Antioksidanlar serbest radikalleri giderme yetenekleri nedeniyle son yıllarda insan beslenmesinde incelenen önemli araştırma konularından birini oluşturmaktadırlar. EC, özellikle çay, kakao, üzüm başta olmak üzere birçok bitkisel kaynakta ve besinlerde bulunan (Çizelge 2.5) antioksidan özelliğinin yanında kanser ve hücrenin genetik yapısının değişmesini önleyici özelliklere sahip bir organik bileşiktir [33]. (-) - Epikatekin (2R, 3R) konfigürasyonlu bir katekindir. (+) - Epikatekin'in enantiyomeridir.

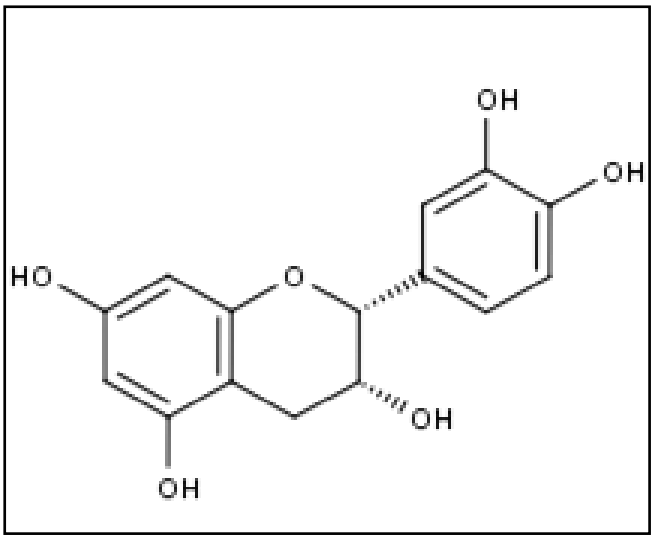
Çizelge 2.5. Bazı besinlerin EC içeriği [33]

Besin	Ortalama İçerik (mg/100g)	Besin	Ortalama İçerik (mg/100g)
Kakao (Toz işlenmemiş)	158,30	Siyah Çay	3,94 mg/ 100 ml
Bitter çikolata	70,36	Yeşil Çay	7,93 mg/ 100 ml
Beyaz çikolata	14,58	Şeftali	7,97
Yaban Mersini	4,20	Bakla (çiğ)	37,55
Üzüm	5,24	Kiraz	7,78
Elma (Bütün, Çiğ)	8,37	Elma şarabı	28,67

2.3.1. Yapısı

Yapısal olarak EC, oksijenlenmiş bir heterosikl ile bir 4-hidroksil grubuyla bağlanmış iki aromatik halkadan oluşmaktadır (Şekil 2.4).

Molekül Formülü : $C_{15}H_{14}O_{6,}$
Molekül Ağırlığı : 290.271 g/mol.



Şekil 2.4. (-)- Epikatekin'in yapısı

2.3.2. Stabilitesi

Genel olarak polifenollere uygulanan ısıl işlemin derecesi ve süresi antioksidan özelliklerini etkileyebilmektedir [12]. Bunun yanında fenolik bileşiklerin nem ile karşılaşmaları ve güneş ışınlarına maruz bırakılmaları da yapılarını bozarak antioksidan vb. özelliklerinin kaybolmasına neden olabilirler.

İnsanlarda; oral yolla alındığında, EC içeren flavanoller, mide geçişi sırasında stabildir, ancak ince bağırsaklarda glukosidaz, laktaz-fiorizin hidralazlar gibi çeşitli sindirim enzimleri ile karşılaşmaktave yapısal değişime uğramaktadır. Sonrasında, karaciğerde glukuronidaz, sülfataz ve katekol-o-metil transferaz ile biyotransformasyon meydana gelmekte ve faz-II metabolitleri oluşmaktadır. Bu aşamalar sonucunda mezenterik dolaşımda düşük oranlarda doğal EC düzeyi kalmaktadır [34].

137 mg (470 μmol) EC içeren 80 g çikolata tüketen 10 kişilik bir grup insan deneklerle yapılan küçük bir niceleyici klinik çalışma da, kan plazmasındaki EC 2 saat sonra bazal seviyelerden 12 kat artmış ve 257 ± 66 nmol / L'ye yükseldiği gösterilmiştir. 6 saat sonra on denekten sekizinde başlangıç seviyelerine düşerken, diğer iki kişide daha da arttığı ifade edilmiştir [35].

Çalışmalar incelendiğinde EC'nin yapısının, sindirim ve karaciğer enzimleri gibi etkenler tarafından bozularak, değiştiği belirtilmiştir [34, 35].

2.3.3. Epikatekinin sağlık üzerindeki etkileri

Daha çok yeşil çay ve kakaoda bulunan katekinler sınıfından bir flavanol olan epikatekinin antioksidan, antidiyabetik, anti obezite, hipolipidemik ve antikanserojen aktivitesi ile polifenoller arasında önemli bir yeri vardır. Yapılan bazı çalışmalarda EC içeren yiyeceklerin tüketimi, hem insülin direncini hem de kan basıncını azaltarak, tip II diyabetin ve birçok kardiyovasküler hastalığın başlamasının önlenmesine yardımcı olabileceği belirtilmiştir [36].

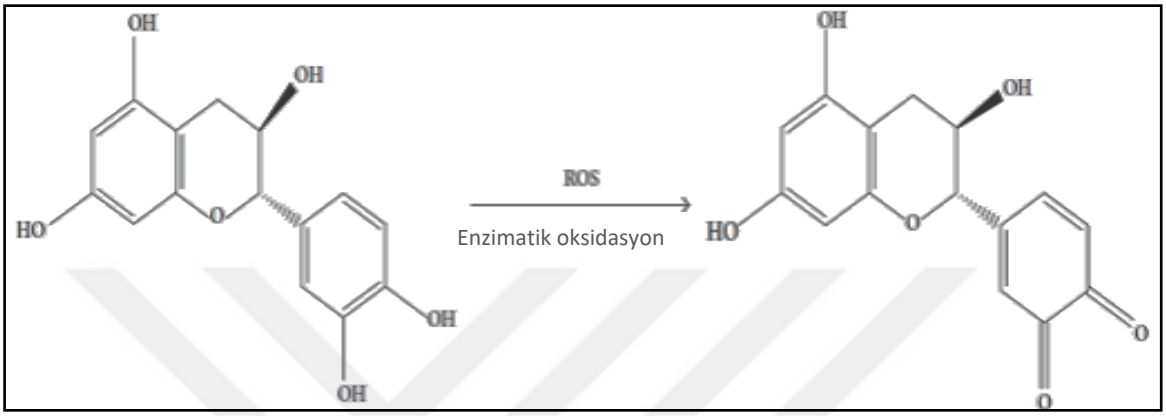
Antioksidan etkisi

Oksijen kaynaklı serbest radikallere reaktif oksijen türleri (ROS) denir. ROS oksijenin mitokondrideki reaksiyonu sonucu oluşmaktadır. Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet -}$), hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$) ve nispeten daha az reaktif olan hidrojen peroksit (H_2O_2) reaktif oksijen türlerine örnek olarak verilebilmektedir. Reaktif yapıları nedeni ile ROS ve diğer serbest radikaller, bütün hücre bileşenleri (lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi) ile etkileşebilme ve zarar verme potansiyeline sahiptirler. ROS sinyal iletiminde rol oynamasına rağmen, aşırı ROS üretimi oksidatif strese neden olur [9].

(-) - Epikatekinin başlıca yararlı etkilerinden biri, ROS ile kimyasal olarak tepkimeye girmesi veya ROS atım bileşenlerini ve enzimleri düzenleyen yolları modüle ederek doğrudan veya dolaylı olarak ROS'u süpürme kabiliyetidir. Hidroksil grupları, flavonoidlerin ROS süpürmesinden sorumlu önemli yapısal özelliği olarak tanımlanmıştır [37].

Jung ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada; kaempferol, kaempferol-7-O-β-D glukozit, (+) - katekin, dihidrokaempferol, hesperetin-5-O-β-D-glukozit, narinjenin ve 7-O-β-D-glukozit olmak üzere yedi flavonoid analiz edilmiş ve bunların inhibe edici gücünün, toplam ROS üzerindeki bileşiklerin içerdikleri hidroksil gruplarının sayısı ile değişiklik gösterdiği ifade edilmiştir. Bunun yanında, orto-hidroksil gruplarının varlığı da, EC'de (Şekil 2.5) orto-(o) katekol parçasında görüldüğü gibi ROS süpürücü etki için gerekli olduğu aktarılmıştır [37].

2013 yılında yapılan bir çalışma bu bilgiyi destekler niteliktedir, (-) - epikatekinin o-katekol kısmının, süperoksit ve hidrojen peroksit ile reaksiyondaki doğrudan detoksifikasyon etkileri için gerekli olduğunu doğrulamıştır. EC'nin ROS etkileşimi sonucunda oluşan en basit reaksiyon ürünü, başka reaksiyonlara da girebilecek olan (-) – epikatekin o kinon (Şekil 2.5) olacağı belirtilmiştir [9].



Şekil 2.5. (-) - Epikatekin ve oksidasyon ürünü (-) – epikatekin-o-kinon [37]

Antikanser etkisi

Yeşil çay katekinlerinden olan epikatekinin etkilerinin yoğun olarak incelendiği alanlardan biri de kanserdir. 2010 yılında yapılan bir çalışmada EC'nin, ardışık 22 gün boyunca 40mg/ kg'lık bir dozda ağızdan verildiğinde, farelerde akut miyeloid lösemi hücrelerinde DNA (Deoksiribo nükleik asit) hasarına ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir [38].

EC'nin KRAS mutant pankreatik kanser hücrelerini spesifik olarak in vitro ve in vivo inhibe ettiği keşfedilmiştir. Bu çalışmada, EC tedavisi, KRAS mutant pankreatik kanser hücrelerinin yaşayabilirliğini azalttığı ve normal hücrelerin canlılığını etkilemediği, aynı zamanda GTP bağlı Ras protein seviyelerini, Akt fosforilasyonunu ve NF-κB transkripsiyonel aktivitesini azalttığı belirtilmiştir [39].

Catalpa speciosa, *Taxus cuspidata* ve *Magnolia acuminata* (MA) kabuğu ekstraktlarının antioksidan ve antikanser etkilerinin incelendiği 2019 Şubat ayında yayınlanan bir çalışma da, MA test edilen diğer türlerden ve standart antioksidanlardan önemli ölçüde daha yüksek antioksidan aktiviteler gösterdiği belirtilmiştir. Bunun yanında MA'nın MCF-7, HeLa, Jurkat, T24 ve HT-29 hücrelerine karşı diğer ekstrakt türlere göre daha iyi antikanser aktivite gösterdiği ifade edilmiştir. Ayrıca, normal hücrelerde hiçbir

antiproliferatif aktivite gözlenmediği belirtilmiştir. MA'da iki fenolik asit (ellajik asit ve protokatejik asit) ve üç katekin (katekin, epikatekin ve epigallokatekin gallat) yapılan analiz neticesinde tespit edilmiş ve EC miktarı 22,78 mg/100 g ile ikinci dominant bileşik olduğu belirtilmiştir. Antikanser aktivitenin fenolik bileşiklere özgü olduğu ifade edilmiştir [40].

Bazı polifenollerin katkı maddesi veya sinerjistik etkisine ilişkin bir takım endikasyonlar bulunmaktadır. Buharda pişirilmiş ginseng'den türetilen ve aktif bir bileşik olan *panaxadiol*'ün EC ile birlikte verildiğinde sinerjik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. İnsan kolorektal kanserli HCT-116 hücreleri kullanılarak, 20 μM panaxadiol'ün 150, 200 veya 250 μM EC ile kombinasyonunun sırasıyla % 51, % 97 ve % 95 büyüme inhibisyonu ile sonuçlandığı tespit edilmiştir. Bu kombinasyon, anneksin V / PI(propidyum iyodür) boyaması ile incelendiğinde apoptoz düzeyini % 11,9, % 16,6 ve % 25,8 oranında artırdığı belirtilmiştir [41]. Bu ve benzeri çalışmalar, (-) - epikatekin ve epikatekin ile kombine edilen ilaçların antikanser aktivitesi için çok önemli veriler sağlamıştır.

EC'nin tümör hücrelerinin proliferasyonu üzerinde konsantrasyona bağlı bir inhibitör etkiye sahip olduğu ve izobolografik analizle *cisplatin* ile oluşturulan kombinasyonunun etkisinin sinerjik olduğu ortaya çıkarılmıştır. EC'nin hücre ölümünü apoptoz ile arttırdığı da gözlenmiştir [10].

Kanser tedavisi alan hastalar, hastalığın tedavisinin yanında, kanserin oluşturduğu konvansiyonel etkilerin tedavisinde de EC'den yararlanabilmektedirler. Epikatekinin kemoterapi ilaçları ile birlikte uygulanmasında kemoterapi ilaçlarının yan etkilerinin tedavisine yönelik 2011 yılında yapılan çalışmada, yetişkin sıçanların EC ile ön muamelesi, TNFα, iNOS ve NF-κB ekspresyonunu azaltarak, beyindeki toplam nitrit seviyesini düşürmüş, *doxorubicin'*in nörotoksisitesini azalttığı ifade edilmiştir [42].

Pankreas kanserinin tipik olarak geleneksel terapötik müdahalelere karşı dirençli olduğu ve radyo-duyarlılaştırıcı ilaçların bu terapötik engelin üstesinden gelmek için faydalı olabileceği ifade edilmektedir [43].

EC'nin, Panc-1 hücrelerinde artmış oksijen tüketim oranları ile belirgin olarak mitokondriyal solunum teşvik ettiği belirtilmiştir. EC, glioblastom ve pankreas kanseri

hücrelerini radyasyona karşı duyarlı hale getirmiş olsa da, HNF hücrelerini duyarlı hale getirmemiştir. Bu sonuç ile EC'nin radyosyona karşı duyarlı hale getirme etkisinin kanser hücrelerine özgü olduğu gösterilmiştir. Çoğu pankreas kanseri türü Kras mutasyonları ile karakterize edilmektedir. Bu araştırmada EC'nin radyasyona karşı duyarlı hale getirme özelliğinin MIA PaCa-2 hücre hatlarında da etkili olduğu ifade edilmiştir [44].

Metabolik hastalıklar üzerine etkisi

Obezite, son yıllarda hem gelişmiş ülkelerde hem de gelişmekte olan ülkelerde her geçen gün artan bir halk sağlığı sorunudur [45]. Obezite, tip 2 diyabet, kalp hastalıkları, hipertansiyon ve çeşitli kanser formları gibi metabolik ve kronik hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir ve sağlık sistemine büyük bir yük eklediği ifade edilmiştir [45]. Sano ve arkadaşları tarafından yapılan EC'nin obezite üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada, EC'nin obezite ve insülin direncine inhibisyon etkileri bulunmuştur. Obezite inhibisyon etkisi, kısmen, yağ doku iltihabının iyileştirilmesi yoluyla gerçekleştirildiği ifade edilmiştir [46].

2016 yılında yapılan bir çalışmada, yüksek açlık ve HFD (yüksek yağlı diyet) tüketimi ile beslenen C57BL / 6J farelerinde plazma glukoz ve insülin seviyeleri bozulmuş ve bu farelerde obezite ve insülin direnci oluşturulmuştur. EC bakımından zengin gıdaların tüketiminin obezite ile ilişkili insülin direncini azaltmak için bir diyet stratejisi oluşturabileceği gösterilmiştir. Bu etkinin, adipoz ve karaciğer dokularında insülin tetikleyici sinyalizasyon basamaklarının (insülin reseptörü, IRS1, ERK1/2, Art) bileşenlerinin aktivasyonlarındaki değişikliklerle ilişkili olduğu belirtilmiştir. EC (20 mg/kg-gün) takviyesinin tüm bu parametreleri engellediği / iyileştirdiği ifade edilmiştir. EC, JNK, IKK, PKC ve Protein Tirozin Fosfataz 1B inhibitör moleküllerinin baskılanması yoluyla HFD farelerin insülin duyarlılığının kısmen iyileştirildiği rapor edilmiştir [4].

Hindistan'ın orta, batı ve güney bölgelerinde yaygın olarak bulunan, diyabet ve diğer hastalıkların tedavisinde Hindistan'da önemli bir geleneksel ilaç olarak kullanılan bir ağaç olan *Pterocarpus marsupium* içeriğinde önemli bir biyoaktif bileşik olarak EC bulunduğu belirtilmiştir [47]. Diyabet için bir tedavi aracı olarak kullanılan *Pterocarpus marsupium* özütünün önemli etkilerinin EC'nin insülinimetik etkilerine bağlı olduğu belirtilmiştir [36].

Kalp ve damar hastalıkları üzerine etkisi

Kuna yerlilerinin Panama şehrinin bir banliyösüne (Vera Cruz) taşınanlarla, adalarda yaşayanların diyetinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, Panama kıyılarındaki adalarda yaşayan Kuna yerlilerinin, etkili düzeyde düşük hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalık insidansına sahip oldukları tespit edilmiştir. Adalarda yaşayan yerlilerin günlük bol miktarda kakao tükettikleri ifade edilmektedir. Banliyöde yaşayan Kuna yerlilerinde bu etkinin kakao tüketiminin kesilmesiyle kaybolması, genetik özelliklerden ziyade sürekli kakao tüketimine bağlı olduğu belirtilmiştir [48]. Fermente edilmemiş kakao çekirdekleri 120-180 g / kg polifenol içerir ve EC % 35'e yakın oranı ile kakaonun ana polifenolik bileşiği olduğu gösterilmiştir. Bu yüksek oran dikkate alındığında EC'nin kakaonun yararlı etkilerinin anahtar aracı olduğu aktarılmıştır [36, 49].

Hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıkları indükleyen en önemli faktörlerden biridir. Klinik çalışmalar ve meta-analizleri, EC bakımından zengin olan kakao içeren yiyeceklerin, insanlarda kardiyovasküler ve nöropsikolojik sağlığa, yüksek kan basıncının düşürülmesi ve damar fonksiyonundaki iyileşmeler gibi önemli yararlar sağlayabileceğini ifade etmektedir [50].

Deoksikortikosteron asetat (DOCA) - tuz hipertansif fareler üzerinde yapılan (28 günlük, 1 mg/kg/gün) bir çalışmada, EC'nin kan basıncını düşürme, miyokardiyal sertleşmeyi önleme ve hipertrofiye karşı DOCA-tuz sıçan kalplerinde kardiyak uyumunu koruyabilme gibi faydalı etkileri gösterilmiştir [51].

2018 yılında yapılan bir çalışmada, dişi *Wistar normotansif* (NTR) ve kendiliğinden hipertansif sıçanlar (SHR) üzerinde, EC'nin (0,3, 1 ve 3 mg/kg) klinik kullanım için diüretikler *L-NAME, Atropin ve İndometasin* ile birlikteolan etkileri incelenmiştir. EC, amilorid ile kombinasyon halinde verildiğinde, Cl atılımında ve bu diüretik sınıfının karakteristik özelliği olan potasyum koruyucu etkide önemli bir artış oluşturduğu tespit edilmiştir [52].

İn vivo ve in vitro olarak yapılan çalışmada, EC (1 mg/kg/gün) miyokardiyal iskemi operasyonundan önce 10 gün boyunca her gün oral gavaj yoluyla uygulanmıştır. Kardiyomiyositler ise, EC (5 μM) ile 1 saat muamele edilmiş ve sonrasında anoksi

koşulları altında 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonuç olarak, epikatekinin in vivo olarak fare miyokard iskemisi üzerindeki koruyucu etkisi gösterilmiştir. Bu çalışma ile EC fosfataz ve tensin homolog / protein kinaz B/ fosfoinositid 3-kinaz sinyal yollarını hedefleyerek iskemik kalp hasarını azaltan yeni bir anti-apoptotik reaktif olarak belirtilmiştir [53]**.**

Yaşlı sığır koroner arter endotel hücreleri ve 3 ve 18 aylık farelerde (Hücreler 48 saat/1 µM- fareler 15 gün/ (1 mg/kg/gün)) yapılan çalışmalarda; EC'nin, endotel hücre yaşlanmasını tersine çevirdiği ve vasküler fonksiyonun kilit kontrol elemanlarını geri yüklediği gösterilmiştir. Bu etkilerin, kakao tüketiminin kardiyak ve vasküler hastalıkların insidansı üzerindeki yararlı etkileri için epidemiyolojik kanıtları kısmen açıkladığı ifade edilmektedir [54].

Nörodejeneratif hastalıklar üzerine etkisi

2013 yılında yapılan bir çalışma da reperfüzyondan 90 dakika önce EC tedavisi ile kalıcı distal orta serebral arter tıkanıklığının ardından beyin iskemi / reperfüzyon hasarında epikatekinin etkileri incelenmiştir. Sırasıyla 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 15 mg/kg EC ile tedavi edilen farelerde enfarktüs boyutunda % 55, % 40 ve % 50 azalma tespit edildiği belirtilmiştir [55]. Yaban tipi ve NRf2 -/- farelerden kültürlenmiş nöronları kullanan araştırmacılar, oksijen / glikoz yoksunluğundan 6 saat önce başlayan 50 veya 100 µM EC ile ön muamele, yaban tipi farelerin nöronal kültürlerini oksijen/glukoz yoksunluğundan koruduğu, ancak Nrf2 -/- farelerden izole edilen nöronlarda bu etkinin gözlenmediği ifade edilmiştir [55].

2019 Mart ayında yayınlanan bir araştırmada, EC (10, 20 µM- 1saat) kullanılarak HT22 hücre hattında çalışma yapılmış, çalışma sonucunda EC'nin HT22 hücrelerinin metamfetamin (METH) kaynaklı hücre ölümünü azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca, EC'nin ERK, p38 aktivasyonunu engellediği ve CHOP, DR4 ekspresyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir. EC ayrıca METH kaynaklı ROS birikimini azalttığı açıklanmıştır. EC'nin ER stresini ve mitokondriyal hasarı azaltarak HT22 hipokampal nöronlarını METH kaynaklı hücre ölümüne karşı koruyabileceğini gösterdiği aktarılmıştır [56].

EC'nin oral uygulandığı bir çalışmada, EC lipid peroksidasyonunu ve ROS seviyelerini önemli ölçüde düşürmüş ve glutatyon seviyelerini arttırdığı belirtilmiştir. Ayrıca, EC tedavisi mitokondriyal fonksiyonu önemli ölçüde iyileştirdiği rapor edilmiştir. EC, homosistein tarafından indüklenen oksidatif strese ve mitokondriyal hasara karşı koruyucu etkiler göstermesi, alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi veya tedavisi için etkili bir ilaç olma potansiyeli barındırdığı belirtilmektedir [57].

Antienflamatuar etkisi

EC'nin, koliti azaltan ve kolitin önlenmesi ve tedavisi için faydalı olduğunu gösteren, doku iyileşmesini uyarma potansiyeline sahip bir antioksidan aktivitesi olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada, dört hayvan grubu farklı dozlarda (5, 10, 25 ve 50 mg/kg) EC, kolit indüksiyonundan iki gün önce günde bir kez, kolit indüksiyonundan 2 saat önce ve 24 saat sonra oral olarak verilerek 3 haftalık inceleme yapılmıştır. Araştırma sonucunda 10 mg / kg EC'nin, hem akut hem de kronik kolit modellerinde kolit şiddetini etkili bir şekilde azalttığı ifade edilmiştir. EC, glutatyon seviyelerinin korunması ile oksidatif stresi azaltarak, mukozayı enfeksiyon sızmasına karşı koruduğu belirtilmiştir. EC'nin antienflamatuar etkisi, dokudaki Siklooksijenaz (COX-2) seviyelerinin azalmasında da gözlenmiş, bunun yanı sıra EC'nin, Epidermal büyüme faktörünün ekspresyonunu uyararak hücre proliferasyonunu ve epitel onarımı uyardığı belirtilmiştir [58].

Antialerjik etkisi

Dişi BALB/c fareleri, köklü bir gıda alerjisi modelinin protokolünü takiben ovalbümine (OVA) duyarlı hale getirildiği bir çalışmada, son hassaslaştırma işleminden sonra 8 gün boyunca polifenoller ile zenginleştirilmiş ekstraktlar veya saflaştırılmış EC içeren diyetlerle beslenmişlerdir. Hassaslaştırılmış fareler, müdahaleden sonra oral olarak OVA ile tehdit edilmiştir. Kontrol ve tedavi grubu farelerin alerjene spesifik serum Ig konsantrasyonlarına ve bağırsaktaki gen ekspresyon profillerine ek olarak alerji semptomları karşılaştırılmıştır. EC içeren polifenolle zenginleştirilmiş meyve özleri, in vivo olarak önemli bir antialerjik etki gösterdiği açıklanmıştır. EC'nin duyarlılaştırılmış farelere oral olarak uygulaması alerji semptomlarını doza bağlı bir şekilde modüle ettiği belirtilmiştir. Plazmadaki biyoyararlanım ölçümleri, alerji semptomlarının azalmasının EC metabolitlerinin daha yüksek konsantrasyonlarına bağlı olabileceği gösterilmiştir. EC'nin,

duyarlılaştırılmış farelerde alerji sonuçlarını modüle etme kabiliyetine sahip anahtar bir biyoaktif polifenol olduğu ifade edilmiştir [59].

Radyasyon koruyucu etkisi

EC ile radyasyon öncesi ve radyasyon sonrası tedavileri, ROS aracılı mitokondriyal hasarı, süperoksit dismutaz aktivitesinin azaltılmasını ve yüksek nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 ekspresyonunu içeren IR (iyonize radyasyon) oksidatif stres tepkilerini hafifletmiş ve insan fibroblast sağkalımını arttırdığı gösterdiği ifade edilmiştir. EC'nin, in vitro olduğu gibi, fare trombositlerinde de in vivo IR'ye maruz kaldıktan sonra ROS aracılı mitokondriyal hasarı da hafiflettiği belirtilmiştir. Bununla beraber EC'nin oral uygulaması, fare hematopoetik hücrelerinin in vivo radyasyon hasarından geri kazanımını önemli ölçüde arttırdığı ifade edilmiştir. EC'nin, mitokondri aracılı oksidatif stresi hedef alarak kazara IR maruziyetine karşı hemen etkili olan potansiyel olarak uygulanabilir bir karşı önlem ajanı olduğu ortaya konmuştur [60].

2.4. Kullanılan Destek Materyalleri

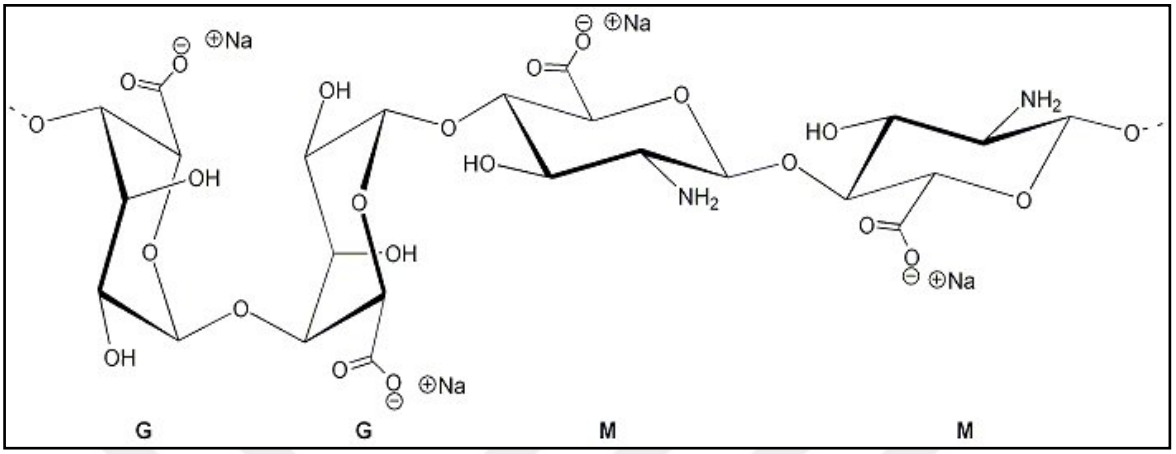
2.4.1. Sodyum aljinat

Stanford 12 Ocak 1881 tarihinde alkali çözeltiler yardımıyla *Laminaria* türü bir yosundan elde ettiği akışmazı kullanmıştır. Kullandığı bu ürüne halen tanımlarda kullandığımız "Algin" (tr. aljin) ismini vermiştir [61].

Kahverengi deniz yosunlarından alkali ile muamele edilerek izole edilen aljinatlar, gıda endüstrisinde ve endüstriyel uygulamalarda çok amaçlı olarak kullanılan hidrokolloidlerden biridir. Bu maddenin doğal görevi su yosunun esnekliğini sağlamaktır. Bu nedenle dalgalı sularda yetiştirilen algler sakin sularda yetişenlerden daha fazla aljinat barındırmaktadır. Aljinat α-L-guluronik asit (G) ve β-D-mannuronik asit (M) gibi fonksiyonel bileşenlerine (Şekil 2.6) ayrılabilen, biyouyumlu bir polimerdir [62].

Aljinatlar birçok enkapsülasyon metoduna uygun olması, toksik olmaması, mekanik olarak dayanıklı enkapsüllerin elde edilebilmesi, porozitesinin yüksek olması, biyouyumlu ve biyoparçalanabilir olması nedeni ile geniş bir kullanım avantajı sunmaktadır. Ticari olarak

sodyum tuzu halinde elde edilir. Gıda endüstrisinde jel yapımında yaygın olarak kullanılır [64].



Şekil 2.6. Sodyum aljinatın kimyasal yapısı:β-D-mannuronik asit (M), α-L-guluronik asit (G) [63]

Aljinatlar; proteinlerin, etken maddelerin ve hücrelerin tutulup taşınmasında bir matriks olarak kullanılmasına imkân sağlar. Sodyum aljinatın iki değerlikli katyonlarla çapraz bağlanarak hazırlanmış aljinat jel mikropartikülleri, kontrollü salım preparatlarında oral yolla ilaç taşıyıcı araç olarak büyük önem taşımaktadır [65].

Sodyum Aljinatın özellikleri

Molekül Ağırlığı	:	216.121 g/mol
Molekül Yapısı	:	$C_6H_9NaO_7$
Viskozite	:	200 ± 20 mpa.s.

Çözünürlük

Aljinatların su içindeki çözünürlükleri ortamın iyonik gücü, çözücünün içindeki jelleştirici iyonların varlığına ve çözücünün pH'sına bağlıdır. Amonyum aljinat, potasyum aljinat ve sodyum aljinat suda çözünmekteyken, aljinik asit ve kalsiyum aljinat suda çözünmemektedir. Çözünür hale geçmeleri için protonlanmış karboksilik asit grupları ve pH'nin belirli değerlerde tutulması gereklidir. Ortamın değişen iyonik gücü, polimer üç boyutlu ortamda dizilimini, zincir uzamasını, akışkanlığı ve bu nedenle de çözeltinin çözünürlüğünü etkilemektedir. Ca^{+2}, Sr^{+2} ve Ba^{+2} gibi iki değerlikli katyonların varlığında

jelleşebilen aljinatların çözünebilmesi için çapraz bağlama iyonlarının sulu serbest solvent olması gerekmektedir [66].

Seçici iyon bağlama

Jel oluşumu için esas olan çok değerlikli katyonları seçici olarak bağlaması aljinatın en önemli özelliğidir. Aljinatlar kalsiyum ve çinko iyonları gibi iki değerlikli katyonların varlığında iyonotropik çapraz bağlama yoluyla hidrojel oluşturma yeteneğine sahiptir. Kalsiyum aljinat jeli oluşturmak için $CaCl_2$ yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [67].

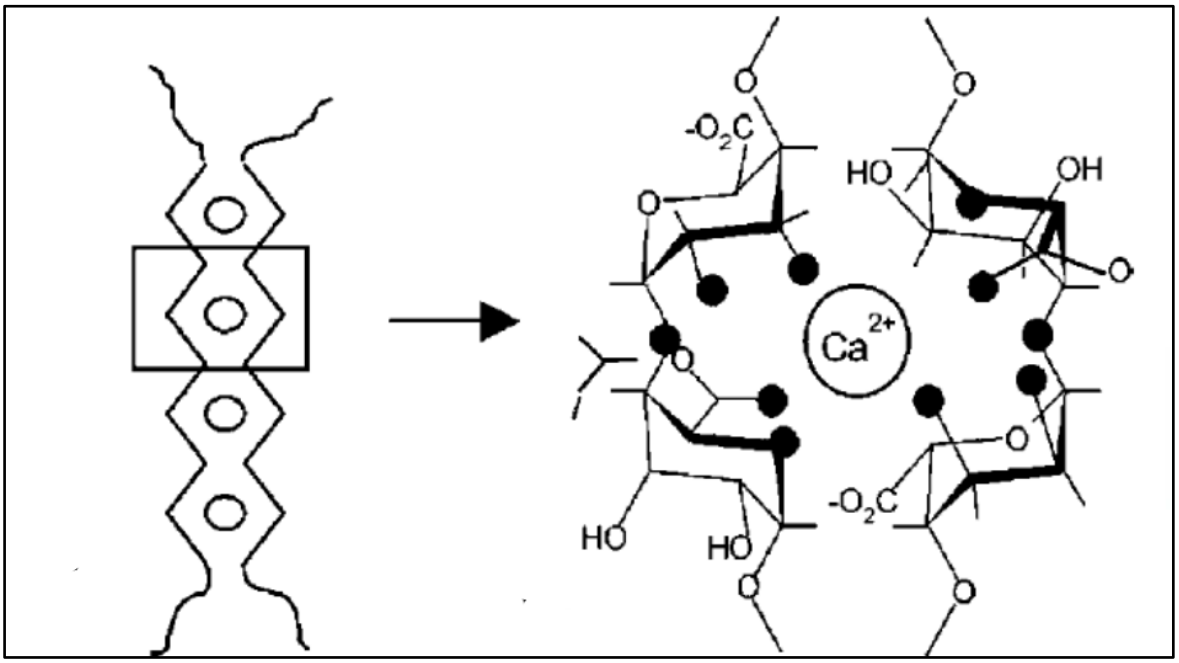
Katyon tuzu ve aljinat çözeltisi arasındaki tepkime aşağıda gösterilmiştir:

$$2Na.Alg + M^{1}Cl_2 \rightarrow M.Alg_2 + 2NaCl$$

Kalsiyum iyonu ve/veya diğer iki veya çok değerlikli katyon içeren sulu çözeltilere aljinat solüsyonunun damlalar halinde ilave edilmesi küresel (boncuk şeklinde) bir jel yapı oluşumuna neden olmaktadır [68]. Zincir boyunca mevcut G bloklarının miktarı, jelleşme kapasitesini düzenleyen bu mekanizma ile doğrudan ilişkilidir. Çünkü hidrojelin oluşumunda yalnızca gluronik asit aktif rol oynamaktadır. Bir başka deyişle bir aljinat solüsyonu Ca^{+2} ve Be^{+2} gibi iki değerlikli katyonların varlığında hidrojel yapıya dönüşebilmektedir. Bu hidrojel yapı, guluronik asit kalıntıları ve iki değerlikli katyonların moleküller arası çapraz bağlanması sonucu, kalsiyum iyonlarının etkisi altında iyonik etkileşimler yardımıyla birbirine tutunan üç boyutlu aljinat filamentleri oluşturarak "yumurta-kafes" adı verilen jel yapıya dönüşmektedir [63]. Şekil 2.7'de "yumurta-kafes modeli" modelinin oluşumu gösterilmiştir. Bu reaksiyon çok hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir ve bu jelin stabilitesi istikrarlı birleşmelerin oluşumundaki G bloklarının uzunluğuna ve solüsyona eklenen iyonların miktarına bağlıdır. Difüzyon metodu ve iç jelasyon metodu, iyonik çapraz bağlama ile aljinat jellerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Çapraz bağlama iyonları ortama bu yöntemlerde farklı şekillerde ilave edilmektedir. Difüzyon yöntemi, aljinat çözeltisi içine dış ortamdan iki değerlikli iyonların girişi ile karakterize edilmektedir [69].

[1]M: İki değerli katyon

Bu jelleşme çok kısa sürede gerçekleşmekte, aljinat jeli içindeki çapraz bağların homojen olmayan bir dağılımı ile sonuçlanmaktadır. İç jelasyon yöntemi aljinat solüsyonu ile çapraz bağlama iyonunun bir inaktif formunun karıştırılmasına dayanmaktadır. Kalsiyum genellikle jelasyon işleminde kullanılan iyondur. Yavaş bir şekilde gerçekleşen bu metotta jellerin oluşumu kontrol altında tutularak, aljinat jelinin homojen bir şekilde dağılımı amaçlanmıştır [70].



Şekil 2.7. Yumurta-kafes modelinin oluşumu [63]

2.4.2. Polivinilpirolidon

Polivinilpirolidon (PVP), suda çözünebilen, polaritesi yüksek, toksik olmayan ve amfoterik yapıda sentetik bir polimerdir (Şekil 2.8). Polivinilpirolidon, povidon, polipovidon, polividonum, poli(N-vinil-2-pirolidon), poli(N-vinilbutirolaktam), 1-vinil-2-pirolidone homopolimer gibi farklı isimlerle bilinen polimer, ilaç endüstrisinde yardımcı etken madde (tablet, kontrollü salım dozaj formları) başta olmak üzere, tekstil endüstrisinde, kozmetik ve gıdada fazlaca kullanılmaktadır [71]. Sulu çözeltileri berrak ve renksiz-hafif sarımsıdır. Toz ürünleri, beyaz ve krem renklidir.

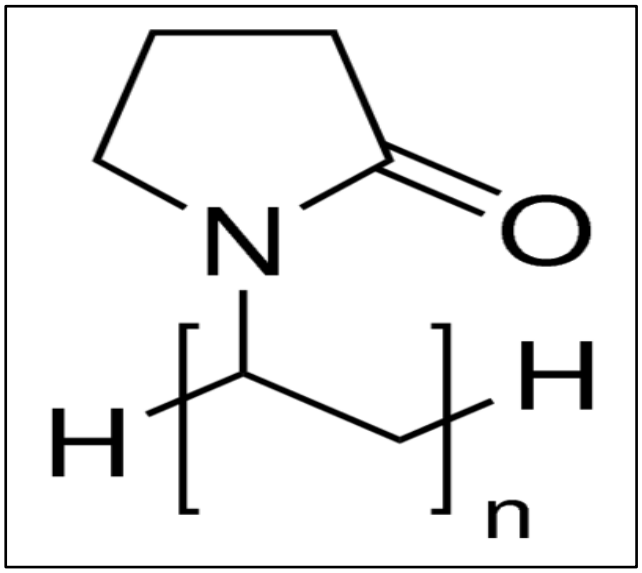
PVP, özellikle su içindeki iyi çözünürlüğü, toksik olmayan karakterive hidrofilik ve hidrofobik maddeler ile uyumu, fiziksel ve kimyasal özellikleriyle yakından ilgilidir. PVP, çözünürlüğü miktarı az olan ilaçların çözünme miktarlarının arttırılması için yaygın olarak

kullanılmaktadır. PVP, katı halde dağıtılan ilaçların yapımında da kullanılan bileşenlerden biridir [72]. Sahip olduğu amorf katı hal, çözünme hızını ve ilaç çözünürlüğünü arttırmaktadır.

PVP, polar çözücüler içinde de çözünebilen uyumlu bir polimer olması, çevresel kararlılığı, mükemmel optik saydamlığı ve kolay işlenmesi sayesinde yoğun ilgi çekmektedir. PVP molekülü, kuvvetli bir hidrofilik bileşen (pirolidon parçası) ve önemli bir hidrofobik grup (alkil grubu) içerir. PVP birçok malzeme ile karışabildiği gibi, stabilizasyon katkı maddesi olarak da kullanılabilmektedir. PVP; kozmetik, ilaç ve elektrikli cihazlar da dâhil olmak üzere yaygın kullanımı ile uygulama alanlarını hızla genişletmektedir [73].

Polivinilpirolidon yapısı

IUPAC adı : Poli [1- (2 – okso- 1- pirinidil) etilen]
Molekül ağırlığı : 111.144 g/mol
Molekül Formulü : $(C_6H_9NO)_n$



Şekil 2.8. PVP’nin molekül yapısı [72]

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal maddeler

Etken madde olarak kullanılan (-)- Epikatekin (EC) Sigma-Aldrich'den (Steinheim, Almanya) temin edilmiştir.

Sodyum Aljinat (NaAlg, Orta Viskoziteli, Molekül ağırlığı 80000-12000 arasında) Sigma Chemical Co (Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir.

Dolgu maddesi olarak kullanılan polimerlerden Polivinilpirolidon (PVP) (ortalama molekül kütlesi: 111,144 g/mol) ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan kalsiyum klorür ($CaCl_2$), Parafin ve Tween-80 Merck firmasından temin edilmiştir.

Diğer kimyasallar; n-heksan Carlo Erba Reagents firmasından, propanol Aklar Kimya firmasında temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

UV spektrofotometresi

Hazırlanan mikrokürelerden salınan EC miktar tayinleri, Rigol Ultra 3600 UV Visible spektrofotometresi kullanılarak 203 nm dalga boyunda ölçülmüştür. EC'nin kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Ek- 1). Antioksidan kapasite tayinleri 517 nm'de ölçülmüştür.

Fourier transform infrared (FTIR) spektrofotometresi

PVP-NaAlg ile oluşturulan boş ve ECyüklü mikroküre lerin FTIR spektrumları, Bruker Vertex 80 model FTIR spektrometresinde ATR aparatı kullanılarak, oda sıcaklığında orta infrared bölgesinde alınmıştır.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Mikrokürelerin elektron mikrografları, vakum altında altın ile kaplandıktan sonra Quanta 4000 F Field Emission model taramalı elektron mikroskobu kullanılarak alınmıştır.

X-ışını kırınımı (XRD)

Etken madde içeren ve boş mikrokürelerin XRD sonuçları APD 2000 PRO X-Işını kırınımı cihazı kullanılarak elde edilmiştir.

Santrifüj

Hazırlanan mikroküreler MPW-251 marka santrifüj cihazı ile çöktürülmüştür.

Ayrıca bu temel cihazların yanında aşağıda verilen cihazlar da kullanılmıştır:

- Çalkalamalı su banyosu (Medline BS-21)
- Magnetik karıştırıcı (Chiltren)
- Etüv (Memmert)
- Analitik terazi (Precisa XB 220A).

3.2. Yöntem

3.2.1. EC yüklü mikroküreleri hazırlanması

EC yüklü mikroküreler emülsiyon çapraz bağlama yöntemiyle elde edilmiştir. Destek maddesi olarak kullanılan NaAlg % 2 (w/w) ve PVP % 8 (w/w) derişimlerinde saf suda hazırlanmıştır. Belirlenen oranlarda hazırlanan polimer karışımının (PVP/NaAlg) homojen dağılmasını sağlamak amacıyla 20 dakika karıştırılmıştır. Oluşturulan bu polimer karışımına önceden hesaplanan miktarda etken madde (EC) ilave edilmiş ve etken madde çözünene kadar (30 dakika) karıştırmaya devam edilmiştir. Farklı bir beher içerisine 20 ml Parafin, 6-7 damla Tween-80 ilave edilerek homojen dağılım sağlamak için yaklaşık 20 dakika karıştırılmış ve etken madde içeren polimer karışımı parafin-tween 80 karışımına ilave edilmiştir. Hazırlanan su/ yağ (w/o) emülsiyonu üzerine % 5 (w/w) $CaCl_2$ çapraz bağlayıcı ilave edilerek su/yağ/su (w/o/w) emülsiyon oluşturulmuştur. Çapraz bağlama işleminin 30 dakika boyunca 400 rpm karıştırma hızında devam etmesi sağlanmıştır.

Emülsiyon çapraz bağlama yöntemiyle elde edilen küreler çapraz bağlama süresi sonunda süzülerek ortamdan alınmış ve sırasıyla n-heksan, izopropil alkol ve distile su ile yıkanmıştır. Yıkanan küreler 40 ^{0}C 'de etüvde 1 gün kurutularak sabit tartıma getirilmiştir.

Farklı etken madde ve polimer oranlarında mikroküreler hazırlanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Mikroküre lerin hazırlanma koşulları (ÇBD[1]: % 5 $CaCl_2$)

No	Polimer (w/w)	Etken madde/Polimer Oranı (w/w)	Çapraz bağlama Süresi (dk)
A_0	NaAlg	—	30
A_1	NaAlg	1/2,5	30
A_2	NaAlg	1/5	30
A_3	NaAlg	1/10	30
B_0	1/10 (PVP/NaAlg)	—	30
B_1	1/10 (PVP/NaAlg)	1/2,5	30
B_2	1/10 (PVP/NaAlg)	1/5	30
B_3	1/10 (PVP/NaAlg)	1/10	30
B_4	1/10 (PVP/NaAlg)	1/10	45
C_0	1/5 (PVP/NaAlg)	—	30
C_1	1/5 (PVP/NaAlg)	1/2,5	30
C_2	1/5 (PVP/NaAlg)	1/5	30
C_3	1/5 (PVP/NaAlg)	1/10	30

[1] ÇBD: Çapraz bağlayıcı derişimi

3.2.2. EC yüklü mikroküre lerden salım çalışması

Farklı oranlarda hazırlanan mikroküre lerin salım miktarları ve hızlarını belirlemek için 10 mg etken madde içerecek şekilde mikroküre örnekleri alınmış, 100 ml distile su salım ortamı içeren cam kap içerisine konulmuş ve cam kabın ağzı kapatılarak çalkalamalı su banyosuna yerleştirilmiştir. Salım çalışmaları 37 ^{0}C'de ve pH= 7 de gerçekleştirilmiştir. Mikroküre lerden salınan EC miktarını belirlemek için 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 24. saatlerde salım ortamından 10 ml örnekler alınmış ve yerine 10 ml salım ortamı ilave edilmiştir. Salım ortamından alınan 10 ml'lik örneklerin UV spektrofotometresi ile 203 nm'de absorbans değerleri belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi (Ek-1) kullanılarak absorbans üzerinden derişimler hesaplanmıştır.

3.2.3. Mikroküre lerin denge su içeriklerinin tayini

Boş mikroküre lerin şişme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla sabit tartıma gelmiş 0,05 g mikroküre örnekleri 50 mL saf su ve pH 7 tampon çözeltisi içerisinde 24 saat süreyle bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda mikroküre lerin yüzey suyu uzaklaştırılarak tartılmıştır.

Boş mikroküre lerin denge su içeriklerinin hesaplanması amacıyla "Eş. 3.1" kullanılmış ve % denge su içerik değerleri Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

$$\%\ Denge\ su\ içeriği\ \ \frac{w}{w} = \frac{(Ws - Wk}{Wk}\ x\ 100 \qquad \text{(Eş. 3.1)}$$

W_s: Şişmiş mikroküre lerin kütlesi,
W_k: Kuru mikroküre lerin kütlesidir.

3.2.4. Tutuklama verimi (TV)

Teorik olarak yüklenmesi gereken etken maddenin gerçekte ne kadar yüklendiğinin ölçüsü "Tutuklama Verimi" ifadesi ile açıklanmaktadır. Emülsiyon çapraz bağlama yöntemi ile hazırlanan EC yüklü mikroküre lerden 0,05 g alınarak 50 ml distile suda ve 37 ^{0}C de çalkalamalı su banyosu içinde 4 saat salım yapılmıştır. 2. ve 4. saatlerde 10 ml örnekler alınarak, yerine aynı miktarda salım ortamı ilave edilmiştir. Alınan örneklerin UV spektrofotometresi ile 203 nm absorbans değerleri belirlenmiş ve etken madde derişimleri tespit edilmiştir.

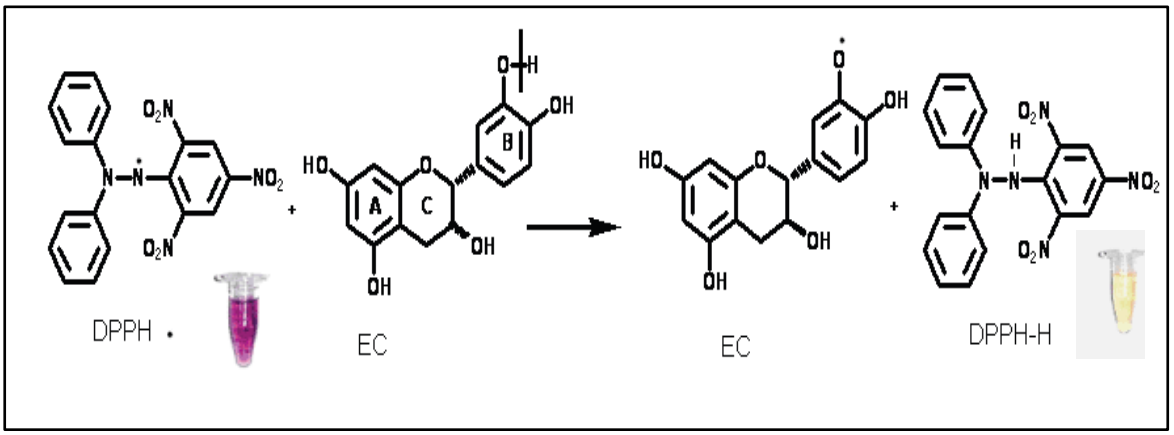
Mikrokürelerin tutuklama verimleri "Eş. 3.2" kullanılarak hesaplanmış ve % tutuklama verim değerleri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir [12].

$$\%\ Tutuklama\ Verimi = \frac{\text{Deneysel Epikatekin Miktarı (mg)}}{\text{Mikrokürelerde Bulunan Toplam Epikatekin Miktarı (mg)}}\ x\ 100 \qquad \text{(Eş. 3.2)}$$

$$\%\ Verim = \frac{\text{Sabit Tartıma Gelen Küre Miktarı}}{\text{Polimer Miktarı} + \text{Epikatekin Miktarı}} x\ 100 \qquad \text{(Eş. 3.3)}$$

3.2.5. DPPH radikal süpürücü aktivite

DPPH yöntemi Marsden Blois (1958) tarafından model antioksidan olarak sistein kullanılarak tanıtılmıştır. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen stabil organik nitrojen radikalidir. Sentetik ya da doğal bileşiklerin DPPH radikalini süpürücü etkileri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil stabil radikalinin menekşe/mor rengini giderme yetenekleri ile ölçülmektedir. Bileşiklerin DPPH ile etkileşmeleri sonucunda oluşan yapının 517 nm'de ölçümüne ve standart madde ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır. DPPH çözeltisi, bir hidrojen atomu verebilecek bir madde (antioksidan) ile karşılaştığında indirgenmiş forma dönüşerek mor-menekşe rengin kaybolmasına neden olmaktadır (Şekil 3.1) [74].



Şekil 3.1. DPPH radikali ile donör molekül EC'nin primer reaksiyonu [12]

Oda sıcaklığında bir süre inkübasyonun ardından 517 nm'de absorbans ölçülmekte ve süpürücü etki, radikal redüksiyonunun yüzdesi olarak hesaplanmaktadır.

Deneyin yapılışı

1) 0,05 mg/ml derişimde hazırlanan DPPH etanol çözeltisinden 1400 µl alınmıştır.

2) Reaksiyon ortamındaki konsantrasyonu 0,5 mg/ml, 1 mg/ml ve 2 mg/ml olacak şekilde hazırlanan mikroküre örnek çözeltilerinden 100 µl alınarak üzerine ilave edilmiş, oda sıcaklığında bir süre bekletilmiştir.

3) Örnekler UV Spektrofotometresinde 517 nm de okunarak absorbans değerleri belirlenmiştir. Kullanılan bileşiklerin radikal süpürücü etkileri kontrol olarak kullanılan DPPH çözeltisine oranla okunan absorbans değerlerine göre "Eş. 3.4" ile hesaplanmıştır.

$$\% \ İnhibisyon = (1 - A_{bileşik} / A_{kontrol}) \ x \ 100 \qquad \text{(Eş. 3.4)}$$

$A_{Kontrol}$: Herhangi bir kimyasal ilave edilmeden ve sadece kimyasal bileşiklerin çözücüsünün ilave edildiği DPPH-Çözücü karışımı kontrol çözelti olarak alınmaktadır.

$A_{Bileşik}$: Antioksidan etkisi incelenen bileşiğin ilavesi ile oluşturulan çözelti.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Farklı oranlarda PVP /NaAlg polimer karışımları ve NaAlg polimerinin destek madde olarak kullanıldığı bu çalışma da, boş küreler ve EC yüklü mikroküreler emülsiyon çapraz bağlama yöntemi ile hazırlanmıştır.

Hazırlanan mikrokürelerin etken madde salım değerleri, denge su içerik değerleri, içerdikleri EC miktarları incelenmiştir. Bu mikrokürelerin etken madde salım oranları karşılaştırılarak en iyi etken madde/polimer oranı, polimer/polimer oranı tespit edilmiştir.

Mikroküreler FTIR, SEM, DPPH ve XRD ile karakterize edilmiştir.

4.1. Mikrokürelerin % Verim Değerleri, % Tutuklama Verimleri

Çizelge 4.1'de EC yüklü farklı polimer/polimer ve etken madde/ polimer oranlarında hazırlanan mikrokürelerin % tutuklama verimleri, % verim değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 incelendiğinde yapıdaki etken madde miktarının fazla olduğu kürelerde tutuklama veriminin düştüğü, polimer miktarı arttıkça da tutuklama veriminin arttığı görülmüştür. Bu durumun polimer yapısındaki Ca^{+2} bağlanma bölgelerinin (guluronik asit) artması ile daha çok çapraz bağlanması ve daha iyi matris yapının oluşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer sonuçlara literatürde rastlanmıştır [75, 76].

Destek materyal olarak PVP ilavesi tutuklama verimini arttırmıştır. PVP'nin kıvam arttırıcı özelliği [72] nedeniyle daha iyi tutuklama sağladığı düşünülmektedir. PVP oranını daha fazla arttığımızda ise NaAlg miktarı azalmış ve tutuklama verimi azalmıştır [21, 76].

Çapraz bağlama süresi arttıkça, yüksek çapraz bağlanmadan dolayı polimerin daha sıkı bir yapı kazanması, böylece polimer matrisleri arasındaki serbest hacimlerin azalarak daha az etken madde kapsüllendiği düşünülmektedir. Sonuçlar literatürle uyumludur [77]. Kabaş'ın, yaptığı enkapsülasyon çalışmasında çapraz bağlama süresini 5 dk.'dan 60 dk.' ya arttırdığında tutuklama veriminin düştüğünü gözlemlemiştir [77]

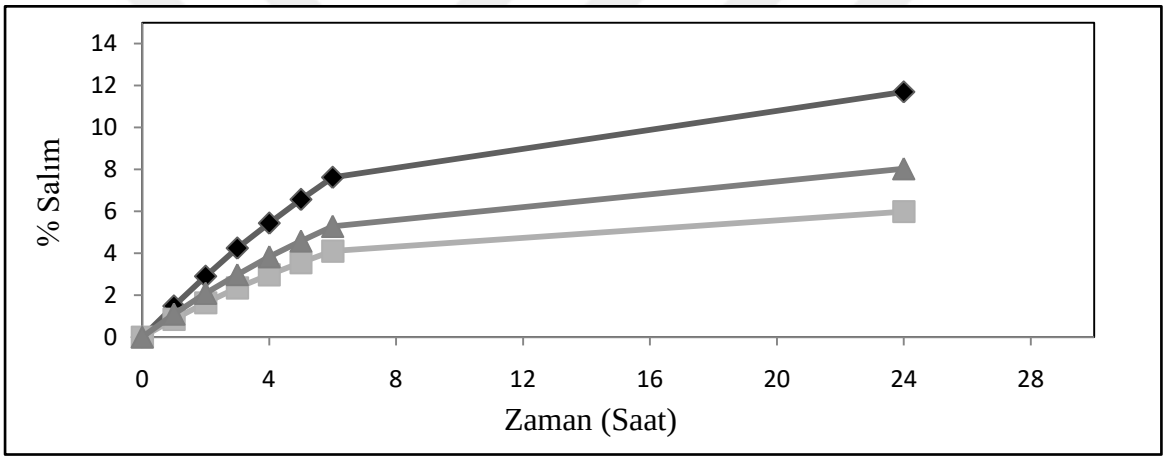
Çizelge 4.1. Farklı formülasyonlarda hazırlanan mikroküreler de % tutuklama verimleri ve % verim değerleri (ÇBD: % 5 (w/w) $CaCl_2$)

No	Polimer (w/w)	Etken madde/Polimer Oranı (w/w)	Çapraz bağlama Süresi (dk)	Verim (%)	Tutuklama verimi (%)
A_0	NaAlg	—	30	100	—
A_1	NaAlg	1/2,5	30	67,92	2,90
A_2	NaAlg	1/5	30	46,66	3,60
A_3	NaAlg	1/10	30	75	6,12
B_0	1/10 (PVP/NaAlg)	—	30	80	—
B_1	1/10 (PVP/NaAlg)	1/2,5	30	39,45	2,46
B_2	1/10 (PVP/NaAlg)	1/5	30	64,48	5,48
B_3	1/10 (PVP/NaAlg)	1/10	30	85,38	7,18
B_4	1/10 (PVP/NaAlg)	1/10	45	29,73	1,63
C_0	1/5 (PVP/NaAlg)	—	30	100	—
C_1	1/5 (PVP/NaAlg)	1/2,5	30	100	4,27
C_2	1/5 (PVP/NaAlg)	1/5	30	86	4,42
C_3	1/5 (PVP/NaAlg)	1/10	30	96,77	5,03

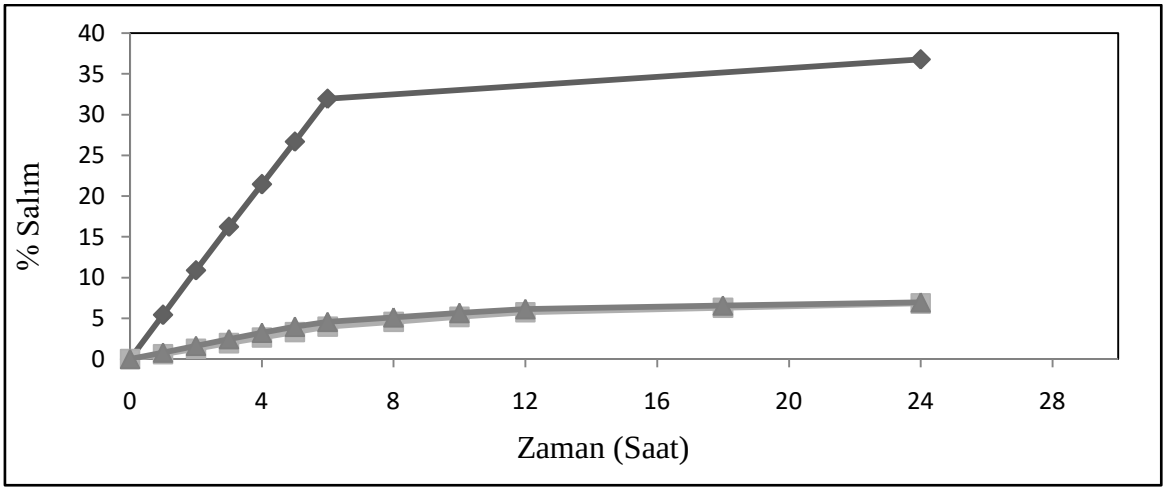
4.2. EC'nin Mikroküreelerden Kontrollü Salımı

4.2.1. Etken madde/polimer oranının EC salımı üzerine etkisi

Etken madde/polimer oranı mikroküreelerden etken madde salımına etki eden önemli bir değişkendir. PVP/NaAlg ve NaAlg tabanlı mikroküreelerde etken madde/polimer oranının etkisini belirlemek amacıyla polimer türü ve oranları, çapraz bağlayıcı türü ve çapraz bağlama süresi sabit tutulmuştur. EC'nin salımına etken madde etkisini incelemek amacıyla hazırlanan polimer yapılara 1/10, 1/5 ve 1/2,5 oranlarında etken madde yüklenmiş ve 24 saatlik salım çalışması yapılmıştır. EC'nin mikroküreelerden salımının E/P oranı ile değişimi Şekil 4.1 ve 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. NaAlg mikroküreelerde E/P oranının salım üzerine etkisi (ÇBD: % 5 (w/w) $CaCl_2$, ÇBS: 30 dak.,▲:A_1, ■: A_2,◆:A_3)

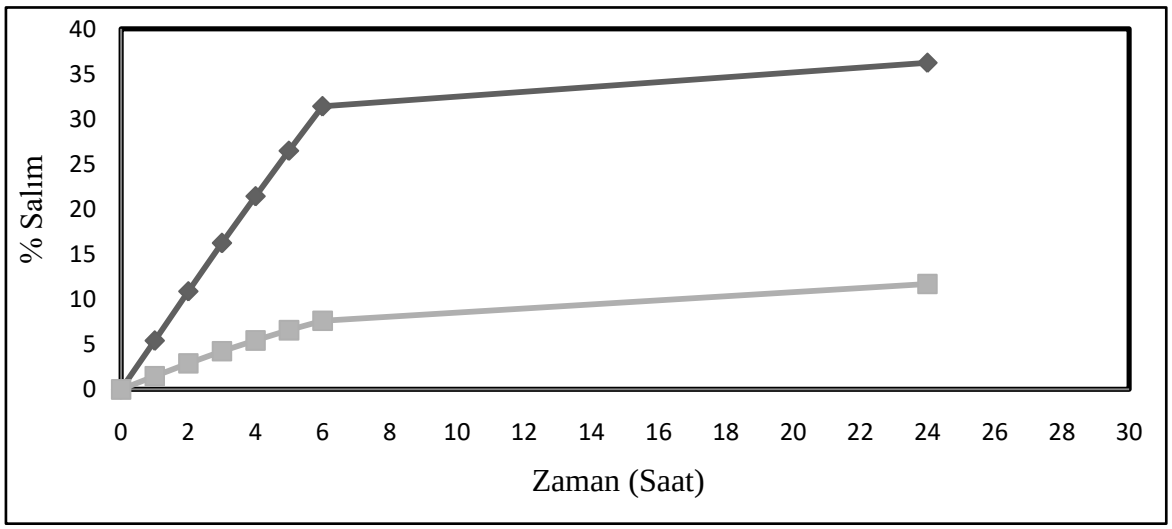


Şekil 4.2. PVP/NaAlg mikroküreelerde E/P oranının salım üzerine etkisi (PVP/NaAlg: 1/10, Ç.B.S: 30 dk, ÇBD: % 5 (w/w) $CaCl_2$, ◆:B_3, ■:B_2, ▲:B_1)

Şekil 4.1 ve 4.2 incelendiğinde etken madde miktarının 1/2,5'dan 1/10'a doğru azalmasıyla etken madde salımı artmıştır. Etken madde miktarı düşük olan mikroküreler de, artan polimer miktarı ile mikroküreler de serbest hacmin arttığı ve salım ortamına etken maddenin difüzlenmesinin kolaylaştığı öngörülmektedir. Elde edilen sonuçlar literatürde benzer çalışmalarla da uyumludur [75, 76, 78]. Yu ve arkadaşları, kitosan ve NaAlg kullanarak hazırladıkları mikroküreler de polimer derişimi arttıkça mikroküreler den etken madde salımının kürelerin daha fazla şişmesi ile arttığını tespit etmişlerdir [75]. Bununla beraber, Kahraman tarafından yapılmış olan bir araştırmada, etken madde olarak 5-fluorourasil kullanmıştır. Etken madde oranını 1/8'den 1/16'ya doğru azaltması ile polimer derişimi artmış ve buna bağlı olarak etken madde salımının arttığı ifade edilmiştir [78].

4.2.2. PVP ilavesinin EC salımı üzerine etkisi

Mikroküre lere PVP eklenmesinin EC salımı üzerine etkisini incelemek amacıyla PVP/NaAlg 1/10 oranında polimer karışımı oluşturulmuş, çapraz bağlama süresi ve etken madde/polimer oranı sabit tutulmuştur. 1/10 oranından etken madde yüklenen NaAlg ve PVP/NaAlg tabanlı mikroküre lerin salım değerleri incelenmiştir.



Şekil 4.3. PVP ilavesinin salım üzerine etkisi (E/P:1/10, ÇBD: % 5 (w/w) $CaCl_2$, ÇBS: 30 dak.,■:A_3◆:B_3)

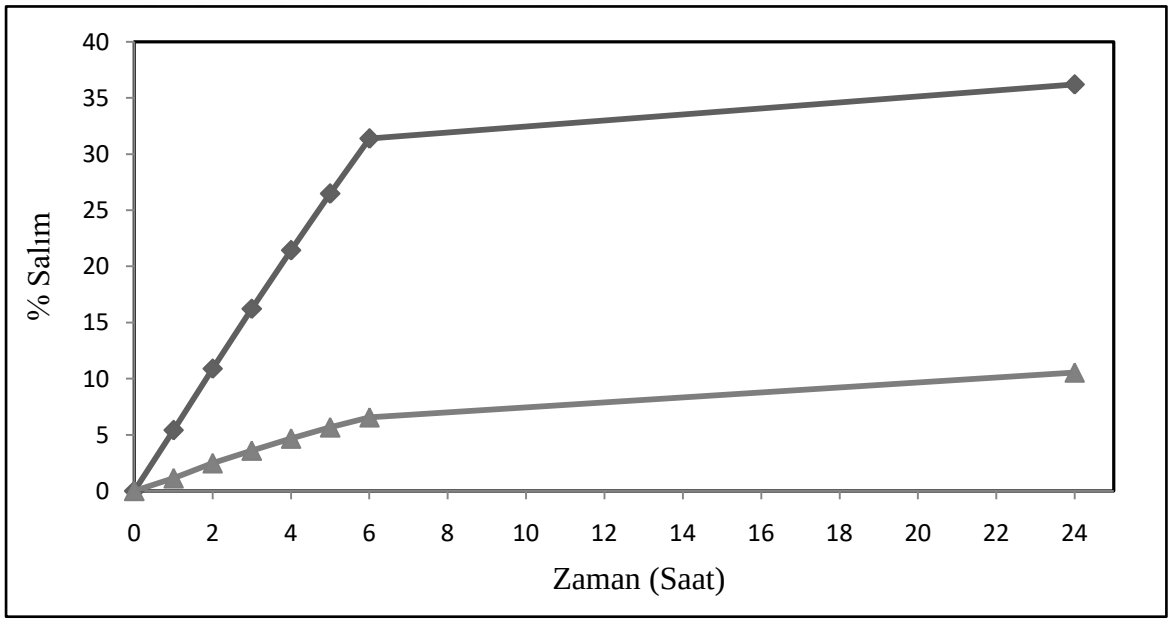
Şekil 4.3 incelendiğinde en iyi tutuklama verimine sahip olan B_3 formülasyonlu mikroküre lerin salım miktarının A_3 formülasyonlu mikroküre lere göre yüksek olduğu görülmüştür.

Etken madde/ polimer (w/w) oranı sabitken mikroküreleredestek madde olarak PVP eklenmesiyle etken madde salımının arttığı görülmüştür. PVP'nin uygun bir koloidal stabilizatör, şekil yönlendirme ajanı ve dağıtıcı olduğu literatürde vurgulanmaktadır [73]. Bununla beraber PVP ilavesiyle mikroküreleri, denge su içerikleri ile uyumlu olarak daha fazla şiştiği için etken madde kolay difüzlendiği ve etken maddenin salım oranının arttığı düşünülmektedir. Benzer sonuçlar literatürde de mevcuttur [73, 79]. 2016 yılında yapılan bir çalışmada, PVP ilavesi ile mikroküreleri salım ortamında daha fazla şiştiği ve etken madde salımının arttığı gözlemlenmiştir [79].

PVP/ NaAlg oranı 1/10 olan mikroküreleri daha yüksek etken madde salımının sağlanabilmesi nedeniyle B_3 formülasyonlu mikroküreler ile çalışmaya devam edilmiştir.

4.2.3. Çapraz bağlama süresinin EC salımı üzerine etkisi

PVP/NaAlg mikroküreleri çapraz bağlayıcı süresinin etkisini incelemek amacıyla PVP / NaAlg: 1/10, E/P: 1/10, ÇBD: %5 $CaCl_2$ (w/w) sabit tutulmuş ve 30 ve 45 dakika çapraz bağlama sürelerinin salım değerleri karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.4. Çapraz bağlama süresinin salım üzerine etkisi (PVP/NaAlg: 1/10, E/P: 1/10, ÇBD: % 5 lik $CaCl_2$, ▲:B_4, ◆:B_3)

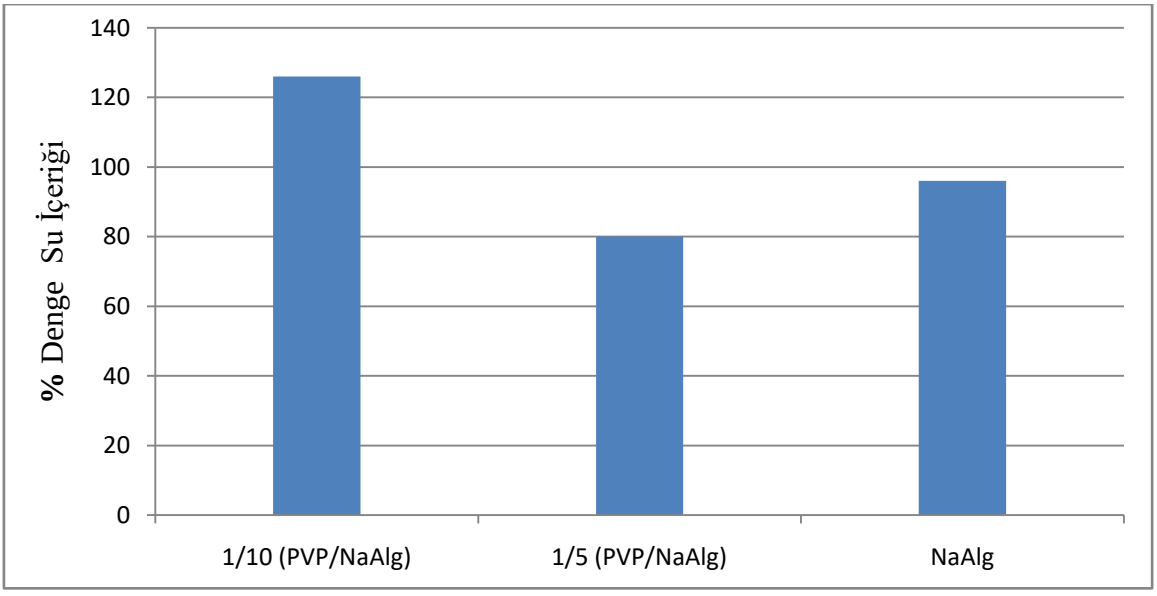
Çapraz bağlama süresinin artmasıyla mikroküreleredeki çapraz bağlanma miktarının arttığı, bu durumun moleküler zincir yapısında daha sıkı yapı oluşturmasına neden olduğu ve

etken maddenin kürelerden difüzyonu zorlaştığı için etken madde salımının azalmasına neden olduğu düşünülmüştür. Benzer sonuçlara literatürde de rastlanmıştır [77, 80]. Bulut tarafından NaAlg ve sodyum karboksi metil selüloz (NaCMC) ile hazırlanan mikrokürelerde çapraz bağlama süresinin etken madde salımına etkisi araştırılmış ve 15 dk, 30 dk, 60 dk, 120 dk çapraz bağlama sürelerini karşılaştırmıştır. Eşit salım sürelerinde çapraz bağlayıcı süresi arttıkça salım değerlerinin azaldığını bulmuştur [80]. Yüksek salım miktarı için en uygun çapraz bağlama süresi 30 dakika olarak optimize edilmiştir (Şekil 4.4).

B_3 formülasyonlu mikroküre lerin % salım değeri % 36,23 ile en iyi oran olarak tespit edilmiştir.

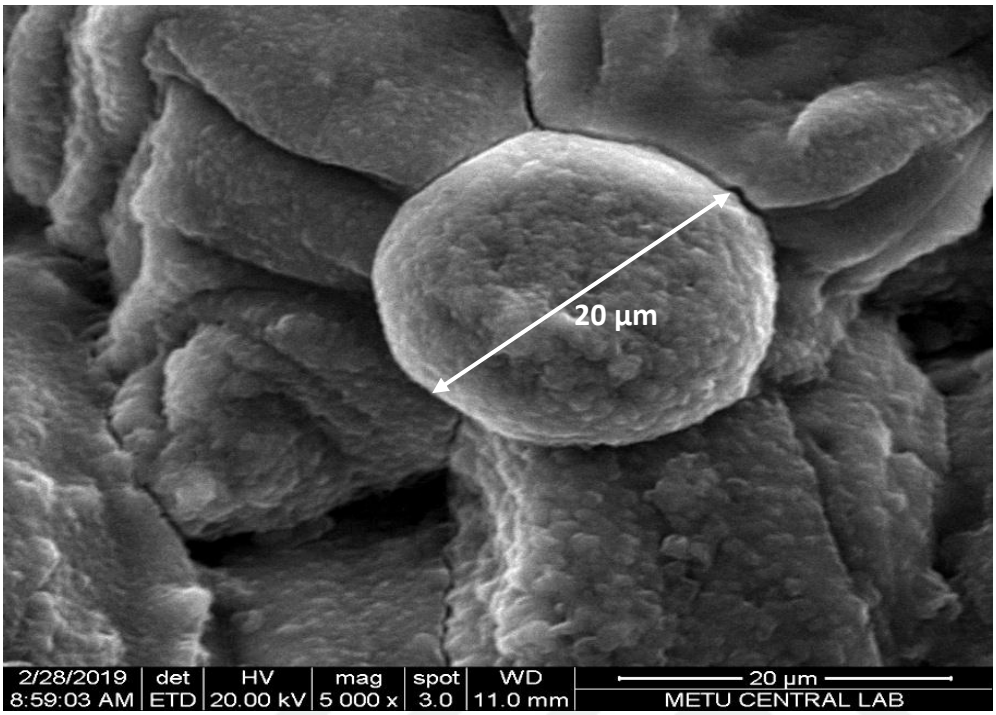
4.3. Mikroküre lere Ait Denge Su İçerikleri

Farklı formülasyonlarda hazırlanan etken madde içermeyen mikroküre lerin % denge su içerik (şişme) değerleri Şekil 4.5'te verilmiştir. Şekil 4.5 incelendiğinde, mikroküreler için en yüksek şişme değeri PVP/ NaAlg 1/10 oranında elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre mikroküreler için şişme değerlerinin tutuklama verimi ve salım sonuçlarını desteklediği görülmektedir.

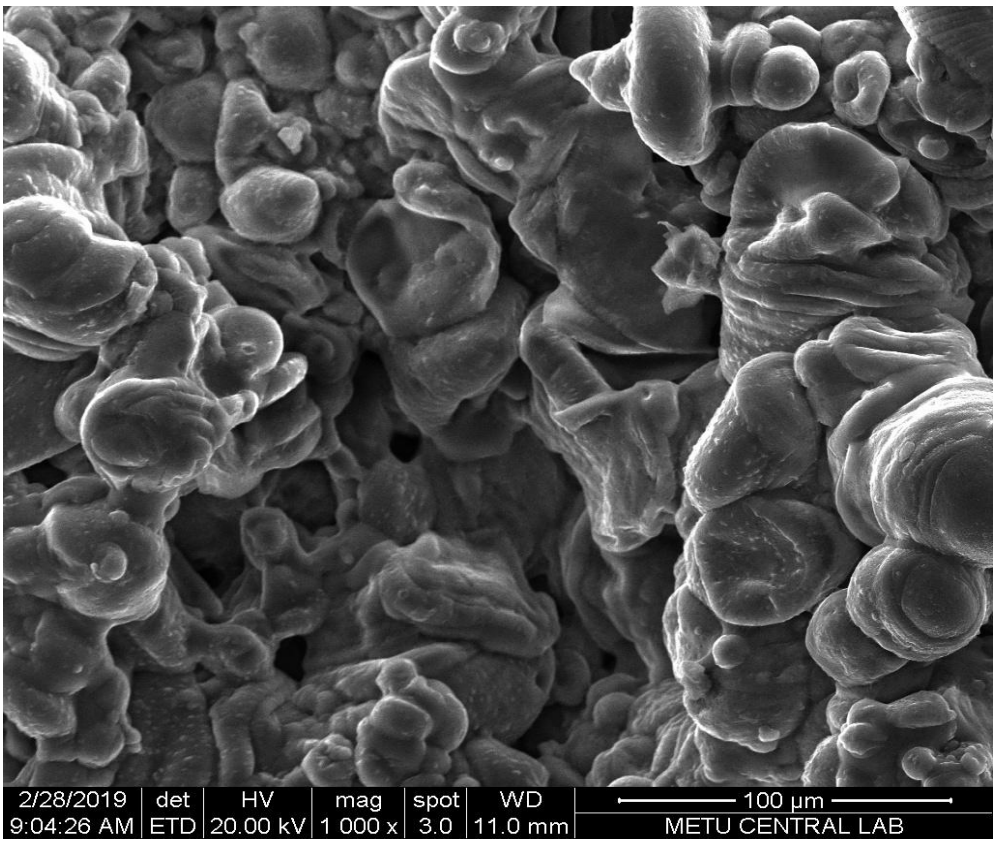


Şekil 4.5. Hazırlanan boş mikroküre lerin % denge su içerikleri

4.4. Mikrokürelerin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri

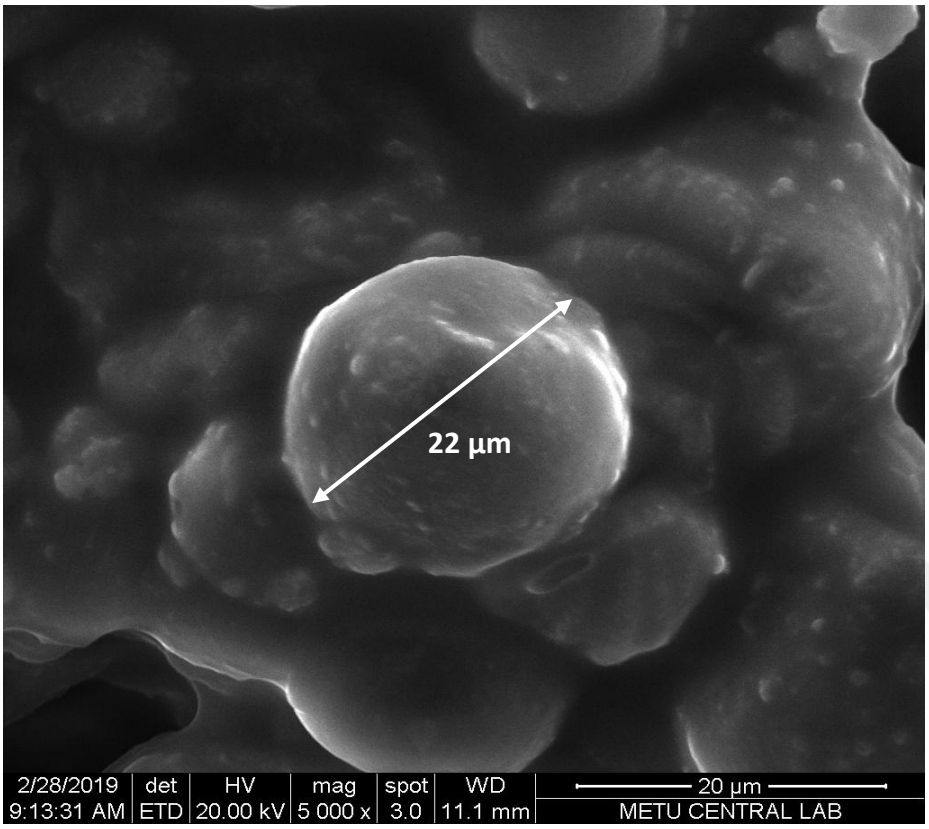


Resim 4.1. B_0 formülasyonlu mikrokürenin 5000 büyütmeli SEM görüntüsü



Resim 4.2. EC yüklü B_3 formülasyonlu mikrokürenin 1000 büyütmeli SEM görüntüsü

Resim 4.1'de B_0 formülasyonlu mikrokürenin 5000 büyütmeli, Resim 4.2 ve 4.3'te sırasıyla B_3 formülasyonlu mikrokürenin 1000 ve 5000 büyütmeli SEM fotoğrafları verilmiştir. Resimlerdeki SEM görüntülerindeki boş ve EC yüklü PVP/NaAlg mikroküreleri küresel formda olduğu görülmüştür.



Resim 4.3. EC yüklü B_3 formülasyonlu mikroküreleri 5000 büyütmedeki SEM görüntüsü

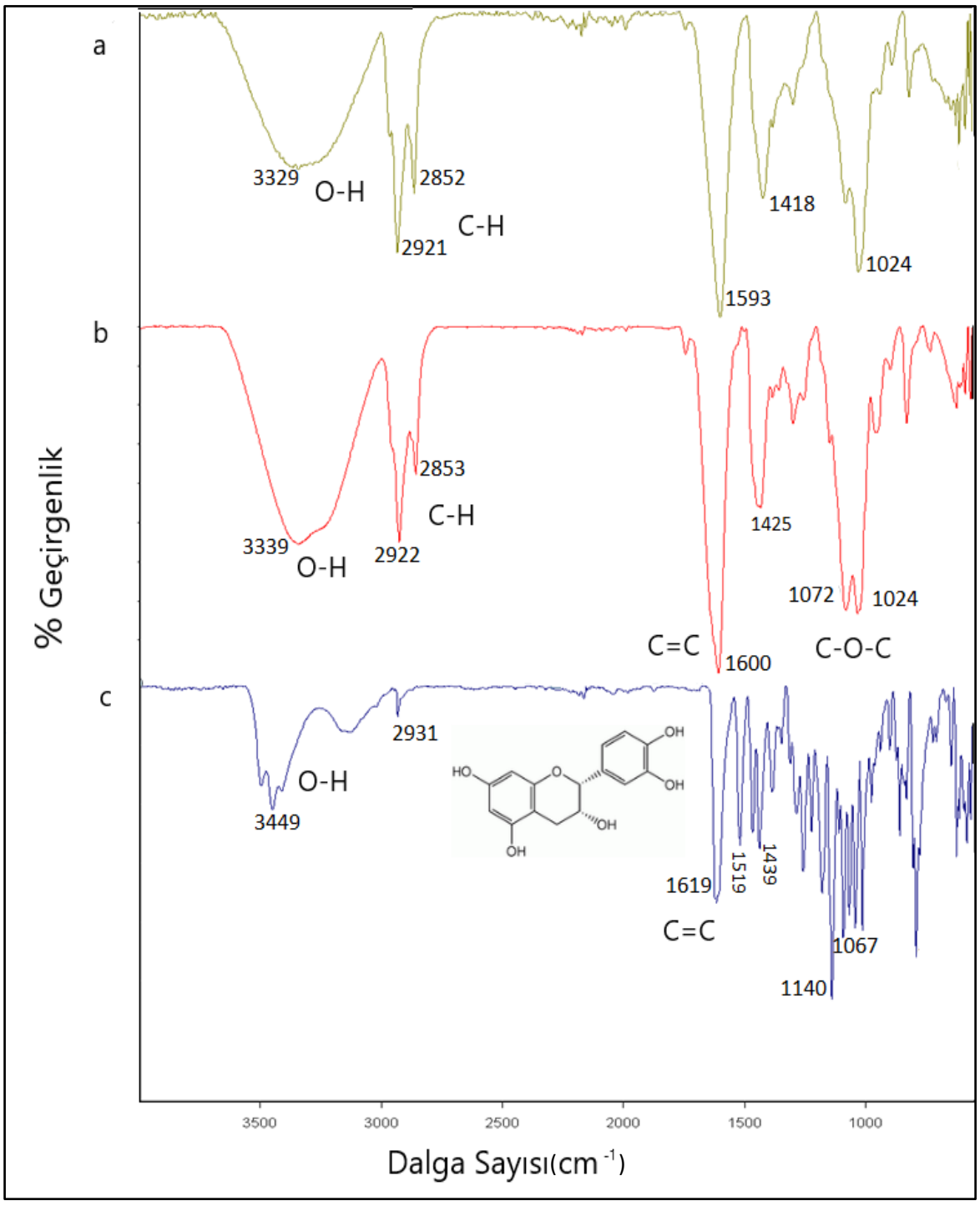
4.5. Mikroküreleri FTIR Spektrum Analizleri

B_0 ve B_3 formülasyonlu mikroküreleri ve EC'nin FTIR spektrumları Şekil 4.7'de verilmiştir.

EC'nin FTIR spektrumunda (Şekil 4.7c) 3449 cm^{-1}'de gözlenen pik O-H gerilme bantlarından kaynaklanmaktadır.

EC yüklü PVP/ NaAlg mikroküreleri FTIR pikleri, daha önce EC için bildirilen IR spektrumları ile uyumludur. O-H gerilme bantları 3339 cm^{-1} de, 1600 cm^{-1} de C=C grupları EC için karakteristik aktivasyon bantlarını ifade etmektedir. Sonuçlar EC ile yapılan benzer çalışmalarla uyumludur [12].

EC yüklü mikroküre lerin FTIR spektrumunda (Şekil 4.7b) gözlenen 1072 cm^{-1}'deki C-O-C pikinin EC'nin FTIR spektrumunda 1140 cm^{-1} ve PVP/NaAlg boş mikroküre lerde 1024 cm^{-1}'de gözlenen piklerin örtüşmesi ile ortaya çıktığı düşünülmüştür. Bu durum mikroküre lerde EC varlığını desteklemektedir.



Şekil 4.7. FTIR Spektrumları 1. (a) B_0 formülasyonlu mikroküre, (b) B_3 formülasyonlu mikroküre ve (c) EC'nin FTIR spektrumları

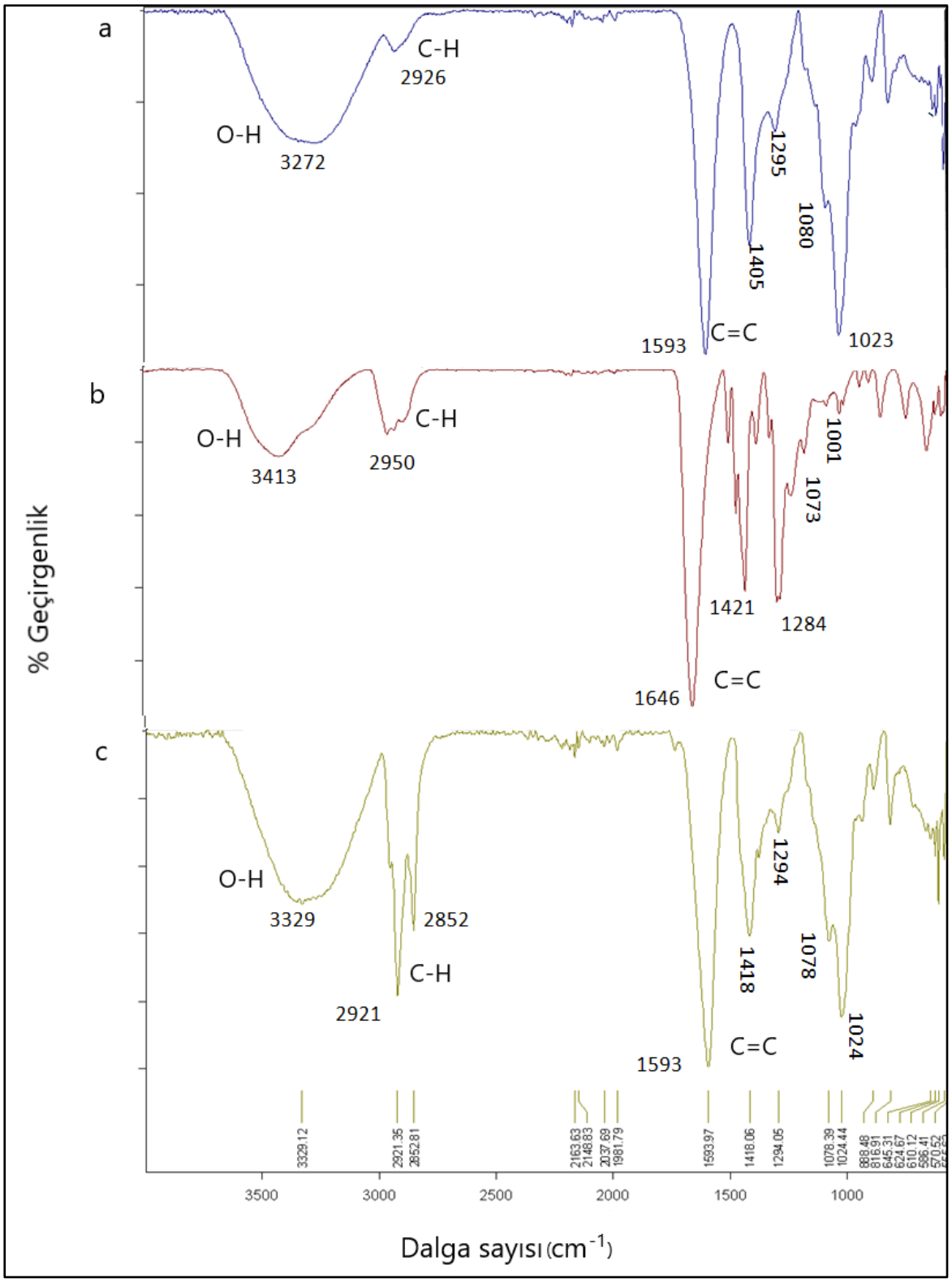
Şekil 4.8'de PVP, NaAlg ve B_0 formülasyonlu mikrokürenin FTIR spektrumu verilmiştir.

NaAlg'ın FTIR spektrumunda (Şekil 4.8a) 3272 cm^{-1}'de görülen bantların O-H grubuna ait gerilme bantları olduğu düşünülmektedir. 2926 cm^{-1}'de alifatik C-H bantları, 1295 ve 1080 cm^{-1}'de C-O-C gerilme bantlarının olduğu düşünülmektedir. Asimetrik ve simetrik karbonil grubuna ait (C=O) bantların sırasıyla 1593 ve 1405 cm^{-1}'de ortaya çıktığı gözlenmiştir.

PVP FTIR spektrumunda (Şekil 4.8b) 3413 cm^{-1}'de O-H bandı, 2950 cm^{-1}'de ise C-H bandı görülmüştür. Bu bantlar mikrokürelere ait spektrumda (Şekil 4.8c) 3329 cm^{-1} ve 2921 cm^{-1} de gözlemlenmiştir.

PVP'nin FTIR spektrumunda 1646 cm^{-1}'de gözlenen C=O grubuna ait pik, NaAlg'ın spektrumunda 1593 cm-1'de gözlenmiştir. Mikrokürelere ait spektrumda bu pik 1593 cm^{-1}'de ortaya çıkmıştır. Ayrıca, NaAlg FTIR spektrumunda 1023 cm-1'de gözlenen C-O grubuna ait pikin blend mikrokürelerde 1024 cm^{-1}'de ortaya çıktığı gözlenmiştir.

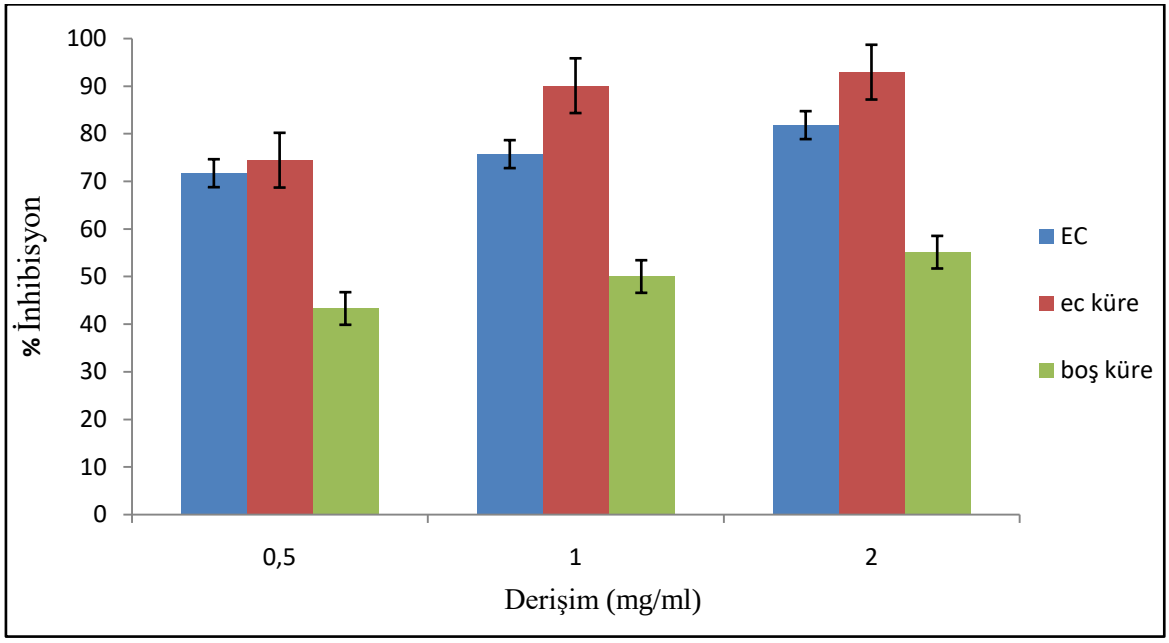
PVP ve NaAlg polimerlerine ait piklerin blend mikrokürelerine ait FTIR spektrumunda ortaya çıktığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlarda, PVP ve NaAlg için karakteristik bant ve pik değerleri gözlenmiştir [72,79].



Şekil 4.8. FTIR spektrumları 2. (a) NaAlg, (b) PVP, (c) B_0 formülasyonlu boş mikroküre FTIR spektrumları

4.6. Mikroküreleri̇n DPPH Radikal Süpürücü Aktiviteleri

Hazırlanan mikrokürėlerin antioksidan kapasiteleri, örneklerin DPPH radikali süpürücü etkileri ölçülerek belirlenmiştir. Örneklerin 517 nm'de absorbans değerleri ölçülmüş ve 'Eş. 4.4' kullanılarak radikal süpürücü etki hesaplanmıştır. Mikrokürėlerin antioksidan aktivitesini tespit edebilmek için ilk olarak DPPH çözeltisi içine belirlenen miktarda küre ilave edilmiş ve bir süre beklenmiştir. Kontrol olarak saf su alınmıştır. İçinde küre bulunan çözeltiden bir miktar alınarak UV spektrofotometrede absorbans değeri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

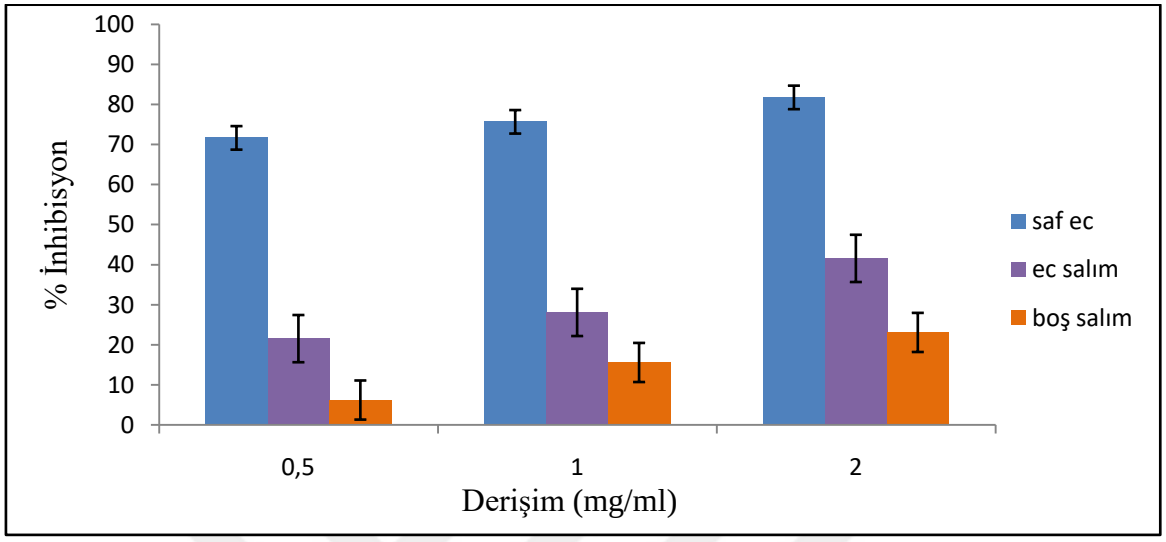


Şekil 4.9. 1. yöntem ile belirlenen DPPH % inhibisyon değerleri

Şekil 4.9 incelendiğinde, EC ile EC yüklü küreler kıyaslandığında kürelerin daha iyi antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. EC yüklü kürelerin daha iyi antioksidan aktivite göstermesinin, kürelerde bulunan NaAlg'ın radikal süpürücü özellik barındırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. 2015 yılında yayınlanan bir çalışmada NaAlg'ın antioksidan aktivitesi gösterilmiştir [81]. EC'nin kürelere yüklenmesi EC'nin antioksidan aktivitesini geliştirmiştir.

DPPH ile yapılan bir diğer antioksidan çalışmasında ise, tutuklama verimine göre 2 saatlik salım sonrası 2 mg/ml,1 mg/ml ve 0,5 mg/ml olduğu hesaplanmış olan salım ortamları alınarak DPPH çözeltisine ilave edilmiş ve bir süre beklenmiştir. Süre sonunda örnekler

sırayla 517 nm'de okunarak absorbans değerleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



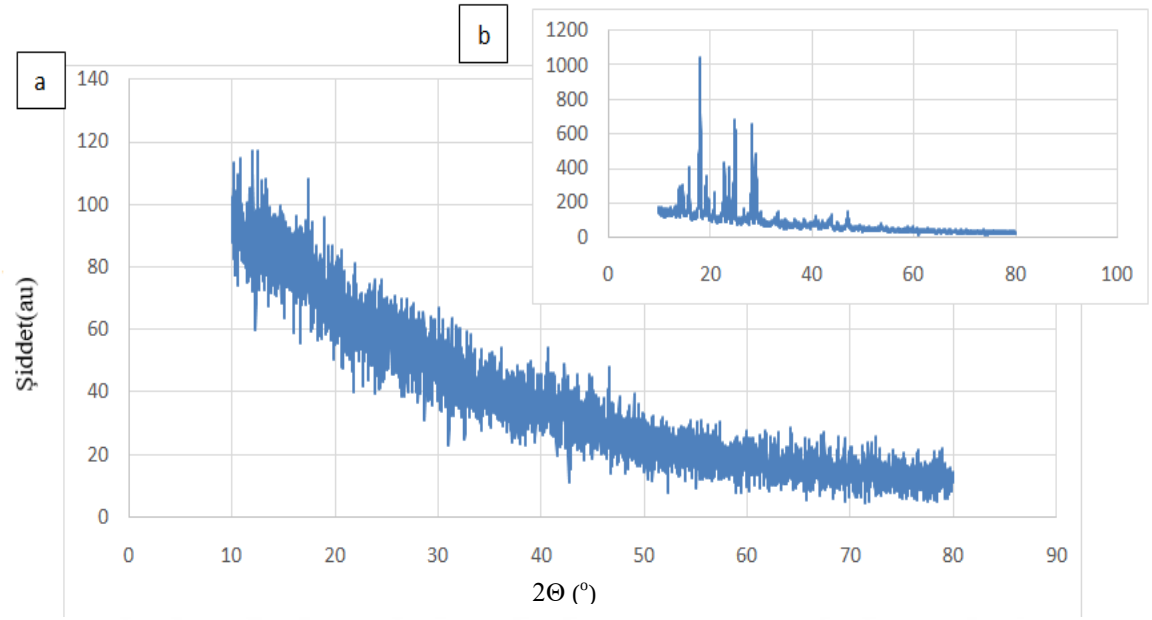
Şekil 4.10. 2. yöntem ile belirlenen DPPH % inhibisyon değerleri

Mikrokürelerinin inhibisyonu saf EC'ye göre düşük çıkmıştır. Literatürde benzer sonuçlar bulunmaktadır [82, 12]. R.Yadav ve arkadaşları tarafından EC yüklü BSA nanoküreler üzerinde yapılmış olan bir araştırmada, benzer şekilde elde edilen mikrokürelerin DPPH ile belirlenmiş olan antioksidan aktivitesinin, saf etken madde ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu bulunmuştur. Bunun yüklü kürelerin yavaş salım yapmasından ya da enkapsülasyon işleminin radikal süpürücü hidrojen mevcudiyetini azalttığından kaynaklanabileceği belirtilmiştir [12].

4.7. Mikroküreleri ve EC'nin X-Işını Kırınımı Eğrileri

X-Işını Kırınım yöntemi (XRD), karakteristik atomik dizilimlerine bağlı olarak her bir kristalin fazın, X-ışınlarını kendine özgü bir düzen içerisinde kırması esasına dayanan populer bir tekniktir. Her bir kristalin faz için bir nevi parmak izi gibi olan bu kırınım profilleri o kristali tanımlamaktadır. X-Işını Kırınım cihazıyla çeşitli bileşiklerin niteliksel tanımlanması, kimyasal türlerin nicel çözünürlüğü, kristalinite derecesinin ölçülmesi, parçacık boyutları ve polimerlerin nitel ve nicel incelemeleri gibi analizler yapılabilmektedir [83].

Şekil 4.11'de EC yüklü mikroküre ve EC nin XRD spektrumları verilmiştir. EC yüklü PVP/NaAlg mikroküre lerde EC nin karakteristik pikine rastlanmamış, karakteristik pikin XRD spektrumlarında gözlenmemesinin nedeni, etken maddenin mikroküre lerde homojendağılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sonuç benzer çalışmalarla uyumludur [15].



Şekil 4.11. XRD spektrumları, (a) B_3 formülasyonlu mikroküre lerin ve (b) EC'nin XRD spektrumları

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

PVP/NaAlg ve NaAlg mikroküreleden EC salımı çalışmasında;

- PVP/NaAlg polimerleri ile EC yüklü mikroküreler elde edilmiştir. En iyi tutuklama verimi % 7,18 ile B_3 formülasyonlu mikroküreleerde elde edilmiştir.
- Etken madde salım değerleri etken madde/polimer oranının 1/10 olduğu mikroküreleerde daha yüksek gözlemlenmiştir.
- PVP/NaAlg ve NaAlg mikroküreleerde EC salımının PVP ilavesiyle arttığı belirlenmiştir. Çalışılan oranlarda en uygun PVP/NaAlg oranı 1/10 olarak tespit edilmiştir.
- PVP/NaAlg 1/10 ve EC yüklü (E/P: 1/10) mikroküreleerde 30 dk. ve 45 dk. çapraz bağlama süreleri çalışılmış ve en yüksek ilaç salımının % 36,23 ile 30 dakika çapraz bağlanan mikroküreleere ait olduğu belirlenmiştir.
- B_3 ve B_0 formülasyonlu mikroküreleerin SEM görüntülerinden küresel yapıları doğrulanmıştır.
- B_3 formülasyonlu mikroküreleerin XRD grafiklerinden EC'nin mikroküreleerde homojen olarak dağıldığı görülmüştür.
- Mikroküreleerin FTIR verileri incelendiğinde EC'nin mikroküreleerdeki varlığı tespit edilmiştir.
- Yapılan DPPH analizleri neticesinde EC'nin mikroküreleere yüklendiği ve EC'nin antioksidan özelliklerini devam ettirdiği tespit edilmiştir.
- % 5'lik $CaCl_2$'nin çapraz bağlama ajanı olarak kullanıldığı bu enkapsülasyon işlemi sonucunda EC salımının çalışılan oranlarda en uygun olduğu koşullar; PVP/NaAlg (w/w): 1/10, E/P oranı: 1/10, çapraz bağlanma süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir.
- Elde edilen mikroküreleerle hücre kültürü ve hayvan çalışmaları planlanabileceği öngörülmektedir.
- PVP/NaAlg mikroküreleerde çapraz bağlayıcı derişimi % 5 olarak çalışmıştır, farklı çapraz bağlayıcı derişimlerinin etkileri de incelenebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Chaudière, J. and Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9-10), 949-962.
2. Rice-Evans, C., Miller, N. and Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.
3. İnternet: From character to personality. (2015, June). The European Food Information Council. URL: https://www.eufic.org/en/whats-in-food/article/polyphenols, Son Erişim Tarihi: 20 Nisan 2019.
4. Cremonini, E., Bettaieb, A., Haj, F.G., Fraga, C.G. and Oteiza, P.I. (2016). (-)-Epicatechin improves insulin sensitivity in high fat diet-fed mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 599, 13–21.
5. İnternet: Ötleş, S., Kaya, N. (Aralık, 2017). Polifenollerin diyetteki önemi ve analizlerde dikkat edilmesi gereken noktalar. Dünya Gıda Dergisi, Sayı: 2017 (12), 92. URL: http://www.dunyagida.com.tr/kose-yazisi/polifenollerin-diyetteki-onemi-ve-analizlerde-dikkat-edilmesi-gereken-noktalar/7998, Son Erişim Tarihi: 25 Nisan 2019.
6. Yüksel, Z., Avcı, E. and Erdem, Y. K. (2010). Characterization of binding interactions between green tea flavonoids and milk proteins. *Food Chemistry*, 121(2), 450–456.
7. Zhang, X. (2018). Mini-Review: Nanotechnology Forms of Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8(6), 275-277.
8. Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J. and Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(1), 8-21.
9. Ruijters, E. J., Weseler, A. R., Kicken, C., Haenen, G. R. and Bast,A. (2013). The flavanol (-)-epicatechin and its metabolites protect against oxidative stress in primary endothelial cells via a direct antioxidant effect. *European Journal of Pharmacology*, 715 (3), 147–153.
10. Varela-Castillo, O., Cordero, P., Gutiérrez-Iglesias, G., Palma, I., Rubio-Gayosso, I., Meaney, E., Ramirez-Sanchez I.,Villereal F., Ceballos G. and Nájera, N. (2018). Characterization of the cytotoxic effects of the combination of cisplatin and flavanol (-)-epicatechin on human lung cancer cell line A549. An isobolographic approach. *Experimental Oncology*, 40(1), 19-23.
11. Wisuitiprot, W., Somsiri, A., Ingkaninan, K. and Waranuch, N.(2011). A novel technique for chitosan microparticle preparation using a water/silicone emulsion: green tea model. *International Journal of Cosmetic Science*, 33(4), 351–358
12. Yadav R., Kuma, D., Kumari, A. and Yadav, S. K. (2014). Encapsulation of catechin and epicatechin on bsa nps improved their stability and antioxidant potentıal. *EXCLI Journal*, 13, 331-346.
13. Bayraktar İ. (2014). Kontrollü ilaç salınım. *İnovatif Kimya Dergisi*, 2(9), 13-15.
14. Torchilin, V. P. (2000). Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11, 81-91.
15. Er A. (2014). *Ketorolak Trometaminin Karboksimetil Selüloz/Poli(Vinil Alkol) Mikrokürelerden Kontrollü Salımı*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

16. Serim T. M. (2011). *Kontrollü Salım Yapan Rivastigmin İçeren İmplante Partiküler Sistemlerin Formülasyonu Üzerine Çalışmalar*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 4-14.

17. Dash, A. K. and Cudworth G. C. (1998). Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *Journal of Pharmacology And Toxicology Methods*, 40(1), 1-12.

18. Munro C.J, Laughlin L.S, Vonschalscha T, Baldwin D.M. and Asley, B.L. (1996). An enzyme immunoassay for serum and urinary levonorgestrel in human and non-human primates. *Contraception*, 54(1), 43-53.

19. Tüylek, Z. (2017). İlaç Taşıyıcı Sistemler Ve Nanoteknolojik Etkileşim. *Bozok Tıp Dergisi*, 7(3), 89-98.

20. Li, G., Wang, S., Xue, X., Qu, X.J. and Liu, H.P. (2013). Monoclonal antibody-related drugs for cancer therapy. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 7(5), 178-84.

21. Tükmen B. (2008). *Yüzen Mikroküre Formülasyonlarından Etkin Madde Çıkışını Etkileyen parametrelerin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 4, 42, 109.

22. Méndez, N. A. N., Barreda, C. T. Q., Vega, A. F., Calderon, J. E. M., Urioste, C. G., Palomec, X. C., Martinez A. R. and Díaz, M. P. (2017). Design and development of pharmaceutical microprocesses in the production of nanomedicine. *In Nanostructures for Oral Medicine,* 669-697. Elsevier.

23. W.H. De Jong, Borm, P.J.A. (2008).Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3(2), 133–149.

24. Fu, S., Buckner, I. S. and Block, L. H. (2014). Inter-grade and inter-batch variability of sodium alginate used in alginate-based matrix tablets. *AAPS PharmSciTech*, 15(5), 1228-1237.

25. Virmani, T. and Gupta, J. (2017). Pharmaceutical application of microspheres: An approach for the treatment of various diseases. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(8), 3252-3260.

26. Rajput,S., Agrawal, P., Pathak,A., Shrivasatava,N. and Baghel,S. S. (2012). A Revıew On Mıcrospheres: Methods Of Preparatıon And Evaluatıon. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutıcal Scıences*, 1(1), 422-438.

27. Olukman M. (2010). *Kanser İlacı 5-Fluorourasilin iyonik çapraz bağlı aljinat esaslı mikrokürelerden pH kontrollü salımı*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 21.

28. Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. and Bugarski, B. (2011, May 22-26). *An overview of encapsulation technologies for food applications.* 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF 11), Athens, Greece.

29. Giada, M. D. L. R. (2013). Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. In Morales-Gonzalez, J. A. (Eds.). *Oxidative stress and chronic degenerative diseases—A role for antioxidants*, 87-112. IntechOpen.

30. Pandey, K. B. and Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278.

31. Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M. and Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition*, 5, 87.

32. Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G. and Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892.

33. İnternet: Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., Du Chaffaut, L., Mennen, L. and Scalbert, A. (2010). Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database, 2010*. URL: http://phenol-explorer.eu/contents/polyphenol/125, Son Erişim Tarihi: 10 Mayıs 2019.

34. Fraga, C. G. and Oteiza, P. I. (2011). Dietary flavonoids: role of (−)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(4), 813-823.

35. Rein, D., Lotito, S., Holt, R. R., Keen, C. L., Schmitz, H. H. and Fraga, C. G. (2000). Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *The Journal of Nutrition*, 130(8), 2109-2114.

36. Shay, J., Elbaz, H. A., Lee, I., Zielske, S. P., Malek, M. H. and Hüttemann, M. (2015). Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (-)-Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 181260.

37. Jung, H. A., Jung, M. J., Kim, J. Y., Chung, H. Y., and Choi, J. S. (2003). Inhibitory activity of flavonoids fromPrunus davidiana and other flavonoids on total ROS and hydroxyl radical generation. *Archives of Pharmacal Research*, 26(10), 809-815.

38. Papież, M. A., Baran, J., Bukowska-Straková, K., and Wiczkowski, W. (2010). Antileukemic action of (−)-epicatechin in the spleen of rats with acute myeloid leukemia. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3391-3397.

39. Siddique, H. R., Liao, D. J., Mishra, S. K., Schuster, T., Wang, L., Matter, B., Campell, P.M., Villalta, P., Nanda, S., Deng, Y.and Saleem, M. (2012). Epicatechin-rich cocoa polyphenol inhibits Kras-activated pancreatic ductal carcinoma cell growth in vitro and in a mouse model. *International Journal of Cancer*, 131(7), 1720-1731.

40. Elansary, H. O., Szopa, A., Kubica, P., A Al-Mana, F., Mahmoud, E. A., Zin El-Abedin, T., Mattar, A. M. and Ekiert, H. (2019). Phenolic Compounds of Catalpa speciosa, Taxus cuspidate, and Magnolia acuminata have Antioxidant and Anticancer Activity. *Molecules*, 24(3), 412.

41. Rodriguez, M., Du, G. J., Wang, C. Z. and Yuan, C. S. (2010). Letter to the editor: Panaxadiol's anticancer activity is enhanced by epicatechin. *The American Journal of Chinese Medicine*, 38(06), 1233-1235.

42. Mohamed, R. H., Karam, R. A. and Amer, M. G. (2011). Epicatechin attenuates doxorubicin-induced brain toxicity: critical role of TNF-α, iNOS and NF-κB. *Brain Research Bulletin*, 86(1-2), 22-28.

43. Chrystoja, C. C., Diamandis, E. P., Brand, R., Rückert, F., Haun, R. and Molina, R. (2013). Pancreatic cancer. *Clinical Chemistry*, 59(1), 41-46.

44. Elbaz, H. A., Lee, I., Antwih, D. A., Liu, J., Hüttemann, M. and Zielske, S. P. (2014). Epicatechin stimulates mitochondrial activity and selectively sensitizes cancer cells to radiation. *PLoS One*, 9(2), e88322.

45. Wang, S., Moustaid-Moussa, N., Chen, L., Mo, H., Shastri, A., Su, R., Babat, P., Kwun, I. and Shen, C. L. (2014). Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(1), 1-18.

46. Sano, T., Nagayasu, S., Suzuki, S., Iwashita, M., Yamashita, A., Shinjo, T., Sanui, T., Kushiyama, A., Kanematsu, T., Asano, T. and Nishimura, F. (2017). Epicatechin downregulates adipose tissue CCL19 expression and thereby ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 27(3), 249-259.

47. Devgun, M., Nanda, A. and Ansari, S.H. (2009). Pterocarpus marsupium Roxb. - a comprehensive review. *Pharmacognosy Reviews*, 3, 359-363.

48. McCullough, M. L., Chevaux, K., Jackson, L., Preston, M., Martinez, G., Schmitz, H. H., Coletti C., Campos H. and Hollenberg, N. K. (2006). Hypertension, the Kuna, and the epidemiology of flavanols. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 47(2), 103-109.

49. Belščak, A., Komes, D., Horžić, D., Ganić, K. K. and Karlović, D. (2009). Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International*, 42(5-6), 707-716.

50. Bernatova, I. (2018). Biological activities of (−)-epicatechin and (−)-epicatechin-containing foods: Focus on cardiovascular and neuropsychological health. *Biotechnology Advances*, 36(3), 666-681.

51. Jackson, D., Connolly, K., Batacan, R., Ryan, K., Vella, R. and Fenning, A. (2018). (−)-Epicatechin Reduces Blood Pressure and Improves Left Ventricular Function and Compliance in Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertensive Rats. *Molecules*, 23(7), 1511.

52. Mariano, L. N. B., Boeing, T., Cechinel-Filho, V., Niero, R., da Silva, L. M., de Souza, P. and de Andrade, S. F. (2018). Preclinical evaluation of the diuretic and saluretic effects of (-)-epicatechin and the result of its combination with standard diuretics. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 107, 520-525.

53. Li, J. W., Wang, X. Y., Zhang, X., Gao, L., Wang, L. F. and Yin, X. H. (2018). (-)-Epicatechin protects against myocardial ischemia-induced cardiac injury via activation of the PTEN/PI3K/AKT pathway. *Molecular Medicine Reports*, 17(6), 8300-8308.

54. Ramirez-Sanchez, I., Mansour, C., Navarrete-Yañez, V., Ayala-Hernandez, M., Guevara, G., Castillo, C., LoredoM., Bustamente M., Ceballos G.and Villarreal, F. J. (2018). (−)-Epicatechin induced reversal of endothelial cell aging and improved vascular function: underlying mechanisms. *Food & Function*, 9(9), 4802-4813.

55. Leonardo, C. C., Agrawal, M., Singh, N., Moore, J. R., Biswal, S. and Doré, S. (2013). Oral administration of the flavanol (−)-epicatechin bolsters endogenous protection against focal ischemia through the Nrf2 cytoprotective pathway. *European Journal of Neuroscience*, 38(11), 3659-3668.

56. Kang, Y., Lee, J. H., Seo, Y. H., Jang, J. H., Jeong, C. H., Lee, S., Jeong, G. S.and Park, B. (2019). Epicatechin Prevents Methamphetamine-Induced Neuronal Cell Death via Inhibition of ER Stress. *Biomolecules & Therapeutics*, 27(2), 145-151.

57. Shaki, F., Shayeste, Y., Karami, M., Akbari, E., Rezaei, M. and Ataee, R. (2017). The effect of epicatechin on oxidative stress and mitochondrial damage induced by

homocycteine using isolated rat hippocampus mitochondria. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 12(2), 119-127.

58. Vasconcelos, P. C. D. P., Seito, L. N., Di Stasi, L. C., Akiko Hiruma-Lima, C. and Pellizzon, C. H. (2012). Epicatechin used in the treatment of intestinal inflammatory disease: an analysis by experimental models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 508902.
59. Singh, A., Demont, A., Actis-Goretta, L., Holvoet, S., Lévêques, A., Lepage, M., Nutten, S.and Mercenier, A. (2014). Identification of epicatechin as one of the key bioactive constituents of polyphenol-enriched extracts that demonstrate an anti-allergic effect in a murine model of food allergy. *British Journal of Nutrition*, 112(3), 358-368.
60. Shimura, T., Koyama, M., Aono, D. and Kunugita, N. (2019). Epicatechin as a promising agent to countermeasure radiation exposure by mitigating mitochondrial damage in human fibroblasts and mouse hematopoietic cells. *The FASEB Journal*, 33(6), 6867-6876.
61. Draget, K.I., Smidsrød, O., Skjåk-Bræk, G. (2005). Alginates from algae. Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry. In A. Steinbüchel and S. K. Rhee (Eds.), *Properties, Production, and Patents*. Wiley, Weinheim. 1-30.
62. Gökbulut İ. ve Öztürk F. S. (2018). Gıda Mikroenkapsülasyonunda Aljinat Kullanımı. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 8(1/2), 16-28.
63. Sikorski, P., Mo, F., Skjåk-Bræk, G. and Stokke, B. T. (2007). Evidence for Egg-Box-Compatible Interactions in Calcium−Alginate Gels from Fiber X-ray Diffraction. *Biomacromolecules*, 8(7), 2098–2103.
64. Nokhodchi, A. and Tailor, A. (2004). In situ cross-linking of sodium alginate with calcium and aluminum ions to sustain the release of theophylline from polymeric matrices. *Il Farmaco*, 59(12), 999-1004.
65. Fang, Z., Jiang, R., Zhang, L., Wu, Y., Zhao, X., Zhao, L., Jiangang, L., Shenggiang, Z., Miaomiao Z.and Du, F. (2018). In situ fabrication of radiopaque microcapsules for oral delivery and real-time gastrointestinal tracking of Bifidobacterium. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 4093- 4105.
66. Pawar, S.N. and Edgar, K.J. (2012). Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, 33(11), 3279-3305.
67. Han, Y., Zeng, Q., Li, H. and Chang, J. (2013). The calcium silicate/alginate composite: Preparation and evaluation of its behavior as bioactive injectable hydrogels. *Acta Biomaterialia*, 9(11), 9107–9117.
68. Woranucha, S., Yoksana, R. (2013). Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: II. Application in biobased plastics for active packaging. *Carbohydrate Polymers*, 96(2), 586-592.
69. Fujiwara, G.M., Campos, R., Costa, C.K., Dias, G.J.F., Miguel, O.G., Miguel, M.D., Marques, F.A. and Zanin, S.M.Z. (2013). Production and characterization of alginate-starch-chitosan microparticles containing stigmasterol through the external ionic gelation technique. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(3), 537-547.
70. Vicini, S., Castellano, M., Mauri, M. and Marsano, E. (2015). Gelling process for sodium alginate: New technical approach by using calcium rich microspheres. *Carbohydrate Polymers*, 134, 767–774.

71. Adeyeye, C. M. and Barabas, E. (1993). Povidone. In H. G. Brittain (Eds.), In Analytical profiles of drug substances and excipients. *Academic Press*, 22, 555-685.

72. Zhu, J., Yang, Z., Chen, X., Sun, J., Awuti, G., Zhang, X. and Zhang, Q. (2007). Preparation and physicochemical characterization of solid dispersion of quercetin and polyvinylpyrrolidone. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 16(1), 51-56.

73. Koczkur, K. M., Mourdikoudis, S., Polavarapu, L. and Skrabalak, S. E. (2015). Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalton Transactions*, 44(41), 17883-17905.

74. Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.

75. Yu, C.Y., Zhang, X.C., Zhou, F.Z., Zhang, X.Z., Cheng, S.X. and Zhuo, R.X. (2008). Sustained release of antineoplastic drugs from chitosan-reinforced alginate microparticle drug delivery systems. *International Journal of Parmaceutics*, 357(1-2), 15-21.

76. Faidi, A., Lassoued, M. A., Becheikh, M. E. H., Touati, M., Stumbé, J. F. and Farhat, F. (2019). Application of sodium alginate extracted from a Tunisian brown algae Padina pavonica for essential oil encapsulation: Microspheres preparation, characterization and in vitro release study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 386-394.

77. Kabaş, Z. (2006). *İndometasinin, kalsiyum klorür ile çapraz bağlanmış sodyum aljinat ve poli(vinil alkol) / sodyum aljinat mikrokürelerden kontrollü salımı*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 68, 69, 74,75.

78. Kahraman, A. (2014). *Kanser ilacı 5-fluorourasil'in polimerik nanokürelerden kontrollü salımı*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 51, 52.

79. Prabha, G. and Raj, V. (2016). Preparation and characterization of chitosan—Polyethylene glycol-polyvinylpyrrolidone-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: Drug loading and in vitro drug release study. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 104(4), 808-816.

80. Bulut, E. (2011). *Donepezil hidroklorür'ün sodyum aljinat, sodyum aljinat/sodyum karboksimetil selüloz ve sodyum aljinat/sodyum karboksimetil selüloz/poli(vinilalkol)-aşı-akrilamid mikrokürelerden salımı*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 73, 74, 115.

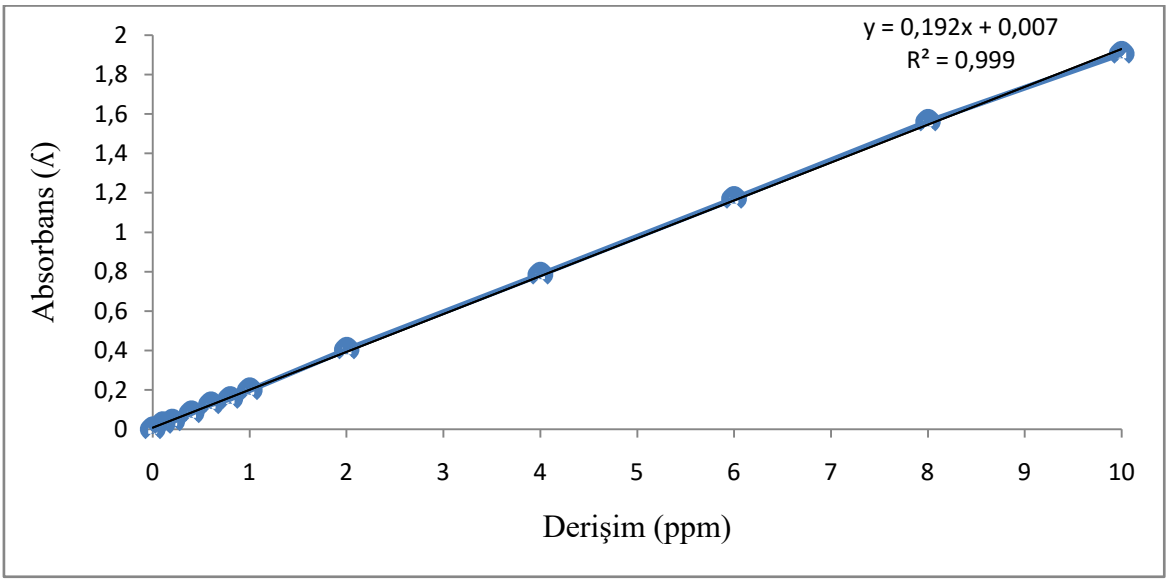
81. Sellimi, S., Younes, I., Ayed, H. B., Maalej, H., Montero, V., Rinaudo, M., Dahia M., Mechichi, T., Hajji, M.and Nasri, M. (2015). Structural, physicochemical and antioxidant properties of sodium alginate isolated from a Tunisian brown seaweed. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1358-1367.

82. Ghosh, P., Bag, S., Roy, A. S., Subramani, E., Chaudhury, K. and Dasgupta, S. (2016). Solubility enhancement of morin and epicatechin through encapsulation in an albumin based nanoparticulate system and their anticancer activity against the MDA-MB-468 breast cancer cell line. *Royal Society of Chemistry Advances*, 6(103), 101415-101429.

83. Akkaş, M., Çetin, T. ve Boz, M. (2018). Gaz atomizasyon yöntemi ile am60 magnezyum alaşım tozu üretimi ve karakterizasyonu. *Uluslararası Teknolojik Bilimler Dergisi*, 10(3), 1-9.

EKLER

EK – 1. EC Kalibrasyon Eğrisi



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler



Soyadı, adı	: ÖZTÜRK, Ali
Uyruğu	: T.C.
Doğum tarihi ve yeri	: 07.11.1987, Adana
Medeni hali	: Evli
Telefon	: 0(312)259 06 87
e-mail	: alioz0711@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/ İleri Teknolojiler ABD	Devam ediyor
Lisans	Sakarya Üniversitesi/ Fen Bilimleri Öğretmenliği	2010
Lise	İhsan Mermerci Lisesi (YDAL)	2005

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2015- Halen	Milli Eğitim Bakanlığı	Öğretmen

Yabancı Dil

İngilizce (orta seviye)

Yayınlar

Öztürk, A. (2019, 15-16 Mart). *Sürdürülebilir ilaç teknolojileri: epikatekin yüklü polivinilpirolidon/ sodyum aljinat mikroküre lerin hazırlanması, karakterizasyonu ve epikatekinin kontrollü salımı.* 1. Uluslararası Sürdürülebilir Yaşam Kongresi, Ankara.

Hobiler

Sinemaya gitmek, Spor.



GAZİ GELECEKTİR...