T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

İNFLAMATUVAR BAĞIRSAK HASTALIĞI MODELİNDE NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN İN VİTRO / İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. SERKAN YENER

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. FÜSUN ACARTÜRK

ANKARA
OCAK 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

İNFLAMATUVAR BAĞIRSAK HASTALIĞI MODELİNDE NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN İN VİTRO / İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. SERKAN YENER

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. FÜSUN ACARTÜRK

Bu tez ‘Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri’ kapsamında 02/2012-40 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

ANKARA
OCAK 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 08/02/2013

Prof. Dr. Nevin Çelebi
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Füsun Acartürk
Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. İmran Vural
Hacettepe Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
Kabul ve onay	**I**
İçindekiler	**II**
Şekiller	**XIV**
Tablolar	**XVIII**
Resimler	**XXIII**
Eşitlikler	**XXIV**
Semboller, Kısaltmalar	**XXV**
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolonun Anatomik ve Fizyolojik Özelikleri	3
2.2. Kolon Mikroflorası	4
2.3. Kolonik pH	4
2.4. İntestinal Geçiş	5
2.5. Kolondan İlaç Absorpsiyonu	6
2.6. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı: Ülseratif Kolit ve Crohn Hastalığı	6
2.6.1. Hastalık Lokalizasyonu	8
2.6.2. Ülseratif Kolit Etyopatolojisi	8
2.6.2.1. İnflamasyon Medyatörleri	9
2.6.2.2. Oksidatif Stres	9
2.6.2.2.1. Reaktif Oksijen Metabolitleri (ROM)	10
2.6.2.3. Kolonik Çevre	12
2.7. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığında Tedavi Yaklaşımları	13
2.8. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığında Tedavi Amaçlı Kullanılan İlaçlar	15

2.8.1. İBH Tedavisinde Antioksidanlar & Serbest Radikal Yakalayıcıları 16

2.9. Etkin Maddelerin Kolona Hedeflendirilmesinde Uygulanan Yöntemler 19

2.9.1. Mikrobiyal Enzim Kontrollü İlaç Taşıyıcı Sistemler 19

2.10. Kolona Özgü Nanopartiküler Sistemler 23

2.11. Pektin Hakkında Genel Bilgiler 27

2.11.1. Pektin Türevleri 28

2.11.2. Esterifikasyon Derecesi 28

2.11.3. Pektinin Fizikokimyasal Özellikleri 29

2.11.4. Pektinin Jelleşme Özellikleri 29

2.11.5. Pektinin Farmakolojik Etkisi 30

2.11.6. Pektinin Farmasötik Teknolojide Kullanılışı 31

2.12. Melatonin (MEL) 37

2.12.1. Tanımı ve Biyosentezi 37

2.12.2. Fizyolojik ve Farmakolojik Özellikleri 37

2.12.3. Etki Mekanizması 39

2.12.3.1. Melatonin Reseptörleri ve Etki Mekanizması 39

2.12.3.2. Serbest Radikal Yakalayıcı Özelliği 39

2.12.4. Fizikokimyasal Özellikleri 40

2.12.4.1. MEL'in Kimyasal Yapısı 40

2.12.4.2. MEL'in Çözünürlüğü 40

2.12.4.3. MEL'in UV/VIS Spektrumu 41

2.12.4.4. MEL'in Stabilitesi 41

2.12.5. MEL'in Antioksidan Özelliği 43

2.12.5.1. MEL'in Doğrudan Antioksidan Etkisi 43
2.12.5.2. MEL'in Prooksidan Enzim Aracılı Etkisi 43
2.12.5.3. MEL'in Antioksidan Enzim Aracılı Etkisi 43
2.12.6. Deneysel Kolit Modellerinde MEL Kullanımı 44
2.12.7. MEL İle Yapılan Klinik Çalışmalar 48
3. GEREÇ VE YÖNTEM 51
3.1. Gereç 51
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 51
3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler 52
3.2. Yöntem 53
3.2.1. *İn Vitro* Çalışmalar 53
3.2.1.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı 53
3.2.1.1.1. Fosfat tamponları (USP XXXI) 53
3.2.1.1.2. pH 1.2 HCl tamponu (USP XXXI) 53
3.2.1.2. Etkin Madde (MEL) Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler 54
3.2.1.2.1. Partikül Büyüklüğü Analizi 54
3.2.1.2.2. IR Spektrumu 54
3.2.1.2.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi ve Etkin Maddenin Erime Noktası Tayini 54
3.2.1.2.4. UV Spektrumu 55
3.2.1.2.5. Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Standart Doğrunun Hazırlanması 55
3.2.1.2.6. Spektrofotometrik Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu 56
3.2.1.2.6.1. Doğrusallık 56

3.2.1.2.6.2. Doğruluk ve Geri Elde 56
3.2.1.2.6.3. Kesinlik 57
3.2.1.2.6.3.1. Deneyleriçi Tekrarlanabilirlik Çalışması 57
3.2.1.2.6.3.2. Deneylerarası Tekrarlanabilirlik Çalışması 57
3.2.1.2.6.4. Özgünlük, Seçicilik 57
3.2.1.2.6.5. Stabilite 58
3.2.1.2.7. MEL'in pH 1.2, 6.8 ve 7.4 Tamponlarında Çözünürlüğünün Belirlenmesi 58
3.2.1.3. Önformülasyon Çalışmaları 59
3.2.1.3.1. İyonotropik Jelasyon 59
3.2.1.3.2. Formülasyonda Kullanılacak Pektin Tipine Karar Verilmesi 61
3.2.1.4. Formülasyon Çalışmaları 63
3.2.1.4.1. İyonotropik Jelasyon Yöntemiyle Nanoboyuta İnilmesi 63
3.2.1.4.2. Nanopartikül Formülasyonuna Ait Faktöriyel Tasarım 66
3.2.1.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 68
3.2.1.5.1. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Polidispersite İndeksi 68
3.2.1.5.2. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyeli 69
3.2.1.5.3. Nanopartiküllerin Etkin Madde Yükleme Kapasitesi 69
3.2.1.5.4 Formülasyonların pH'sı 70
3.2.1.6. İn Vitro Salım Çalışmaları 70
3.2.1.6.1. Diyaliz Torbalarının Hazırlanması 70
3.2.1.6.2. Faktöriyel Tasarıma Ait Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Salım Çalışmaları 71

3.2.1.7. Pythia® Yapay Sinir Ağı (YSA) Programı 72
3.2.1.7.1. Pythia®'ya Girilen Parametreler Işığında Matematiksel Olarak Elde Edilen Veriler İle Laboratuvar Ortamında Elde Edilen Deneysel Verilerin Karşılaştırılması 75
3.2.1.7.2.Pythia®'nın Matematiksel Olarak Önerdiği Verilerin Doğruluğunun Kontrol Edilmesi 75
3.2.1.7.3. Pythia®'ya Girilen Parametreler Işığında Matematiksel Olarak En Uygun Formülasyonun Seçilmesi 76
3.2.1.8. Optimum Formülasyon Olarak Seçilen P28 Nolu Formülasyon Üzerinde Yapılan Salım Çalışmaları 77
3.2.1.8.1. pH 1.2 Mide Ortamında Yapılan Çalışmalar 77
3.2.1.8.2. pH 7.4 Fosfat Tamponunda Yapılan Çalışmalar 77
3.2.1.8.3. pH 6.8 Fosfat Tamponu + Pectinex® Ortamında Yapılan Çalışmalar 77
3.2.1.8.4. Salım Ortamının Değiştirildiği Çalışmalar 77
3.2.1.9. İn Vitro Salım Sonuçlarının Kinetik Olarak Değerlendirilmesi 79
3.2.1.10. Stabilite Çalışmaları 79
3.2.1.11. Mukoadezyon Çalışmaları 80
3.2.1.12. Formülasyonda Bağlanmayan Ca^{+2} Miktarının Belirlenmesi 82
3.2.1.13. Nanopartiküllerin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) İle Görüntülenmesi 82
3.2.1.14. Nanopartiküllerin Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) İle Görüntülenmesi 83

3.2.2. *İn Vivo* Çalışmalar 84
3.2.2.1. Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanları 84
3.2.2.2. Deney Hayvanlarında Anestezi Oluşumu 85
3.2.2.3. Deney Hayvanlarında TNBS ile Kolit İndüksiyonu 85
3.2.2.4. Patolojik Değerlendirme 86
3.2.2.5. İn Vivo Çalışmada Oluşturulan Deney Grupları 87
3.2.2.6. Deney Gruplarına Uygulanan Tedavi Protokolü 89
3.2.2.7. Kolon Dokusu Örneklerinin Alınması 90
3.2.2.8. Makroskopik Kolit Değerlendirmesi 91
3.2.2.9. Kolon Örneklerinin Homojenizasyonu ve Deney İçin Hazırlanması 92
3.2.2.10. Kolonik Mukozada Oksidatif Stres Ölçümü 92
3.2.2.10.1. Nitrik Oksit Seviyesinin Ölçülmesi 93
3.2.2.10.2. Malondialdehit (MDA) Seviyesinin Ölçülmesi 93
3.2.2.10.3. Glutatyon Seviyesinin Ölçülmesi 93
3.2.2.11. Kolon Mukozasında Yapılan İmmünolojik Çalışmalar 94
3.2.2.11.1. TNF- α, IL–10 ve IL–17 Düzeylerinin Belirlenmesi 94
3.2.2.12. Histolojik Değerlendirme 95
3.2.2.13. İstatistiksel Değerlendirme 95
4. BULGULAR 97
4.1. *İn Vitro* Çalışmalara Ait Bulgular 97
4.1.1. Etkin Madde (MEL) Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemelere Ait Bulgular 97
4.1.1.1. Partikül Büyüklüğü Analizine Ait Bulgular 97
4.1.1.2. FT-IR Spektrumuna Ait Bulgular 97

4.1.1.3. DSC Analizi ve MEL'in Erime Noktası Tayinine Ait Bulgular 99
4.1.1.4. MEL'in UV Spektrumuna Ait Bulgular 101
4.1.1.5. MEL'in Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Standart Doğru Denklemlerinin Hazırlanmasına Ait Bulgular 103
4.1.1.6. MEL'in Spektrofotometrik Miktar Tayini Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular 105
4.1.1.6.1. Doğrusallık 105
4.1.1.6.2. Doğruluk ve Geri Elde 105
4.1.1.6.3. Tekrarlanabilirlik 106
4.1.1.6.4. Özgünlük, Seçicilik 108
4.1.1.6.5. Stabilite 110
4.1.1.7. MEL'in pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4 Tamponlarında Çözünürlüğünün Belirlenmesine Ait Bulgular 114
4.1.2. Önformülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular 114
4.1.2.1. Formülasyonda Kullanılacak Pektin Tipine Karar Verilmesine Ait Bulgular 114
4.1.3. Nanopartiküllerin Karekterizasyonuna Ait Bulgular 116
4.1.4. *İn Vitro* Salım Çalışmalarına Ait Bulgular 118
4.1.4.1. Faktöriyel Tasarıma Ait Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Salım Çalışmalarına Ait Bulgular 118
4.1.5. Pythia® Kullanılarak Yapay Sinir Ağının Oluşturulmasına Ait Bulgular 122
4.1.5.1. Pythia® Kullanılarak Matematiksel Olarak Elde Edilen Veriler İle Laboratuvar Ortamında Elde Edilen Deneysel Verilerin 122

Karşılaştırılmasına Ait Bulgular
4.1.5.1.1. Partikül Büyüklüğüne Ait Bulgular 122
4.1.5.1.2. Yığılmalı (%) MEL Salımına Ait Bulgular 128
4.1.5.1.3. Zeta Potansiyeli ve Polidispersite İndeksine Ait Bulgular 134
4.1.5.2. Pythia®'nın Test Edilmesine Ait Bulgular 134
4.1.5.3. Faktöriyel Tasarımdan Optimum Formülasyonun Seçilmesine Ait Bulgular 135
4.1.6. Optimum Formülasyon Olarak Seçilen P28 Nolu Formülasyon Üzerinde Yapılan Salım Çalışmalarına Ait Bulgular 136
4.1.6.1. pH 1.2 Mide Ortamında Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular 136
4.1.6.2. pH 7.4 Fosfat Tamponunda Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular 137
4.1.6.3. pH 6.8 Fosfat Tamponu + Pectinex® Ortamında Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular 138
4.1.6.4. Salım Ortamının Değiştirildiği Çalışmalara Ait Bulgular 139
4.1.7. *İn Vitro* Salım Sonuçlarının Kinetik Olarak Değerlendirilmesine Ait Bulgular 141
4.1.8. Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular 143
4.1.9. Mukoadezyon Ölçüm Çalışmalarına Ait Bulgular 145
4.1.10. Formülasyonda Bağlanmayan Ca^{+2} Miktarına Ait Bulgular 147
4.1.11. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) İle Elde Edilen Görüntüler 147
4.1.12. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) İle Elde Edilen Görüntüler 148
4.2. *İn Vivo* Çalışmalara Ait Bulgular 152

4.2.1. Kolit Oluşumuna Ait Patolojik Bulgular 152
4.2.2. Gruplara Ait Kolon Örneklerinin Makroskopik Görünümüne Ait Bulgular 155
4.2.3. Sıçanlara Ait Bulgular 157
4.2.3.1. Sıçanlarda Görülen % Ağırlık Kaybına Ait Bulgular 157
4.2.3.2. Sıçanların Tükettikleri Pellet Yem Miktarına Ait Bulgular 158
4.2.3.3. Sıçanların Tükettikleri Musluk Suyu Miktarına Ait Bulgular 160
4.2.3.4. Sıçanlarda Kolit Oluşumuna Bağlı Diyare-Kanama Durumuna Ait Bulgular 162
4.2.3.5. Sıçanların Tüm Kolon Ağırlığına Ait Bulgular 163
4.2.3.6. Kolon Makroskopik Skoruna Ait Bulgular 165
4.2.3.7. Kolonik Ülser Uzunluğuna Ait Bulgular 167
4.2.3.8. Sıçanlarda *Kolon Ağırlığı/Sıçan Ağırlığı* Değerine Ait Bulgular 169
4.2.4. Kolonik Mukozada Oksidatif Stres Ölçümüne Ait Bulgular 171
4.2.4.1. Kolonik mukozada NOx seviyelerine Ait Bulgular 171
4.2.4.2. Kolonik mukozada MDA seviyelerine Ait Bulgular 173
4.2.4.3. Kolonik Mukozada GSH Seviyelerine Ait Bulgular 175
4.2.5. Kolonik Mukozada Sitokin Ölçümlerine Ait Bulgular 177
4.2.5.1. Kolonik Mukozada TNF-α Seviyelerine Ait Bulgular 177
4.2.5.2. Kolonik Mukozada IL-10 Seviyelerine Ait Bulgular 179
4.2.5.3. Kolonik Mukozada IL-17 Seviyelerine Ait Bulgular 182
4.2.6. Histolojik Çalışmalara Ait Bulgular 184
5. TARTIŞMA 192
5.1. *İn Vitro* Çalışmalara Ait Değerlendirmeler 194

5.1.1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Değerlendirmeler 194
5.1.2. Önformülasyon Çalışmalarına Ait Değerlendirmeler 196
5.1.2.1. İyonotropik Jelasyonun Değerlendirilmesi 196
5.1.2.2. Kullanılacak Pektin Tipine Karar Verilmesinin Değerlendirilmesi 197
5.1.3. Formülasyon Çalışmalarına Ait Değerlendirmeler 198
5.1.3.1. Nanoboyuta İnilmesinin Değerlendirilmesi 198
5.1.3.2. Nanopartiküllerin Karekterizasyonunun Değerlendirilmesi 198
5.1.3.2.1. Partikül Büyüklüğünün Değerlendirilmesi 198
5.1.3.2.2. Polidispersite İndeksinin Değerlendirilmesi 199
5.1.3.2.3. Zeta Potansiyelinin Değerlendirilmesi 200
5.1.3.2.4. MEL Yüklenme Kapasitesinin Değerlendirilmesi 201
5.1.3.3. İn Vitro Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi 202
5.1.3.3.1. Faktöriyel Tasarıma Ait Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi 202
5.1.3.4. Pythia® Kullanılarak Yapay Sinir Ağının Oluşturulmasına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 203
5.1.3.4.1. Pythia® Kullanılarak Matematiksel Olarak Elde Edilen Veriler İle Laboratuvar Ortamında Elde Edilen Deneysel Verilerin Karşılaştırılmasının Değerlendirilmesi 205
5.1.3.4.2. Pythia® Kullanılarak Faktöriyel Tasarımdan En Uygun Formülasyonun Seçilmesinin Değerlendirilmesi 205
5.1.3.5. Optimum Formülasyon Olarak Seçilen P28 Nolu Formülasyon

Üzerinde Yapılan Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi 206
5.1.3.6. İn Vitro MEL Salımı Sonuçlarının Kinetik Olarak Değerlendirilmesi 209
5.1.3.7. Stabiliteye Ait Bulguların Değerlendirilmesi 210
5.1.3.8. Mukoadezyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi 211
5.1.3.9. Formülasyonda Bağlanmayan Ca^{+2} Miktarının Değerlendirilmesi 213
5.1.3.10. Nanopartiküllerin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) İle Görüntülenmesinin Değerlendirilmesi 213
5.2. *İn Vivo* Çalışmalara Ait Değerlendirmeler 214
5.2.1. Sıçanlara Ait Bulguların Değerlendirilmesi 217
5.2.1.1. Sıçanlarda Görülen % Ağırlık Kaybının Değerlendirilmesi 217
5.2.1.2. Sıçanların Tükettikleri Pellet Yem Miktarının Değerlendirilmesi 218
5.2.1.3. Sıçanların Tükettikleri Musluk Suyu Miktarının Değerlendirilmesi 219
5.2.1.4. Sıçanlarda Kolit Oluşumuna Bağlı Olarak Görülen Diyare-Kanama Durumunun Değerlendirilmesi 220
5.2.1.5. Sıçanların Tüm Kolon Ağırlığının Değerlendirilmesi 221
5.2.1.6. Sıçanların Kolonik Makroskopik Skorunun Değerlendirilmesi 222
5.2.1.7. Kolonik Ülser Uzunluğunun Değerlendirilmesi 224
5.2.1.8. *Kolon Ağırlığı*/*Sıçan Ağırlığı* Değerinin Değerlendirilmesi 224

5.2.2. Kolonik Mukozada Oksidatif Stres Ölçümüne Ait Bulguların Değerlendirilmesi 225
5.2.2.1. Kolonik Mukozada NOx Seviyelerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 226
5.2.2.2. Kolonik Mukozada MDA Seviyelerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 228
5.2.2.3. Kolonik Mukozada GSH Seviyelerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 230
5.2.3. Kolonik Mukozada Sitokin Ölçümlerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 231
5.2.3.1. Kolonik TNF-α Seviyelerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 232
5.2.3.2. Kolonik IL-10 Seviyelerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 234
5.2.3.3. Kolonik IL-17 Seviyelerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 235
5.2.4. Histolojik Bulguların Değerlendirilmesi 237
6. SONUÇ 239
7. ÖZET 243
8. SUMMARY 245
9. KAYNAKLAR 247
10. EKLER 270
11. ÖZGEÇMİŞ 271
12. TEŞEKKÜR 272

ŞEKİLLER **SAYFA**

Şekil 1. Kolonun fizyolojik yapısı 3

Şekil 2. ÜK vakalarında hastalığın tuttuğu bölgeye göre verilen isimler 8

Şekil 3. Rektal alınan preparatlarının kolonda dağılımı 14

Şekil 4. İBH tedavisinde piramit yaklaşımı 14

Şekil 5. Nanopartikülerin sağlıklı ve inflame kolonik dokudaki dağılımı 24

Şekil 6. Pektinin fizikokimyasal yapısı 27

Şekil 7. HMP'lerde (A) ve LMP'lerde (B) jelleşme mekanizması 30

Şekil 8. MEL'in fizikokimyasal yapısı 40

Şekil 9. MEL'in antioksidan özelliklerinin özeti 44

Şekil 10. İyonotropik jelasyonun temel mekanizması 59

Şekil 11. Tez çalışmamızda kullandığımız iyonotropik jelasyon düzeneği 61

Şekil 12. MEL yüklü kalsiyum pektinat nanopartikül formülasyonunun hazırlanması 65

Şekil 13. Salım çalışmalarında kullanılacak diyaliz torbalarının hazırlanması 70

Şekil 14. Pythia®'da çalışan nöronlar ve bu nöronlar arasındaki sinir ağları 74

Şekil 15. Mukoadezyon çalışmasında kullanılan TA-XT Plus Texture Analyzer® cihazı 81

Şekil 16. MEL'e ait partikül büyüklüğü dağılımı 97

Şekil 17. MEL'in FT-IR spektrumu 98

Şekil 18. MEL'e ait DSC termogramı 99
Şekil 19. LM-104 AS-FS DSC'e ait termogramı 100
Şekil 20. MEL + LM-104 AS-FS (1:1 oranındaki karışımı)'a ait DSC termogramı 100
Şekil 21. MEL + LM-104 AS-FS +1:1 oranındaki karışıma ait DSC termogramı 101
Şekil 22. MEL'in pH 1.2, 6.8 ve 7.4'de tamponunda UV spektrumu 102
Şekil 23. pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4'de gerçekleştirilen analizler sonucunda elde edilen doğru kalibrasyon doğruları 104
Şekil 24. Pektinin (LM-104 AS-FS) UV spektrumu 109
Şekil 25. Pectinex®'in UV spektrumu 109
Şekil 26. MEL içermeyen nanopartikül formülasyonunun UV spek. 110
Şekil 27. 25°C'de, pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4 tamponlarında gün ışığına maruz bırakılan MEL'in stabilitesi 111
Şekil 28. 25°C'de, pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4 tamponlarında gün ışığından korunan MEL'in stabilitesi 112
Şekil 29. 37°C'de, pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4 tamponlarında MEL'in stabilitesi 113
Şekil 30. LM 104 AS-FS ile oluşturulan mikropartikülün ışık mikroskopu ile elde edilen görüntüsü 115
Şekil 31. P28'e ait partikül büyüklüğü dağılımı 116
Şekil 32. P1-P8 formülasyonlarının MEL salım profilleri (n=6) 120
Şekil 33. P9-P16 formülasyonlarının MEL salım profilleri (n=6) 120
Şekil 34. P17-P24 formülasyonlarının MEL salım profilleri (n=6) 121
Şekil 35. P25-P32 formülasyonlarının MEL salım profilleri (n=6) 121

Şekil 36. Pythia® (YSA)'nın verdiği değerler ile deneysel olarak elde edilen değerler arasındaki regresyonel ilişki (partikül büyüklüğü) 124
Şekil 37 A, B, C, D. MEL yüklü kalsiyum pektinat nanopartiküllerini hazırlarken kullanılan formülasyon parametreleri ile ortalama partikül büyüklüğü arasındaki ilişkiler 125
Şekil 38. Yığılmalı (%) MEL salımında Pythia® (YSA)'nın verdiği değerler ile deneysel olarak elde edilen değerler arasındaki regresyonel ilişki 130
Şekil 39 A, B, C, D. MEL yüklü kalsiyum pektinat nanopartiküllerini hazırlarken kullanılan formülasyon parametreleri ile nanopartikül formülasyonlarından pH 6,8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif % MEL miktarı arasındaki ilişkiler 134
Şekil 40. pH 1.2 HCl tamponunda P28'e ait in vitro salım grafiği (n=6) 137
Şekil 41. pH 7.4 fosfat tamponunda P28'e ait in vitro salım grafiği (n=6) 138
Şekil 42. pH 6.8 fosfat tamponu + %2 Pectinex enzim konsantresi içeren salım ortamındaki P28'e ait in vitro salım grafiği (n=6) 139
Şekil 43. Salım ortamı değiştirilerek gerçekleştirilen in vitro salım çalışmalarında P28'e ait in vitro salım grafiği (n=6) 140
Şekil 44. Salım ortamı değiştirilerek gerçekleştirilen in vitro salım çalışmalarında P28'e ait in vitro salım grafiği (n=6) 141
Şekil 45. Sağlıklı kontrol grubuyla (Grup A) yapılan mukoadezyon ölçüm çalışmalarına ait kuvvet-mesafe grafiği 146
Şekil 46. TNBS ile kolit oluşturulup tedavi verilmeyen grupla (Grup B) yapılan mukoadezyon ölçüm çalışmalarına ait kuvvet-mesafe grafiği 146
Şekil 47. Nanopartikül formülasyonu (yakın çekim) 147
Şekil 48. Nanopartikül bulutları (uzak çekim) 148

Şekil 49. P28'e ait nanopartiküllerin AFM mikrografı I 149
Şekil 50. P28'e ait nanopartiküllerin AFM mikrografı II 149
Şekil 51. Yazılımsal olarak nanopartiküllerin boyutunun tespit edilmesi I 150
Şekil 52. Yazılımsal olarak nanopartiküllerin boyutunun tespit edilmesi II 150
Şekil 53. P28'e ait nanopartiküllerin üç boyutlu (3D) gösterimi I 151
Şekil 54. P28'e ait nanopartiküllerin üç boyutlu (3D) gösterimi II 151
Şekil 55. Sıçanların ağırlıklarında görülen % kayıp 157
Şekil 56. Sıçanların tükettikleri pellet yem miktarı 159
Şekil 57. Sıçanların tükettikleri musluk suyu miktarı 161
Şekil 58. Sıçanların tüm kolon ağırlığı 164
Şekil 59. Sıçanların kolonlarına ait makroskopik skor değerleri 166
Şekil 60. Sıçanların kolonik ülser uzunluğu 168
Şekil 61. Grupların kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı değerleri 170
Şekil 62. Kolonik mukozada NOx seviyeleri 172
Şekil 63. Kolonik mukozada MDA seviyeleri 174
Şekil 64. Kolonik mukozada GSH seviyeleri 176
Şekil 65. Kolonik mukozada TNF-α seviyeleri 178
Şekil 66. Kolonik mukozada IL-10 seviyeleri 180
Şekil 67. Kolonik mukozada IL-17 seviyeleri 182

TABLOLAR **SAYFA**

Tablo 1. Normal bireylerden elde edilen pH değerleri 5

Tablo 2. Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin klinik ve diagnostik özellikleri 7

Tablo 3. İBH tedavisinde kullanılan ilaçlar 16

Tablo 4. Kolit çalışmasında elde edilen kolonik MDA, NO_x ve GSH düzeyleri 18

Tablo 5. Kolona hedeflendirmede kullanılan polisakkaritler 20

Tablo 6. Cevik ve ark.[126] araştırmalarında elde ettiği bulgular 45

Tablo 7. Asetik asit ile kolit oluşturulan sıçanlarda MEL'in etkisi 46

Tablo 8. TNBS ve etanol ile kolit oluşturulmuş modelde 2.5, 5.0 ve 10.0 mg/kg melatonin ve 100 mg/kg 5-ASA'nın NO_x, KMHİ ve HS üzerine etkileri 47

Tablo 9. Ülseratif kolitli hastalarda 5-ASA ve MEL kullanımının etkisi 50

Tablo 10. Yedi farklı pektin ve sahip oldukları DA^o, DE^o değerleri 62

Tablo 11. Kullanılacak pektin tipine karar verebilmek için hazırlanan formülasyonda kullanılan formülasyon parametreleri ve değerleri 63

Tablo 12. Faktöriyel tasarımda kullanılan formülasyon parametreleri ve değerleri 66

Tablo 13. 32 farklı formülasyon ve bunlar hazırlanırken kullanılan formülasyon parametrelerinin değerleri 67

Tablo 14. Pythia® programına girilen veriler ve programdan elde edilen veriler 73

Tablo 15. P_A'ya ve P_B'ye ait formülasyon parametreleri 75

Tablo 16. Salım ortamı değiştirilerek gerçekleştirilen in vitro salım

çalışmalarında kullanılan salım ortamları ve süreleri I 78
Tablo 17. Salım ortamı değiştirilerek gerçekleştirilen in vitro salım çalışmalarında kullanılan salım ortamları ve süreleri II 78
Tablo 18. Validasyon sonuçlarına göre mukoadezyon çalışmasında kullanılmasına karar verilen test parametreleri 80
Tablo 19. Sıçanlarda TNBS ile kolit indüklendikten sonra tedavide uygulanan formülasyonlar ve uygulama yolları 88
Tablo 20. Kolon hasarı için makroskobik skorlama kriterleri 92
Tablo 21. MEL'in pH 1.2'deki kalibrasyon parametreleri 103
Tablo 22. MEL'in pH 6.8'deki kalibrasyon parametreleri 103
Tablo 23. MEL'in pH 7.4'deki kalibrasyon parametreleri 103
Tablo 24. pH 1.2 HCl tamponu için MEL (%) geri elde değerleri 105
Tablo 25. pH 6.8 fosfat tamponu için MEL (%) geri elde değerleri 106
Tablo 26. pH 7.4 fosfat tamponu için MEL (%) geri elde değerleri 106
Tablo 27. Deneyiçi tekrarlanabilirlik sonuçları 107
Tablo 28. Deneylerarası tekrarlanabilirlik sonuçları 108
Tablo 29. MEL'in pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4 ortamlarındaki çözünürlük değerleri 114
Tablo 30. Farklı pektin türleriyle oluşturulan partiküllerin büyüklüğü, MEL yüklenme kapasitesi ve 30 G'luk iğnenin ucunu tıkama durumu 115
Tablo 31. Faktöriyel tasarıma ait formülasyonların ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel, MEL yüklenme kapasitesi ve pH değerleri 117
Tablo 32. pH 6.8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan

kümülatif MEL miktarı değerleri 119
Tablo 33. Deneysel olarak elde edilen ve Pythia®(YSA)'nın matematiksel olarak verdiği partikül büyüklüğüne ait bulgular 123
Tablo 34. Yığılmalı (%) MEL salımına ait deneysel olarak elde edilen ve Pythia® (YSA)'nın verdiği bulgular 129
Tablo 35. Deneysel ve matematiksel olarak elde edilen yığılmalı MEL salımı (%) sonuçları ile partikül büyüklüğü sonuçları 135
Tablo 36. Formülasyonlara ait salım verilerinin kinetik olarak incelenmesi 142
Tablo 37. 4°C/(Ortam nemi) Ortamındaki stabilite sonuçları 143
Tablo 38. 25°C/(% 60 Bağıl nem) Ortamındaki stabilite sonuçları 144
Tablo 39. 40°C/(% 75 Bağıl nem) Ortamındaki stabilite sonuçları 144
Tablo 40. Sağlıklı kontrol grubuyla (Grup A) yapılan mukoadezyon ölçüm çalışmalarına ait bulgular 145
Tablo 41. TNBS ile kolit oluşturulup tedavi verilmeyen grupla (Grup B) yapılan mukoadezyon ölçüm çalışmalarına ait bulgular 145
Tablo 42. Çalışmanın sonunda sıçanların ağırlıklarında görülen % kayıp 157
Tablo 43. Sıçanlarda görülen % ağırlık kaybının gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi 158
Tablo 44. Sıçanların tükettikleri pellet yem miktarı 159
Tablo 45. Sıçanların tükettikleri pellet yem miktarının gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi 160
Tablo 46. Sıçanların tükettikleri musluk suyu miktarı 161
Tablo 47. Sıçanların tükettikleri musluk suyu miktarının

gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi 162
Tablo 48. Sıçanlarda kolit oluşumuna bağlı diyare-kanama durumu 162
Tablo 49. Sıçanların tüm kolon ağırlığı 163
Tablo 50. Sıçanların tüm kolon ağırlığının gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi 165
Tablo 51. Sıçanların kolonlarına ait makroskopik skor değerleri 165
Tablo 52. Sıçanların kolonlarına ait makroskopik skor değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi 167
Tablo 53. Sıçanların kolonik ülser uzunluğu 167
Tablo 54. Sıçanların kolonlarına ait ülser uzunluğu değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi 169
Tablo 55. Grupların kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı değerleri 169
Tablo 56. Grupların kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi 171
Tablo 57. Kolonik mukozada NOx seviyeleri (µmol/g doku) 171
Tablo 58. Kolonik mukozada NOx değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi 173
Tablo 59. Kolonik mukozada MDA seviyeleri (nmol/g doku) 173
Tablo 60. Kolonik mukozada MDA değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi 175
Tablo 61. Kolonik mukozada GSH seviyeleri (µmol/g doku) 175
Tablo 62. Kolonik mukozada GSH değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi 177
Tablo 63. Kolonik mukozada TNF-α seviyeleri (pg/mL) 177

Tablo 64. Kolonik mukozada TNF-α değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi 179
Tablo 65. Kolonik mukozada IL-10 seviyeleri (pg/mL) 180
Tablo 66. Kolonik mukozada IL-10 değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi 181
Tablo 67. Kolonik mukozada IL-17 seviyeleri (pg/mL) 182
Tablo 68. Kolonik mukozada IL-17 değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi 184
Tablo 69. Kolit oluşturulmuş deney hayvanlarında MEL uygulama yolunun, süresinin ve dozunun karşılaştırılması 216

RESİMLER **SAYFA**

Resim 1. Sıçanların yerleştirildiği metabolik kafes 85

Resim 2. Trandelenburg pozisyonunda tutulan bir sıçan 86

Resim 3. Sıçanlara oral uygulama yapılması 88

Resim 4. Sıçanlara intrakolonik uygulama yapılması 89

Resim 5. Sıçanlara intrakolonik uygulama yaparken kullanılan gavaj 89

Resim 6. Sıçanlara oral uygulama yaparken kullanılan gavaj 90

Resim 7. Ksifopubik median kesi ile laparatomi yapılan sıçanlar 91

Resim 8. TNBS ile kolit oluşturulan sıçanlarda kolona ait ışık mikroskobu görüntüleri 153, 154

Resim 9. Sıçanlarda kolonun makroskopik açıdan değerlendirilmesi 155, 156

Resim 10. Kontrol grubuna (Grup A) ait kolon dokusu 186

Resim 11. Kolit oluşturulduktan sonra tedavi verilmeyen gruba (Grup B) ait kolon dokusu 187

Resim 12. Kolit oluşturulduktan sonra oral yoldan MEL yüklü nanopartikül uygulaması yapılan gruba (Grup C) ait kolon dokusu 188

Resim 13. Kolit oluşturulduktan sonra intrakolonik yoldan MEL yüklü nanopartikül uygulaması yapılan gruba (Grup D) ait kolon dokusu 189

Resim 14. Kolit oluşturulduktan sonra oral yoldan boş nanopartikül uygulaması yapılan gruba (Grup E) ait kolon dokusu 190

Resim 15. Kolit oluşturulduktan sonra intrakolonik yoldan boş nanopartikül uygulaması yapılan gruba (Grup F) ait kolon dokusu 191

EŞİTLİKLER **SAYFA**

Eşitlik 1 68

Eşitlik 2 69

Eşitlik 3 81

Eşitlik 4 82

Eşitlik 5 83

SEMBOLLER, KISALTMALAR

2-HPßCD: 2-hidroksipropil-ß-siklodekstrin

5-ASA: 5 amino salisilik asit

6-OH MEL: 6-hidroksi melatonin

8-OHdG: 8-hidroksi-deoksi guanozin

ADPRT: Adenozin difosfat ribozil transferaz

AFM: Atomik güç mikroskobu

AFMK: N^1-asetil-N^2-formil-5-metoksi kinuramin

AMK: N^1-asetil-metoksi-kinuramin

BCS: Biopharmaceutics Classification System (Biyofarmasötik sınıflandırma sistemi)

BSA: Sığır serum albümini

BSS: Bağıl standart sapma

Ca^{+2}: Kalsiyum

CaP: Kalsiyum pektinat

CH: Crohn hastalığı

C_{max}: Doruk (Pik) plazma derişimi

CRP: C-reaktif protein

Cu^{+2}: Bakır

DA^o: Amidifikasyon dereceleri

DE^o: Esterifikasyon derecesi

DNBS: Dinitro benzen sülfonik asit

DSC: Diferansiyel tarama kalorimetresi

DSS: Dekstran sodyum sülfat

Elisa: Enzyme linked immuno sorbent assay

FT-IR: Fourier transform infrared

GA: Güven aralığı

GHK–Cu^{+2}: Glisil-l-histidil-l-lisin–Cu(II)

Gİ: Gastrointestinal

GİS: Gastrointestinal sistem

GSH: Glutatyon

GSH-Px: Glutatyon peroksidaz

H_2O_2: Hidrojen peroksit

HAS: Hastalık aktivite skoru

HMP: Yüksek metoksilli pektin

HPC: Hidroksi propil selüloz

HPMC: Hidroksi propil metil selüloz

HS: Histolojik skor

HS: Homosistein

IFN-γ: İnterferon-gamma

IL: İnterlökin

IV: İntravenöz

İBH: İnflamatuvar bağırsak hastalığı

k: Çözünme sabiti

kr^0: Sıfır derece hız sabiti

kr^1: Birinci derece hız sabiti

KMHİ: Kolonik mukoza hasar indeksi

LMP: Düşük metoksilli pektin

LTB4: Lökotrien-B4

MDA: Malondialdehit

MEL: Melatonin

Mg^{+2}: Magnezyum

M_n: Sayıca ortalama molekül ağırlığı

MPO: Miyeloperoksidaz

MT_1, MT_2: Melatonin spesifik reseptörler

M_w: Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı

NAC: N-asetil sistein

NEDD: Naftiletilendiamin dihidroklorür

NF-kβ : Nükleer faktör kappa-β

NK: Doğal öldürücü (natural killer) hücre

NOS: Nitrik oksit sentaz

NO_x: Nitrit oksit

$O_2^{\bullet-}$: Süperoksit anyonu

$OH^{\cdot}$: Hidroksil radikali

ORT: Ortalama

PAF: Platelet aktive edici faktör

PDI: Polidispersite indeksi

PEG: Polietilen glikol

PG: Propilen glikol

r: Korelasyon katsayısı

R: Radikal

r^2: Determinasyon katsayısı

ROM: Reaktif oksijen metabolitleri

RSH: Regresyonun standart hatası

SOD: Süperoksit dizmutaz

SS: Standart sapma

TCA: Trikloroasetik asit

TEM: Geçirimli elektron mikroskobu

TNBS: Trinitro benzen sülfonik asit

TNF-α: Tümör nekrozis faktör-alfa

TX: Tromboksan

UV: Ultraviyole

ÜK: Ülseratif kolit

YSA: Yapay sinir ağı

Zn^{+2}: Çinko

λ_{max}: Etkin maddenin maksimum absorbans verdiği dalga boyu

1. GİRİŞ

İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) sindirim sisteminin tamamının veya bazı bölgelerinin kronik inflamasyonudur. İBH'nın Crohn hastalığı (CH) ve ülseratif kolit (ÜK) olmak üzere başlıca iki tipi bulunur. CH'nın terminal ileumda görülmesine karşın, ÜK kolonu tutar.

İBH intestinal inflamasyon ve mukozal doku hasarıyla başlar, bozulmuş immün cevapla ilerleyerek intestinal ve ekstra intestinal belirtilere sebep olur.

İBH'nın nedeni tam olarak ortaya çıkmamakla birlikte bağışıklık, kalıtımsal nedenler ve çevresel faktörlerin hastalığın oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir.

Reaktif oksijen türleri, oksijenin normal metabolizması ile oluşan ve eşlenmemiş elektron taşımaları nedeniyle reaktivitesi çok yüksek ürünlerdir. Reaktif oksijen türlerinin yıkıcı özelliklerine karşı dokularda antioksidan savunma sistemleri bulunur. Reaktif oksijen metabolitlerinin üretimindeki artış ve antioksidanlar tarafından etkisiz hale getirilmeleri arasındaki dengesizlik sonucunda oksidatif stres artmaya başlar.

Son yıllarda oksidatif stresin İBH'da önemli bir faktör olduğu tezi öne çıkmaktadır. Bu nedenle antioksidanların bu hastalığın tedavisinde kullanımı gittikçe önem kazanmaktadır.

Melatonin (MEL) immunoregulasyon, inflamasyonal cevap oluşumu ve oksidatif stres üzerinde önemli fizyolojik role sahip, epifiz bezinde üretilen bir hormondur. MEL'in immün sistem stimulasyonu, epitelyal rejenerasyon stimulasyonu ve antioksidan özellikleriyle İBH tedavisinde yararlı olabileceği gösterilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda nano boyuttaki partiküllerin, kolonik inflamasyon bölgesinde daha uzun süre kalarak yüksek oranda biriktiği gösterilmiştir. Bu nedenle İBH'da antiinflamatuvar

ve antioksidan etki gösteren ilaçların nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ile verilmesi halinde daha iyi etkinlik sağlayacağı fikri önem kazanmıştır.

Kolona özgü ilaç taşıyıcı sistemler konvansiyonel ilaçlara göre etkin maddelerin, etki yerinde istenilen konsantrasyona daha düşük doz ile ulaşmasını sağlayıp, istenmeyen sistemik yan etkilerin görülme sıklığını azaltır. İBH'nın tedavisinde kolona hedeflendirme, konvansiyonel ilaçlara göre daha başarılıdır.

Pektin, kolonda bulunan bakterilerin ürettiği enzimler tarafından parçalanan doğal bir polimerdir. Kolona özgü ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı İBH'da uygulanmak üzere MEL içeren pektin nanopartiküllerinin hazırlanarak, etkinliğinin in vitro ve in vivo değerlendirilmesidir. Yapılan literatür incelemesinde MEL-pektin nanopartiküllerinin İBH'daki etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

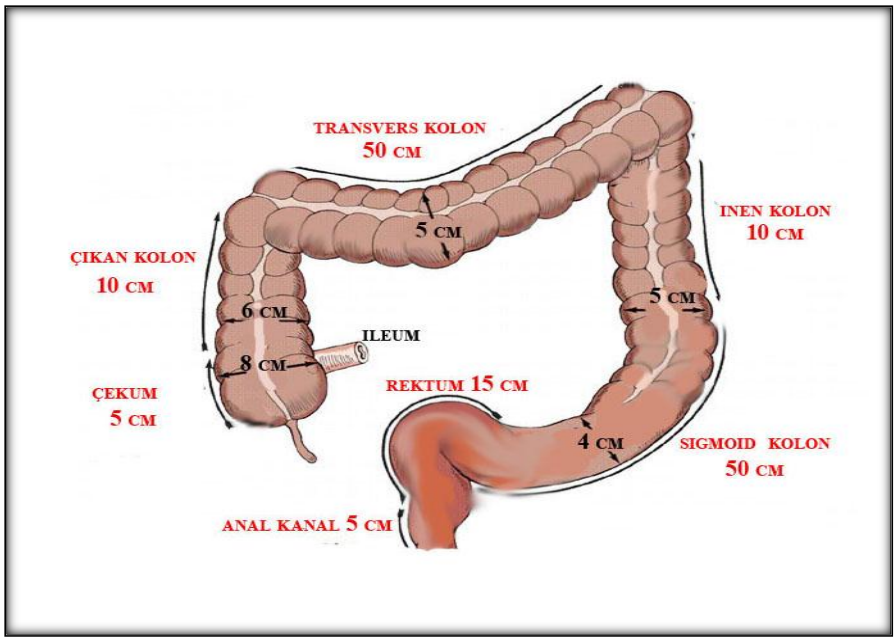
Bu bağlamda;

- Nanopartiküller hazırlanırken çeşitli parametreler değiştirilerek bunların partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve etkin madde salımı üzerine etkileri incelenmiştir.
- Nanopartiküller hazırlandıktan sonra Phytia® yapay sinir ağı programı kullanılarak optimum nanopartikül formülasyonu üzerinde çalışılmıştır.
- İn vitro deneylerden elde edilen sonuçlar ışığında en uygun formülasyon seçilmiş ve trinitro benzen sülfonik asit (TNBS) ile kolit indüklenen sıçanlarda oral ve intrakolonik uygulamadan sonra in vivo olarak etkinliği biyokimyasal, histolojik ve immünolojik olarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolonun Anatomik ve Fizyolojik Özelikleri

Kolon, ileoçekal bağlantıdan başlayıp anüse kadar uzanan, sindirim sisteminin en son kısmıdır. İnsanlarda 130-150 cm uzunluğunda ve 2,5-8,5 cm çapındadır[1,2] (Şekil 1).



Şekil 1. Kolonun fizyolojik yapısı[2]

Kolon ince bağırsaklara göre daha geniş bir çapa sahip olup luminal içeriği daha viskozdur. İnce bağırsakların aksine absorpsiyondan sorumlu mikrovilluslar ve besinlerin sindiriminden sorumlu enzimler içermez[3].

Kolonik epitelyumun major fonksiyonu kalın bağırsak üst kısmında sıvı ve elektrolit absorpsiyonunun gerçekleşmesidir. Sindirilemeyen materyallerin (selüloz, bakteri gibi) eliminasyonundan kolon sorumludur.

2.2. Kolon Mikroflorası

Doğumda insan kolonu sterildir. Neonatal dönem ve hayatın ilk aylarında mide-bağırsak kanalına bakteriler yerleşmeye başlar ve zamanla gastrointestinal kanalın değişik yerlerinde kompozisyonları farklı olan mikroflora oluşur[4]. Midede aside dayanıklı gram negatif aerob türler yaşarken kolonda yaşayan bakterilerin çoğu anerobtur[5].

Kolonda yaşayan başlıca bakteri türleri Bacterioides, Bifidobacterium ve Eubacterium'dur[5].

Enterik immün sistem ile mikroorganizmalar arasındaki dengenin bozulması, kronik inflamatuvar bağırsak hastalığını (İBH) başlatan süreci tetikler. İBH'de bağırsak lümenindeki bakteri sayısının arttığına ve flora kompozisyonunun değiştiğine ait bilgiler vardır[6].

Endojen kolon bakterileri sindirilmeden geçen karbonhidrat ve proteinlerin yıkımında önemli rol oynarlar. Ayrıca enterohepatik dolaşım ile yeniden kazanılan birçok maddenin (bilirübin, safra asitleri, östrojen, kolestrol) metabolizmasında görev alır. K vitamini gibi gerekli maddeleri üretirler. Sahip oldukları polisakkaridaz türevi enzimlerle bazı ilaçların kolona hedeflendirilmesinde önemli rol oynarlar[5].

Genelde ülseratif kolit ve Crohn hastalığı olanlar sağlıklı bireylerle kıyaslandığında bakterilerin glikozidaz aktivitesinde azalma olduğu gözlenmiştir[7].

2.3. Kolonik pH

Gastrointestinal (GI) alanın pH'sı salım sistemlerini doğrudan etkileyen bir faktördür. Sağlıklı bireylerde GI alan pH'sı iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Altmışaltı sağlıklı bireyde yapılan bir çalışmada elde edilen GI pH değerleri Tablo 1'de verilmiştir[8].

Altı ülseratif kolit (ÜK) hastası ile yapılan bir çalışmada sağlıklı bireylere göre daha düşük pH değeri gözlenmiştir (2.3, 2.9 ve 3.4). Crohn hastalığı (CH) olan hastalarda ise intraluminal pH değerleri sağ kolonda daha düşüktür (pH 5.3±0.3) ve distal kolonda daha asidik ortam gözlenmiştir[9].

Tablo 1. Normal bireylerden elde edilen pH değerleri[8]

Bölge	n	pH (ORT±SS)
Jejunum	55	6.63±0.53
Orta-ince bağırsak	52	7.41±0.36
İleum	58	7.49±0.46
Sağ kolon	66	6.37±0.58
Orta kolon	51	6.61±0.83
Sol kolon	50	7.04±0.67
Tüm ince bağırsak	51	7.30±0.34
Tüm kolon	48	6.63±0.67

2.4. İntestinal Geçiş

Oral preparatların kolona ulaşma süresi mide içeriğinin boşalmasına ve ileoçekal bağlantıda tutulma süresine göre değişir. Kolondan geçiş süresi ise preparatın şekline, büyüklüğüne, açlık-tokluk durumuna, hastalık durumuna ve yaşa bağlı olarak birkaç saatten iki güne kadar değişkenlik gösterir[10].

Oral hedeflendirilmiş sistemler için intestinal geçiş süresi önemli bir parametredir. Kapsül ve tablet gibi monolitik sistemler, çözelti ve partiküler sistemlerin tüm çıkan kolona yayılması nedeniyle kolondan daha hızlı geçer.

İBH hastalarında intestinal geçiş süresi sağlıklı bireylerle kıyaslandığında farklı olabilmektedir. Bu farklılık mukozal inflamasyon ve onun neden olduğu değişikliklerden kaynaklanmaktadır[4]. ÜK hastalarında

GI sistemden toplam geçiş süresinin daha uzun olduğu gözlenmiştir (56 saat ve 78 saat olmak üzere)[11].

2.5. Kolondan İlaç Absorpsiyonu

Kolonik absorpsiyonun büyük kısmı kolonun ilk yarısında gerçekleşir, ikinci yarı daha çok depolama ve defekasyon ile ilgilidir. Kolonda ilaçların absorpsiyonu, transselüler transport ve daha çok paraselüler transport ile gerçekleşir. Kolon epitel hücreleri arasındaki bağlantılar ince bağırsaktakilere oranla çok daha sıkıdır ve ilaçların absorpsiyonunda önemli bir engel oluşturur. Ancak ilaçların kolonik mukozayla temas süresi uzun olduğundan absorpsiyon oranı artar.

Absorplanan etkin madde venöz ve/veya lenfatik kapilerler yoluyla sistemik dolaşıma katılır. Hidrofilik ilaçlar venöz yolla çok kısa sürede sistemik dolaşıma katılır ancak karaciğerde ilk geçiş eleminasyonuna uğrarlar. Hidrofobik ilaçlar ise lenfatik yollardan daha uzun sürede sistemik dolaşıma geçerler ancak hepatik ilk geçiş etkisine uğramazlar[12].

2.6. İnflamatuvar bağırsak hastalığı: Ülseratif Kolit ve Crohn Hastalığı

İBH başlığı altında birbiriyle ilişkili ancak farklı hastalıklar olarak tanımlanan ÜK ve CH yer almaktadır. Bu iki hastalık klinik, endoskopik ve histolojik özellikleri ile birbirinden ayrılır (Tablo 2). Ancak bazı hastaların klinik tablosu bu iki hastalık arasında kalır ve indetermine kolit olarak adlandırılır[13].

CH birincil olarak ince bağırsağı, özellikle de ileumu tutarken, ÜK ise sadece kolon hastalığı olarak ortaya çıkar, rektumdan proksimale doğru ilerler. Her iki hastalık da gerek belirti ve bulguları, gerekse seyirleri açısından genel olarak birbirlerine benzer. Her ikisi de bağırsak dışı birçok organda oluşturabildikleri komplikasyonlar ve malinite potansiyelleri nedeniyle kolon ve rektum hastalıkları arasında önemli yer tutarlar[14].

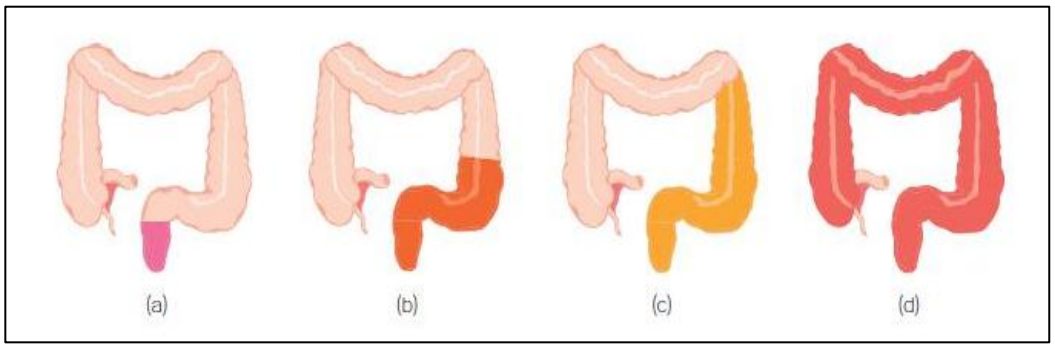
Tablo 2. Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin klinik ve diagnostik özellikleri[15]

	Crohn Hastalığı	Ülseratif Kolit
Semptom ve bulgular		
Karın ağrısı	+++	+
Diyare	+++	+++
Rektal kanama	+	+++
Kilo kaybı	+++	+
Ateş	+++	+
Malnütrasyon	++	+
Abdominal kitle	+++	+
Tutulum paterni	Sıçrayıcı lezyonlar şeklinde	Devamlı düz bir sıra şek.
Tutulan bölgeler	Gastrointestinal kanalın herhangi bir kısmı tutulabilir. Sıklıkla ileum tutulur.	Sadece rektum ve kolon tutulur.
Endoskopik bulgular	Segmental inflamasyon Kaldırım taşı manzarası Aftöz ve lineer ülserler	Yaygın inflamasyon Eritem Frajilite ve granülarite varlığı Vasküler belirginliğin kaybolması Psödopolipler
Histolojik bulgular	Transmural inflamasyon Granülom	Mukozal inflamasyon Kript abseleri
Radyolojik bulgular	Bağırsak duvarı kalınlaşması Yağ birikimi Obstrüksiyon	Toksik mega kolon

2.6.1. Hastalık Lokalizasyonu

Hedeflendirilmiş salım sistemlerinde önemli noktalardan biri de hastalığın oluştuğu kolonik bölgedir. ÜK'de inflamasyon bölgeleri daha çok kolondan proksimal alana kadar uzanmaktadır. CH'da ise inflamasyonun baskın olduğu alan distal ileum olup; hastaların %30-%40'ında kolonda rastlanmaktadır. Böylece ÜK ve CH olan hastaların tedavisinde salım sistemleri farklı olacaktır.

ÜK vakalarına, hastalığın tuttuğu kolonik bölgeye göre farklı isimler verilmektedir. Hastalık sadece rektumu tuttuğunda proktit (Şekil 2a), proksimale yayılan sigmoidal kolonu tuttuğunda proktosigmoit (Şekil 2b), splenik fleksuraya kadar olan tutulumda distal kolit (Şekil 2c), çekuma kadar tüm kolon tutulumuna ise pankolit (Şekil 2d) adı verilir[16].



Şekil 2. ÜK vakalarında hastalığın tuttuğu bölgeye göre verilen isimler[16].

2.6.2. Ülseratif Kolit Etyopatolojisi

İBH'nin hastalık mekanizmasını tetikleyen etkenler halen bilinmezliğini korurken, hastalığın ilerlemesinde yer alan olası mekanizmalar ve medyatörler konusunda giderek daha fazla teoriler geliştirilmektedir. Genetik ve çevresel faktörlerin kombinasyonunun hastalığın oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan genom incelemeleri ile 1. ve 4. kromozomda ülseratif kolite hassas genlerin olduğu bulunmuştur[17].

Ülseratif kolit ile ilişkili patolojik bulgular belirli inflamasyon medyatörlerinde artış, oksidatif stres belirtileri, kolonik çevrenin bozulması, olarak bildirilmiştir[18].

2.6.2.1. İnflamasyon Medyatörleri

İmmün cevabın düzenlenmesinde hücreler arasındaki iletişimi sağlayan glikoprotein yapısındaki bileşiklere sitokinler denir. Doğal immünitede sitokinler, mononükleer fagositler ve doğal öldürücü (natural killer, NK) hücreler tarafından üretilir. Kazanılmış immünitede ise T hücreler; tarafından üretilirler[19].

İBH'da kolon epitelyal hücrelerindeki ve immün sistemdeki anormal aktivasyon sonucu gelişen lenfosit proliferasyonu ve IL-1β (interlökin 1-beta), IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IFN-γ (interferon gamma), prostagladinler, TX (tromboksan), LTB4 (lökotrien-B4), TNF-α (tümör nekrozis faktör-alfa), PAF (platelet aktive edici faktör) gibi sitokinler ve nötrofillerden salgılanan aşırı NO_x (nitrit oksit) akut intestinal inflamasyonu başlatır[21]. Hastalığa yatkınlığı olmayanlar bu inflamasyonu immün cevabın down-regülasyonu ile sınırlandırarak geride herhangi bir skar dokusu kalmaksızın iyileşmeyi sağlarlar. Genetik olarak yatkın kişilerde ise inflamatuvar cevap baskılanamaz ve doku yıkımını takiben kronik inflamasyon ve fibrozis gelişir[18,20].

2.6.2.2. Oksidatif Stres

Dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllere radikal adı verilir ve "R" ile gösterilir. Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında veya çeşitli dış etkenlerin etkisiyle oluşabilir. Kararsız bir yapı gösteren bu tanecikler bir an önce kararlı hale ulaşmak isterler, çok aktif yapıda olup tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermektedir[22].

Serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirilme hızı dengede olduğu sürece, organizma bu bileşiklerden etkilenmemektedir. Buna karşılık savunma azalır veya bu zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa, bu denge bozulmakta ve serbest radikallere bağlı zararlı etkiler ortaya çıkabilmektedir. Bu duruma oksidatif stres denir[23].

Ülseratif kolitte intestinal mukozada oksidatif stres artışını gösteren belirtiler gösterilmiştir. Bir çalışmada her iki İBH grubunda kontrol grubu ile kıyaslandığında oksidatif DNA hasarını gösteren 8-hidroksi-deoksi guanozin (8-OHdG) seviyesinde artış olduğu gösterilmiştir[24].

2.6.2.2.1. Reaktif Oksijen Metabolitleri (ROM)

Oksijen canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için mutlak gerekli bir elementtir. Oksijen, hücre içinde dört elektron gerektiren bir dizi reaksiyon sonunda indirgenir, bu sırada hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlar. Bu süreçte oksijenin az bir kısmı (%1-3) tam olarak suya dönüşemez ve bu reaksiyonlarda ara ürün olarak serbest radikaller olan süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) oluşur. Bu bileşiklere reaktif oksijen metabolitleri denir[25].

Organizmada meydana gelen süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet -}$) süperoksit dismutaz enzimi tarafından hidrojen perokside (H_2O_2) dönüştürülür. Fenton reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten (H_2O_2) hidroksil radikali (OH•) oluşmaktadır. Fenton hipotezine göre OH• radikalleri DNA'ya saldırarak hasar oluşturur, H_2O_2 ve $O_2^{\bullet -}$ 'nin doğrudan hasar yapma yeteneği yoktur[26].

Organizmada çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçler sonucunda meydana gelen ROM'ların intestinal inflamasyon patogenezinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir[27].

Yapılan bir çalışmada, İBH olan bireylerde DNA hasarının önemli bir belirleyicisi olan adenozin difosfat ribozil transferaz (ADPRT) enzim düzeylerinin normal bireylere göre çok daha yüksek olduğu ve bu durumun hidrojen peroksit (H_2O_2) indüklü DNA sentezinden kaynaklandığı belirtilmiştir[28].

Yapılan bir diğer çalışmada, 17 ÜK'li bireyin nefesindeki etan (oksidatif metabolizmanın son ürünü) seviyeleri gaz kromatografisi ile ölçülerek normal bireylerle kıyaslanmıştır ve hasta bireylerde çok daha yüksek bulunmuştur. Nefesle verilen etan seviyesindeki artış lipid peroksidasyonunun önemli göstergelerinden biridir. ÜK'li hastalarda görülen intestinal hasar ve intestinal kanama Fenton reaksiyonu sonucunda meydana gelen OH• 'in lipid peroksidasyonunu indüklemesiyle ilişiklendirilir[29].

Tüzün ve ark.[30] yaptığı bir çalışmada, İBH'da serbest radikal artışının en önemli göstergelerinden biri olan plazma glutatyon peroksidaz (GSH-Px) seviyeleri araştırılmıştır. İBH'da artan serbest radikal düzeylerine bağlı olarak gelişen oksidatif strese yanıt olarak plazma GSH-Px düzeyleri artmıştır. Bu durum İBH'nın etyolojisinin temelinde, artan serbest radikal ve ROM düzeylerinin neden olduğu oksidatif stres ve azalan antioksidan kapasite olduğu göstermektedir.

Otuzyedi Crohn hastası üzerinde yapılan bir çalışmada ise oksidatif stresi değerlendirmek üzere hastaların lipit peroksidasyon seviyesi ve plazma antioksidan konsantrasyonları ölçülmüştür. Lipit peroksidasyonu solunumla verilen pentan, etan miktarı ve F_2-izoprostan seviyeleri ile değerlendirilmiştir. Crohn hastalarında her üç parametre de sağlıklı kontrol grubu ile kıyaslandığında yüksek bulunmuştur. Plazma antioksidan (askorbik asit, α ve β-karoten, likopen ve β-kriptoksantin) seviyeleri de Crohn hastalarında kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Bu bulgular Crohn hastalığı olan bireylerin oksidatif stres altında olduğunu göstermektedir[26].

Yirmidört Crohn hastası ve 18 ülseratif kolit hastasını içeren bir klinik çalışmada, hasta bireylerin ve sağlıklı gönüllülerin plazma malondialdehit (MDA) seviyeleri karşılaştırılmıştır. Crohn hastalığı olan bireyler, kontrol grubu ile kıyaslandığında plazma MDA seviyesi anlamlı derece daha yüksek bulunmuştur. Ülseratif kolitli hastalarda da MDA seviyesi daha yüksek olmasına rağmen kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı değildir[27].

ÜK hastalarından alınan intestinal mukoza biyopsilerinde reaktif oksijen bileşenleri, DNA oksidasyon ürünleri, ve demir seviyesinde kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde bir artış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bakır (Cu^{+2}) ve çinko (Zn^{+2}) seviyelerinde ve endojen antioksidan bir enzim olan süperoksit dismutaz kofaktörlerinde azalma gözlenmiştir[31].

İntestinal mukozanın bütünlüğü, glutatyon/glutatyon disülfit ile sistein/sistin arasında gerçekleşen luminal redoks reaksiyonlar tarafından muhafaza edilir. Bu redoks reaksiyonlar, lümenden sindirilmiş maddelerin absorpsiyonunda, intestinal bakteriyel floranın bütünlüğün sağlanmasında ve mukusun akışkanlığının belirlenmesinde rol oynar. Bu iki redoks çifti intestinal mukozanın rejenerasyonunu, hücrelerin proliferasyonunu, farklılaşmasını ve apoptozisini yöneterek belirler. İBH'da bu redoks reaksiyonlar bozulur, redoks sinyaller oksidatif stres nedeniyle dejeneratif mukozal hasarın oluşmasına yol açar. Sinyalin bozulmasındaki en önemli faktör inflamasyon hücrelerinden yüksek miktarda salgılanan ROM'dir[32].

2.6.2.3. Kolonik Çevre

Spesifik bir patojenin izole edilememiş olmasına rağmen, kolitte bakterilerin rol oynadığını gösteren bulgular vardır. Özellikle patojenik *Escherichia coli* kolit ile ilişkilendirilmiştir[33].

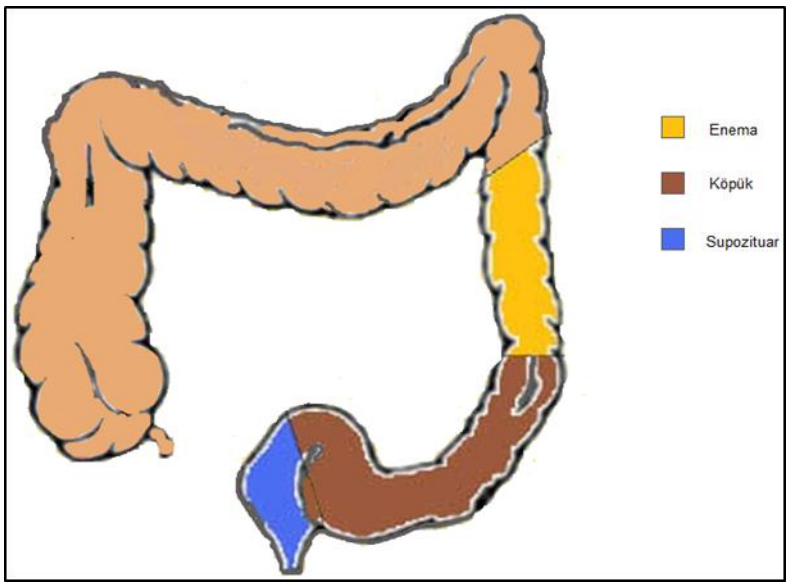
Araştırmacılar bu bakterilere karşı geliştirilen immün cevabın ÜK etyolojisinde rol oynayabileceğini düşünmektedir. İBH'da inflamasyonel süreci başlatan uyarının sıklıkla anaerobik bir bakteri tarafından başlatıldığı düşünülür[33].

2.7. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığında Tedavi Yaklaşımları

Kolona ilaç taşınması rektal ve oral yoldan yapılabilir. Konvansiyonel oral ilaçlar kolona ulaşmadan çok daha önce absorplanır, rektal preparatlar ise yükselen kolon bölgesine ulaşmakta yetersiz kalmaktadır, bu nedenle kolona ilaç taşıyan oral sistem araştırmaları giderek artan bir ivme kazanmıştır. Oral kolona hedeflendirilmiş sistemler, kolonun kendine özgü fizyolojik özelliklerinden yararlanarak içeriğindeki formülasyonu istenilen kolon bölgesinde açığa çıkarır[1].

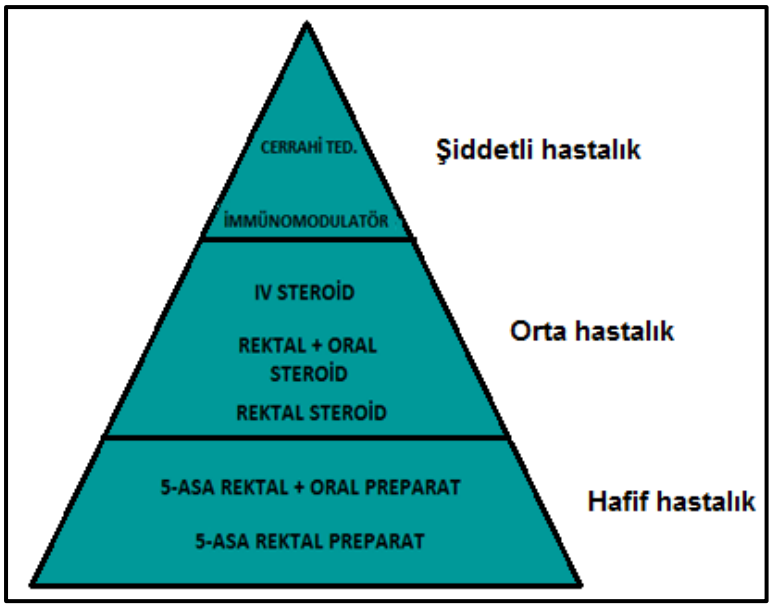
İBH genellikle GI alanda spesifik bölgelerde lokalize olur. (CH terminal ileumu, ÜK ise kolonu tutar.) İBH'nin tedavisinde kullanılacak ilaç şeklinin seçilmesindeki en önemli etken hastalığın kolonun hangi bölgesini tuttuğudur. Ülseratif proktit (sadece rektum tutulumu) tedavisinde ilk yaklaşım rektal yolla uygulanan topikal ilaç şekilleriyken ileumu tutan CH'nın tedavisinde topikal uygulamanın yeri yoktur[34].

Yapılan bir çalışmada rektal yoldan verilen ilaçların distal kolondaki dağılımında etkili formülasyon parametreleri araştırılmıştır. Uygulanan ilaçların hacminin ve viskozluğunun etkin bir faktör olabileceği belirtilmiştir. Bu araştırmacılar 5-ASA enemasının kolondaki dağılımını sintigrafik inceleme yaparak tespit etmişlerdir. Yapılan sintigrafik çalışmalarda supozituvarın ilacı sadece rektumda saldığı, köpük halinde sigmoid kolona kadar, enema formunda ise splenik fleksür'e kadar yayıldığı gözlemlenmiştir[35] (Şekil 3).



Şekil 3. Rektal alınan preparatlarının kolonda dağılımı[35]

İBH'nin standart tedavisinde aminosalisilat ve kortikosteroid bileşikleri yer almaktadır. İnflamasyonun lokalizasyonu, miktar ve aktivitesine bağlı olarak ilaçlar topikal, sistemik veya kombinasyon şeklinde kullanılabilmektedir. Dolayısıyla İBH tedavisi bir piramit sisteminden oluşmaktadır (Şekil 4).



Şekil 4. İBH tedavisinde piramit yaklaşımı[36]

Hastalığın tedavisine aminosalisilatlarla başlanır, şiddeti arttıkça rektal preparatlardan sistemik preparatlara geçilir ve tedaviye steroidler eklenir. Daha şiddetli vakalarda ise tedaviye immünomodülatör ilaçlar eklenir ve cerrahi prosedür başlatılır[36].

İBH ilaçlarla tedavisindeki ana hedef, küçük idame dozdaki ilaçlarla hastalığın akut alevlenmesinin engellenmesidir[37].

2.8. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığında Tedavi Amaçlı Kullanılan İlaçlar

Tedavi, hastalığın aktivasyon durumuna göre aktif hastalığın tedavisi ve idame tedavisi şeklinde ikiye ayrılır. Aktif hastalık; hafif-orta aktiviteli veya orta-şiddetli aktiviteli olabildiği gibi, şiddetli seyirli de olabilir. Ayrıca tutulan kolon segmentine göre kolonun sadece bir kısmını (proktit) veya tüm kolonu (pankolit) kapsayabilir. Bu durumlarda tedavi farklılık arz eder[38].

İnflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisinde kullanılan ilaçlar özet halinde Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. İBH tedavisinde kullanılan ilaçlar[39]

Aminosalisilatlar (Sülfasalazin ve 5-ASA)	Azülfidin, Olsalazin, Asacol, Pentasa, Balsalazid
Kortikosteroidler	Hidrokortizon, Prednizon, Budesonid
İmmunomodulatör ajanlar	Azathioprine, 6-Merkaptopürin, Siklosporin A, Metotreksat, Anti- TNF-α antikor, IL-10, IL-11, IL-1 reseptör antagonisti, Anti-CD4 antikor
Antibiyotikler	Metronidazol, Siprofloksasin, Klaritromisin, Trimetoprim-Sülfametoksazol
Yeni potansiyel ilaçlar	Antioksidanlar & Serbest radikal yakalayıcıları (melatonin, vitamin C, vitamin E) Lökotrien inhibitörleri Kısa zincirli yağ asitleri (asetat, propiyonat, bütirat) Probiyotikler

2.8.1. İBH Tedavisinde Antioksidanlar & Serbest Radikal Yakalayıcıları

İBH'da ROM üretimindeki artış doğrudan veya dolaylı olarak mukozal doku hasarına neden olmaktadır. İBH'da ROM'nin ana kaynağı fagositik lökositlerdir. İnflamasyon boyunca bu hücreler büyük oranda intestinal mukozaya sızarlar ve fazla miktarda ROM salınmasına neden olurlar.

İntestinal mukoza endojen antioksidan koruma sistemlerine sahip olmasına rağmen, burada akciğer, karaciğer gibi diğer organlarla kıyaslandığında seviyeleri daha düşük miktardadır. Ayrıca inflamasyon süresinde bu sistemler zayıflayabilir ve mukoza oksidatif hasara açık hale gelir[40].

İBH'da tedavi yaklaşımları arasında oksidatif stresi önlemek amacıyla ROM üreten enzim inhibisyonu, ROM yakalayıcıların kullanılması veya hücresel antioksidan kapasitesinin artırılmasına yönelik yaklaşımlar yer almaktadır[41].

Kanada'da yapılan ve 126 İBH olan bireyi kapsayan bir çalışmada, sağlıklı bireylerle kıyaslandığında, İBH olan bireylerin; plazma vitamin E, vitamin A, vitamin B_6, vitamin B_{12} ve çinko düzeyleri ile hemoglobin ve ferritin değerleri anlamlı derecede düşük bulunmuştur. İBH'nın tedavisinde antioksidan desteğinin önem arz ettiği ifade edilmiştir[42].

İBH olan bireylerde intestinal epiteliyal hücrelerinden ve aktive olmuş inflamasyon hücrelerinden salınan ROM, dokuların sahip olduğu glutatyon, bakır ve kofaktörü çinko olan süperoksit dizmutaz gibi endojen antioksidanları çok çabuk tüketir. Dışardan antioksidan takviyesi olmaması durumunda oksidatif doku hasarı oluşmaya başlar. Oluşan hasar inflamasyon bölgesinde daha çok ROM oluşmasına neden olur ve antioksidan ihtiyacı daha da artar. Antioksidanların İBH tedavisine farklı bir bakış açısı getirebileceği düşünülmüştür[43].

Li ve ark.[44] dekstran sodyum sülfat (DSS) ile kolit oluşturulmuş farelerde vitamin E'nin antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerini araştırmıştır. Sıçanlara %0.03, %0.1 ve %0.3 vitamin E ile zenginleştirilmiş yem verilmiş ve kolit oluşumunun ardından, 8-hidroksi-deoksi guanozin (8-OHdG) ve prostaglandin E_2 düzeyleri ölçülmüş, inflamasyon indeksleri kontrol grubuyla kıyaslanmıştır. Çalışma sonucunda E vitamininin doza bağımlı olarak, ROM'lerinin oluşturduğu luminal oksidatif stresi ve buna bağlı olarak meydana gelen DNA hasarını anlamlı ölçüde azalttığı ve bu etkilerini antioksidan enzim ve proteinlerden bağımsız olarak kendi başına serbest radikalleri yakalayarak gerçekleştirdiği gösterilmiştir.

DSS ile kolit oluşturulmuş sıçanlar üzerinde yapılan bir diğer çalışmada, n-asetil sisteinin (NAC) antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri araştırılmıştır. Sıçanlarda kolit oluşturulduktan sonra NAC içme suyuyla birlikte 150 mg/kg dozunda 45 gün boyunca deney hayvanlarına verilmiştir. Elde edilen veriler Tablo 4'de özet halinde verilmiştir.

Tablo 4. Kolit çalışmasında elde edilen kolonik MDA, NO ve GSH düzeyleri[45]

	Kontrol grubu (Ort±GA)	**Kolit grubu (Ort±GA)**	**Tedavi grubu (Ort±GA)**
MDA (nM/mgprotein)	0.22±0.02	1.91±0.13	0.35±0.01
NO (µM/mg protein)	10.4±0.1	21.3±0.8	12.29±0.9
GSH (µM/mg protein)	20.07±0.69	11.42±0.34	17.65±1.74

Çalışmada elde edilen veriler ışığında, uzun süreli NAC tedavisinin fagosit kaynaklı ROM'ni temizleyerek oksidatif stresi dengelediği, epiteliyal hiperplaziyi düzelterek İBH'nın tedavisinde yararlı olabileceği görülmüştür[45].

Brückner ve ark.[46] yaptığı bir çalışmada DSS ile kolit oluşturulan sıçanlarda, yeşil çay ekstresinin en kuvvetli antioksidan bileşiği olan epigallo kateşin 3-gallat'ın antioksidan etkisi araştırılmıştır. Hayvanlara 6.9 mg/kg dozunda verilmiştir. Lipit peroksidasyonunun son ürünü ve en önemli göstergesi olan malondialdehit (MDA), iltihaplı kolon dokusundaki nötrofil infiltrasyonunun belirteci olan miyeloperoksidaz (MPO) ve bağırsakta antioksidan olarak görev yapan enzimler olan süperoksit dizmutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeyleri araştırılmıştır. Antioksidan özellikteki bileşiğin lipit peroksidasyonunu ve nötrofil infiltrasyonunu azalttığı, tedavi edilmeyen kolit grubunda yüksek olan SOD ve GSH-Px düzeylerinin tedaviyle birlikte düştüğü görülmüştür. Antioksidan özellikteki bileşiklerin İBH tedavisinde önem arz ettiği belirtilmiştir.

2.9. Etkin Maddelerin Kolona Hedeflendirilmesinde Uygulanan Yöntemler

Kolona özgü ilaç taşıyıcı sistemler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir[47].

1. pH kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler
2. Zaman kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler
2.a. Membran sistemler
2.b. Şişen sistemler
2.c. Ozmotik sistemler
3. Mikrobiyal enzim kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler
3.a. Azo polimerlerin kullanıldığı sistemler
3.b. Glikozidik polimerlerin kullanıldığı sistemler
3.c. Ön-ilaçlar
4. Basınç kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler

Çalışmada kullanılan pektin kolondaki mikrobiyal enzimlerle parçalandığı için sadece bu konuda bilgi verilecektir.

2.9.1. Mikrobiyal Enzim Kontrollü İlaç Taşıyıcı Sistemler

İnce bağırsakta ve kolonda yaşayan bakteri sayısındaki çok büyük farka dayanarak geliştirilen sistemlerdir. Enzim kontrollü ilaç salınması, kolonda bulunan mikroorganizmaların ya bizzat kendisi veya ürettiği enzimler tarafından yürütülür. Mikroorganizmaların ürettikleri enzimler göz önüne alınarak; ön ilaçlar, hidrojeller, matriksler ve biyolojik yıkıma uğrayabilen kaplama maddeleri geliştirilmiştir[48].

Kolonik bakteriler tarafından üretilen enzimler, hidroliz (glikozidaz, sülfataz, amidaz, esteraz), redüksiyon (çifte bağlar, nitro grupları, azo grupları), dealkilasyon, deaminasyon, asetilasyon, dekarboksilasyon gibi metabolik reaksiyonları gerçekleştirebilir[49].

Bu sistemler, üst gastrointestinal kanaldan kolona geçince enzimatik hidroliz ile etkin maddenin taşıyıcı molekülden ayrılarak açığa çıkabileceği şekilde tasarlanmaktadır[50].

Polisakkaritler, monosakkaritlerden oluşmuş polimerlerdir. Sindirim enzimleri ve gastrik pH'ya dayanıklı oldukları için bütünlüklerini üst mide bağırsak kanalından geçerken korurlar. Kolona ulaştıkları zaman bakteriyel polisakkaridazlar yardımıyla biyolojik olarak yıkıma uğrarlar.

Doğal polimerler çok düşük toksisiteye sahip olmaları, biyolojik olarak yıkıma uğrayabilmeleri nedeni ile kolona ilaç taşıyıcı sistemler olarak kabul görmektedir.

Bu amaçla kullanılan bileşikler nişasta (amiloz), guar zamkı, pektin, kitozan, selüloz, inülin, kondriotin sülfat ve dekstran gibi polisakkaritlerdir[51] (Tablo 5).

Tablo 5. Kolona hedeflendirmede kullanılan polisakkaritler[51]

Polisakkarit	**Elde edildiği kaynak**	**Yapısını oluşturan birim**
Nişasta	Bitkisel	α-(1-4) bağlı D-glikoz
Selüloz	Bitkisel	β-(1-4) bağlı D-glikoz
Aljinik asit	Kahverengi algler	α-(1-4)-bağlı D-mannuronik asit, β-(1-4)-bağlı L-glukronik asit
Pektin	**Kuru narenciye kabuğu**	**α-(1,4) bağlı D-galaktouronik asit**
Hyaluronik asit	Hayvansal	β-(1-3)-bağlıN-asetil-D-glukozamin, D-galaktouronik asit
Dekstran	Mikrobiyal (Leuconostoc mesenteroides türü)	α-(1-6) bağlı D-glikoz
Guar zamkı	Bitkisel	β-(1-4)-bağlı D-mannoz ünitelerine bağlı α-(1-6) D-galaktoz
İnülin	Bitkisel	β-(2-1)-fruktozil bağlı D-fruktoz

İlaçların kolona hedeflendirilmesinde polisakkaritler tek başlarına kullanılabileceği gibi pektin-HPMC, aljinat-kitozan, kitozan-HPMC, etil selüloz-nişasta, kitozan-pektin ve guar zamkı-aljinat kombinasyonları şeklinde de kullanılabilir[51].

Acartürk ve Celkan[52] 'ın galaktomannan yapısında bir polisakkarit olan guar zamkı üzerinde yaptıkları bir çalışmada, teofilin model ilaç olarak seçilmiştir. 12 farklı tip guar zamkı örneğinin viskozite ve partikül büyüklüğü farklılıklarının etkin madde salımı üzerine etkisi incelenmiştir. Guar zamkı örneklerinin pseudoplastik akış gösterdikleri ve partikül boyutunun büyümesiyle viskozitenin düştüğü görülmüştür. Polimer ile doğrudan basım yöntemiyle matriks tablet formülasyonları hazırlanmıştır. Bu tabletler sürekli akış hücresine yerleştirilerek pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8 ve pH 7.4 ortamlarında salım profilleri incelenmiştir. Tüm guar zamkı örneklerinin teofilin salımını geciktirdiği ancak içlerinden üçünün kolona hedeflendirilmede kullanılabileceği belirtilmiştir.

Tuğcu-Demiröz ve ark.[50] sodyum aljinat ve guar zamkı gibi doğal polimerleri kullanarak kolona hedeflenmiş ilaç şekilleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada, ondansetron model ilaç olarak seçilerek direkt baskı yöntemiyle matriks tabletler hazırlanmıştır. Sürekli akış hücrelerinde yapılan salım çalışması sonuçlarına göre formülasyonda kullanılan polimerin viskozitesi arttıkça etkin madde salımının azaldığı görülmüştür. Yapılan çalışmanın sonucunda kolona hedeflendirilmiş matriks tabletlerin irrite bağırsak sendromunda visseral hassasiyeti azaltabilecek ve motor aktiviteyi inhibe edebilecek umut verici bir sistem olduğu belirtilmiştir.

Tuğcu-Demiröz ve ark.[53] yaptığı bir diğer çalışmada guar zamkı ile kolona hedeflendirilmiş 5-ASA tabletleri hazırlanmıştır. Gerçekleştirilen sintigrafik incelemeler ışığında oral yoldan verilen tabletlerin 24 saatin sonunda, 8 sağlıklı gönüllünün hepsinde kolona ulaştığı gözlenmiştir. Guar zamkının, kalın bağırsaktaki bakterilerle

enzimatik parçalanmasına bağlı olarak, bu polimerin kolona hedefleme çalışmalarında uygun bir polimer olduğu kanısına varılmıştır.

Yapılan bir diğer çalışmada yara iyileştirici özelliği bilinen sodyum aljinat kullanılarak antioksidan özellikteki MEL'in, kolona özgü jel formülasyonları geliştirilmiştir. İn vitro kontroller sonucunda elde edilen en iyi jel formülasyonun, inflamatuvar bağırsak hastalığındaki oksidatif stres üzerine etkisi, asetik asit ile kolit oluşturulmuş sıçanlarda kolonik MDA, NO_X ve GSH düzeyleri ölçülerek değerlendirilmiştir[54].

İnsülin içeren enterik kaplı kitozan kapsülleri kullanılarak, insülinin kolondan emilimi incelenmiştir. İnsülinin ince bağırsaktan emilimi, insülin içeren kitozan kapsülleri sıçanlara oral yoldan uygulandıktan sonra sıçanlardaki insülin plazma düzeyi ve oluşturduğu hipoglisemik etki ölçülerek bulunmuştur. Mide ve ince bağırsak ortamında ilaç salımı gözlenmezken, sıçan çekum içeriği varlığında ilaç salımının anlamlı ölçüde arttığı görülmüştür. Hipoglisemik etkinin, 8 saat sonra, hazırlanan formülasyon kolona girince başladığı görülmüştür[55].

Doğal yapıdaki polimerlerden bir diğeri nişastadır. Amiloz, nişastanın en büyük kısmıdır. Uygun koşullar altında jelleşerek film oluşturabilir. Oluşan filmin yapısı, pankreatik α-amilaza dayanıklı fakat kolon bakterileri tarafından üretilen amilazca yıkıma uğratılabilir. Mide ve ince bağırsak koşullarının taklit edildiği ortamlara pepsin ve pankreatin eklenerek yapılan in vitro deneylerde amiloz filminin şişme özelliğini en iyi etil selülozun (Ethocel®) kontrol ettiği bulunmuştur. Bu sistemde, 5-ASA salımı incelenmiş ve ilaç salımının feçes bakteri karışımıyla inkübe edildiği zaman gerçekleştiği görülmüştür[56].

Kullanılan bir diğer doğal polimer inülindir. İnülin GİS'in üst bölgelerinde gerçekleşen hidroliz ve sindirime karşı dayanıklıdır. Kolondaki bakteriler tarafından yıkıma uğratılabilir. Bu nedenle, inülin, Eudragit® RS filmi içerisinde süspande edilerek, kolonda bölgesel olarak yıkıma

uğrayabilen bir kaplama olarak kullanılabilir. Bakterilerin bu film kaplamayı yıkmaları üzerinde, kullanılan inülin miktarının ve inkübasyon süresinin etkili olduğu bulunmuştur[57].

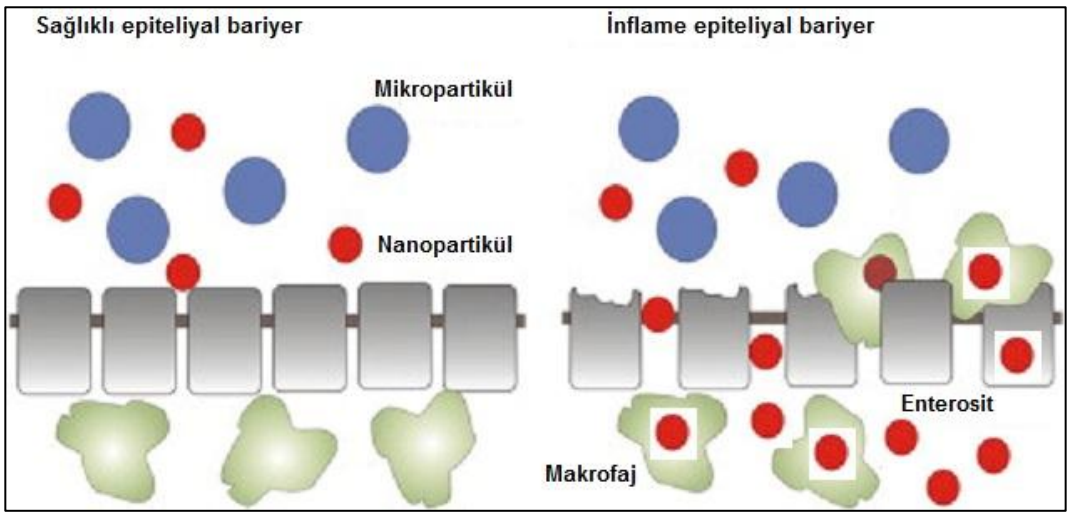
Kaplama materyali olarak kondroitin sülfat kullanılan bir çalışmada indometazin içeren matriks tabletleri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu tabletlerden indometazin salımı fosfat tamponu içinde sıçan çekum içeriği varlığında ve yokluğunda incelenmiştir. Sonuçta indometazin salımının sıçan çekum içeriğinin bulunduğu ortamda gerçekleştiği sonucuna varılmıştır[58].

2.10. Kolona Özgü Nanopartiküler Sistemler

İlaçların farmakolojik etkilerinin optimizasyonuna yönelik yaklaşımlardan biri, etki bölgesine spesifik, hedeflendirilmiş ilaç salımı sağlayan ilaç taşıyıcı partiküler sistemlerin kullanılmasıdır[59].

Kolona hedeflendirilmiş nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin İBH tedavisindeki yerleri açısından yapılan araştırmalar, etkin maddelerin hedef kolonik dokudaki antiinflamatuvar etkinliklerinin arttığını, doku ve hücre dağılım profillerinin de optimum seviyeye ulaştığını göstermektedir[60].

Nanopartiküller, submikron partikül büyüklükleri ile kapiler damarlar aracılığıyla derin kolonik dokulara geçebilmekte, epitel dokuya kolayca penetre olup hücre içine alınabilmektedir. Ayrıca nanopartikül hazırlanmasında kullanılan polimer karakteristiklerinin değiştirilmesiyle istenilen hedef dokuda optimum terapötik etkinlik sağlanabilmektedir[60] (Şekil 5).



Şekil 5. Nanopartiküllerin sağlıklı ve inflame kolonik dokudaki dağılımı[60]

Nanopartiküller, İBH'da inflamasyon hücrelerinin artmış olan aktiviteleri nedeniyle kolonik dokularda yüksek birikim gösterebilirler. Büyüklüğü 4 μm'nin altında olan partiküller makrofajlar tarafından fagosite edilir. Dolayısıyla nanopartiküller, büyük partiküllere göre çok daha uzun süre inflamasyon bölgesinde kalır[61].

TNBS ile kolit oluşturulmuş sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, oral yoldan verilen floresans özellik gösteren, boyutu 0.1 μm'nin altındaki polistiren nanopartiküllerin inflame kolonik dokuda sağlıklı kontrol grubuna göre 6.5 kat daha fazla biriktiği görülmüştür. Partiküller verildikten sonra %15'inin kolonik dokuda biriktiği, kolonik dokudaki partiküllerin işlemden 1 gün sonra %9.1'e 3. gün sonunda %3.4'e ve 5. gün sonunda %1.9'a düştüğü görülmüştür. Hazırlamada kullanılan polimerlerin mukoadezif karakterinden bağımsız olarak, nanopartiküller inflame kolonik dokuya daha fazla tutunurlar. 0.1 μm, 1 μm ve 10 μm boyutundaki partiküllerin kolonik inflamasyon bölgesine sırasıyla; %39, %31 ve %13 oranında yapıştığını göstermektedir[62]. Bu çalışmalar İBH'da antiinflamatuvar ve antioksidan etki gösteren ilaçların nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ile verilmesi halinde daha iyi etkinlik sağlayacağını göstermiştir.

Lamprecht ve ark.[63] tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada İBH'nın tedavisi için takrolimus içeren PLGA nanopartikülleri hazırlanmış ve hem hazırlanan nanopartiküler hem de saf takrolimus çözeltisi kolit oluşturulmuş sıçanlara oral yolla 10 gün boyunca uygulanmıştır. Son gün gerçekleştirilen uygulamadan sonra sıçanların kolonları çıkarılarak kolon/vücut indeksi tayin edilmiştir. Yapılan tayinler sonucunda inflamasyonlu dokuya nanopartiküllerin selektif şekilde adhezyonlarının gerçekleştiği ve saf takrolimusa oranla nanopartiküllerin inflamasyonlu doku içine etkin maddenin selektif penetrasyonunu artırdıkları belirlenmiştir.

Ülseratif kolit tedavisine yönelik olarak Makhlof ve ark.[64] tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada floresanlı bir madde olan kumarin-6 yüklü PLGA:Eudragit S 100 nanopartikülleri ve Eudragit S 100 mikroküreleri hazırlanmış ve terapötik etkinlikleri kolit oluşturulmuş sıçanlar üzerinde oral yolla uygulanarak incelenmiştir. İn vivo çalışmalar sonucunda mikrokürelere oranla nanopartiküllerin kolonda çok daha yüksek düzeyde bulundukları ve floresan madde açısından çok daha düşük bir sistemik etki gözlendiği belirlenmiştir. Gerçekleştirilen konfokal lazer görüntüleme deneyleri sonucunda nanopartiküllerin ülserli ve inflamasyonlu kolon dokusuna çok güçlü ve spesifik bir şekilde adhere olduğu gözlenmiştir.

Lamprecht ve Pertuit[65] 'in yaptıkları bir diğer çalışmada 5-ASA yüklü poli(ε-kaprolakton) nanopartikülleri hazırlanarak TNBS ile kolit oluşturulmuş sıçanlarda partiküllerin lipit peroksidasyonu üzerine olan etkisi incelenmiştir. Kolit oluşturulduktan 24 saat sonra sıçanlara oral yoldan 0.5 mg/kg dozunda 5-ASA yüklü nanopartikül süspansiyonu, ilaç içermeyen nanopartikül süspansiyonu, 30 mg/kg ve 100 mg/kg dozunda 5-ASA içeren solüsyonlar verilerek kolonik dokunun MPO aktivitesi ölçülmüştür.

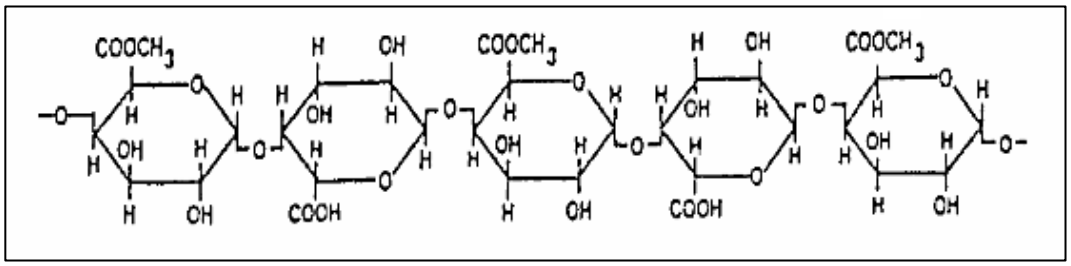
Nanopartiküllere 0.5 mg/kg dozunda yüklenen 5-ASA ile 30 mg/kg dozunda 5-ASA içeren solüsyonun kolonik MPO üzerindeki inhibe edici etkisi aynı bulunmuştur. Dolayısıyla İBH'da 5-ASA'nın nanopartiküllere yüklenerek verilmesi ilacın farmakolojik etki gösterdiği dozu çok daha aşağılara çekmiş (0.5 mg/kg) ve yan etki görülme olasılığını da neredeyse imkansız hale getirmiştir.

Kolon kanseri tedavisinde de nanometre boyutunda büyüklüğe sahip ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanıldığı görülmektedir:

Şengel-Türk ve Gönül[66] 'ün kolona hedeflendirme üzerine yaptıkları bir çalışmada, polimer olarak PLGA kullanılarak meloksikam yüklü nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Hazırlanan formülasyonlardan en uygun nanopartiküller belirlenmiş ve fizikokimyasal özelliklerini geliştirebilmek ve farklı özelliklere sahip yeni nanopartiküller hazırlayabilmek için yüzey modifikasyonuna gidilmiştir. Yüzey modifikasyon ajanı olarak PEG 2000 kullanılmıştır. Nanopartiküler hücre kültürü deneylerine taşınarak antineoplastik aktivitesi değerlendirilmiştir. Meloksikam yüklü nanopartiküllerin %15 - %58 seviyesinde değişen oranlarda kanser hücreleri üzerinde antineoplastik etki gösterdikleri belirlenmiştir.

Dutta ve Sahu[67] 'nun iyonotropik jelasyon yöntemiyle oksaliplatin içeren manyetik özellikli, kolona hedeflendirilmiş pektin nanopartiküllerini hazırladıkları bir çalışmada, partiküllerin kolon kanseri üzerine olan etkisi incelenmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında boyutları 100 ile 200 nm arasında olan nanopartiküllerin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi aynı dozdaki serbest ilaca göre 10 kat daha fazla bulunmuştur.

2.11. Pektin Hakkında Genel Bilgiler



Şekil 6. Pektinin fizikokimyasal yapısı[98]

Grekçe katılaşmak anlamına gelen pektin, karasal bitkilerin odunsu olmayan kısımlarında yer alan, çoğunluğunu galaktouronik asit moleküllerinin (%84) oluşturduğu bir heteropolisakkarittir. Pektin selülozla birlikte hücrelerin ve dokuların birbirine bağlanmasını sağlayarak bitkilerin fiziksel dayanıklılığını, direncini artırır[68].

Pektin, metanolle kısmi olarak esterleşmiş, α-(1-4) bağlı, D-poligalaktronik asit birimlerinden oluşmuş, doğrusal bir polimerdir (Şekil 6). Ayrıca pektinde, D-galaktoz, L-arabinoz, L-ramnoz poliholozitleri bulunur[69].

Besinlerle birlikte alınan selülozu ve pektini memeli hayvanların gastrointestinal sistemlerinde yer alan enzimler parçalayamaz. Kalın bağırsakta yaşayan anaerob bakteriler sahip oldukları pektinolitik enzimlerle pektini yıkarlar[70].

Pektin elde etmek için elma, limon, portakal gibi narenciye meyveleri ufalanır ve sıkıldıktan sonra kalan kısım kullanılır. Ekstraksiyon seyreltik asitlerle ısıtmak suretiyle yapılır. Böylece pektin, pektik asit haline geçer ve suda daha kolay çözünür. Pektin etanolle çöktürülür veya çözelti vakumda yoğunlaştırıldıktan sonra püskürtülerek kurutulur[71].

2.11.1. Pektin Türevleri

Bitkilerde işlenmemiş halde bulunan, sıcak su veya seyreltik asit ile ekstrakte edilebilen maddelere protopektin denir.

Hiçbir karboksil grubu esterleşmemiş veya ihmal edilebilir oranda metil ester grupları içeren poligalaktouronik asitlere pektik asit**,** bunların alkali metallerle yaptığı tuzlara ise pektat denir.

Karboksil grupları değişik oranlarda metil grupları ile esterleşen poligalaktouronik asitlere pektinik asit**,** bunların alkali metallerle yaptığı tuzlara pektinat denir[72].

2.11.2. Esterifikasyon Derecesi

Pektin zincirinde yer alan metil esteri yapmış galaktouronik asit gruplarının tüm galaktouronik asit gruplarına oranına esterifikasyon derecesi (DE^o) denilmektedir.

Pektinler DE^o 'ya göre yüksek metoksilli pektin (HMP) ve düşük metoksilli pektin (LMP) olmak üzere ikiye ayrılırlar.

HMP'lerde pektin zincirini oluşturan galaktouronik asit moleküllerinin %50'den fazlası metil esteri şeklindeyken, LMP'lerde galaktouronik asit birimlerinin %50'den fazlası serbest şekilde bulunmaktadır.

DE^o, pektinin hangi sıcaklık ve pH'da jel oluşturacağına, oluşturduğu jelin elastik ya da kırılgan oluşuna, jelin oluştuğu ortamda yer alan katyonlardan (Ca^{+2}) etkilenip etkilenmeyeceğine, jelin oluşma süresine ve jelin stabilitesine etki eder[73].

2.11.3. Pektinin Fizikokimyasal Özellikleri

Pektin, ince veya kaba görünüşlü, kokusuz, müsilajımsı lezzette, sarımsı beyaz renkte bir tozdur. Molekül ağırlığı 100.000-250.000 arasında değişir. 20 kısım suda çözünerek, kolloidal, negatif yüklü, viskoz ve opak bir çözelti oluşturur. Turnusol kağıdına karşı asit reaksiyondadır. Alkol, seyreltik alkol veya diğer organik çözücülerde çözünmez.

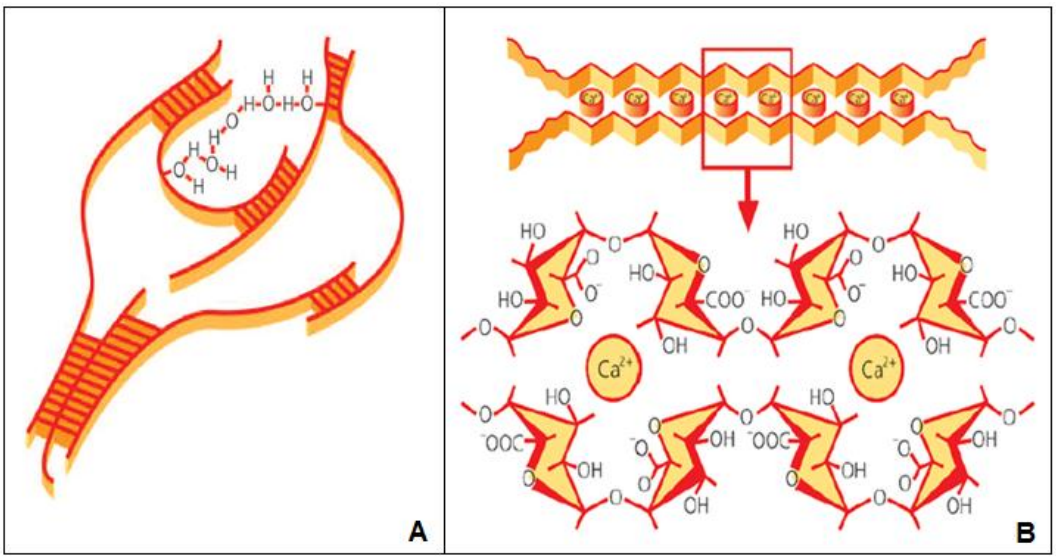
Pektin, suda %5 çözünerek viskoz bir jel oluşturur. Pektin zayıf anyonik bir polielektrolittir. Elektrik yüklü olduğu için, diğer elektrik yüklü maddelerle etkileşebilir[74].

2.11.4. Pektinin Jelleşme Özellikleri

Pektin türleri jel oluşturabilme özelliklerine göre farklılık gösterir. Jelleşme yeteneği moleküldeki galakturonik asit miktarına, esterifikasyon derecesine, pH'ya ve sıcaklığa bağlı olarak değişir.

HMP'lerde karboksil gruplarının yarıdan fazlası metil esteri şeklindedir. Diğer karboksil gruplarının iyonlaşmasını engellemek için ortama asit (H^+) ilave edilmelidir. İyonlaşamayan serbest karboksil gruplarıyla komşu hidroksil grupları arasında hidrojen bağları oluşur. Ortama ilave edilen şeker ise pektinle ıslanmak için yarışarak pektinin suyla ıslanmasını yavaşlatır ve hidrojen bağı oluşan yerlerde öbeklenmesini sağlar (Şekil 7A).

LMP'lerde karboksil gruplarının yarıdan fazlası serbest şekildedir. Ortamda iyonlaşarak negatif yüklü hale gelir. Ortamda bulunan divalen (Ca^{+2}, Mg^{+2}, Zn^{+2}…) metal iyonlarla elektrostatik çekim sonucunda yaklaşır ve moleküler arası iyonik bağlar oluşur[75]. İyonotropik jelasyonun temeli bu esasa dayanır (Şekil 7B).



Şekil 7. HMP'lerde (A) ve LMP'lerde (B) jelleşme mekanizması[75]

2.11.5. Pektinin Farmakolojik Etkisi

Beyaz tavşanlar üzerinde yapılan incelemelerde, hiçbir toksik ve iritan etkisi görülmemiştir[76].

Pektin GI kanalda yer alan fazla suyu yapısına çekerek gaitanın hacmini ve viskozitesini artırdığından bebek ve çocuklara 4 g/kg dozunda verilerek antidiyareik olarak kullanılır[77].

Toksinlerin ve kurşun, civa gibi +2 değerlikli ağır metallerin sindirim sisteminden uzaklaştırılmasında aktif rol oynar. Bağırsak mukozasında koruyucu bir tabaka oluşturur[78].

Ondört gün boyunca günde en az altı gram alınması taurokolik asit transportunu %50 oranında azaltır dolayısıyla bağırsaklardan kolesterolün absorpsiyonunu azaltır böylece kan kolesterol seviyeleri %13 oranında azalır[79].

2.11.6. Pektinin Farmasötik Teknolojide Kullanılışı

Mide ve ince bağırsak ortamlarındaki asit ve sindirim enzimlerine karşı dayanıklı olması ve kolonda bulunan bakteriyal enzimler tarafından parçalanabilmesi nedeniyle oral yoldan kolona ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu özelliği nedeniyle, etkin maddelerin kolonda lokal ve sistemik etki göstermesini sağlar[80].

Farklı pektin türleri, ilaçların kolona hedeflendirilmesinde;

- Etkin maddelerle değişik oranlarda karıştırılarak doğrudan basım metoduyla oluşturulan matriks tipi tabletler şeklinde,
- Çekirdek tabletlerin basınç uygulanarak pektinle kaplanması metoduyla oluşturulan çok katlı tabletler şeklinde,
- Çeşitli selüloz türevleriyle karıştırılarak tabletlerin GİS sıvılarla ıslanılabilirliğinin optimize edildiği tablet kaplama materyali olarak,
- Kolona hedeflendirilmiş kapsüllerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Ayrıca etkin maddelerin biyoyararlanımını artırabilmek, ilaçları kolona hedeflendirebilmek ve ilaçların biyolojik membranlardan geçişini artırabilmek amacıyla;

- İyonotopik jelasyon
- Y/S emülsiyonu çözücü buharlaştırma yöntemleriyle ilaç taşıyıcı partiküler sistemleri hazırlanmıştır.

Pektinin etkin maddelerle değişik oranlarda karıştırılıp doğrudan basım metoduyla oluşturulan, kolona hedeflendirilmiş matriks tipi tabletler hazırlanmıştır.

Yapılan bir çalışmada, pektinin sudaki çözünürlüğünü azaltmak için suda çözünmeyen kalsiyum tuzu olan kalsiyum pektinat (CaP) kullanılarak matriks tabletler hazırlanmıştır. İndometazin içeren CaP'la hazırlanan matriks tabletlerin biyolojik yıkımı Pectinex 3XL®, sıçan

çekal içeriği ve Bacterioides ovatus içeren ortamda incelenmiştir. CaP-indometazin matriks tabletlerinden indometazin salımı, Pectinex 3XL®, B. ovatus ve sıçan çekal içeriği olan ortamlarda, olmayanlara (kontrol) oranla daha hızlı gerçekleşmiştir[81].

İnsülin, suda çözünen model ilaç olarak kullanılarak, kalsiyum pektinat ile baskıyla kaplanmıştır. İnsülin içeren baskıyla kaplı kalsiyum pektinat tabletlerinin, köpeklere oral yoldan uygulandığı zaman, kalın bağırsağa kadar ilaç salımını geciktirdikleri bulunmuştur. 6 saat boyunca (ortalama mide ve ince bağırsak geçiş süresi) ilaç salımı görülmemiştir[82].

Katyonik bir polisakkarit olan kitozan ile anyonik bir polisakkarit olan pektinin fiziksel karışımlarını çeşitli oranlarda kullanarak, doğrudan basma metoduyla klorpromazin içeren matriks tabletler hazırlanmıştır. Tabletlerde polimer oranı arttıkça ilaç salımının azaldığı bulunmuştur. İlaç salımının, polimerin jel oluşturma özelliğine ve ilaç-polimer etkileşmesine bağlı olduğu görülmüştür[83].

Hazırlanan çekirdek tabletlerin basınç uygulanarak pektinle kaplanması ile kolona hedeflendirilmiş tabletleri de hazırlanmaktadır.

Türkoğlu ve ark.[84] yaptıkları bir çalışmada yaş granülasyon yöntemiyle hazırlanmış nisin içeren çekirdek tabletler, farklı oranlarda karıştırılmış pektin/HPMC polimer karışımı ile basınç uygulanarak kaplanmıştır. Kaplı tabletlerden ilaç salımı üzerine, pektin/HPMC polimer oranının etkili olduğu saptanmıştır. Hazırlanan tabletlerden nisin salımının ortama ilave edilen pektinaz aktivitesinden ve miktarından etkilendiği görülmüştür. Bu nedenle polipeptid yapısında olan nisin'in pektin/HPMC polimer karışımı ile basınçla kaplanmasının, nisin'in peptit yapısının bozulmadan kolona ulaştırılmasında son derece uygun olduğu saptanmıştır.

Türkoğlu ve Uğurlu[85], 5-ASA içeren baskı ile kaplı pektin/HPMC sistemlerini kolona taşıyıcı sistem olarak incelemişlerdir. pH 1.2 ve 6.8'de pektinolitik enzim varlığında yapılan dissolüsyon/erozyon çalışmaları sonucu pektinin yalnız başına çekirdek tabletleri kolona ulaşıncaya kadar koruyamadığı bunun için yüksek viskoziteye sahip HPMC ilavesinin gerekli olduğu sonucuna varmışlardır. Bu sistemle kolona ilaç taşınması için optimum olarak %20 HPMC konsantrasyonu gerektiğini bildirmişlerdir.

Uğurlu ve ark.[86] İBH tedavisinde yararlı olabileceğini düşündükleri peptit yapısındaki metalotransferaz enzim inhibitörü, glisil-l-histidil-l-lisin–Cu(II) (GHK–Cu^{+2})'yi kolona hedeflendirmeye çalışmışlardır. Öncelikle iyonotropik jelasyon yöntemiyle, pektin ve çinko (Zn^{+2}) kullanarak GHK–Cu^{+2} yüklü çinko pektinat mikropartiküllerini oluşturmuşlardır. Oluşturulan mikropartiküllerden yüklenen etkin maddenin %80'ini 4 saatte salan formülasyon seçilerek, hidrofobik bir polimer olan hidroksi propil selülozla (HPC) baskı ile kaplanmış ve tablet haline getirilmiştir. Oluşturulan bu kaplı tabletlerden pH 6.8 fosfat tamponunda yapılan salım çalışmaları sonucunda ilk 6 saatte herhangi bir ilaç salımı gözlenmemiştir. Bu yöntemle peptit yapısındaki GHK–Cu^{+2} kolona başarıyla taşınmıştır.

Baskı ile kaplı pektin/HPMC matriks sistemlerinin kolona taşıyıcı sistem olarak incelendiği sintigrafik bir çalışmada altı sağlıklı gönüllü kullanılmıştır. Tabletler içeriğini, gönüllülerin üçünde çıkan kolonda, kalan üçünde ise transvers kolonda salmıştır. GI kanaldan kolona geçiş sırasında pektin/HPMC matriks sistemlerinin çekirdek tableti koruduğu, tablet kolona ulaştığı zaman ise bakteriyel enzimatik aktivite sayesinde yıkıma uğrayarak ilacı saldığı bulunmuştur. Yapılan in vivo sintigrafik çalışmaların in vitro sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür[87].

Kolona hedeflendirilmiş ilaç şekillerinin hazırlanmasında pektin doğrudan kaplama materyali olarak da kullanılmaktadır.

Ekstrüksiyon–sferonizasyon yöntemiyle içinde teofilin, kalsiyum asetat ve mikrokristalize selüloz içeren pelletler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu pelletler, yüzeylerarası kompleks oluşumu yöntemi ile kalsiyum pektinat ile kaplanmıştır. Kaplanmış çekirdeklerden teofilin salımı hızlı olmuş ve salımın, zamanın karekökü ile doğru orantılı olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmada, kaplama kalınlığının çekirdek tabletlerden ilacın salımı üzerindeki en önemli faktör olduğu bulunmuştur. Kaplama kalınlığı optimum seviyeye getirilerek ilaçların kolona hedeflendirilmesinde kullanılabileceği belirtilmiştir[88].

Pektin ve etilselüloz karışımının sulu fazda disperse edilip film kaplama materyali olarak kullanıldığı bir çalışmada parasetamol model ilaç olarak seçilmiştir. Filmle kaplı çekirdek tabletlerin çözünme hızı profilleri sürekli akış hücresinde incelenmiştir. Kolondaki bakteri florasını taklit etmek için pektinolitik enzim kullanılmıştır. Yapılan çözünme hızı deneyleri sonunda etkin madde salımının, film kaplama içindeki etil selüloz- pektin oranına bağlı olarak değiştiği, etil selüloz miktarı ve kaplama ağırlığı arttıkça etkin madde salımının azaldığı bulunmuştur. Ayrıca çözünme hızı ortamına pektinolitik enzim eklenmesi ile ilaç salımının arttığı görülmüştür[89].

Pektin kullanılarak kolona hedeflendirilmiş kapsüller hazırlanmıştır.

Krögel ve Bodmeier[90], kapsül şeklinde kolona hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler üzerinde çalışmalar yapmıştır. Kapsül tıpasını oluşturmak için, farklı oranlarda pektin ve pektinolitik enzim karışımı doğrudan basma yöntemiyle tablet şeklinde basılmıştır. Çalışmada kullanılan kapsülün alt kısmı su geçirmez olup, kapsül tıpası GİS enzimlerinden etkilenmez. Tıpada yer alan pektinolitik enzim aktif hale gelerek tıpayı eritir ve kapsül bağırsak hareketlerine bağlı olarak nereye

ulaştıysa, kapsül içeriği orada serbestleşir ve etkin madde farmakolojik etkisini gösterir. Kapsül içeriğinin kolona hedeflendirilmesi için kapsül tıpasında yer alan pektin:enzim oranı 9.9:0.1 seçilmelidir. Böylelikle kapsül içeriğinde yer alan etkin madde hedeflenen bağırsak ortamında salınarak diğer bölgelerin ilaca maruz kalması engellenir.

Kolona hedeflendirilmiş pektin içeren partiküler sistemlerin hazırlanmasında iyonotopik jelasyon yöntemi kullanılmaktadır.

Etkin madde içeren pektin çözeltisi $CaCl_2$ (divalen metal) çözeltisine damlatılarak katyonik özellikte bir etkin madde olan atenolol ve anyonik özellikte bir etkin madde olan piroksikam içeren pektin jel boncukları hazırlanmıştır. Bu çalışmada, iyonotropik jelleşme yöntemiyle boncuklarda yüksek miktarda etkin madde tutulduğu görülmüştür[80].

Önder[91] iyonotropik jelasyon yöntemiyle pektin boncukları hazırlamış, boncuk hazırlanmasına ve boncukların özelliklerine etki eden faktörleri incelemiştir. Boncukların hazırlanmasında biri suda çözünen (propranolol) diğeri suda çözünmeyen (ketoprofen) iki farklı etkin madde kullanılmıştır. Yapılan in vitro salım çalışmalarında pH 7.4 fosfat tampon çözeltisinde çinko pektinat boncuklarından salımın, 0.1 N HCl tamponundaki etkin madde salımından hızlı bulunmuştur. Sonuç olarak iyonotropik jelleşme yöntemiyle hem suda çözünen hem de suda çözünmeyen ilaçlarla uygun özelliklerde pektin boncukların hazırlanabileceği görülmüştür.

İyonotropik jelasyon yöntemiyle resveratrol yüklenmiş pektin mikropartikülleri üzerinde yapılan bir diğer çalışmada ise, divalen metal konsantrasyonunun, çapraz bağlanma solüsyon pH'sının, çapraz bağlanma süresinin, pektin konsantrasyonunun ve pektin, etkin madde oranının, enkapsülasyon etkinliği, etkin madde salım hızı ve partikül büyüklüğü üzerine etkileri incelenmiş ve en ideal formülasyonun in vivo koşulları taklit eden ortamda etkin madde salım hızı araştırılmıştır.

İyonotropik jelasyon yöntemiyle hazırlanan mikropartiküllerin ilaçların kolona hedeflendirilmesinde uygun taşıyıcı sistem olduğuna karar verilmiştir[92].

Sığır serum albümini (BSA) yüklü kalsiyum pektinat jel boncukları, iyonotropik jelleşme yöntemiyle hazırlanmıştır. Boncuklardan BSA salım testleri in vivo koşullara uygun olarak yapılmıştır. Ortamda pektinolitik enzim bulunmasının boncuklardan BSA salımı üzerinde etkili olduğu, boncuklardan BSA salımının beş saat geciktiği ve beşinci saatten sonra ortama pektinolitik enzim eklenmesi ile boncuklardan BSA salımının arttığı görülmüştür. Bu çalışmada protein yapısındaki ilaçların kolona hedeflendirilmesinde iyonotropik jelleşme yönteminin kullanılabileceği belirtilmiştir[93].

İnsülin yüklenmiş kalsiyum pektinat nanopartikülleri üzerinde yapılan bir diğer iyonotropik jelasyon çalışmasında ise birbirinden farklı DE^{o} 'lerine sahip iki pektinin, formulasyon pH'sının ve pektin molekül ağırlığının, enkapsülasyon etkinliği, etkin madde salım hızı ve partikül büyüklüğü üzerine olan etkileri araştırılmıştır. LMP'in Ca^{+2} gibi divalen katyonlarla daha stabil jel oluşturduğu görülmüştür[94].

Pektin içeren ilaç taşıyıcı partiküler sistemlerin hazırlanmasında Y/S emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi de kullanılmaktadır.

Burapapadh ve ark.[95] suda çözünürlüğü çok düşük bir ilaç olan itrakonazolün biyoyararlanımını artırabilmek amacıyla pektin kullanarak Y/S emülsiyonu solvan buharlaştırma yöntemiyle itrakonazol yüklü, büyüklüğü 100 nm olan nanopartiküller oluşturmuşlardır. Uygulamadan 24 saat önce aç bırakılan sıçanlara (200 gram ağırlığındaki Wistar) 3 mg/mL dozunda itrakonazol süspansiyonu ve 15 mg/kg dozunda itrakonazol yüklü nanopartikül süspansiyonu oral yoldan verilmiştir. İtrakonazol süspansiyonu sıçanlarda 36.55 ± 35.25 C_{max} (ng/mL) değeri

sağlarken, nanopartikül süspansiyonu 93.61 ± 69.34 C_{max} (ng/mL) değeri oluşturmuştur. İtrakonazolün pektin nanopartiküllerine yüklenmesiyle biyoyararlanımının başarılı bir şekilde artırılabildiği belirtilmiştir.

Oküler tedaviye yönelik hazırlanan preparatlarda da pektin kullanılarak nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir.

Glokom hastalarında intraoküler basıncı düşürmek amacıyla kullanılan timolol maleatın biyoyararlanımını artırabilmek için korneadan geçişinin arttırılması kararlaştırılmıştır. Bunun için iyonotropik jelasyon yöntemiyle pektin nanopartikülleri hazırlanmıştır. Laboratuvar ortamında keçi korneası kullanılarak, söz konusu yöntemle oluşturulan 200 nm boyutundaki nanopartiküllerin geçişi ile %0.9'luk NaCl içerisinde süspande edilen ilacın geçişi karşılaştırılmıştır. Nanapartikül formülasyonu serbest ilaca göre dört kat daha fazla miktarda korneaya geçmiştir. Timolol maleatın biyoyararlanımı başarılı bir şekilde arttırılmıştır[96].

2.12. Melatonin (MEL)

2.12.1. Tanımı ve Biyosentezi

MEL, epifiz bezinden salgılanan, birçok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur. Kimyasal adı N-asetil-5-metoksitriptamin'dir. Sentezi aydınlık-karanlık siklusuna göre kontrol edilmektedir. Karanlıkta MEL sentezi stimüle edildiğinden yatmadan önce serum MEL seviyesi en yüksek değerdedir.

MEL, ruhsal durum, uyku, üreme ile ilgili değişimler, immünolojik fonksiyonlar ve sirkadien ritmin biyolojik modülatörüdür[97].

2.12.2. Fizyolojik ve Farmakolojik Özellikleri

İnsanlarda MEL sekresyonu, karanlıkla beraber artmaya başlar. Serum MEL konsantrasyonu gece yarısında (saat 2-4 arasında) en

yüksek seviyeye ulaşır ve gecenin ikinci yarısından itibaren düşmeye başlar[98].

Serum MEL konsantrasyonu yaşa bağlı olarak farklılık gösterebilir. 3 aylık olana dek bebeklerde melatonin salımı çok azdır. Daha büyük bebeklerde salımı artar ve sirkadien (24 saatlik) özellik kazanır. 1-3 yaşları arasında nokturnal (gece) maksimum konsantrasyona ulaşır (325 pg/mL) ve daha sonra azalmaya başlar. Normal genç yetişkinlerde gündüz ve gece değerleri sırasıyla 10 pg/mL ve 60 pg/mL'dir[99].

MEL üretildikten sonra hızlı bir biçimde pasif difuzyonla kan dolaşımına katılır. Beyin omurilik sıvısı dahil olmak üzere tüm biyolojik sıvılara ve dokulara dağılır. Karaciğerde hidroksilaz enzimi ile son metaboliti olan 6-hidroksi melatonin sülfata (6-OH MEL) dönüştürülerek idrar yolu ile atılır; 6-OH MEL'in idrardaki konsantrasyonu, serum MEL konsantrasyonu ile paralellik gösterir. Oral uygulanan MEL, insanda yaklaşık olarak 60. dakikada pik plazma düzeyine ulaşır. Eliminasyon yarılanma ömrü 3 ile 45 dakika arasında farklılık gösterir. Oral uygulama ile çok yüksek oranda ilk geçiş etkisine maruz kalır[100].

Yapılan çalışmalarda MEL'nin akut stres, viral hastalıklar veya ilaç tedavisi gibi nedenlerle ortaya çıkan immün cevabı artırdığı ve immün yetmezliği düzelttiği gösterilmiştir[101]. MEL'in nitrik oksit üretimini inhibe ettiğinden deneysel gram-negatif septik şokta terapotik etkisinin olabileceği gösterilmiştir[102].

Hipnotik etkileri ile uyku düzenleyici rolu bildirilmiştir. Sirkadien ritmi kontrol eder. Depresyon gibi ruhsal bozukluklarda ruh hali üzerinde olumlu etkileri vardır[103].

Antiproliferatif, immün cevabı artırıcı ve serbest radikal yakalayıcı özelliğiyle kanser hücreleri üzerinde etkilidir. T-helper hücrelerinden IL üretimini artırarak immün cevabı artırıcı özelliği vardır[104].

Serbest radikal yakalayıcı ve koruyucu özelliği ile hücre ölümünü azaltarak yaşlanmayı geciktirici etkisinin olduğu bildirilmiştir[105].

2.12.3. Etki Mekanizması

2.12.3.1. Melatonin reseptörleri ve etki mekanizması:

MEL, suya göre lipid çözünürlüğünün çok daha yüksek olması nedeniyle hücrelere rahatça girebilmektedir. Bu nedenle etkileri sadece hücre membrana bağlanmaya yönelik değildir. MEL için nukleusta spesifik bağlanma noktalarının olduğu gösterilmiştir. Bu bulgulara göre MEL etkilerinin nukleustaki moleküler olaylarla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür[106].

2.12.3.2. Serbest Radikal Yakalayıcı Özelliği

MEL, toksisitesi yüksek olan hidroksil ve peroksil radikallerinin güçlü bir süpürücüsüdür. MEL'in antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkisinin reseptör aracılı olmadığı ve bu etkilerin fizyolojik konsantrasyonların üzerinde oluştuğu bildirilmektedir[107].

$OH^{\bullet}$ radikalini nötralize edici etkisi glutatyondan 5 kat ve $ROO^{\cdot}$ inaktivasyonunda ise E vitamininden 2 kat daha fazla etkilidir. Ayrıca inflamasyon reaksiyonları sırasında makrofajların aktivasyonu ile oluşan ve toksik bir oksijen türevi olan H_2O_2'e karşı da süpürücü etki göstermektedir.

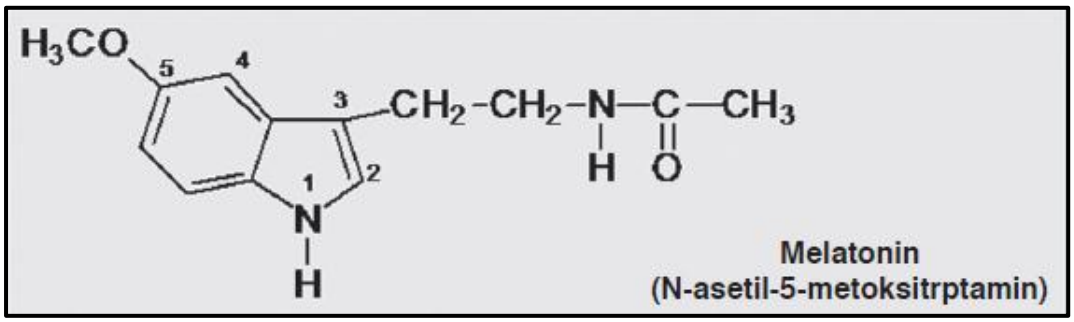
MEL'in H_2O_2 ile reaksiyonu sonucu N^1-asetil-N^2-formil-5-metoksi kinuramin (AFMK) oluştuğu, AFMK nın ise katalazla N^1-asetil-5-metoksi kinuramine dönüştürüldüğü ve antioksidan etkiye sahip bu metabolitlerin MEL'in süpürücü etkisini artırdığı bildirilmiştir[108].

İnflamasyonun uyarılmasıyla doku hasarı oluşturan mekanizmaların çeşitli basamaklarını MEL bloke ederek, antiiflamatuvar ve doku koruyucu etki sağlamaktadır[109].

2.12.4. Fizikokimyasal Özellikleri

2.12.4.1. MEL'in Kimyasal Yapısı

MEL'in kapalı formülü $C_{13}H_{16}N_2O_2$'dir (Şekil 8). Beyazımsı toz olup, molekül ağırlığı 232.278 g/mol'dur[110]. Erime derecesi 116-118^oC'dir[111].



Şekil 8. MEL'in fizikokimyasal yapısı[110]

2.12.4.2. MEL'in Çözünürlüğü

Bechgaard ve ark.[112] nazal uygulama için geliştirdikleri MEL formülasyonunda, MEL'in sudaki düşük çözünürlüğü nedeniyle formülasyonda %40 oranında PEG 300 kullanmışlardır. Bu çalışmada MEL'in suda çözünürlüğü 2 mg/mL olarak bildirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada MEL, sahip olduğu düşük çözünürlük ve yüksek permeabilite (sudaki permeabilite sabiti, $Kp=7.20\pm1.43x10^{-4}$) özellikleri nedeniyle BCS (Biopharmaceutics Classification System) sınıflandırma sistemine göre Class II grubunda olabilecek bir ilaçtır[113].

MEL'in intravenöz (IV) uygulanabilmesi için geliştirilen bir formülasyon çalışmasında sudaki çözünürlüğü düşük (37^{o}C'de 2.4 mg/ml), zayıf bazik (pKa =12.7), çözeltilerinin ışığa duyarlı ve oksidasyona açık olduğu bulunmuştur. Optimum bir IV formülasyon için çözünürlüğün 2-hidroksipropil-β-siklodekstrin ve propilen glikol kullanılarak artırılması gerektiği vurgulanmıştır[114].

MEL'in transdermal yolla salımı için geliştirilen bir formülasyonda yapılan çözünürlük çalışmalarında elde edilen verilere göre, sudaki ve etanoldeki çözünürlükleri sırasıyla (ORT±SS) 3.17±0.06 ve 156.87±23.86 mg/mL bulunmuştur[115].

MEL'in propilen glikol (PG) ve 2-hidroksipropil-ß-siklodekstrin (2-HPßCD)'deki çözünürlüklerinin değerlendirildiği bir çalışmada ise su, (pH 1.2) gastrik sıvı ve (pH 7.4) intestinal sıvıda pH'dan bağımsız olarak çözünürlüğünün düşük olduğu bulunmuştur[116].

2.12.4.3. MEL'in UV/VIS Spektrumu

Yapılan spektrofotometre çalışmalarında MEL'in 250-350 nm dalga boyu aralığında absorbans gösterdiği ve maksimum absorbans verdiği dalga boyunun (λ_{max}) 278 nm olduğu gösterilmiştir[117].

2.12.4.4. MEL'in Stabilitesi

0.14 mg/mL konsantrasyonunda MEL içeren farklı solüsyonların UVA ve UVB ışınlarına maruz bırakılarak fotodegredasyonunun incelendiği bir çalışmada, pH 4.0 fosfat tamponu, pH 7.4 fosfat tamponu–metanol (85:15) karışımı ve pH 9.0 fosfat tamponu kullanılmıştır. Fotodegredasyon sonucunda 6-hidroksi melatonin ve N^1-asetil-N^2-formil-5-metoksi kinuraminin oluştuğu NMR yöntemiyle tespit edilmiştir. Meydana gelen bu bileşiklerin vücutta endojen olarak meydana gelen, toksik olmayan ve antioksidan karakterli maddeler olduğu görülmüştür[118].

MEL ile gerçekleştirilen bir stabilite çalışmasında 0.1 mg/mL konsantrasyonunda MEL içeren pH 7.4 fosfat tamponu hazırlanarak, 400 W gücündeki UV lambaya iki saat süreyle maruz bırakılmıştır. Yapılan analizlerde ilk 20 dakikanın sonunda MEL'in %20'sinin, 120 dakikanın sonunda ise MEL'in tamamının bozunduğu görülmüştür[119].

Bir başka çalışmada ise MEL'in değişik tampon çözeltilerindeki stabilitesi incelenmiştir. Bu çalışmalarda MEL'in birinci derece kinetikle bozunduğu ortaya konmuştur. pH 1.4 HCl-NaCl tamponu gibi kuvvetli asidik ortamlardaki bozunması pH 4-10 aralığındaki bozunmasından son derece hızlıdır[116].

10 mg/mL konsantrasyonunda MEL içeren bir oral solüsyon (gliserin, etanol, tutti-frutti aroması) ile 3 mg dozunda MEL içeren jelatin kapsüller (Methocel®, laktoz anhidrat) üzerinde bir stabilite çalışması yapılmıştır. Oral solüsyon 4^{o}C ve 25^{o}C'de, kapsüller ise 25^{o}C, %60 bağıl nem ve 40^{o}C, %75 bağıl nem koşullarında, renkli cam şişeler içerisinde tutulmuştur. Her bir farmasötik ürün için altı farklı seri üzerinde çalışılarak 1., 7., 14., 28., 60. ve 90. günlerde HPLC ile miktar tayini yapılmıştır. İki farmasötik ürünün de 90'ıncı günün sonunda başlangıçtaki MEL miktarının %98'ini içerdiği ve stabilitelerinin bozulmadığı gözlemlenmiştir. Oral solüsyonun kokusunda, tadında, pH'sında ve renginde herhangi bir değişiklik olmadığı ve bakteriyel üremeye rastlanmadığı belirtilmiştir[120].

pH 1.2-12 aralığında, 25^{o}C ve 37^{o}C'de MEL'in stabilitesinin değerlendirildiği bir diğer çalışmada, pH değerleri 1.2, 2.0, 4.0, 7.4, 10.0 ve 12.0 olan fosfat tamponu içinde MEL çözeltileri hazırlanmıştır. Örnekler ilk bir hafta boyunca her gün ayrıca 14. gün ve 21. günlerde analiz edilmiştir. HPLC ile yapılan miktar tayini çalışmalarında MEL çözeltileri 25^{o}C ve 37^{o}C'de ilk iki gün stabil bulunmuştur. Ayrıca 21. gün sonunda başlangıçtaki MEL miktarının %30'u bozunmaya uğramıştır. Bu bulgular MEL'in vücut sıcaklığında ve geniş bir pH aralığında stabil olduğunu göstermiştir[121].

2.12.5. MEL'in Antioksidan Özelliği:

MEL'in antioksidan özelliği üç ana başlık altında toplanabilir:

1. MEL'in Doğrudan Antioksidan Etkisi

2. MEL'in Prooksidan Enzim Aracılı Etkisi

3. MEL'in Antioksidan Enzim Aracılı Etkisi

2.12.5.1. MEL'in Doğrudan Antioksidan Etkisi:

Serbest radikal yakalayıcısı özelliği ile MEL, H_2O_2, $OH^{\cdot}$, peroksi nitrit anyonu, $O_2^{\cdot}$ ve peroksil radikallerini temizleyebilmektedir. MEL'in antioksidan mekanizması diğer antioksidanlardan farklıdır. Çünkü klasik antioksidanlar elektron vererek bir redoks tepkimeyle etki gösterir; oksidasyonu önlemekle beraber aynı zamanda bunun ilerlemesine neden olmaktadır. Ancak MEL serbest radikallerle idrar ile atılabilen özellikte stabil bileşikler meydana getirmektedir. N^1-asetil-N^2-formil-5-metoksi-kinuramin (AFMK), N^1-asetil-metoksi-kinuramin (AMK) MEL'in metabolitleri olup, MEL gibi serbest radikal yakalama özelliğine sahiplerdir[122].

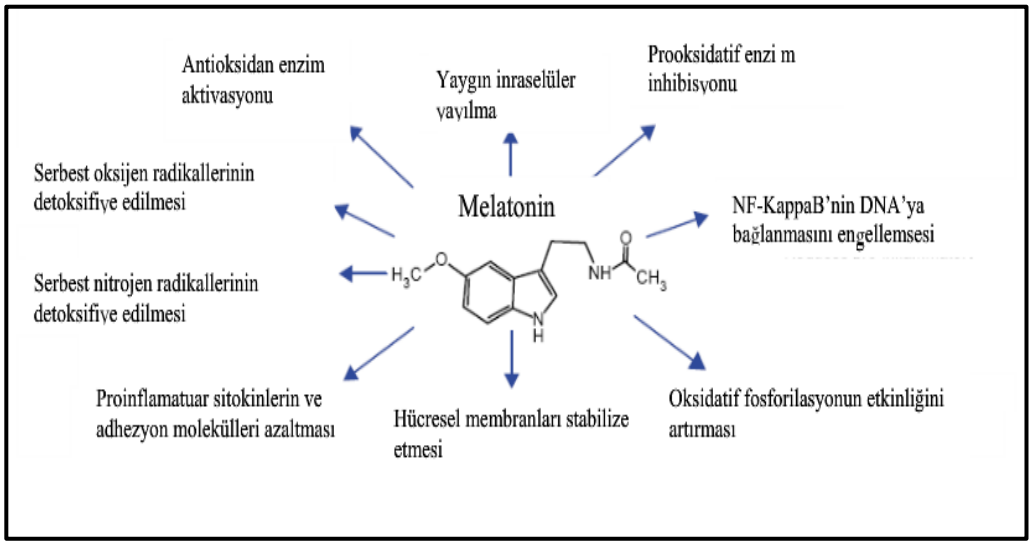
2.12.5.2. MEL'in Prooksidan Enzim Aracılı Etkisi:

MEL'in bazı prooksidan enzimleri inhibe ederek, serbest radikal oluşumunu azalttığı ve bu yolla da antioksidan sistemi desteklediği öne sürülmektedir. In vitro ve in vivo şartlarda, $NO^{\bullet}$ ve daha ileri aşamada $ONOO^{-}$ oluşumuna neden olan nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesinin, fizyolojik melatonin konsantrasyonunda inhibe edildiği bildirilmektedir[123].

2.12.5.3. MEL'in Antioksidan Enzim Aracılı Etkisi:

MEL, antioksidan enzimlerin yazılımı veya aktivitesini indükleyerek dolaylı olarak etki göstermektedir. Yapılan çalışmalarda MEL'in, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon

redüktaz gibi antioksidan enzimlerin sentezini veya aktivitesini artırmak yoluyla indüklediği gösterilmiştir[124].



Şekil 9. MEL'in antioksidan özelliklerinin özeti[124]

2.12.6. Deneysel Kolit Modellerinde MEL Kullanımı

Asetik asit, tri/di-nitro benzen sülfonik asidin intrakolonik uygulanması ile deneysel kolit oluşturulmuş sıçanlarda MEL'in etkisi incelenmiştir[125].

Cevik ve ark.[126] MEL'in spesifik-reseptör bağımlı ve reseptörlerden bağımsız olarak gösterdiği antioksidan ve antiinflamatuvar etkisini araştırmışlardır. Sıçanlara eksojen, herhangi bir MEL formülasyonu verilmeden 15 gün boyunca 24 saat sürekli karanlıkta tutularak pineal bezden salgılanan MEL konsantrasyonunun artması sağlanmıştır. Diğer hayvan grubu ise 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık siklus ortamında tutulmuştur. Sıçanlara kolit oluşturulmasından 30 dakika önce, kolit oluşumundan 6 saat ve 18 saat sonra 0.25 mg/kg Luzindole (MT_1 ve MT_2 spesifik reseptör antagonisti) intraperitoneal yoldan verilerek MEL'in reseptörlerden bağımsız, serbest radikal süpürücü, doğrudan antioksidan etkisi araştırılmıştır. Kolit oluşumundan 24 saat sonra sıçanlar sakrifiye

edilerek kolonik MDA değerleri ölçülmüş, makroskopik ve mikroskobik skorları karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Cevik ve ark.[126] araştırmalarında elde ettiği bulgular.

	Kontrol Grubu	24 saat karanlık Grubu	12 saat karanlık 12 saat aydınlık Grubu	24 saat karanlık + Luzindole® Grubu
Makroskopik Skor (ORT±SS)	0.06±0.06	1.5±0.2	4.9±0.4	4.0±0.6
Mikroskopik Skor (ORT±SS)	---	8.0±1.8	11.3±0.6	10.0±2.0
MDA (nmol/g doku) (ORT±SS)	9.1±0.3	11.4±3.8	22.3±2.6	13.6±0.8

Onbeş gün boyunca 24 saat karanlıkta tutulan sıçanlarda pineal bezin stimülasyonu sonucunda MEL konsantrasyonunun artması sağlanmıştır. MEL reseptörlerden (MT_1 ve MT_2) bağımsız olarak, serbest radikal süpürücü etkisi ile lipid peroksidasyonunu azaltarak kolonik MDA seviyelerini düşürmüştür. Ayrıca reseptör bağımlı olarak antiinflamatuvar etki göstererek oksidatif stres sonucunda oluşan kolonik hasarı anlamlı derecede azaltmıştır.

Asetik asit ile kolit oluşturulan sıçanlar üzerinde yapılan bir diğer çalışmada ise deney hayvanları dört gruba ayrılmıştır. İki hayvan grubunda kolit oluşturulmuş diğer ikisinde ise kolit oluşturulmamıştır. Bu ayrılan iki grup ise MEL verilenler ile MEL verilmeyenler olmak üzere ikiye ayrılmıştır. MEL ile tedavi edilen sıçanlara üç gün boyunca, 100 mg/kg dozunda intraperitoneal yoldan MEL verilmiştir. Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra kolonik MPO, GSH, MDA ve SOD enzim düzeyleri ile proinflamatuvar sitokinler TNF-α, IL-6 ve IL-1β düzeyleri ölçülmüştür. Makroskopik ve mikroskobik skorları kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Asetik asit ile kolit oluşturulan sıçanlarda MEL'in etkisi[127].

	Kolit oluşturulmayan grup		Kolit oluşturulan grup	
	%0.9 NaCl	**MEL**	**%0.9 NaCl**	**MEL**
Makro. skor	0	0	5.7±0.45	2.6±1.1
Mikro. skor	0.1±0.32	0.1±0.22	8.5±1.34	4.2±1.25
GSH (µmol/mg)	2.2±1.2	2.9±1.1	0.3±0.9	2.2±1.4
SOD (U/mg)	9.7±2.5	8.5±3.6	3.4±2.9	9.6±5.1

Sıçanlarda kolit oluşturulmasıyla birlikte kolonik antioksidanların (GSH) tükendiği, MEL'in ise bu durumu tersine çevirdiği görülmüştür. MEL, antioksidan bir enzim olan SOD'nin düzeylerini arttırmıştır. %0.9 NaCl grubu ile kıyaslandığında kolonik makroskopik ve mikroskobik skorların, kolonik MDA, MPO düzeylerinin ve proinflamatuvar sitokinlerin anlamlı bir şekilde düşmesini sağlamıştır. MEL, sahip olduğu doğrudan (serbest radikal süpürücü) ve dolaylı (antioksidan enzimlerin düzeylerini artırıcı) antioksidan etkileri ve ayrıca antiinflamatuvar etkisiyle, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan koliti tedavi etmede başarılı bulunmuştur[127].

TNBS ile kolit oluşturulan sıçanlarda farklı dozlarda (2.5, 5.0 ve 10 mg/kg), intrakolonik olarak verilen MEL'in kolonik dokudaki lipit peroksidasyonu ve polimorfo nükleer lökosit akümülasyonu üzerine etkisi in vivo olarak değerlendirilmiştir. Tedavi sonunda kolonik dokulardaki MDA ve MPO seviyeleri ölçülmüş ve kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. MEL'in TNBS ile indüklenen kolitte doza bağımlı olarak, lipit peroksidasyonunu inhibe ederek, nötrofil infiltrasyonunun neden olduğu kolonik mukoza hasarını azalttığı görülmüştür[128].

TNBS ile kolit indüklenmiş sıçanlarda kolon hasarına MEL'in etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada sıçanlar, kolit oluşturulduktan sonra serum fizyolojik içinde hazırlanan farklı dozlardaki MEL çözeltisi ile tedavi edilmiştir. Gruplarda kolonik mukoza hasar indeksi (KMHİ), histolojik skor (HS) ve NO aktivitesi değerlendirilmiştir. Sonuçlar 100 mg/kg dozunda 5-ASA ile elde edilen sonuçlar ile kıyaslanmıştır. Doku hasarı ve inflamasyon göstergesi olan KMHİ, HS parametreleri, kolitli modelde kontrol grubu ile kıyaslandığında yüksek bulunmuştur. 2.5, 5.0 ve 10.0 mg MEL ile bu parametrelerde azalma meydana gelmiştir. MEL, kolonik inflamasyon artışını ve mukozal doku hasarını önlemiştir. MEL ayrıca kolitli modelde yüksek seviyelere çıkan NO seviyelerinde de anlamlı azalma meydana getirmiştir. Sonuçlar MEL'in kolonik hasarı 5-ASA ile benzer derecede önlediğini göstermiştir. Sonuçlar Tablo 8'de özetlenmiştir[129].

Tablo 8. TNBS ve etanol ile kolit oluşturulmuş modelde 2.5, 5.0 ve 10.0 mg/kg melatonin ve 100 mg/kg 5-ASA'nın NO, KMHİ ve HS üzerine etkileri[129]

Grup	Doz (mg/kg)	NO (µmol/g)	Kolonik mukoza hasar indeksi (KMHİ)	Histolojik skor (HS)
Kontrol	-	0,29±0,07	0.0±0.0	0.7±1.2
Kolit model	-	0,53±0,07	3.1±1.1	9.7±0.5
5-ASA	100	0,38±0,02	1.7±0.5	5±3
Melatonin	2.5	0,40±0,04	2.3±0.5	4±3
	5.0	0,38±0,03	1.7±0.8	3.2±0.9
	10.0	0,34±0,02	1.8±0.9	2.1±0.8

TNBS ile kolit indüklenmiş sıçanlarda yapılan bir diğer çalışmada ise deney hayvanları dört gruba ayrılmıştır. 1. grupta TNBS ile kolit oluşturulmuştur. 2. grupta kolit oluşturulduktan sonra 15 gün boyunca intraperitoneal 10 mg/kg dozunda MEL verilmiştir. 3. gruba sadece 15 gün boyunca intraperitonal 10 mg/kg dozunda MEL verilmiştir. 4. gruba ise sadece %0.9 NaCl verilmiştir. TNBS ile kolit oluşturulan grupta kolonik nükleer faktör kappa-β (NF-kβ) gen ekspresyonu, kaspas-3 aktivitesi, MDA ve MPO düzeyleri oldukça yüksek; GSH düzeyi ise çok düşük bulunmuştur. Kolit grubunun MEL ile tedavi edilmesiyle birlikte kolonik GSH düzeyleri yükselmiş; NF-kB, kaspas-3, MDA ve MPO aktiviteleri düşmüştür. Elde edilen sonuçlar, MEL'in sahip olduğu antiinflamatuvar, antioksidan ve antiapopitotik etkilerle TNBS ile indüklenmiş oksidatif stresin neden olduğu mukozal doku hasarını azalttığını göstermiştir[130].

2.12.7. MEL İle Yapılan Klinik Çalışmalar

Chen ve ark.[131] 112 ÜK'li ve 110 sağlıklı gönüllü üzerinde bir klinik araştırma yapmışlardır. ÜK'li hastalarda oksidatif doku hasarına neden olduğu bilinen plazma homosistein (HS) düzeyleri, bağırsak dokusunda yer alan kuvvetli bir antioksidan olan plazma melatonin (MEL) düzeyleri, sağlıklı gönüllülerle karşılaştırılmıştır. MEL tayini için kan örnekleri sirkadiyen ritme uyabilmek amacıyla tüm bireylerden sabah 6'da alınmıştır. Çalışmada elde edilen analiz sonuçlarına göre, ÜK'li hastaların MEL düzeyleri anlamlı derecede düşük bulunmuştur. ÜK'li hastalara yapılacak MEL takviyesi, intestinal dokuların boşalan antioksidan kapasitesini artırarak ROM'nin oluşturduğu oksidatif doku hasarını azaltmada yararlı olabilir.

Onyedi bayan hasta üzerinde MEL'in İBH'daki etkisinin değerlendirildiği çift körlü ve plasebo kontrollü bir çalışma yapılmıştır. Hastalar iki gruba bölündükten sonra bir gruba oral yoldan 3 mg MEL içeren tablet, diğer gruba ise plasebo tablet 8 hafta süreyle her gün

verilmiştir. Hastalara, semptom şiddetlerinin skorunu, anksiyete-depresyon skorunu ve uyku bozuklukları skorunu hesaplamak için 3 farklı anket yapılmıştır. Hastalardan alınan tükrük örneklerinde HPLC ile MEL tayini yapılmış ve sonuçlar sağlıklı gönüllülerle kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlar ışığında tükrük MEL konsantrasyonu ile semptom şiddetleri skoru arasında anlamlı bir ters orantı olduğu görülmüştür. İBH semptom skorunda, MEL alımına bağlı olarak anlamlı bir iyileşme gözlenmiştir. Uyku bozukluğu skoru ve anksiyete-depresyon skorunda, tedavi sonrasında MEL ve plasebo ile elde edilen değişiklik benzer bulunmuştur. Plasebo ile kıyaslandığında MEL tedavisi ile abdominal şişlik, abdominal ağrı ve abdominal hassasiyette anlamlı bir iyileşme gözlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, MEL'in uyku düzenleyici ve anksiyolitik etkilerinden bağımsız olarak, İBH'da umut verici bir terapötik ajan olduğu belirtilmiştir[132].

Ülseratif kolitli hastalarda 5-ASA kullanımına ek olarak MEL'in kullanımının, hastalık semptomları üzerindeki etkisini öğrenebilmek için 60 hasta üzerinde bir klinik çalışma yapılmıştır. Hastalar iki gruba bölündükten sonra her iki gruba 2 x 1.0 g (12 saat arayla 1 g) 5-ASA ayrıca buna ek olarak birinci gruba 5 mg MEL içeren tablet, diğer gruba ise plasebo tablet yatmadan hemen önce verilmiş ve bu tedavi protokolüne 12 ay boyunca devam edilmiştir. Hastalara belirli zaman aralıklarında anket yapılarak hastalık aktivite skorları (HAS) belirlenmiştir. 3. ayın sonunda plazma CRP (C-reaktif protein) değerleri karşılaştırılmıştır. Tedavinin sonunda anketlerden elde edilen verilerin ortalaması alınarak gruplararasındaki farklar değerlendirilmiştir (Tablo 9).

Tablo 9. Ülseratif kolitli hastalarda 5-ASA ve MEL kullanımının etkisi[133]

	5-ASA + MEL Grubu (ORT±SS)	**5-ASA + Plasebo Grubu (ORT±SS)**
HAS (Tedavi Başlangıcı)	1.50±0.51	1.61±0.68
HAS (Tedavi Sonunda)	2.75±1.86	5.10±2.22
Plazma CRP (mg/dL)	4.17±2.10	13.13±6.08

5-ASA ile gerçekleştirilen kolit tedavisine MEL ilavesiyle plasebo grubuyla karşılaştırıldığında HAS'da ve inflamasyonun önemli belirteçlerinden biri olan plazma CRP düzeylerinde anlamlı bir düşüş görülmüştür. Standart kolit tedavisine MEL eklenmesinin hastaların yaşam kalitesini artırdığı ve hastalık semptomlarının gerilemesini sağladığı görülmüştür. MEL, sahip olduğu antiinflamatuvar etkiyle ülseratif kolitin aktif hale geçmesini engellemiştir[133].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Melatonin	Sigma, ABD
Pektin LM 104 AS-FS	CP Kelco
Pektin LM 101 AS	CP Kelco
Pektin Amid CU 020	Herbstreith&Fox
Pektin Amid CU 025	Herbstreith&Fox
Pektin Classic CU 701	Herbstreith&Fox
Pektin Classic CU 902	Herbstreith&Fox
Pektin Classic AU 701	Herbstreith&Fox
Sodyum hidroksit	Merck, ALMANYA
Sodyum dihidrojen fosfat	Merck, ALMANYA
Kalsiyum klorür	Merck, ALMANYA
Sodyum klorür	Merck, ALMANYA
Trikloroasetik asit	Sigma, ABD
Bütilhidroksi toluen	Sigma, ABD
Vanadyum (III) klorür	Merck, ALMANYA
Naftiletilendiamin dihidroklorür	Sigma, ABD
Hidroklorik asit	Merck, ALMANYA
Potasyum klorür	Merck, ALMANYA
Fosfat tamponu tuzu (PBS) (Na_2HPO4-NaH_2PO_4-NaCl)	Sigma-Aldrich, ALMANYA
Pectinex	Sigma, ABD
Trinitro benzen sülfonik asit	Sigma, ABD

3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Spektrofotometre	Shimadzu UV 1700, JAPONYA
Partikül Büyüklüğü Aleti	Sympatec Gmbh System Partikel Technik, ALMANYA
Partikül Büyüklüğü Aleti	Zetasizer-NanoZS-Malvern, ABD
Zeta potansiyeli ölçüm aleti	Zetasizer-NanoZS-Malvern, ABD
Fourier Transform Infrared Spek.	Jasco FT/IR-420, JAPONYA
Diferansiyel Taramalı Kalorimetre	Shimadzu, JAPONYA
USP Çözünme Hızı Aleti	Pharma Test Type PTW S 3 C
Biyoadezyon Ölçüm Cihazı	TA-XT Plus Texture Anlayser, İNGİLTERE
Atomik Güç Mikroskobu (AFM)	Nanomagnetics Inst., ABD
Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)	JEOL JSM-840 A, Japonya
Peristaltik Pompa	Master Flex, İSVİÇRE
Santrifüj	Shimadzu, JAPONYA
Diyaliz Membran (M.A<12000Da)	Sigma, ABD
TNF-α Elisa kit (sıçan)	eBioscience, ABD
IL-17 Elisa kit (sıçan)	eBioscience, ABD
IL-10 Elisa kit (sıçan)	eBioscience, ABD
Distile Su Ünitesi	Nuve marka, NS serisi, UK
Rotaevaporatör	Heidolph, ABD
Manyetik Karıştırıcı	Snijders, HOLLANDA
Mikroskop	Leica, JAPONYA
pH Metre	Schott CG 840, ALMANYA
Ultrasonik Banyo	Bransonic 221, ALMANYA
Termostatlı Isıtıcı	Heto DT Hetotherm, ALMANYA
Etüv	Heraeus, ALMANYA
İklim Dolabı	Sanyo MLR 350 H, JAPONYA
Öğütücü	Geratetechnik, Tip A70
Otomatik Pipetler	Eppendorf, ALMANYA

3.2. YÖNTEM

3.2.1. İN VİTRO ÇALIŞMALAR

3.2.1.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

3.2.1.1.1. Fosfat tamponları (USP XXXI)

I. **Monobazik Potasyum Fosfat – (0.2 M):** 27.22 g KH_2PO_4 suda çözülerek 1000 mL'ye tamamlanır.

II. **Sodyum Hidroksit çözeltisi – (0.2 M):** 8 g NaOH suda çözülerek 1000 mL'ye tamamlanır.

pH 7.4 fosfat tamponu hazırlanışı: I nolu çözeltiden 50 mL ve II nolu çözeltiden 39.1 mL karıştırılıp distile suyla 200 mL hacme tamamlanırsa pH 7.4 tampon çözeltisi hazırlanır.

pH 6.8 fosfat tamponu hazırlanışı: I nolu çözeltiden 50 mL ve II nolu çözeltiden 11.6 mL karıştırılıp distile suyla 200 mL hacme tamamlanırsa pH 6.8 tampon çözeltisi hazırlanır.

3.2.1.1.2. pH 1.2 HCl tamponu (USP XXXI)

I. **Potasyum klorür – (0.2 M):** 14.91 g potasyum klorür (KCl) suda çözülerek 1000 mL'ye tamamlanır.

II. **Hidroklorik asit – (0.2 M):** %37.5 a/h oranındaki stoktan 2 mL alınıp distile suyla 100 mL'ye tamamlanır.

pH 1.2 HCl tamponu hazırlanışı: I nolu çözeltiden 50 mL ve II nolu çözeltiden 85 mL karıştırılıp distile suyla 200 mL hacme tamamlanırsa pH 1.2 tampon çözeltisi hazırlanır.

3.2.1.2. Etkin Madde (MEL) Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

3.2.1.2.1. Partikül Büyüklüğü Analizi

Partikül büyüklüğünü belirlemek için Laser-Diffraction Particle Sizer aleti kullanıldı. Laser diffraction tekniği, partikül yüzeyine çarpan ışığın gösterdiği optik tepkilere dayanır. Bu tepkiler ışığın saçılımı ve absorbsiyonudur. Difraksiyon (dağılım), saçılım ve absorbsiyondan sonra ışığın geriye kalan kesridir.

Bu yöntemde katı örnekler (MEL) hava akımında kuru halde (toz) disperse edilip çok elemanlı fotodedektörle ışığın dağılımı ve yoğunluğu ölçülerek, ışığın saçılım ve absorbsiyondan sonra geriye kalan kesri hesaplandı ve bilgisayar yazılımıyla değerlendirildi.

3.2.1.2.2. IR Spektrumu

Yaklaşık 5 mg MEL hassas olarak tartılıp toz halinde (KBr ile disk şeklinde basılmadan), FT-IR (Fourier Transform Infrared) spektrumu alınarak hangi absorbsiyon bandında pik verdiği incelendi.

3.2.1.2.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizi ve Etkin Maddenin Erime Noktası Tayini

MEL'in tek başına DSC (Diferansiyel tarama kalorimetrisi) termogramı alındı. 2 mg etkin madde 0,1 mg duyarlılıkta hassas terazide tartılıp alüminyum örnek kabına alınarak basınç altında sıkıştırılmıştır. Alüminyum örnek kabı ısıtma hücresine konularak azot atmosferi altında 10°C/dak. hızında 400°C'ye kadar ısıtılıp DSC termogramı alındı.

MEL'in tek başına çekilen DSC termogramı, erime noktası tayininde kullanıldı. MEL'in endotermik pik verdiği noktanın literatürlerde bildirilen erime noktası ile uyumu değerlendirildi.

Çalışmada hazırlanan formülasyonlarda kullanılan pektinin (LM 104 AS-FS) MEL ile etkileşmelerinin ve bu etkileşmelerin kimyasal geçimsizliğe yol açıp açmadığının incelenmesinde de DSC analizlerinde elde edilen sonuçlar kullanıldı.

MEL'in ve pektinin 1:1 oranındaki toz karışımınlarının DSC termogramları alındı. Etkin madde (MEL) ve yardımcı maddenin (LM 104 AS-FS) 50 mg olacak şekilde toz karışımı hazırlandı. Daha sonra bu toz karışımdan 2 mg toz karışım hassas terazide tartıldıktan sonra alüminyum örnek kabına alınarak basınç altında sıkıştırıldı. Alüminyum örnek kabı ısıtma hücresine konularak azot atmosferi altında 25°C-400°C arasında 10°C/dak. hızında ısıtılıp DSC termogramı alındı.

3.2.1.2.4. UV Spektrumu

MEL'in pH 1.2, 6.8 ve 7.4 tamponunda 50 µg/mL derişiminde stok çözeltileri hazırlandı. 200-800 nm arasında 1 cm lik kuvartz küvetler kullanılarak, köre karşı spektrumu alındı ve maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyu (λ_{max}) değeri saptandı. Literatürlerde bildirilen λ_{max} ile karşılaştırıldı.

3.2.1.2.5. Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Standart Doğrunun Hazırlanması

MEL'in in vitro salım deneylerinde ve miktar tayininde kullanılan pH 1.2, 6.8 ve 7.4 tampon ortamlarında kalibrasyon doğruları ve denklemleri bulundu. Bunun için etkin maddenin 50 µg/mL derişimde hazırlanan stok çözeltisinden hareketle, artan derişimlerde (10-36 µg/mL arasında) 10 seyreltme yapılarak stok çözeltileri hazırlandı.

Daha önce belirlenen λ_{max}'da bu derişimlere karşılık gelen absorbans değerleri okundu. Her konsantrasyon üçer defa tekrarlandı, ortalama ve standart sapma değerleri hesaplandı. MEL derişimine karşı ortalama absorbans değerleri grafiklendi. Gerekli hesaplamalar yapılarak standart doğru denklemi bulundu.

3.2.1.2.6. Spektrofotometrik Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Analitik yöntemin validasyonu, bir analiz için yeni bir yöntem geliştirilmesi, bir analizin laboratuvarda ilk kez uygulanması, kullanılmakta olan yöntemde değişiklik yapılması, geçerliliği kanıtlanmış bir yöntemin başka bir laboratuvarda kullanılması veya uygulayan kişi veya kullanılan cihazda değişiklik olması, kalite kontrol testlerine göre yöntemin performansında zamanla bir değişme olması durumlarında yapılmalıdır.

Analitik yöntemin validasyonu, miktar tayininde kullanılacak pH 1.2, 6.8 ve 7.4 tampon ortamlarında yapıldı.

3.2.1.2.6.1. Doğrusallık

Miktar tayininde kullanılacak örnek içerisindeki etkin madde derişimi ile, söz konusu derişimde ölçülen absorbans değeri arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunun gösterilmesidir.

Kullandığımız metodun doğrusallığını göstermek üzere, MEL'in pH 1.2, 6.8 ve 7.4'de 50 µg/mL konsantrasyonda 3 adet farklı stok çözeltisi hazırlandı. Her stok çözeltiden 10 adet seyreltme yapılarak farklı konsantrasyonda çözeltiler elde edildi. Her konsantrasyon ve bu konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri en küçük kareler yöntemine göre değerlendirilip, standart doğru denklemi bulundu.

3.2.1.2.6.2. Doğruluk ve Geri Elde

Analiz yönteminin doğruluğu geri kazanım ile hesaplanır ve % bağıl standart sapma (% BSS) ile ifade edilir. Doğruluk, saptanan madde miktarının numune içerisindeki gerçek etkin madde miktarına yakınlığıdır. Miktar tayini yönteminin doğruluğu geri elde etme yüzdesine bağlıdır.

Etkin madde miktarının % 80, % 100, % 120'lik oranları olacak şekilde formülasyon hazırlandı ve MEL miktar tayini yapılan

koşullarda (pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4 tamponları) absorbansları ölçüldü. Bu absorbanslar, hesaplanan kalibrasyon denkleminde yerine konularak derişimler, yüzde geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri hesaplandı.

3.2.1.2.6.3. Kesinlik

Kullandığımız miktar tayini yönteminin aynı anda ve başka zamanlarda tekrar edilebilir olduğunun gösterilmesini sağlar. Standart sapma (SS) ve % bağıl standart sapma (% BSS) değerleri ile ifade edilir. Bulunan % BSS değeri %2' den küçük olmalıdır.

3.2.1.2.6.3.1. Deneyleriçi Tekrarlanabilirlik Çalışması

pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4'de hazırlanan MEL stok çözeltilerinden 20 µg/mL MEL içeren 10'ar farklı çözelti hazırlanıp, pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4'de 278 nm'de ard arda 3 farklı ölçüm yapıldı. Elde edilen absorbansların ortalamaları, ortalamaların standart sapması ve % BSS hesaplandı. Bağıl sapmanın %2'den küçük olması yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermektedir.

3.2.1.2.6.3.2. Deneylerarası Tekrarlanabilirlik Çalışması

Üç farklı pH'daki stok çözeltilerden 20 µg/mL MEL içeren 10'ar farklı çözelti hazırlanıp, ard arda 3 gün pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4'de 278 nm'de ard arda 3 farklı ölçüm yapıldı. Elde edilen absorbansların ortalamaları, ortalamaların standart sapması ve % BSS hesaplandı. % bağıl standart sapma % 2'den küçük olmalıdır.

3.2.1.2.6.4. Özgünlük, Seçicilik

Yöntemin seçiciliği; analiz yapılacak bileşeni örnekte varlığı tespit edilmiş ve bu bileşenle girişim yapabilecek diğer bileşenlerden farklı olarak ölçme yeteneğidir.

Spektrofotometrik miktar tayini yönteminin sadece analiz edilmesi istenen etkin maddeyi saptayabilmesi için, MEL dışındaki bileşenlerin 200-800 nm dalga boyları arası taranarak spektrumları alındı. 278 nm'de absorbans verip vermediği denetlendi.

3.2.1.2.6.5. Stabilite

Bu amaçla MEL'in üç farklı tamponda 50 µg/mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanıp, bunların stabilitesi incelendi.

MEL çözeltilerinin ışığa hassas olduğu bilindiği için, çözeltiler gün ışığına maruz bırakılarak absorbans değişikliği olup olmadığı tayin edildi.

MEL'in in vitro salım çalışmalarında, salım ortamı olarak kullanılacak olan pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4'de;

- Oda sıcaklığında gün ışığına maruz bırakılarak,
- Oda sıcaklığında gün ışığından korunarak,
- 37±1.0^{o}C'deki etüvde 24 saat süreyle bekletilerek,

belirli zaman aralıklarında numune alınarak absorbans değerlerinde bir değişiklik olup olmadığı incelenmiştir.

3.2.1.2.7. MEL'in pH 1.2, 6.8 ve 7.4 Tamponlarında Çözünürlüğünün Belirlenmesi

Formülasyonlardan MEL salım hızı deneylerinin pH 1.2, 6.8 ve 7.4'de yapılması öngörülmüştür. Bu ortamlarda sink koşulun sağlanıp sağlanmadığının saptanması amacıyla MEL'in pH 1.2, 6.8 ve 7.4'de çözünürlükleri tayin edildi.

Bunun için ortamda çözüneceği miktarın fazlası kadar MEL bulunan çözelti 37±1.0^{o}C'de termostatlı su banyosunda manyetik karıştırıcının üzerine 24 saat karıştırılarak bekletildi. Belirli zaman aralıklarında ucuna membran filtre (0.45 µm) ve bir filtre tutucu takılmış

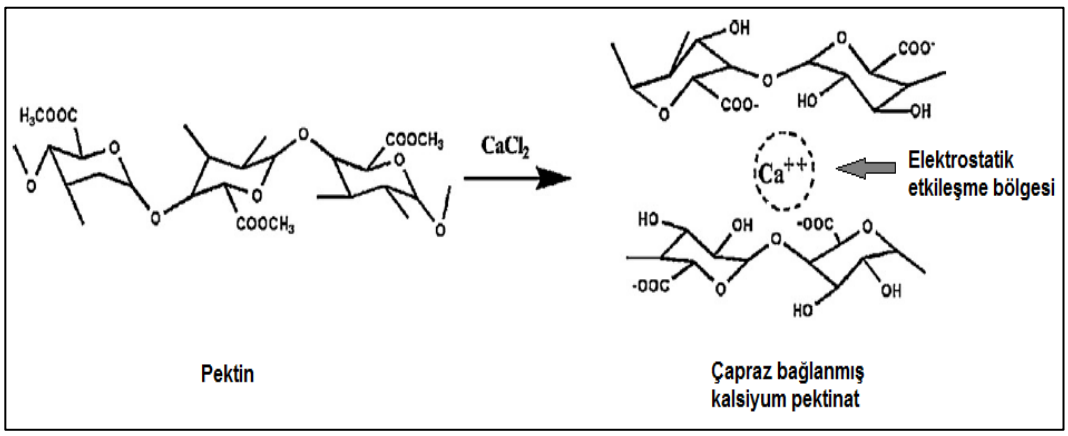
enjektör yardımı ile numuneler süzülerek alındı. Numune alma sırasında enjektör, filtre tutucu ve örnek kapları önceden 37^{o}C'ye kadar ısıtılarak kullanıldı. Alınan numunelerde uygun seyreltmeler yapılarak spektrofotometrik miktar tayini yapıldı ve çözünen MEL miktarı saptandı.

3.2.1.3. Önformülasyon Çalışmaları

Kullanılacak olan pektin tipini seçmek amacıyla önce tüm pektin örnekleri kullanılarak iyonotropik jelasyon yöntemiyle partiküler sistemler hazırlanmıştır.

3.2.1.3.1. İyonotropik Jelasyon

Bölüm 2.11.4.'de anlatıldığı gibi, düşük metoksilli pektinlerde (LMP), pektin molekülünün yapısında yer alan karboksil (-COOH) gruplarının yarıdan fazlası serbest şekilde bulunmaktadır. Dolayısıyla pektin molekülü ortamda iyonlaşarak negatif yüklü hale gelir. Ortamda bulunan pozitif yüklü divalen (Ca^{+2}) metal iyonlarıyla elektrostatik çekim sonucunda yaklaşır ve moleküler arası iyonik bağlar meydana gelir (Şekil 10). Pektin molekülü üç boyutlu düzlemde küresel bir hal alır. Ortamda disperse halde bulunan etkin madde bu küresel yapı içinde hapsedilir[134].



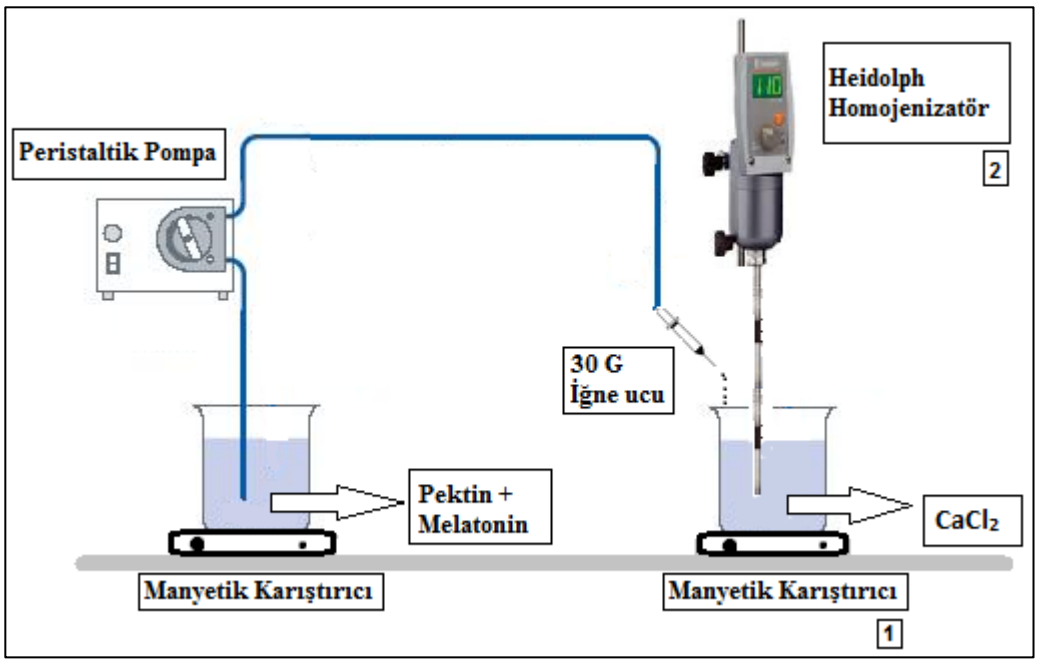
Şekil 10. İyonotropik jelasyonun temel mekanizması[134]

LMP'lerin sahip oldukları bu özellikten yararlanılarak, iyonotropik jelasyon yöntemiyle etkin maddelerin kolona hedeflendirilmesinde kullanılabilecek küresel mikropartiküller oluşturmak mümkündür.

Tez çalışmamız boyunca tüm formülasyon çalışmalarında, iyonotropik jelasyonun tüm basamaklarında, elektriksel direnci 18.2 MΩ olan deiyonize su kullanılmıştır. Böylece distile suda çözünmüş halde bulunan çeşitli divalen metal iyonlarının (Ca^{+2}, Zn^{+2}, Mg^{+2}, Fe^{+2}, Cu^{+2}, vb) pektin ile etkileşerek pektini jelleştirmesi ve formülasyon sonuçlarını etkilemesi engellenmiştir.

İyonotropik jelasyonda öncelikle belirli miktardaki pektinin deiyonize suda tamamen çözünmesi sağlanır. Daha sonra belirli miktar MEL, hazırlanan pektin çözeltisine eklenir ve ortam homojen hale gelene kadar karıştırılır. Ultrasonik banyo kullanılarak hava kabarcıkları ortamdan uzaklaştırılır. Belirli konsantrasyonlarda pektin ve MEL içeren bu dispersiyon ortamı manyetik karıştırıcıyla sabit hızda sürekli olarak karıştırılır.

Hazırlanan MEL ve pektin içeren dispersiyon ortamı peristaltik pompa sistemine bağlanır. Belirli ve sabit bir yükseklikten (5 cm), peristaltik pompa yardımıyla 1mL/dak hızında, ucunda 30 G iğne ucu bulunan enjektörden, içerisinde belirli miktar divalen metal iyonu ($CaCl_2$) bulunan ve sürekli sabit bir hızda karıştırılan (1) çapraz bağlanma ortamına damlatılır. Belirli bir süre bu ortamda tutularak çapraz bağlanmanın tamamlanması beklenir. Elde edilen partiküller ortamdan süzülerek ayrılır, distile suyla yıkanır ve oda sıcaklığında (25^{o} C) kurumaya bırakılır[134]. Tez çalışmamız için tasarlanan iyonotropik jelasyon düzeneği Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11. Tez çalışmamızda kullandığımız iyonotropik jelasyon düzeneği. (1) manyetik karıştırıcı, (2) Heidolph® homojenizatör

İyonotropik jelasyon yönteminde; formülasyonda kullanılacak olan pektin konsantrasyonu, divalen metal iyonu ($CaCl_2$) konsantrasyonu, çapraz bağlanma süresi, çapraz bağlanma ortamının karıştırılma hızı ve pektin:etkin madde (MEL) oranı formülasyon sonuçlarını ve mikropartiküllerin sahip olduğu fizikokimyasal özellikleri etkileyen en önemli parametrelerdir[134].

3.2.1.3.2. Formülasyonda Kullanılacak Pektin Tipine Karar Verilmesi

İyonotropik jelasyonla üretilen kalsiyum pektinat partiküllerinin sahip olduğu fizikokimyasal özellikleri optimum seviyede tutabilmek için CP Kelco® ve Herbstreith&Fox® pektin üreticilerinden sağlanan toplam yedi farklı pektin tipi üzerinde çalışılmıştır. Yedi farklı pektin tipinin formülasyonlarda gösterdiği performansa paralel olarak eleme yapılmış ve tek bir pektin tipi ile tez çalışmasının sürdürülmesine karar verilmiştir.

İçerisinden seçim yapılacak yedi farklı pektin tipinin sahip oldukları esterifikasyon (DE^o) ve amidifikasyon (DA^o) dereceleri ve üreticileri Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Yedi farklı pektin ve sahip oldukları DA^o, DE^o değerleri

Pektin kodu	**DE^o (%)**	**DA^o (%)**	**Üretici firma**
LM 104 AS-FS	28	20	CP Kelco
LM 101 AS	36	14	CP Kelco
Amid CU 020	29	21	Herbstreith&Fox
Amid CU 025	29	21	Herbstreith&Fox
Classic CU 701	38	-	Herbstreith&Fox
Classic CU 902	9.2	-	Herbstreith&Fox
Classic AU 701	41	-	Herbstreith&Fox

Çalışmada kullanılacak pektin tipine karar verebilmek için öncelikle makro boyutlarda çalışılmıştır. Formülasyon hazırlanırken (Şekil 11'de verilen) çapraz bağlanma ortamını karıştırmak için, tasarladığımız iyonotropik jelasyon düzeneğinde (1) ile gösterilen manyetik karıştırıcı kullanılmıştır.

Kullanılacak pektin tipine karar verilmesinde,

- Peristaltik pompa sistemini tıkayıp tıkamaması,
- Oluşturulan kalsiyum pektinat partiküllerinin büyüklüğü,
- MEL yükleme kapasitesi,

sonuçları değerlendirilmiştir.

Kullanılacak pektin tipine karar verebilmek için hazırlanan formülasyonlardaki parametreler ve değerleri Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Kullanılacak pektin tipine karar verebilmek için hazırlanan formülasyonda kullanılan formülasyon parametreleri ve değerleri

Parametre	**Değer**
Pektin konsantrasyonu	% 5 (a/h)
$CaCl_2$ konsantrasyonu	% 10 (a/h)
Çapraz bağlanma süresi	0.5 saat
Pektin:MEL oranı	1:1
Çapraz bağlanma ortamı karıştırma hızı	Manyetik karıştırıcı (100 rpm)

Önformülasyon çalışmalarının sonunda LM 104 AS-FS tipi pektin seçilerek çalışmalara devam edilmiştir.

3.2.1.4. Formülasyon Çalışmaları

3.2.1.4.1. İyonotropik Jelasyon Yöntemiyle Nanoboyuta İnilmesi

Kun ve ark.[94] pektin ve insülin kullanarak gerçekleştirdikleri bir iyonotropik jelasyon çalışmasında, çapraz bağlanma ortamının ($CaCl_2$ çözeltisi) karıştırılma hızının 1000 rpm ve üzerine çıkarılmasıyla oluşturulan kalsiyum pektinat partiküllerinin ortalama büyüklüğünü 600 nm (< 1µm) olarak ölçmüştür.

Yapılan bu çalışmada çapraz bağlanma ortamının ($CaCl_2$ çözeltisi) karıştırılma hızının artırılmasıyla, belirli bir değere ulaşıncaya kadar iyonotropik jelasyon yöntemiyle oluşturulan partiküllerin ortalama büyüklüğünün devamlı olarak düştüğü belirtilmiştir.

Tez çalışmamızda bu yöntem modifiye edilerek MEL yüklü, kolona hedeflendirilmiş kalsiyum pektinat nanopartikülleri oluşturulmuştur.

İyonotropik jelasyon yönteminde yapılan modifikasyon birbirini izleyen üç farklı basamakta gerçekleştirildi:

1. Bölüm 2.11'de belirtildiği gibi pektin, galakturonik asit moleküllerinin düz zincir şeklinde birbirine bağlanmasıyla oluşmuş makromoleküler yapıda bir heteropolisakkarittir. Dolayısıyla öğütülerek bu düz zincir yapısı fiziksel olarak çeşitli yerlerinden kırılıp moleküler boyutu küçültülebilir.

Ancak yapılan literatür taramasında pektinin ısıya karşı çok dayanıksız olduğu ve ısıya doğrudan maruz kaldığında hemen kömürleştiği belirtilmiştir.

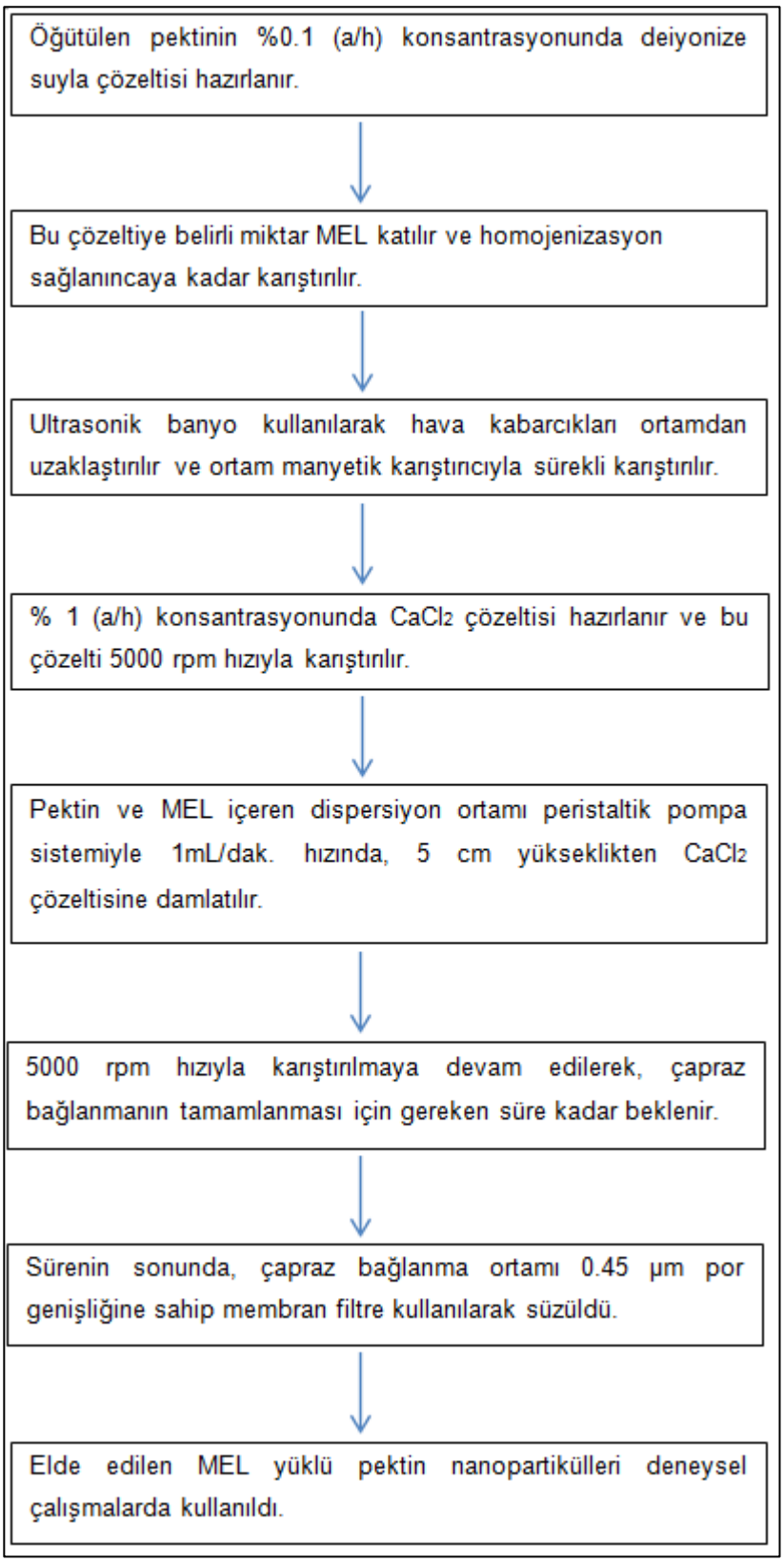
Pektin iki dakikalık periyotlarla toplamda 15 defa öğütülerek moleküler yapısının küçülmesi sağlanmıştır. Kısa süre ancak 15 defa öğütülerek sürtünmeden kaynaklanan ısı enerjisinin pektinin moleküler yapısını bozması engellenmiştir.

2. Çapraz bağlanma ortamı ($CaCl_2$ çözeltisi) literatürde belirtilen 1000 rpm hızı yerine Heidolph Silent Crusher M® kullanılarak 5000-10000 rpm hızında karıştırılmıştır. (Şekil 11'de verilen tasarladığımız iyonotropik jelasyon düzeneğinde (2) ile gösterilen karıştırıcı kullanılmıştır.)

3. Makro boyutlarda çalışılırken iyonotropik jelasyon formülasyonunda kullanılan pektin (%5 a/h) ve $CaCl_2$ (%10 a/h) konsantrasyonu (Tablo 25) $^1/_{50}$ ve $^1/_{10}$ değerine düşürülerek mikro boyutlara inilmiştir.

Yukarıda anlatıldığı gibi gerçekleştirilen modifikasyon ile iyonotropik jelasyon yöntemiyle MEL yüklü, küresel, stabil kalsiyum pektinat nanopartikülleri oluşturuldu.

Şekil 12'de, iyonotropik jelasyon yöntemiyle nanopartikül formülasyonunun hazırlanması özet halinde verilmiştir.



Şekil 12. MEL yüklü kalsiyum pektinat nanopartikül formülasyonunun hazırlanması

3.2.1.4.2. Nanopartikül Formülasyonuna Ait Faktöriyel Tasarım

İyonotropik jelasyon yöntemiyle nanopartikül hazırlanmasında kullanılan formülasyon parametrelerinin, oluşturulan partiküller üzerindeki etkisini incelemek amacıyla bir faktöriyel tasarım yapılmıştır.

Bu faktöriyel tasarım, nanopartikül hazırlanmasında kullanılan 5 farklı formülasyon parametresinin, biri düşük diğeri yüksek olan 2 farklı değerinin incelendiği $(2^5 = 32)$ 32 farklı formülasyondan meydana gelmektedir.

Faktöriyel tasarımla 32 farklı formülasyon hazırlanırken kullanılan formülasyon parametreleri ve değerleri Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. Faktöriyel tasarımda kullanılan formülasyon parametreleri ve değerleri

Parametre	**DÜŞÜK (D)**	**YÜKSEK (Y)**
Pektin konsantrasyonu	% 0.05 (a/h)	% 0.1 (a/h)
$CaCl_2$ konsantrasyonu	% 0.5 (a/h)	% 1 (a/h)
Çapraz bağlanma süresi	15 dakika (0,25 saat)	30 dakika (0.5 saat)
Pektin:MEL oranı	1:1	2:1
Çapraz bağlanma ortamı karıştırma hızı	5000 rpm	10000 rpm

Microsoft Office 2010 Home Premium® Excel programı kullanılarak yapılan, kalsiyum pektinat nanopartikül formülasyonu faktöriyel tasarımına ait 32 farklı formülasyonun kodları ve formülasyonlar hazırlanırken kullanılan parametrelerin değerleri Tablo 13'de verilmiştir.

Tablo 13. 32 farklı formülasyon ve bunlar hazırlanırken kullanılan formülasyon parametrelerinin değerleri

	Pektin (a/h)	$CaCl_2$ (a/h)	Pek : MEL oranı	t (dak)	rpm
P1	% 0.1	%1	2	30	10000
P2	% 0.1	%0.5	2	30	10000
P3	% 0.1	%1	1	30	10000
P4	% 0.1	%1	2	15	10000
P5	% 0.1	%1	2	30	5000
P6	% 0.1	%0.5	1	30	10000
P7	% 0.1	%0.5	2	15	10000
P8	% 0.1	%0.5	2	30	5000
P9	% 0.1	%1	1	15	10000
P10	% 0.1	%1	2	15	5000
P11	% 0.1	%1	1	30	5000
P12	% 0.1	%0.5	1	15	10000
P13	% 0.1	%0.5	2	15	5000
P14	% 0.1	%1	1	15	5000
P15	% 0.1	%0.5	1	30	5000
P16	% 0.1	%0.5	1	15	5000
P17	% 0.05	%1	2	30	10000
P18	% 0.05	%0.5	2	30	10000
P19	% 0.05	%1	1	30	10000
P20	% 0.05	%1	2	15	10000
P21	% 0.05	%1	2	30	5000
P22	% 0.05	%0.5	1	30	10000
P23	% 0.05	%0.5	2	15	10000
P24	% 0.05	%0.5	2	30	5000
P25	% 0.05	%1	1	15	10000
P26	% 0.05	%1	2	15	5000
P27	% 0.05	%1	1	30	5000
P28	% 0.05	%0.5	1	15	10000
P29	% 0.05	%0.5	2	15	5000
P30	% 0.05	%1	1	15	5000
P31	% 0.05	%0.5	1	30	5000
P32	% 0.05	%0.5	1	15	5000

Excel® programı kullanılarak yapılan faktöriyel tasarıma ait 32 farklı formülasyon hazırlandıktan sonra her bir formülasyonun ayrı ayrı ortalama partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, polidispersite indeksi, MEL yüklenme kapasitesi, pH'sı tayin edilmiş ve pH 6.8 fosfat tamponunda in vitro salım çalışmaları yapılmıştır.

3.2.1.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.2.1.5.1. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Polidispersite İndeksi

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (PDI) değerlerinin belirlenmesinde foton korelasyon spektroskopisi esasına bağlı olarak çalışan Zetasizer Nano Series® cihazı kullanılmıştır.

PDI ağırlıkça ortalama molekül ağırlığının (M_w) sayıca ortalama molekül ağırlığına (M_n) oranıdır.

$$\mathrm{PDI} = {}^{\mathrm{Mw}}/_{\mathrm{Mn}} \qquad \text{(Eşitlik 1)}$$

Partikül büyüklüğü ve PDI, kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerin en önemli fizikokimyasal özelliklerindendir. PDI, bir kollodial sistem bütünü içerisindeki partiküllerin dağılımını gösteren bir indekstir. PDI değeri küçüldükçe kollodial sistemi oluşturan partiküllerin homojenitesi artar[135].

Hazırlanan nanopartikül formülasyon örnekleri 1 ml hacmindeki özel tek kullanımlık ölçüm küvetine konulmuş ve elde edilen tüm nanopartikül formülasyonları için her bir ölçüm üç kere tekrarlanarak yapılmıştır. Ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı oda sıcaklığına ayarlanmıştır.

3.2.1.5.2. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyeli

Zeta potansiyel, partikül yüzeyine yapışık olan tabaka ile nötr bölge arasındaki elektriksel potansiyel farkıdır. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyel değerlerinin ölçülmesinde kolloidal partiküllerin yüzey yükleri hakkında bilgi veren en önemli teknik olan lazer doppler anemometri prensibine göre çalışan Zetasizer Nano Series® cihazından yararlanılmıştır. Bu cihazla partikül büyüklüğü 3 nm ile 10 µm arasında bulunan partiküllerin zeta potansiyel ölçümü yapılabilmektedir.

Hazırlanan nanopartikül formülasyon örnekleri 1 ml hacmindeki özel tek kullanımlık ölçüm küvetine konulmuş ve elde edilen tüm nanopartikül formülasyonları için her bir ölçüm üç kere tekrarlanarak yapılmıştır. Ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı oda sıcaklığına ayarlanmıştır.

3.2.1.5.3. Nanopartiküllerin Etkin Madde Yükleme Kapasitesi

İyonotropik jelasyon yöntemiyle hazırlanan nanopartikül formülasyonları 20000 g'de 0.5 saat süreyle santrifüjlenerek, partiküllerin ortamda çökmesi sağlandı. Süpernatanttaki MEL miktarı 278 nm'de spektrofotometrik olarak tayin edildi. Süpernatantta ölçülen miktar, total etkin madde miktarından çıkarılarak, nanopartiküllerde tutulan etkin madde miktarı hesaplandı. Yükleme kapasitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplandı:

$$Yükleme\ kapasitesi = \frac{(C\ total - C\ süpernatant)}{C\ total}\ x\ 100$$

(Eşitlik 2)

3.2.1.5.4 Formülasyonların pH'sı

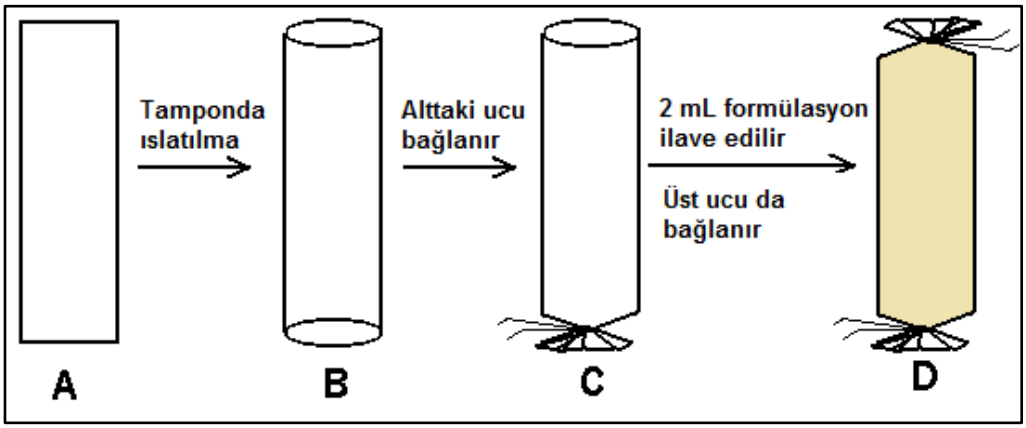
Faktöriyel tasarıma ait 32 farklı formülasyonun pH değerleri pH-metre kullanılarak saptandı. Ölçümler oda sıcaklığında yapıldı. Yapılan her ölçüm 3 kez tekrarlandı.

3.2.1.6. İn-Vitro Salım Çalışmaları

Etkin maddenin nanopartikül formülasyonlarından in vitro salım özelliklerini incelemek üzere USP Apparatus 1 sepetleri içerisine yerleştirilen diyaliz torbası yöntemi kullanılmıştır.

3.2.1.6.1. Diyaliz Torbalarının Hazırlanması

Belirli ve sabit büyüklükte kesilen diyaliz membran (12000 Dalton'dan küçük moleküllere geçirgen), hangi tampon ortamında salım çalışması yapılacaksa, o tampon ortamında bir gece bekletildi. Bir gece bekletildikten sonra diyaliz membran alttan sıkıca bağlandı. İçerisine 2 ml hazırlanan formülasyon ilave edildi. Membrana tekrar üstten sıkıca bağlamak suretiyle torba şekli verildi (Şekil 13). Bu diyaliz torbalar USP Apparatus 1 sepetleri içerisine yerleştirildi[136].



Şekil 13. Salım çalışmalarında kullanılacak diyaliz torbalarının hazırlanması[136]

Hazırlanan diyaliz torbası, sepete yerleştirildikten sonra sepetin üst kısmı takıldı ve salım testi cihazına yerleştirildi. Daha sonra hazırlanan tampon içerisine batırılarak, sepetin belirlenen hızda dönmesi sağlandı.

3.2.1.6.2. Faktöriyel Tasarıma Ait Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Salım Çalışmaları

Faktöriyel tasarıma ait formülasyon çalışmaları sonucunda elde edilen veriler ışığında en uygun formülasyon seçilmiştir. Bu nanopartikül formülasyonu, sıçanlara oral ve intrakolonik yoldan verilerek TNBS ile kolit indüklenmiş sıçanlarda in vivo etkinliği değerlendirilecektir. Dolayısıyla tez çalışmamızda formüle ettiğimiz kolona hedeflendirilmiş partiküler sistem, etki bölgesine ulaşana kadar farklı pH değerine sahip pek çok GI bölgeden geçecektir.

Gastrik pH, salgılanan HCl'den dolayı çok düşük bir pH değerine (pH 1.2) sahiptir. İnce bağırsaklarda ise pH nötrale yakındır (pH 7.4). Kalın bağırsaklarda yaşayan anaerob bakterilerin karbonhidratları fermente etmeleri ile açığa çıkan asidik karakterli kısa zincirli yağ asitleri kolonik pH'yı 6.8'e çeker.

Çalışmamızda salım hızı tayini için altı adet çözünme kabı içine 250'şer mL salım ortamı konularak 37±0.5°C'de salım deneyleri gerçekleştirildi. 50 devir/dakika dönüş hızında belirli zaman aralıklarında ucunda 0,2 µm çapında membran filtre takılı olan enjektör yardımı ile 2'şer mL örnek alındı. Alınan örnek çözeltinin absorbansı 278 nm'de ölçüldükten sonra tekrar çözünme ortamına ilave edildi.

Faktöriyel tasarıma ait 32 farklı formülasyonun pH 6.8 fosfat tamponunda, 8. saat sonunda salınan kümülatif MEL miktarları tespit edilmiştir. Elde edilen veriler kolona hedeflendirmede kullanılacak optimum salım özelliklerine sahip olan nanopartikül formülasyonunun seçilmesinde

kullanılmıştır. Ayrıca elde edilen pH 6.8 fosfat tamponunda, 8. saat sonunda salınan kümülatif MEL miktarları Pythia®'ya *çıktı* veri olarak girilerek sistemin formülasyon parametreleriyle pH 6.8 fosfat tamponunda, 8. saat sonunda salınan kümülatif MEL miktarları arasında matematiksel modelleme yapması sağlanmıştır.

pH 1.2, 6.8 ve 7.4 tamponlarında gerçekleştirilen çözünürlük çalışmaları sonuçlarına bağlı olarak *in vitro* salım çalışmalarında sink koşulun sağlandığı görülmüştür.

3.2.1.7. Pythia® Yapay Sinir Ağı (YSA) Programı

Pythia®; beyni oluşturan nöronların matematik modellerinin bilgisayar ortamında kurulması şeklinde işleyen, birçok nöronun belirli biçimlerde bir araya getirilip bir işlevin gerçekleşmesi hakkındaki sorulara matematiksel olarak yanıt arayan bir yapay sinir ağı programıdır.

Pythia®, faktöriyel tasarıma ait 32 farklı formülasyondan in vivo çalışmalarda kullanılmak üzere optimum özelliklere sahip bir tek formülasyonun belirlenmesinde ve formülasyon parametreleri ile formülasyonların sahip olduğu ortalama partikül büyüklüğü değeri, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve pH 6.8 fosfat tamponunda salınan kümülatif MEL miktarı arasındaki matematiksel ilişkilerin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Pythia®'ya, faktöriyel tasarıma ait 32 farklı formülasyon hazırlanırken kullanılan formülasyon parametreleri *girdi* kısmına, bu formülasyonların laboratuvarda üretilmesiyle elde edilen veriler *çıktı* kısmına girildi (Tablo 14).

Sistemin; pektin konsantrasyonu (%a/h), $CaCl_2$ konsantrasyonu (% a/h), çapraz bağlanma süresi (t), çapraz bağlanma ortamının karıştırılma hızı (rpm) ve pektin:MEL oranı, olarak girilen

formülasyon parametreleri ile ortalama partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, polidispersite indeksi ve pH 6,8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif etkin madde miktarı üzerine etkileri arasındaki ilişkileri incelemesi sağlanmıştır.

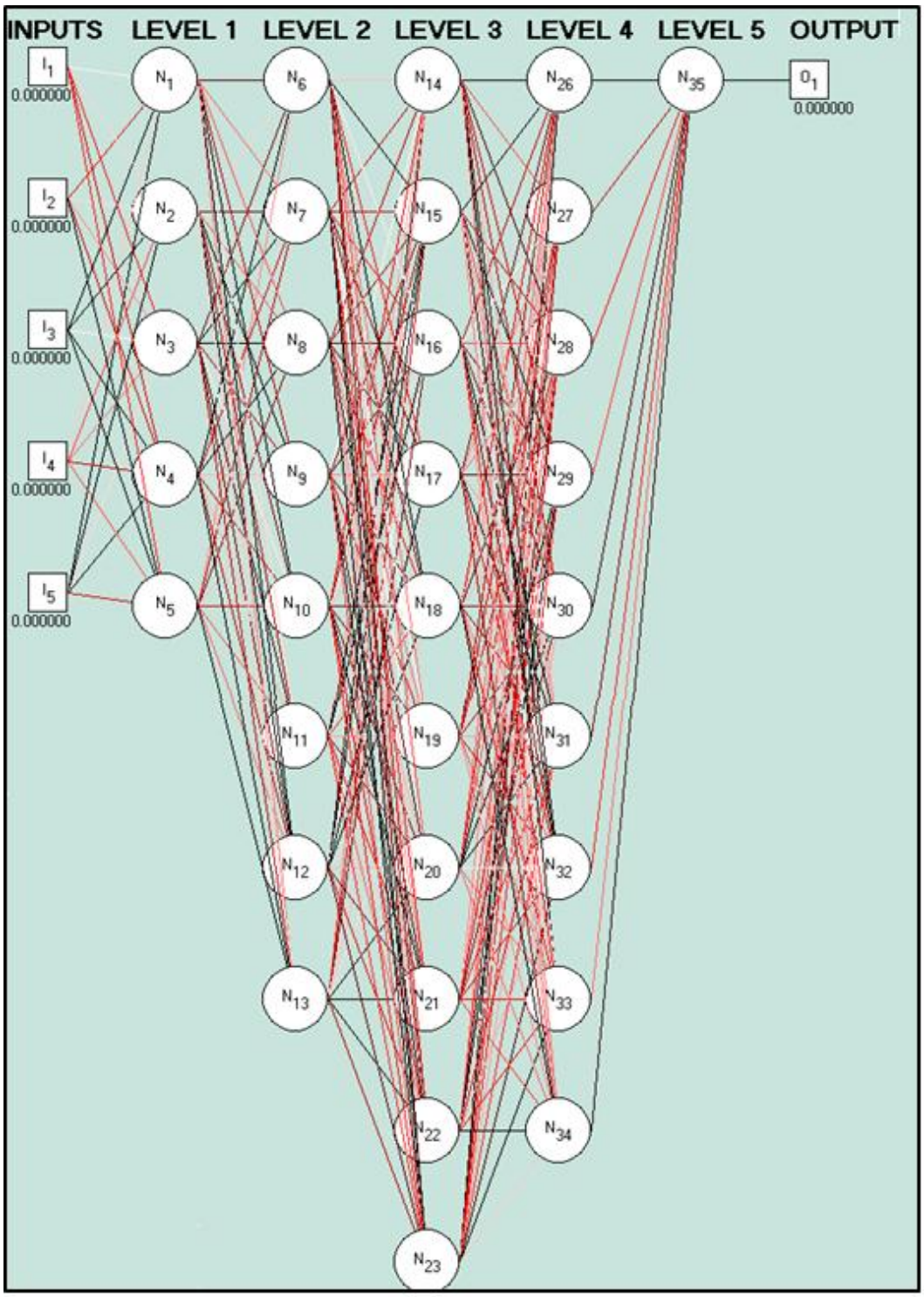
Formülasyon parametreleri ile elde edilen veriler arasındaki matematiksel ilişki tespit edilmiştir.

Tablo 14. Pythia® programına girilen veriler ve programdan elde edilen veriler

Sisteme Girilen Parametreler	
GİRDİ KISMINA	**ÇIKTI KISMINA**
Pektin kons.	Partikül büyüklüğü
$CaCl_2$ kons.	Zeta potansiyel
Çapraz bağ. sür.	% Küm. salınan MEL
Pektin:MEL oranı	Polidispersite indeksi
Karıştırma hızı	

Sistemden Alınan Veriler
Partikül büyüklüğü
Zeta potansiyel
% Küm. salınan MEL
Polidispersite indeksi

Pythia®'da 5 seviyede toplam 35 farklı *nöron* çalışmıştır. Sisteme girilen beş farklı veriden bir tane çıktı veri elde edilmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. Pythia®'da çalışan nöronlar ve bu nöronlar arasındaki sinir ağları

3.2.1.7.1. Pythia®'ya Girilen Parametreler Işığında Matematiksel Olarak Elde Edilen Veriler İle Laboratuvar Ortamında Elde Edilen Deneysel Verilerin Karşılaştırılması

Faktöriyel tasarıma ait formülasyon parametrelerinin ve elde edilen verilerin sisteme girilmesiyle Pythia®'nın matematiksel modellemeyi yapması sağlandı. Pythia®'da 32 farklı formülasyonun, ortalama partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, polidispersite indeksi ve pH 6,8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif etkin madde miktarı matematiksel olarak hesaplatıldı. Pythia®'nın hesapladığı matematiksel veriler ile laboratuvar ortamında elde edilen deneysel veriler arasındaki benzerlik istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.2.1.7.2.Pythia®'nın Matematiksel Olarak Önerdiği Verilerin Doğruluğunun Kontrol Edilmesi

Pythia®'nın matematiksel olarak önerdiği verilerin doğruluğunu kontrol edebilmek amacıyla faktöriyel tasarımda yer almayan iki farklı nanopartikül formülasyonu daha tasarlandı (Tablo 15).

Tablo 15. P_A'ya ve P_B'ye ait formülasyon parametreleri

Parametre	**P_A**	**P_B**
Pektin konsantrasyonu	% 0.075 (a/h)	% 0.1 (a/h)
$CaCl_2$ konsantrasyonu	% 0.75 (a/h)	% 0.25 (a/h)
Çapraz bağlanma süresi	20 dakika	10 dakika
Pektin:MEL oranı	1.25	1.5
Karıştırma hızı	7500 rpm	1000 rpm

Pythia®'ya bu iki farklı formülasyonun (P_A, P_B) parametreleri girildi ve matematiksel olarak bu formülasyonların ortalama partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, polidispersite indeksi ve pH 6.8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif etkin madde miktarı matematiksel olarak hesaplatıldı. Daha sonra laboratuvar ortamında bu iki formülasyon üretildi ve ortalama partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, polidispersite indeksi ve pH 6,8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif etkin madde miktarı ölçüldü.

Pythia®'nın önerdiği matematiksel veriler ile laboratuvar ortamında elde edilen deneysel veriler arasındaki benzerlik/farklılık istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

3.2.1.7.3. Pythia®'ya Girilen Parametreler Işığında Matematiksel Olarak En Uygun Formülasyonun Seçilmesi

Pythia®'dan matematiksel olarak elde edilen veriler ışığında faktöriyel tasarıma ait 32 farklı formülasyondan kolona hedeflendirmede kullanılabilecek optimum özelliklere (ortalama partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, polidispersite indeksi, MEL yükleme kapasitesi, pH'sı ve pH 6.8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif MEL miktarı değerlendirilerek) sahip tek bir nanopartikül formülasyonu seçilmiştir.

Faktöriyel tasarımdan optimum formülasyon olarak seçilen P28 kullanılarak spesifik salım çalışmalarına geçilmiştir.

Sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen in vivo çalışmalarda da sadece seçilen P28 formülasyonu kullanılmıştır.

3.2.1.8. Optimum Formülasyon Olarak Seçilen P28 Nolu Formülasyon Üzerinde Yapılan Salım Çalışmaları

Farklı salım ortamları kullanılarak, Pythia®'dan elde edilen veriler ışığında optimum formülasyon olarak seçilen P28'den MEL salımı üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

3.2.1.8.1. pH 1.2 Mide Ortamında Yapılan Çalışmalar

Bu in vitro salım çalışmasında, salım ortamı olarak pH 1.2 HCl tamponu kullanılmış ve P28 nolu formülasyondan MEL salımı altı saat süreyle izlenmiştir.

3.2.1.8.2. pH 7.4 Fosfat Tamponunda Yapılan Çalışmalar

Bu in vitro salım çalışmasında ise, salım ortamı olarak pH 7.4 fosfat tamponu kullanılmıştır. P28 nolu formülasyondan MEL salımı sekiz saat süreyle izlenmiştir.

3.2.1.8.3. pH 6.8 Fosfat Tamponu+Pectinex® Ortamında Yapılan Çalışmalar

İyonotropik jelasyonla oluşturulan kalsiyum pektinat partiküllerini insan sindirim sisteminde yer alan enzimler parçalayamaz. Bu partiküller kalın bağırsaklarda yaşayan anaerob bakterilerin sahip olduğu pektinolitik enzimlerin aktivitesi sonucunda yıkıma uğrar. Dolayısıyla salım çalışmalarında in vivo ortamı tam anlamıyla taklit edebilmek için pH 6.8 fosfat tamponu ortamına %2 (h/h) oranında Pectinex® enzim konsantresi eklenmiştir[137]. P28 nolu formülasyondan MEL salımı sekiz saat süreyle izlenmiştir.

3.2.1.8.4. Salım Ortamının Değiştirildiği Çalışmalar

P28'den MEL salımı, salım ortamı değiştirilerek de araştırılmıştır. Oral yoldan verilen nanopartikül formülasyonu önce mideyi

sonra ince bağırsakları geçerek spesifik olarak etki edeceği kalın bağırsak bölgesine taşınır. Bu nedenle bu çalışmaların ilkinde salım ortamı olarak; pH 1.2 HCl tamponu ilk iki saat kullanılmıştır. Daha sonra ortam değiştirilerek pH 7.4 fosfat tamponu takip eden üç saat kullanılmıştır. 5. saatin sonunda ortam tekrar değiştirilerek pH 6.8 fosfat tamponu üç saat kullanılmıştır. Salım çalışmasında kullanılan salım ortamları ve süreleri Tablo 16'da verilmiştir. Tamponların kullanım sürelerinde GI transit süreleri baz alınmıştır.

Tablo 16. Salım ortamı değiştirilerek gerçekleştirilen in vitro salım çalışmalarında kullanılan salım ortamları ve süreleri I

Zaman (Saat)	**Kullanılan Salım Ortamı**
0-2 saat (Toplam 2 saat)	pH 1.2 HCl tamponu
2-5 saat (Toplam 3 saat)	pH 7.4 fosfat tamponu
5-8 saat (Toplam 3 saat)	pH 6.8 fosfat tamponu

Salım ortamı değiştirilerek gerçekleştirilen diğer salım çalışmasında ise 5. saatin sonunda ortam değiştirilerek kullanılan pH 6.8 fosfat tamponu yerine pH 6.8 fosfat tamponu + %2 Pectinex® enzim konsantresi içeren ortam kullanılmıştır. Bu salım çalışmasında kullanılan salım ortamları ve süreleri ise Tablo 17'de verilmiştir.

Tablo 17. Salım ortamı değiştirilerek gerçekleştirilen in vitro salım çalışmalarında kullanılan salım ortamları ve süreleri II

Zaman (Saat)	**Kullanılan Salım Ortamı**
0-2 saat (Toplam 2 saat)	pH 1.2 HCl tamponu
2-5 saat (Toplam 3 saat)	pH 7.4 fosfat tamponu
5-8 saat (Toplam 3 saat)	pH 6.8 fosfat tamponu+ %2 Pectinex®

3.2.1.9. İn Vitro Salım Sonuçlarının Kinetik Olarak Değerlendirilmesi

Etkin madde salım hızı çalışmalarında, zamana bağlı olarak salınan yığılmalı MEL miktarı şeklinde elde edilen veriler grafiğe geçirildiğinde farklı profiller elde edilmektedir. Bu profillerin doğrusallaştırılması etkin madde çıkış mekanizmalarının yorumlanması ve farklı formülasyonlar arasında karşılaştırma parametrelerinin elde edilmesi için verilere farklı varsayımlara dayanan metamatiksel modeller uygulanmaktadır.

Çalışmamızda elde edilen salım profilleri, kinetik açıdan sıfırıncı derece, birinci derece ve Higuchi kinetikleri uygulanarak değerlendirilmiştir.

Nanopartiküler sistemden MEL salımının sıfırıncı derece, birinci derece ve Higuchi kinetiklerine uyumu regresyonel olarak incelenmiştir. Salım kinetikleri açısından en iyi uyumun belirlenmesinde r^2 değerinin büyüklüğü (1.000'a olan yakınlığı) değerlendirilmiştir.

3.2.1.10. Stabilite Çalışmaları

Optimum formülasyon olarak seçilen P28 nanopartikül formülasyonu, altı ay süreyle 25^{o}C/%60 bağıl nem içeren iklim dolabında, 40^{o}C/%75 bağıl nem içeren etüvde ve 4^{o}C/ortam nemi içeren buzdolabı ortamında bekletilerek stabilitesi değerlendirilmiştir.

Nanopartiküllerin bu üç farklı ortamdaki (iklim dolabı, etüv, buzdolabı) stabiliteleri; ortalama partikül büyüklükleri, zeta potansiyelleri, formülasyon pH'sı ve polidispersite indeks değerleri açısından değerlendirilmesini ve nanopartiküllere yüklenmiş etkin madde miktarlarının belirtilen sıcaklık değerlerinde analitik olarak tayin edilmesini içermektedir.

3.2.1.11. Mukoadezyon Çalışmaları*

TA-XT Plus Texture Analyzer cihazı (Şekil 15) kullanılarak faktöriyel tasarımdan optimum formülasyon olarak seçilen P28 nanopartikül formülasyonunun mukoadezyon özellikleri incelendi.

Bu mukoadezyon çalışmasında Esiringü[54] ve Tuğcu-Demiröz[138]'e ait daha önceki çalışmalardan yararlanılarak iki araştırmacının valide ettikleri mukoadezyon yöntemi kullanıldı.

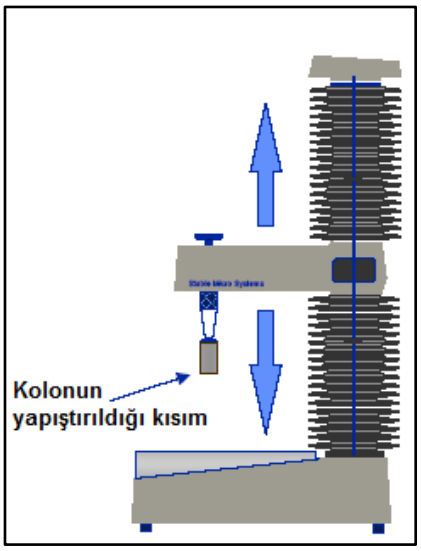
Mukoadezyon çalışmalarında kullanılmasına karar verilen test parametreleri ve değerleri Tablo 18'de verilmiştir.

Tablo 18. Validasyon sonuçlarına göre mukoadezyon çalışmasında kullanılmasına karar verilen test parametreleri

Mukoadezyon Test Parametreleri	**Kullanılacak Değerler**
Prob Hızı	1 mm/sn
Probun Uyguladığı Kuvvet	0.2 N
Mukoza İle Kolonik Örneğin Temas Süresi	60 sn

Mukoadezyon çalışmalarında biyolojik doku olarak; in vivo çalışmalarda kullanılan, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruba (Grup B) ve kolit oluşturulmayan sağlıklı kontrol grubuna (Grup A) ait kolon mukozası doku örnekleri kullanılmıştır.

*Mukoadezyon çalışmaları sırasındaki yardımlarından dolayı Dr.Ecz. Fatmanur TUĞCU-DEMİRÖZ'e teşekkür ederiz.



Şekil 15. Mukoadezyon çalışmasında kullanılan TA-XT Plus Texture Analyzer cihazı

Cihazın penetrometresi ile biyolojik doku (sıçan kolon mukozası) ve nanopartikül formülasyonu (P28) belirli süre temas halinde tutuldu (60 sn). Bu süre sonunda iki materyalin birbirinden ayrılması için uygulanan kuvvet ve yapılan iş değerleri cihazın yazılım programı ile elde edildi.

Çalışmalar sırasında kopma kuvveti (F) ve yapılan adezyon işi (W) bulundu. Ölçümler 37°C'de yapıldı. Yapılan her ölçüm altı kez tekrarlandı.

TA. XT. Plus Texture Analyser'ın yazılım programı bize kopma kuvvetini ve yapılan işi hesaplayarak vermektedir. Burada yapılan iş kuvvet-mesafe grafiğinde eğri altında kalan alandan (AUC) hesaplanmaktadır, birimi N.mm'dir. Mukoadezyon işini hesaplamak için aşağıdaki denklem kullanıldı.

$$\text{Mukoadezyon işi} = \frac{\text{AUC}}{\pi r^2} \qquad \text{(Eşitlik 3)}$$

$$\pi r^2 = \text{Nanopartikül for. ile temas eden yüzeyin alanı} \qquad \text{(Eşitlik 4)}$$

$$AUC = \text{Kuvvet} - \text{mesafe grafiğinde eğri altında kalan alan}$$ (Eşitlik 5)

3.2.1.12. Formülasyonda Bağlanmayan Ca^{+2} Miktarının Belirlenmesi*

Formülasyonda bağlanmadan kalan Ca^{+2} olup olmadığını incelemek amacıyla alevli atomik emisyon spektrometri yöntemi kullanılmıştır.

Yakıcı gaz olarak azot oksit, yakıt olarak asetilen kullanılarak alev elde edilmiştir. Işık kaynağı olarak oyuk katot (Ca^{+2}) lambası kullanılmış ve şiddeti 10 mA'e ayarlanmıştır.

Stok çözeltilerden hazırlanan bilinen derişimlerdeki standartların emisyon şiddetleri 240.7 nm'de belirlendi ve bu sayede standart derişimlerine karşılık emisyon şiddetleri grafiğe geçirilerek bir kalibrasyon grafiği elde edildi. Daha sonra P28'in emisyon şiddeti cihazda okundu. Stok çözeltilerden hareketle hazırlanan denklemde yerine konarak formülasyonda bağlanmayan Ca^{+2} miktarı belirlendi.

3.2.1.13. Nanopartiküllerin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) İle Görüntülenmesi

Hazırlanan nanopartikül formülasyonunun görüntüsü Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı bünyesinde var olan geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile elde edilmiştir.

* Alevli atomik emisyon spektrometri çalışmalarındaki katkılarından dolayı G.Ü. Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim dalı öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr. Orkun ALP ve Yrd.Doç.Dr. Aysel PEHLİVAN-BERKKAN'a teşekkür ederiz.

Laminar hava akımında, hazırlanan nanopartikül süspansiyonundan 1 damla, bakır levha ile kaplanmış karbon filme damlatılmıştır ve kapaklı bir petri kabında bir gece bekletilerek oda sıcaklığında kurutulmuştur. Bu şekilde hazırlanan numuneler TEM cihazına yerleştirilerek görüntüler çekilmiştir.

3.2.1.14. Nanopartiküllerin Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) İle Görüntülenmesi*

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının morfolojilerinin incelenmesi amacıyla nanopartiküllerin görüntülenmesinde kullanılan tekniklerinden biri olan, fakültemiz bünyesinde var olan atomik kuvvet mikroskobundan (AFM) da yararlanılmıştır.

AFM'da non-cantact mode ile çalışılarak nanopartiküllerin görüntüsü elde edilmiştir. Kullanılan formülasyon örnekleri (P28) $^{1}/_{100}$ oranında deiyonize suyla seyreltilmiştir. Aseptik koşullarda, laminar hava akımında hazırlanan örnekler tek kullanımlık mika lameller üzerine temas edilmeden damlatılarak, laminar hava akımında kurumaya bırakılmıştır.

Kullanılan kantilaver alüminyum kaplı olup, tip'in force constant değeri 42 N/m'dir.

* Nanopartiküllerin AFM ile görüntülenmesi çalışmaları sırasındaki yardımlarından dolayı Prof.Dr. İ. Tuncer DEĞİM'e teşekkür ederiz.

3.2.2. İn Vivo Çalışmalar*

G.Ü.ET-12.026 kod numaralı in vivo çalışmalar, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığı'nın 02.04.2012/ 42-6864 sayı ve izniyle Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında, etik kurul kuralları çerçevesinde yürütülmüştür.

Tez çalışmamızda in vitro çalışmalar sonucunda uygun olduğu belirlenen faktöriyel tasarıma ait P28 formülasyonu TNBS ile kolit oluşturulmuş sıçanlara 10 mg/kg dozunda MEL yüklendikten sonra oral ve intrakolonik olarak uygulanmıştır.

3.2.2.1. Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanları

Bu çalışmada; 18 haftalık, 250-300 gram ağırlığında 50 adet erkek Wistar-albino sıçan kullanıldı. Hayvanlar deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve sıcaklık koşullarında (24^{o} C-25^{o} C) tutuldu, standart pellet sıçan yemi ve musluk suyuyla beslendi.

Sıçanlar deneyden 16 saat öncesinden aç bırakıldı ancak suya serbest erişim sağlandı.

Çalışma süresince her bir sıçanın tükettiği pellet yem ve su miktarının, ayrıca sıçanların ağırlık değişimlerinin belirlenebilmesi amacıyla sıçanlar tekli metabolik kafeslere konuldu (Resim 1).

Sıçanların gaitaları, gaitalarının kıvamları ve gaitaların kanama içerip içermedikleri çalışma boyunca her gün kaydedildi.

* İn vivo çalışmalardaki katkılarından dolayı G.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr. K.Gonca AKBULUT ve Yrd.Doç.Dr. Şevin GÜNEY'e teşekkür ederiz.



Resim 1. Sıçanların yerleştirildiği metabolik kafes

3.2.2.2. Deney Hayvanlarında Anestezi Oluşumu

Sıçanlarda anestezi, ketamin hidroklorür (Ketalar®, Pfizer) 50 mg/kg dozunda ve ksilazin hidroklorür (Rompun®, Bayer HealthCare) 5 mg/kg dozunda intramusküler enjekte edilerek sağlandı.

3.2.2.3. Deney Hayvanlarında TNBS ile Kolit İndüksiyonu

Sıçanlarda deneysel kolit oluşturmak için TNBS + %50 etanol stok çözeltisi hazırlandı. Kolit indüklenmesinden hemen önce sıçanların ağırlıkları belirlendi. Ağırlıklarına göre, 80 mg/kg dozunda (sıçan başına 0.6 ml hacim içinde 80 mg/kg olacak şekilde) TNBS içerecek şekilde hazırlanan stok karışımdan enjektöre çekildi. Anestezi altındaki sıçanlara 8 cm uzunluğundaki steril paslanmaz çelik gavaj rektal yoldan 8 cm içeri itildi. TNBS, gavajdan kolon içine yavaşça verilerek sıçanlarda kolit oluşturuldu. Daha sonra, verilen TNBS'nin anüsten geri kaçmasını engellemek amacıyla sıçanlar 60 saniye süre ile kuyruktan kaldırılarak baş aşağı (Trandelenburg pozisyonunda) tutuldu[139] (Resim 2).



Resim 2. Trandelenburg pozisyonunda tutulan bir sıçan

3.2.2.4. Patolojik Değerlendirme*

İki adet sıçanda Bölüm 3.2.2.3'de anlatıldığı gibi TNBS ile kolit indüklendikten 24 saat sonra ötenazi yapılmıştır. Hayvanlar feda edildikten hemen sonra tüm kolonu çıkarılmıştır. Dokular %10'luk formaldehitte 24 saat tespit edildikten sonra enine kesitlerle örneklenmiştir. Sonrasında parafine gömülü bloklar hazırlanmıştır. Bloklardan 4 mikrometre kalınlığında kesitler elde edilmiş ve hematoksilen&eozin boyaları ile ışık mikroskopisinde inceleme yapılmıştır ve patolojik açıdan değerlendirilmiştir. Patolojik çalışmalar sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda in vivo çalışmalara devam edilmiştir.

---

* Patolojik değerlendirmedeki katkılarından dolayı G.Ü. Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr. Ayşe DURSUN ve Yrd.Doç.Dr. Özgür EKİNCİ'ye teşekkür ederiz.

3.2.2.5. İn Vivo Çalışmada Oluşturulan Deney Grupları

İn vivo çalışmalarda, tez çalışmamız doğrultusunda hazırladığımız MEL yüklü nanopartikül formülasyonunun (P28) etkinliğini değerlendirebilmek amacıyla sıçanlar, aşağıda anlatıldığı gibi her grupta 8 hayvan olmak üzere toplam 6 farklı gruba ayrıldı.

*__Grup 1(A):__ Kontrol (sham) grubu olup, anestezi altındaki sıçanlara intrakolonik yoldan 0.6 ml %0.9 NaCl verildi. Kolit indüksiyonu gerçekleştirilmemiştir.

*__Grup 2(B):__ Kolit grubu olup, anestezi altındaki sıçanlarda TNBS-etanol karışımı ile kolit oluşumu indüklendi. Kolit indüksiyonu gerçekleştirildikten sonra tedavi verilmemiştir.

*__Grup 3(C):__ İlk tedavi grubu olup, anestezi altındaki sıçanlarda TNBS-etanol karışımı ile kolit oluşturulduktan sonra 10 mg/kg dozunda MEL yüklü nanopartikül formülasyonu *oral* yoldan verildi (Resim 3).

*__Grup 4(D):__ İkinci tedavi grubu olup, anestezi altındaki sıçanlarda TNBS-etanol karışımı ile kolit oluşturulduktan sonra 10 mg/kg dozunda MEL yüklü nanopartikül formülasyonu *intrakolonik* olarak verildi (Resim 4).

*__Grup 5(E):__ Tedavi grubunun kontrolü olup, anestezi altındaki sıçanlarda TNBS-etanol karışımı ile kolit oluşturulduktan sonra boş nanopartikül formülasyonu *oral* yoldan verildi.

*__Grup 6(F):__ Tedavi grubunun kontrolü olup, anestezi altındaki sıçanlarda TNBS etanol karışımı ile kolit oluşturulduktan sonra boş nanopartikül formülasyonu *intrakolonik* olarak verildi.

Sıçanlarda TNBS ile kolit indüklendikten sonra tedavide uygulanan formülasyonlar ve uygulama yolları özet halinde Tablo 19'da verilmiştir.

Tablo 19. Sıçanlarda TNBS ile kolit indüklendikten sonra tedavide uygulanan formülasyonlar ve uygulama yolları

GRUP	UYGULAMA YOLU	UYGULANAN FOR.
A (Kontrol grubu)	--	Herhangi bir tedavi verilmedi
B (Kolit grubu)	--	Herhangi bir tedavi verilmedi
C (Tedavi grubu 1)	Oral	MEL yüklü nanopartikül for.
D (Tedavi grubu 2)	İntrakolonik	MEL yüklü nanopartikül for.
E (Tedavi kontrol grubu 1)	Oral	Boş nanopartikül for.
F (Tedavi kontrol grubu 2)	İntrakolonik	Boş nanopartikül for.



Resim 3. Sıçanlara oral uygulama yapılması



Resim 4. Sıçanlara intrakolonik uygulama yapılması

3.2.2.6. Deney Gruplarına Uygulanan Tedavi Protokolü

Anestezi altındaki sıçanlara intrakolonik uygulama yaparken 16 G, 8 cm uzunluğundaki, kalın, steril paslanmaz çelik gavaj kullanılmıştır. Bu gavaja ait görüntü Resim 5'de verilmiştir.



Resim 5. Sıçanlara intrakolonik uygulama yaparken kullanılan gavaj

Sıçanlara oral uygulama yaparken herhangi bir yutma problemi görülmemesi için anestezi uygulanmamıştır. Uygulama esnasında 20 G, 6 cm uzunluğundaki, ince, steril paslanmaz çelik gavaj kullanılmıştır. Bu gavaja ait görüntü Resim 6'de verilmiştir.



Resim 6. Sıçanlara oral uygulama yaparken kullanılan gavaj

Tez çalışmamızda etkin madde olarak MEL kullanıldığı için formülasyonların uygulanmasında sıçanların sirkadiyen ritmi göz önünde bulundurulmuştur. Dolayısıyla tedavi uygulamaları öğleden sonra saat 16:00'da, kolit indüksiyonu ise sabah saat 10:00'da yapılmıştır. Tedaviye 4 gün boyunca devam edilmiş ve hayvanlar 5. gün feda edilmiştir.

Sıçanların kalın bağırsak hacimleri ve bir seferde içebilecekleri azami sıvı miktarı göz önünde bulundurularak tez çalışmamızda kullanılacak oral ve intrakolonik uygulamaların hacmi 1 mL olarak tasarlanmıştır.

Deneysel farklılıkların etkisini ortadan kaldırabilmek için in vivo çalışmalarda kullanılacak formülasyon, in vivo deneylerden önce yeterli miktarda, taze olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyon etrafı alüminyum folyo ile sarılarak $+4^{o}$ C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.7. Kolon Dokusu Örneklerinin Alınması

Anestezi altındaki sıçanların;

• Önce ağırlıkları tartıldı.

• Sıçanların mid-line insizyonla batınları açılarak tüm kolonu çıkarıldı (Resim 7).

• Kolon longitudinal olarak açıldı. Kolon % 0.9 NaCl ile iyice yıkandı ardından kurulandı.

• Tüm kolonun ağırlığı ölçüldü.

• Kolonda varsa ülser lezyonunun uzunluğu ölçüldü.

• Kolondaki lezyonların makroskopik değerlendirmesi yapıldı.

• Kolonun 10 cm'lik bölümü ayrıldı.

• Kolonun 10 cm'lik bölümü, üst-alt olarak ikiye ayrıldı. Kolonun anüse yakın olan ilk 4 cm'lik kısmı biyokimyasal incelemelerde, sonraki 2 cm'lik kısmı immünolojik incelemelerde daha sonraki 2 cm'lik kısmı ise histolojik incelemelerde kullanıldı. Kolonun geride kalan kısmı ise -80^{o}'de saklandı.



Resim 7. Ksifopubik median kesi ile laparatomi yapılan sıçanlar

3.2.2.8. Makroskopik Kolit Değerlendirmesi

TNBS-E uygulamasını takiben 5. günde feda edilen sıçanlardan elde edilen kolon mukozasındaki makroskobik hasar değerlendirilmesi için Tablo 20'deki makroskopik skorlama kriterleri kullanıldı[140].

Tablo 20. Kolon hasarı için makroskobik skorlama kriterleri[140]

Puan	Kriter
0	Hasar yok
1	Hiperemi
2	Hiperemi ile birlikte duvar kalınlaşması
3	Duvar kalınlaşması olmadan soliter ülser saptanması
4	İki veya daha fazla ülser veya inflamasyon alanı saptanması
5	İki veya daha fazla alanda ağır ülser ve inflamasyon saptanması veya tek bir alanda 1 cm'den daha uzun ülser veya inflamasyon alanı saptanması
6-10	Kolondaki hasarın 2 cm'den daha uzun olduğu durumlarda her fazla 1 cm için puanlamaya bir puan eklenmiştir.

3.2.2.9. Kolon Örneklerinin Homojenizasyonu ve Deney İçin Hazırlanması

Sıçanların feda edilmesinden hemen sonra eppendorf tüplere alınan dokular, analiz dönemine kadar -80ºC'da saklandı.

Kolon dokularının homojenizasyon çalışmalarında pH 7.4 PBS ve %10'luk trikloroasetik asit (TCA) kullanıldı. Homojenizasyon işlemi başlangıcında kolon dokularının yaş ağırlıkları tartıldı. Dokuların soğukluğu muhafaza edilerek tüplere konuldu. Dokuların üzerine tampon ilave edilerek miktarları kaydedildi. Plastik kaplar içine buz doldurulduu ve tüpteki dokular plastik kapların içerisine yerleştirilerek homojenize edildi. Homojenatlar; sıcaklığı artırılmadan santrifüj edilerek süpernatanları ependorf tüplerine konuldu. Tüpler numaralandırıldı.

3.2.2.10. Kolonik Mukozada Oksidatif Stres Ölçümü

Tez çalışmamızda oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla, kolit ve tedavi gruplarında, kolonik mukozada nitrik oksitin stabl son ürünü olan reaktif azot oksit (NOx) seviyesi, lipit peroksidasyonun son ürünü olan

malondialdehit (MDA) seviyesi ve endojen bir antioksidan olan GSH seviyesi ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar gruplar arasında kıyaslanmıştır.

3.2.2.10.1. Nitrik Oksit Seviyesinin Ölçülmesi

Yaklaşık 0.2 g kolonik doku, 0.1 M PBS ile (1:5) homojenize edildikten sonra, 3500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. 200 µL süzüntüye, ortamdaki nitratı nitrite indirgemek amacıyla eşit miktarda vanadyum (III) klorür (VCl_3) eklendi ve 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra sodyum fosfat tamponu ve eşit miktarlarda karıştırılmış olan Griess I (% 0.2'lik naftiletilendiamin dihidroklorür (NEDD) ve Griess II (% 10'luk fosforik asit (H_3PO_4) içinde % 2'lik sülfanilamid) reaktifleri eklendi. 37°C'de 10 dk inkübasyondan sonra numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede, köre karşı, 540 nm'de okundu.

3.2.2.10.2. Malondialdehit (MDA) Seviyesinin Ölçülmesi

Kolon dokusundaki MDA konsantrasyon tayini için, 0.2 g doku, %10'luk TCA ile (1:9) homojenize edildikten sonra, 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. 750 µL süzüntüye, bütilhidroksi toluenin etanoldeki %1'lik çözeltisi ve %0.67'lik tiyobarbitürik asit eklenerek 15 dk benmaride kaynamaya bırakıldı. Daha sonra numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede, köre karşı, 535 nm'de okundu.

3.2.2.10.3. Glutatyon Seviyesinin Ölçülmesi

0.2 g kolonik doku, %10'luk TCA ile (1:9) homojenize edildikten sonra, 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. 250 µL süzüntüye, Na_2HPO_4 ve DTNB çözeltileri (%1'lik Sodyum sitrat içerisinde 0.4 mg DTNB/ml çözülerek hazırlanır) eklenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakıldı. Numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede, köre karşı, 412 nm'de okundu.

3.2.2.11. Kolon Mukozasında Yapılan İmmünolojik Çalışmalar*

İn vivo çalışmada kullanılan sıçanların kolon mukozasının TNF- α, IL–17 ve IL–10 düzeyleri Elisa (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay) yöntemi ile hazır eBIOSCIENCE® (Vienna, Austria) kiti kullanılarak tespit edildi.

3.2.2.11.1. TNF-α, IL–10 ve IL–17 Düzeylerinin Belirlenmesi

Yaklaşık 0.2 g kolonik doku, 0.1 M PBS ile (1:5) homojenize edildikten sonra, 3500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanlar 0,45 µm'lik membran filtrelerden geçirilerek doku artıklarının sonuçları etkilemesi önlendi (interferans). Çalışmada kullanılan eBIOSCIENCE kite ait standart rekombinant TNF-α, IL–17 ve IL–10 eğrileri kullanılarak TNF-α, IL–17 ve IL–10 konsantrasyonları hesaplandı. Değerler pg/mL olarak verildi.

---

*İmmünolojik çalışmalar G.Ü. Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim dalında gerçekleştirilmiştir. Yardımlarından dolayı Doç.Dr. Resul KARAKUŞ'a teşekkür ederiz.

3.2.2.12. Histolojik Değerlendirme*

Sıçanların feda edilmesinden hemen sonra alınan kolon dokusu örnekleri, oda sıcaklığında, %10' luk formalin çözeltisi içerisinde 72 saat tespit edildiler. Tespit edilen dokular alışılmış ışık mikroskop takip yönteminden geçirilerek parafin bloklar elde edildi. Hazırlanan bloklardan mikrotomla (Leica SM 2000, Germany) lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alınarak Masson trikrom ile boyandı.

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan preparatlar, Leica DM 4000 (Leica, Weetlar, Germany) kamera ataçmanlı (DFC280 Plus Camera, Leica, Weetlar, Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Win 3 programında değerlendirildi ve fotoğraflandı.

3.2.2.13. İstatistiksel Değerlendirme

n değeri bir çalışmadaki denek sayısını veya bir analiz çalışmasındaki analit sayısını ifade eder. Standart sapma; bir çalışma grubundaki her bir verinin ortalamaya göre ne kadar uzaklıkta olduğunu gösteren bir ölçüdür. Belirli bir popülasyonda incelenen bir özelliğin ne kadar geniş bir aralıkta dağıldığını belirtir. Standart hata ise, aynı popülasyondan seçilecek aynı büyüklükteki örneklemlerin ortalamalarının yayılmasını gösteren bir ölçüttür. p değeri, iki grubu karşılaştırmak amacı ile yapılan bir istatistiksel değerlendirmede, iki grup arasında ortaya çıkan farkın şans eseri ortaya çıkma olasılığını göstermektedir. Güven aralığı ise; bir istatistiksel değerlendirmede belirli bir güven seviyesi (%95) ile ifade edilen, standart sapma ve ölçme sayısına bağlı, gerçek ortalama değeri içine alan sınırların belirlediği aralıktır.

---

*Histolojik çalışmalar G.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalında gerçekleştirilmiştir. Yardımlarından dolayı Prof.Dr. Deniz ERDOĞAN ve Arş.Gör.Dr. Güleser ÇAĞLAR-GÖKTAŞ'a teşekkür ederiz.

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi; “SPSS® for Windows 16.0” paket programı kullanılarak “Mann-Whitney U” testi ile yapıldı. $p<0.05$ anlamlı fark olarak kabul edildi. $p<0.001$ ise; çok ileri düzeyde anlamlı fark var olarak kabul edildi.

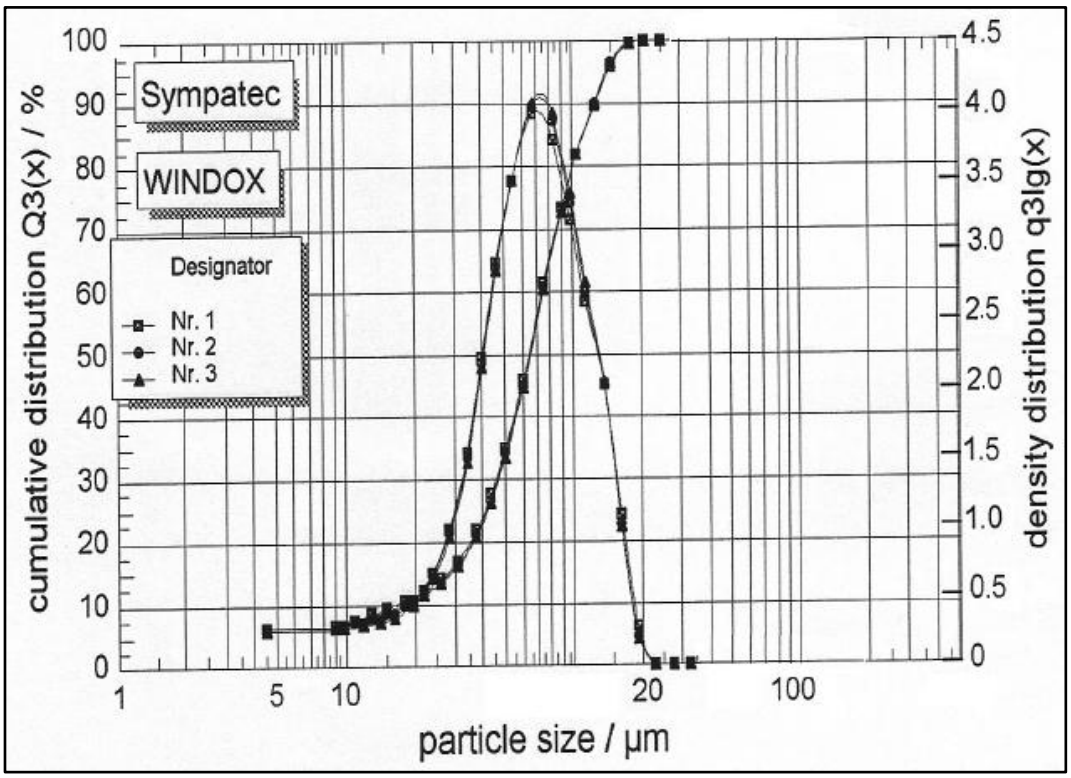
4. BULGULAR

4.1. İN VİTRO ÇALIŞMALAR

4.1.1. Etkin Madde (MEL) Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

4.1.1.1. Partikül Büyüklüğü Analizine Ait Bulgular

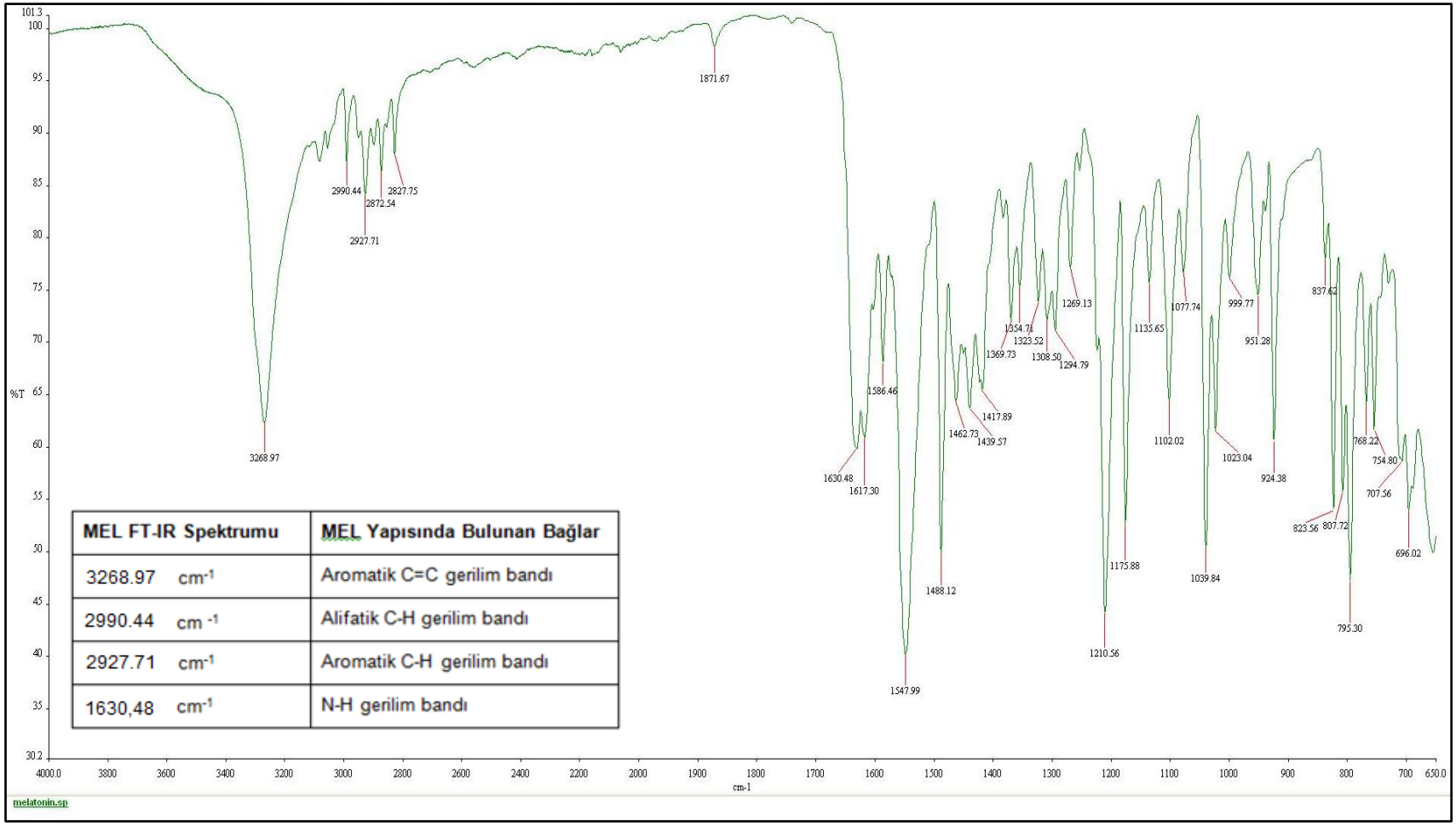
MEL'e ait partikül büyüklüğü dağılımı Şekil 16'da gösterilmiştir. Buna göre MEL'in ortalama partikül büyüklüğü 15.9± 0.2 µm olarak bulunmuştur.



Şekil 16. MEL'e ait partikül büyüklüğü dağılımı

4.1.1.2. IR Spektrumuna Ait Bulgular

Bölüm 3.2.1.2.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen analiz sonucunda elde edilen, MEL'e ait FT-IR spektrumu Şekil 17'de gösterilmiştir.



MEL FT-IR Spektrumu	MEL Yapısında Bulunan Bağlar
3268.97 cm^{-1}	Aromatik C=C gerilim bandı
2990.44 cm^{-1}	Alifatik C-H gerilim bandı
2927.71 cm^{-1}	Aromatik C-H gerilim bandı
1630,48 cm^{-1}	N-H gerilim bandı

Şekil 17. MEL'in FT-IR spektrumu

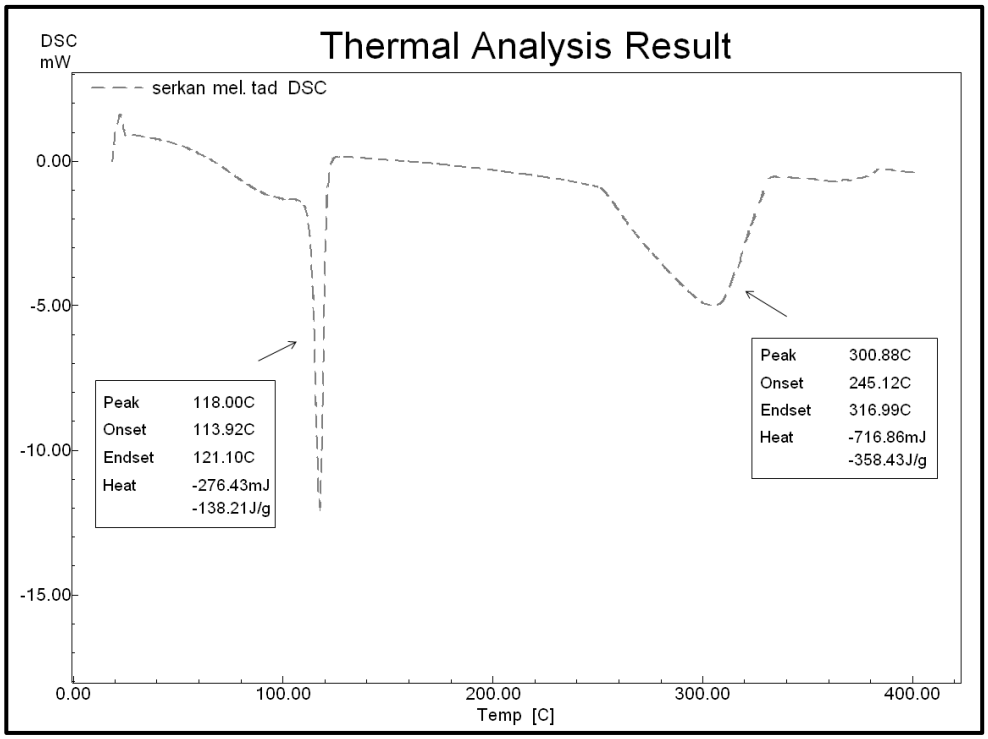
4.1.1.3. DSC Analizi ve MEL'in Erime Noktası Tayinine Ait Bulgular

Bölüm 3.2.1.2.3'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen analiz sonucunda elde edilen, MEL'e ait DSC termogramı Şekil 18'de verilmiştir. 118.0^{o}C'de görülen endotermik pik maddenin erime noktasını göstermektedir.

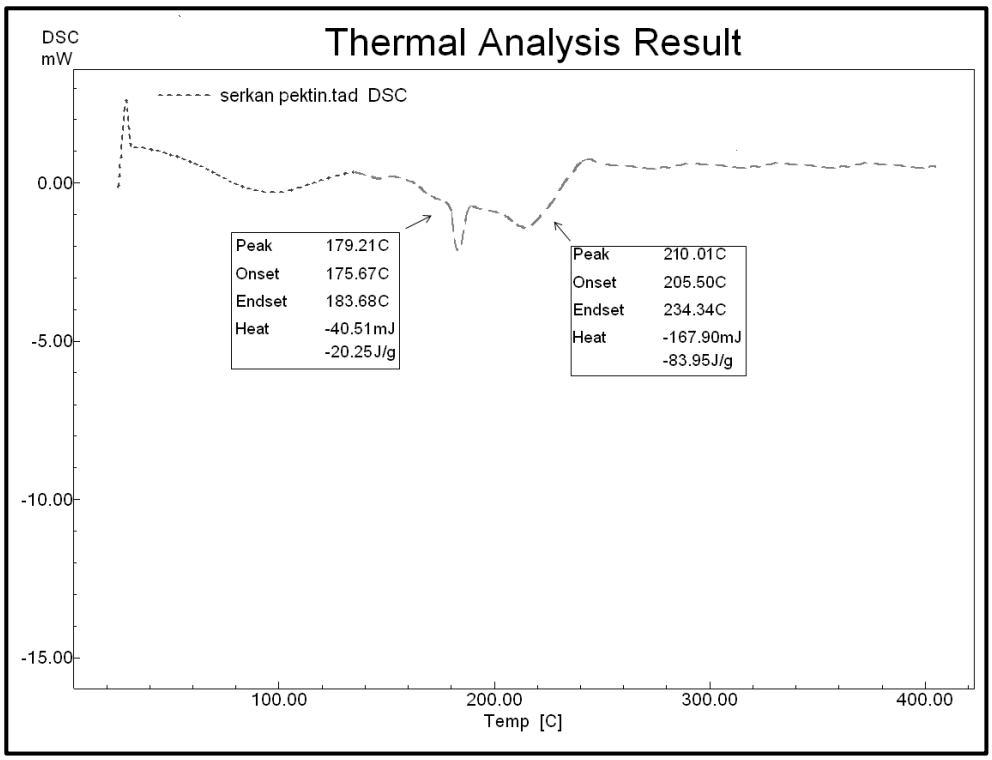
Formülasyonda kullanılan pektine (LM-104 AS-FS) ait termogram Şekil 19'da verilmiştir. 179.21^{o}C'de görülen pik molekülün yapısında yer alan karboksil grubunun (-COOH) CO_2 halinde çıkışını göstermektedir.

Pektin (LM-104 AS-FS) ile MEL'in 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı ise Şekil 20'de verilmiştir.

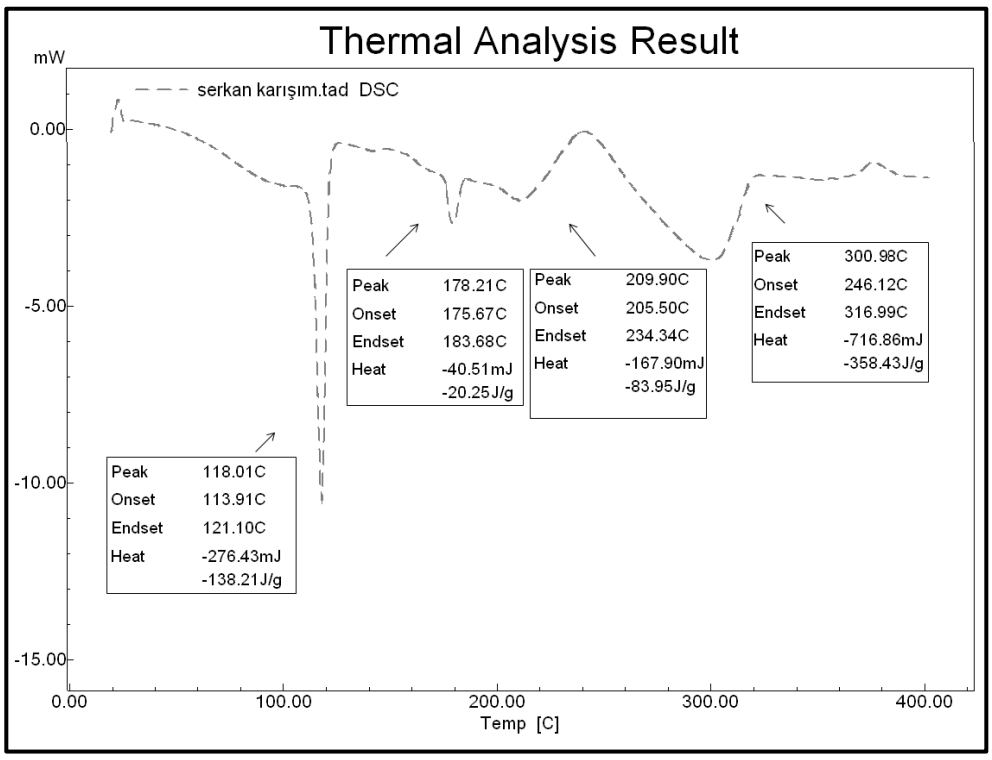
MEL'in, pektinin ve 1:1 oranındaki karışımlarının DSC termogramı ise Şekil 21'de verilmiştir.



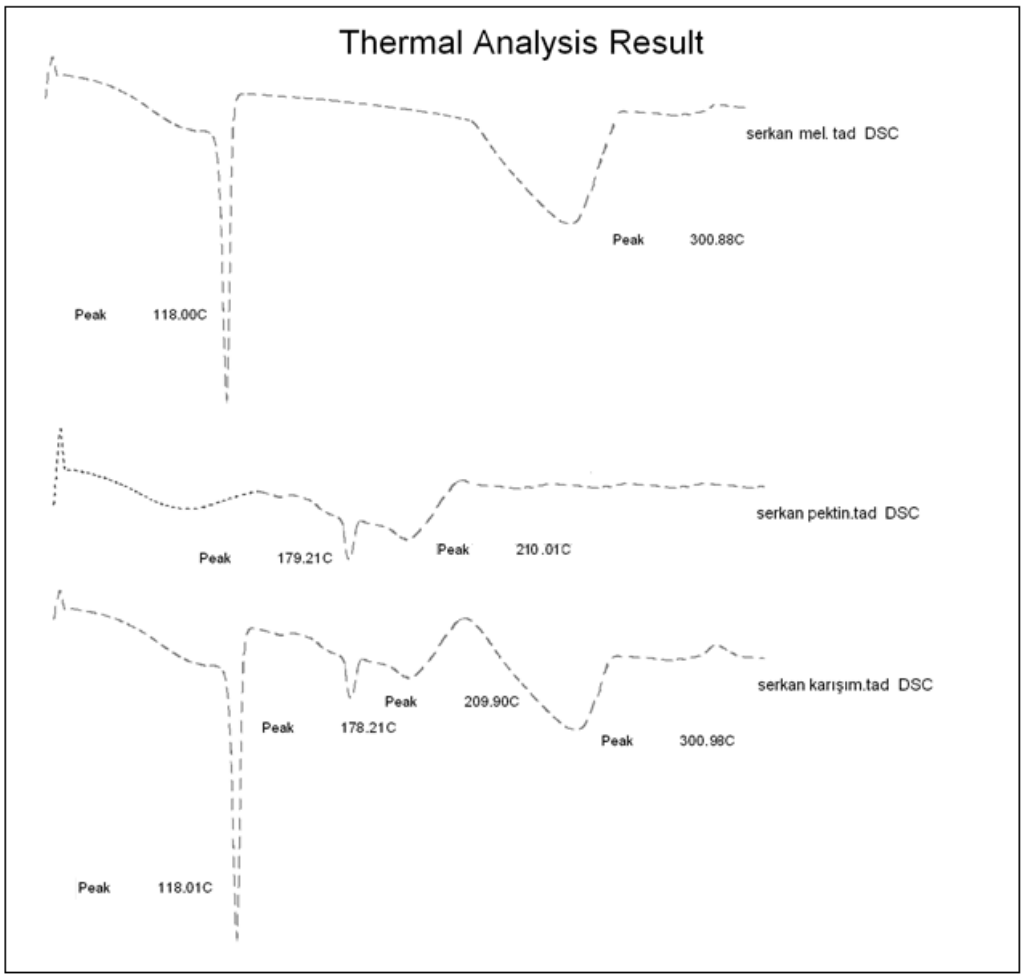
Şekil 18. MEL'e ait DSC termogramı



Şekil 19. LM-104 AS-FS DSC'e ait termogramı



Şekil 20. MEL + LM-104 AS-FS (1:1 oranındaki karışımı)'a ait DSC termogramı

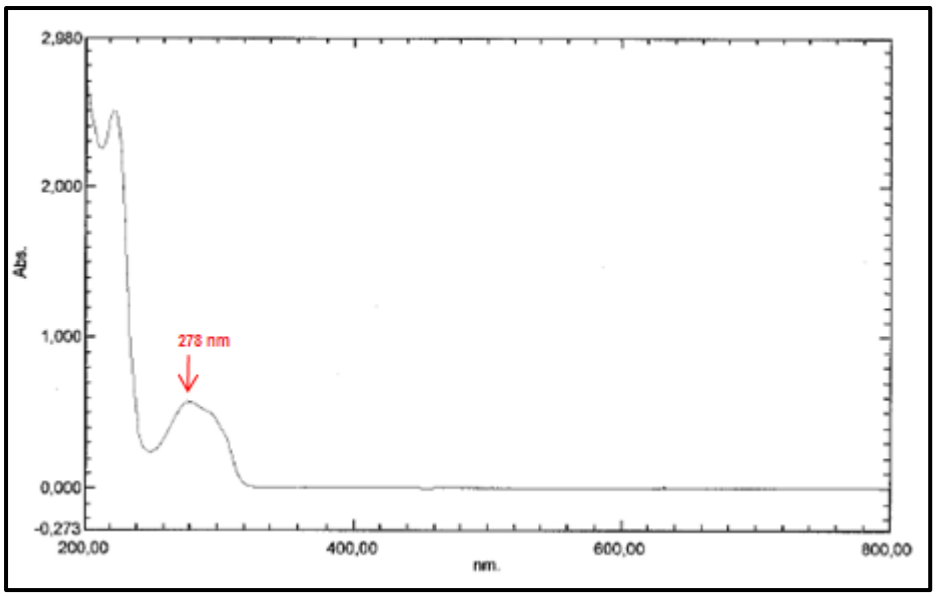


Şekil 21. MEL + LM-104 AS-FS +1:1 oranındaki karışıma ait DSC termogramı

4.1.1.4. MEL'in UV Spektrumuna Ait Bulgular

Bölüm 3.2.1.2.4'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen spektrofotometrik analiz ile MEL'in, pH 1.2, 6.8 ve 7.4'de maksimum absorbans verdiği dalga boyunun (λ_{max}) 278 nm olduğu belirlenmiştir.

MEL'in pH 1.2, 6.8 ve 7.4'de maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunu gösteren spektrum Şekil 22'de verilmiştir.



Şekil 22. MEL'in pH 1.2, 6.8 ve 7.4'de tamponunda UV spektrumu

4.1.1.5. MEL'in Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Standart Doğru Denklemlerinin Hazırlanması

Bölüm 3.2.1.2.5'de anlatıldığı gibi pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4'de gerçekleştirilen spektrofotometrik analizler; sonucunda elde edilen doğru denklemleri, eğim, kesişim, korelasyon katsayısı ve determinasyon katsayısı değerleri Tablo 21, 22 ve 23'de, ve bu elde edilen değerlere bağlı olarak oluşturulan kalibrasyon doğruları Şekil 23'de verilmiştir.

Tablo 21. MEL'in pH 1.2'deki kalibrasyon parametreleri (n=3)

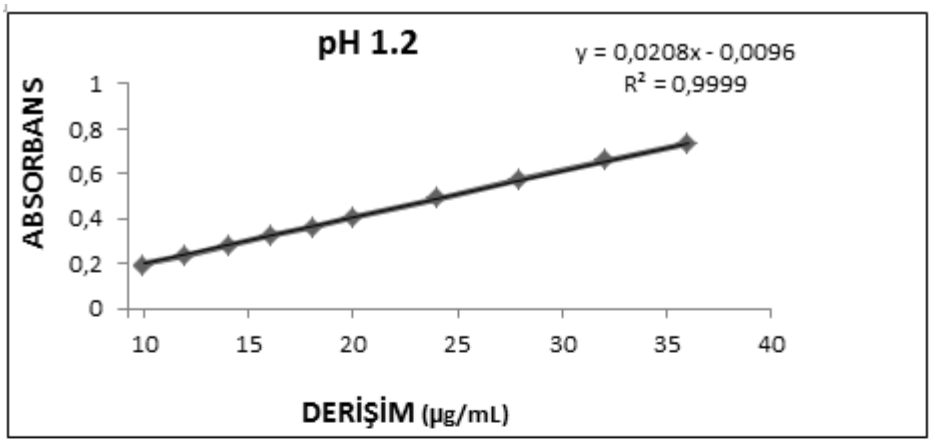
Doğru denklemi (y= mx+n)	y= 0.0208x - 0.0096
Eğim±GA	0.0208 ± 0.0011
Kesişim±GA	0.0096± 0.0017
Korelasyon Katsayısı (r)	0.999 ± 0.000
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0.999 ± 0.000

Tablo 22. MEL'in pH 6.8'deki kalibrasyon parametreleri (n=3)

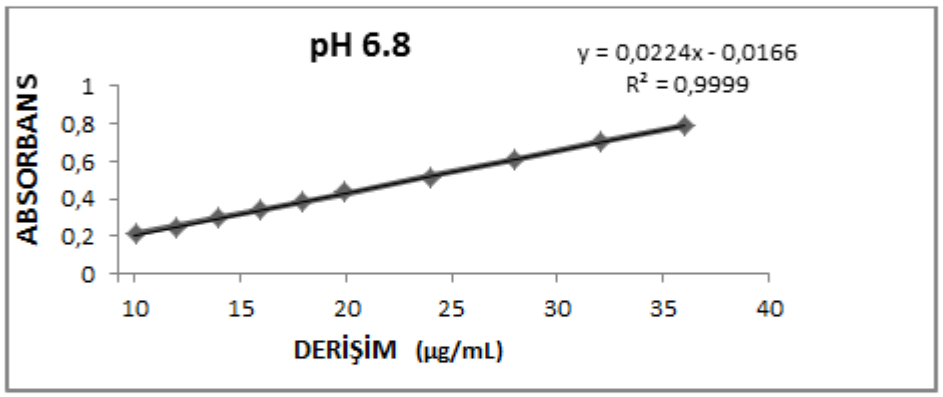
Doğru denklemi (y= mx+n)	y= 0.0224x - 0.0166
Eğim±GA	0.0224 ± 0.0015
Kesişim±GA	0.0166± 0.0027
Korelasyon Katsayısı (r)	0.999 ± 0.000
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0.999 ± 0.000

Tablo 23. MEL'in pH 7.4'deki kalibrasyon parametreleri (n=3)

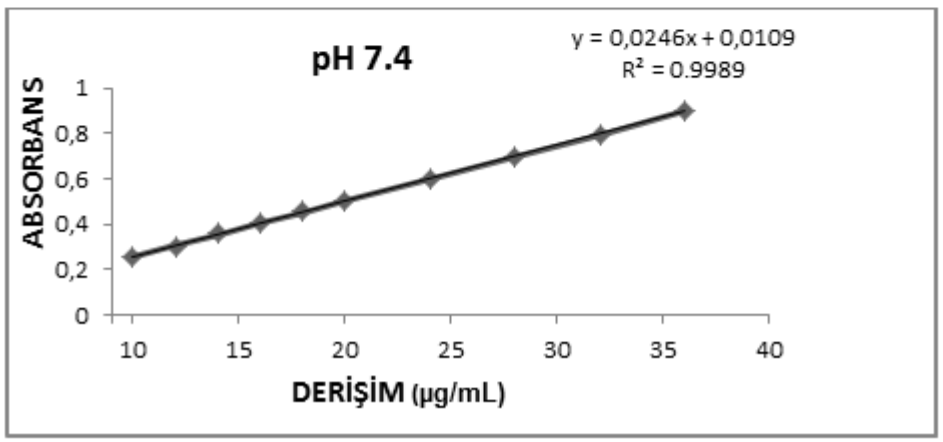
Doğru denklemi (y= mx+n)	y= 0.0246x + 0.0109
Eğim±GA	0.0246 ± 0.0014
Kesişim±GA	0.0106± 0.0021
Korelasyon Katsayısı (r)	0.999 ± 0.000
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0.999 ± 0.000



MEL'in pH 1.2 HCl tamponundaki kalibrasyon doğrusu



MEL'in pH 6.8 fosfat tamponundaki kalibrasyon doğrusu



MEL'in pH 7.4 fosfat tamponundaki kalibrasyon doğrusu

Şekil 23. pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4'de gerçekleştirilen analizler sonucunda elde edilen doğru kalibrasyon doğruları

4.1.1.6. MEL'in Spektrofotometrik Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

4.1.1.6.1. Doğrusallık

Hazırlanan standart derişimlere karşı, ölçülen ortalama absorbans değerleri grafiklendi. Daha sonra gerekli matematiksel işlemler yapılarak (doğrusal regresyon) standart doğru denklemi oluşturuldu. Bu denklemlerin determinasyon katsayısı hesaplandı.

Determinasyon katsayısı değerleri baz alınarak, pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4'de hesaplanan regresyon denklemlerinin doğrusallığı kanıtlanmıştır.

4.1.1.6.2. Doğruluk ve Geri Elde

Bu amaçla faktöriyel tasarıma ait P28 kullanıldı. Bölüm 3.2.1.2.6.2'de anlatıldığı gibi pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4'de gerçekleştirilen analizler sonucunda elde edilen, geri elde değerleri Tablo 24'da, Tablo 25'de ve Tablo 26'da verilmiştir.

Tablo 24. pH 1.2 HCl tamponu için MEL (%) geri elde (n=3)

	For. içindeki MEL Miktarı (mg)	Hesapla Bulunan Ortalama MEL Miktarı (mg)	Geri elde (%)	Standart Sapma	Bağıl S. Sapma (%)
% 80 MEL	40	40.7	102	0	0.531
% 100 MEL	50	50.4	101	1	1.02
% 120 MEL	60	60.4	101	0	0.387

Tablo 25. pH 6.8 fosfat tamponu için MEL (%) geri elde (n=3)

	For. içindeki MEL Miktarı (mg)	Hesapla Bulunan Ortalama MEL Miktarı (mg)	Geri elde (%)	Standart Sapma	Bağıl S. Sapma (%)
% 80 MEL	40	40.5	101	0	0.344
% 100 MEL	50	50.5	101	1	1.24
% 120 MEL	60	60.6	101	0	0.325

Tablo 26. pH 7.4 fosfat tamponu için MEL (%) geri elde (n=3)

	For. içindeki MEL Miktarı (mg)	Hesapla Bulunan Ortalama MEL Miktarı (mg)	Geri elde (%)	Standart Sapma	Bağıl S. Sapma (%)
% 80 MEL	40	40.6	101	0	0.893
% 100 MEL	50	50.4	101	1	1.11
% 120 MEL	60	60.7	101	0	0.307

pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4'de hesaplanan % bağıl standart sapma değerlerinin tamamı %2'den küçük bulunmuştur.

4.1.1.6.3. Tekrarlanabilirlik

Bölüm 3.2.1.2.6.3.1'de anlatıldığı gibi pH 1.2, 6.8 ve 7.4'de gerçekleştirilen deneyiçi tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular Tablo 27'de verilmiştir.

Tablo 27. Deneyiçi tekrarlanabilirlik sonuçları (n=3)

	pH 1.2	pH 6.8	pH 7.4
	MEL Miktarı (µg/mL)	**MEL Miktarı (µg/mL)**	**MEL Miktarı (µg/mL)**
1.Ölçüm	20.0	19.4	19.7
2.Ölçüm	19.8	19.5	19.4
3.Ölçüm	19.7	19.5	19.5
4.Ölçüm	19.8	19.5	19.5
5.Ölçüm	20.1	19.3	19.4
6.Ölçüm	20.1	19.4	19.5
7.Ölçüm	19.8	19.7	19.4
8.Ölçüm	19.9	19.5	19.5
9.Ölçüm	19.6	19.5	19.5
10.Ölçüm	20.1	19.4	19.4
Ortalama	19.9	19.5	19.5
Standart Sapma	0.2	0.1	0.1
% Bağıl Standart Sapma	0.901	0.544	0.472

Bölüm 3.2.1.2.6.3.2'de anlatıldığı gibi pH 1.2, 6.8 ve 7.4'de gerçekleştirilen deneylerarası tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular ise Tablo 28'de verilmiştir.

Yapılan tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucunda elde edilen bulgulara göre MEL'in miktarının tespitinde kullanılan analitik yöntem pH 1.2, 6.8 ve 7.4'de deneyiçi ve deneylerarası tekrarlanabilir bulunmuştur.

Tablo 28. Deneylerarası tekrarlanabilirlik sonuçları (n=3)

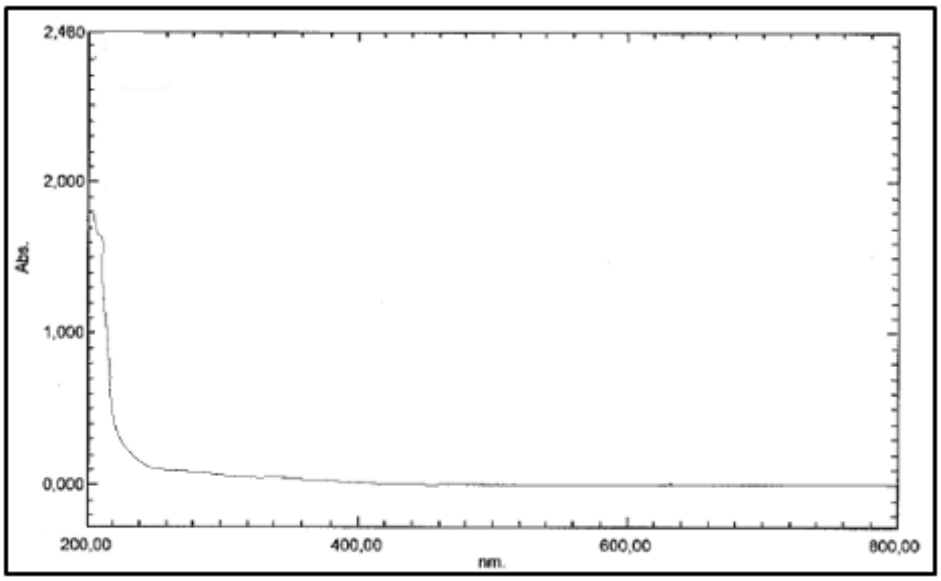
	pH 1.2	pH 6.8	pH 7.4
1.Gün Ort MEL Miktarı (µg/mL)	19.9	19.9	19.9
2.Gün Ort MEL Miktarı (µg/mL)	19.6	19.7	19.7
3.Gün Ort MEL Miktarı (µg/mL)	19.6	19.7	19.7
Ort MEL Miktarı (µg/mL)	19.7	19.8	19.8
Standart Sapma	0.2	0.1	0.1
% Bağıl Standart Sapma	0.880	0.584	0.584

4.1.1.6.4. Özgünlük, Seçicilik

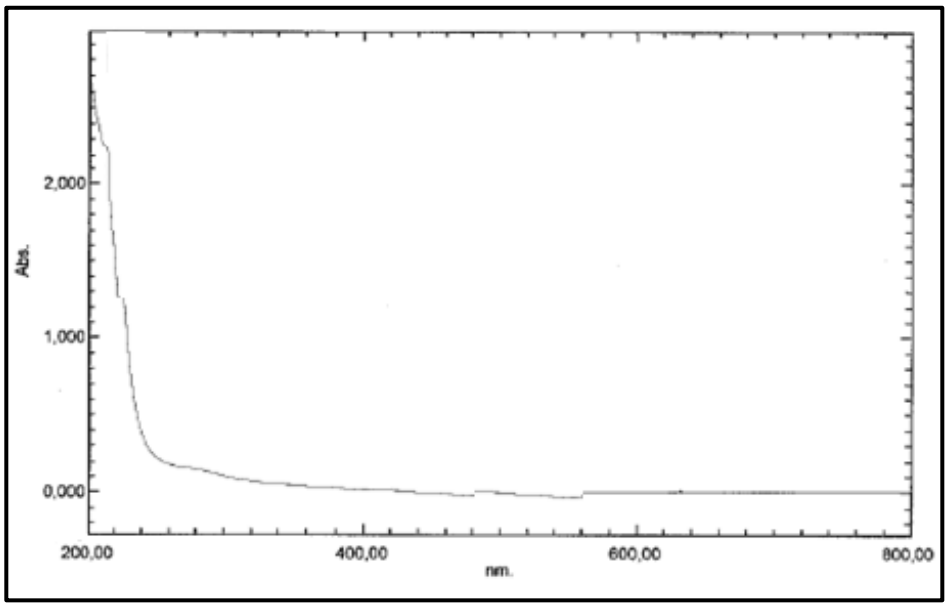
Spektrofotometrik miktar tayini yönteminin sadece analiz edilmesi istenen etkin maddeyi analiz ettiğini kanıtlamak için, formülasyona giren melatonin dışındaki bileşenler 200-400 nm dalga boyları arası taranarak spektrumları incelendi.

Bu yardımcı maddelerin pH 1.2, 6.8 ve 7.4'de gerçekleştirilen spektrofotometrik analizlerde herhangi bir absorbans piki vermediği görüldü. Kullanılan analitik yöntemin etkin maddeye (MEL) özgü olduğu gösterilmiştir.

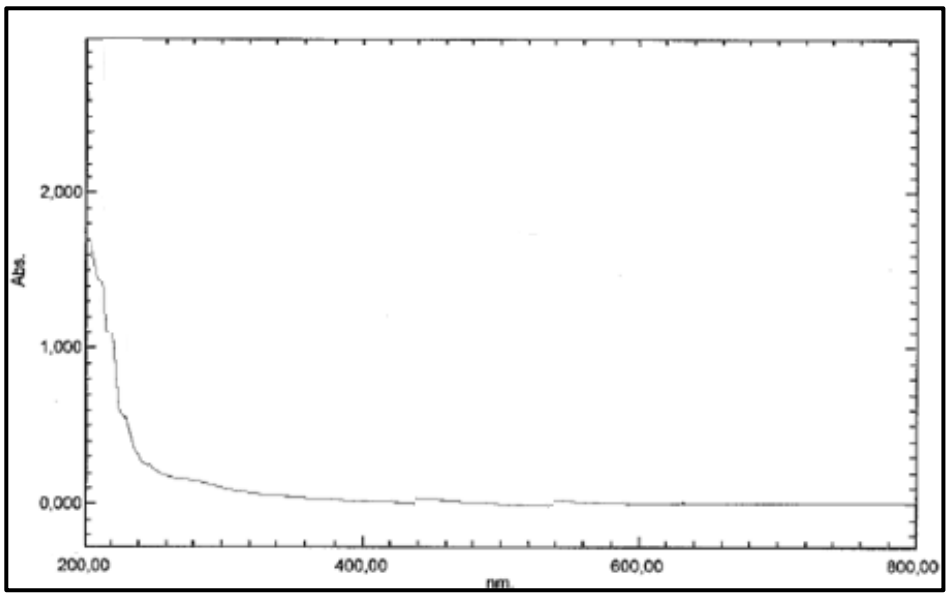
Formülasyonda kullanılan pektinin, salım çalışmalarında kullanılan Pectinex®'in ve MEL içermeyen nanopartikül formülasyonunun spektrumları Şekil 24, 25 ve 26'da verilmiştir.



Şekil 24. Pektinin (LM-104 AS-FS) UV spektrumu



Şekil 25. Pectinex®'in UV spektrumu

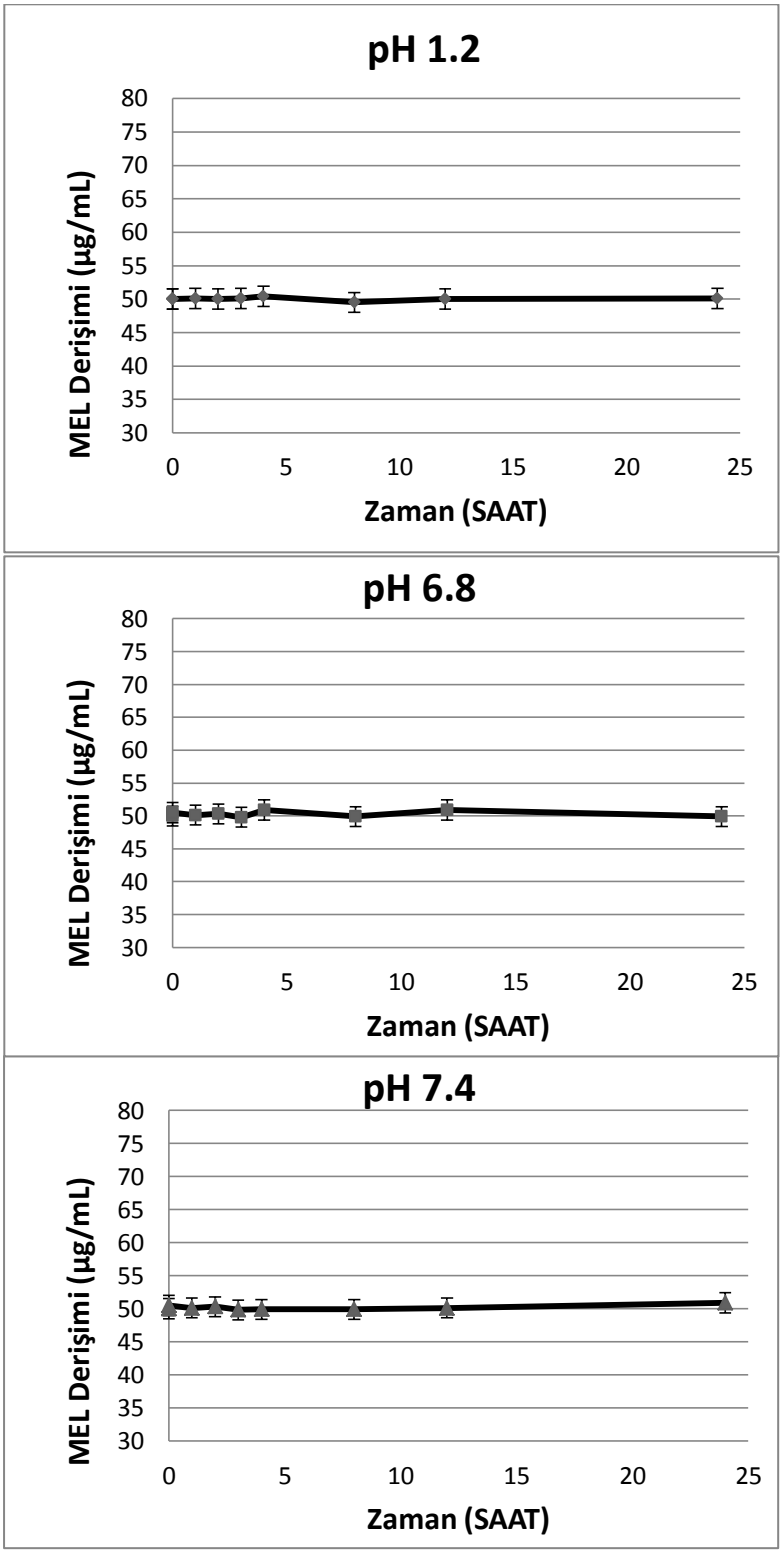


Şekil 26. MEL içermeyen nanopartikül formülasyonunun UV spektrumu

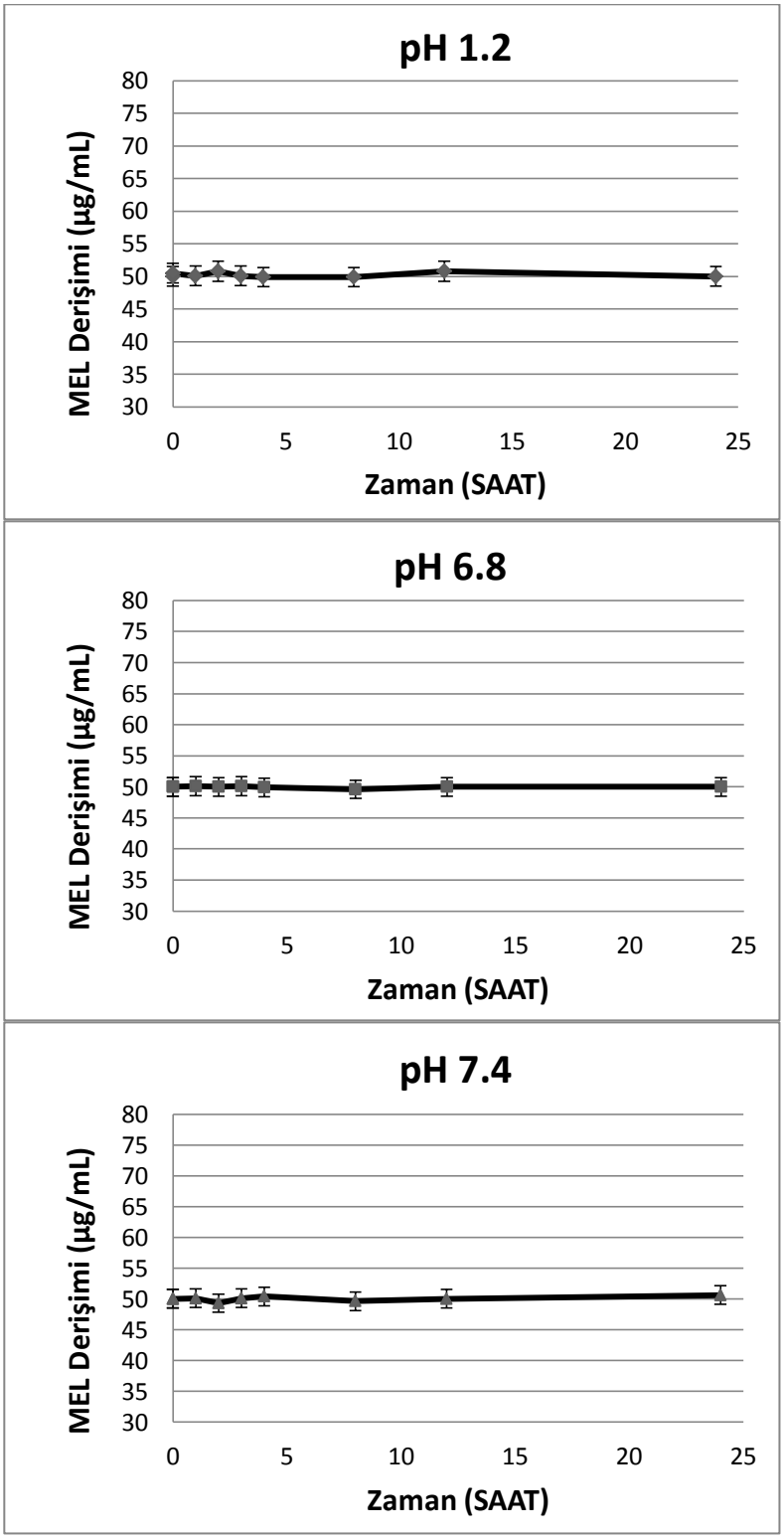
4.1.1.6.5. Stabilite

Bölüm 3.2.1.2.6.5'de anlatıldığı gibi MEL'in, salım hızı çalışmaları yapılacak tamponlardaki (pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4) stabilitesini incelemek için yapılan deneyler sonucunda, okunan absorbans değerlerinde anlamlı bir fark görülmemiştir.

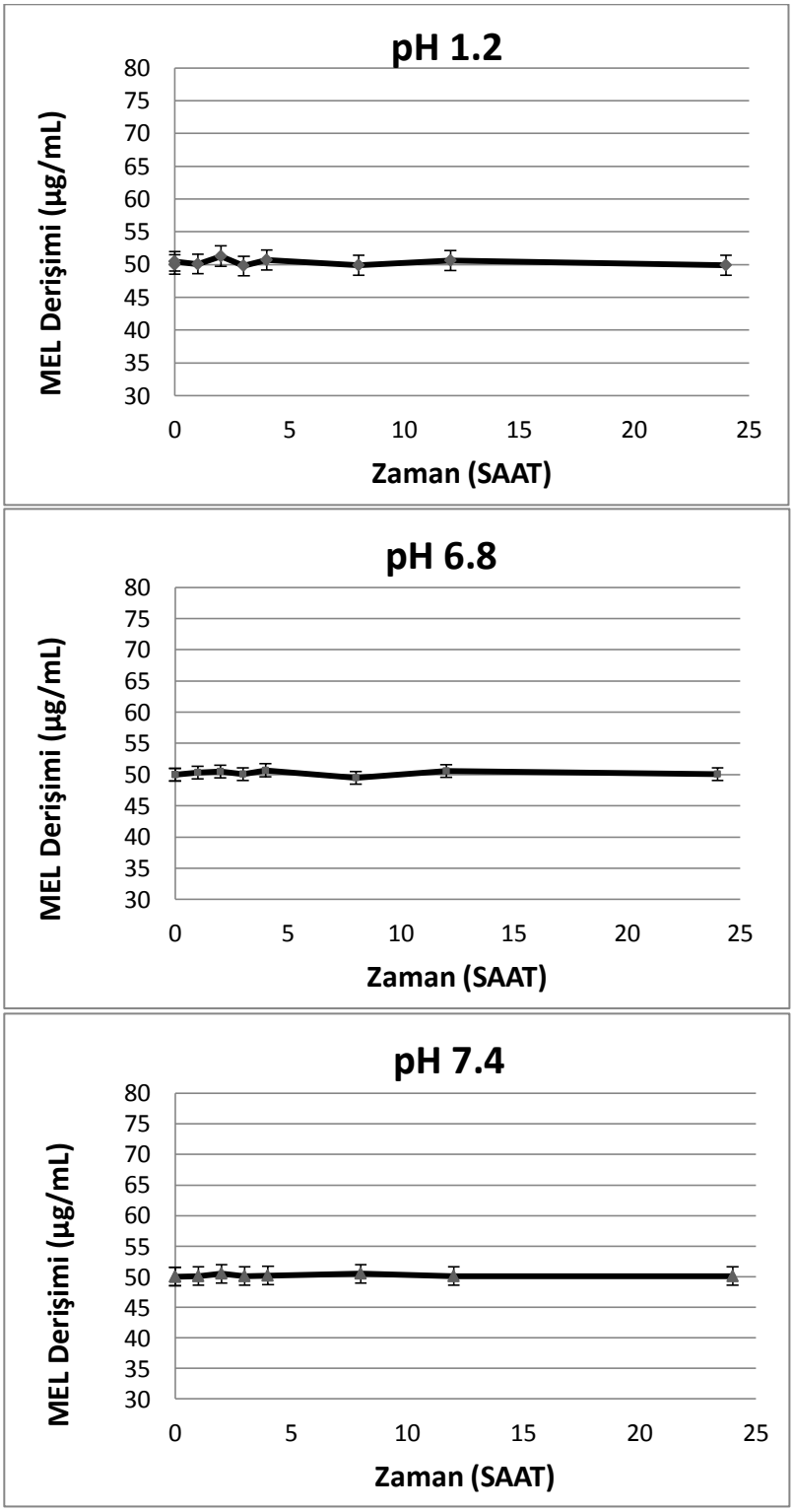
pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4 tamponlarında, oda sıcaklığında gün ışığına maruz bırakılarak, gün ışığından korunarak ve 37^{o}C'de etüvde, 24 saat süreyle izlenen zaman/derişim grafikleri Şekil 27'de, Şekil 28'de Şekil 29'da verilmiştir.



Şekil 27. 25^{o}C'de, pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4 tamponlarında gün ışığına maruz bırakılan MEL'in stabilitesi (n=3)



Şekil 28. 25^{O}C'de, pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4 tamponlarında gün ışığından korunan MEL'in stabilitesi (n=3)



Şekil 29. 37^{o}C'de, pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4 tamponlarında MEL'in stabilitesi (n=3)

4.1.1.7. MEL'in pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4 Tamponlarında Çözünürlüğünün Belirlenmesi

Bölüm 3.2.1.2.7'de anlatıldığı gibi MEL'in, salım hızı çalışmaları yapılacak tamponlardaki (pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4) çözünürlüğünü incelemek için yapılan deneyler sonucunda, elde edilen veriler Tablo 29'da verilmiştir.

Tablo 29. MEL'in pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4 ortamlarındaki çözünürlük değerleri (mg/mL) (ORT±GA) (n=3)

ORTAM	ÇÖZÜNÜRLÜK	% BAĞIL SAPMA
pH 1.2 tamponu	1.93±0,01	1.00
pH 6.8 tamponu	2.26±0,01	0.724
pH 7.4 tamponu	2.61±0.02	1.00

4.1.2. Önformülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

4.1.2.1. Formülasyonda Kullanılacak Pektin Tipine Karar Verilmesi

Tablo 10'da verilen formülasyon parametreleri kullanılarak, makro boyutlarda çalışılmış ve elde edilen veriler ışığında tez çalışmamızda kullanılacak pektin tipine karar verilmiştir.

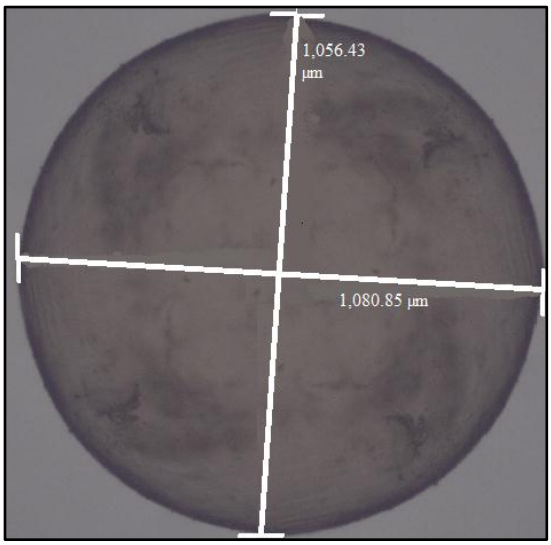
Herbstreith&Fox® firmasından temin edilen Classic AU 701, Classic CU 902 ve Classic CU 701 kodlu ürünler, farklı zamanlarda yapılan üç farklı denemede peristaltik pompa sisteminin ucunda yer alan 30 G'luk iğnenin ucunu tıkamıştır. Bundan dolayı belirtilen üç pektin türüyle partikül oluşturulamamıştır.

Geride kalan dört farklı pektin (Amid CU 025, Amid CU 020, LM 101 AS ve LM 104 AS-FS) ile çalışılmaya devam edilerek, Tablo 30'daki veriler elde edilmiştir.

Tablo 30. Farklı pektin türleriyle oluşturulan partiküllerin büyüklüğü, MEL yükleme kapasitesi ve 30 G'luk iğnenin ucunu tıkama durumu (n=3)

	Amid CU 025	**Amid CU 020**	**LM 101 AS**	**LM 104 AS-FS**
Partikül büyük. (mm) (ORT±GA)	2.2±0.2	2.4±0.1	2.3±0.2	1.1±0.1
MEL yükleme kapasitesi (%) (ORT±GA)	68.5±1.1	67.4±1.7	73.6±2.1	89.8±1.8
30 G'luk iğnenin ucunu tıkama durumu	++	+	-	-

Tablo 11'de verilen formülasyon parametreleri ve LM 104 AS-FS kullanılarak elde edilen mikropartikülün ışık mikroskopu ile elde edilen görüntüsü Şekil 30'da verilmiştir.



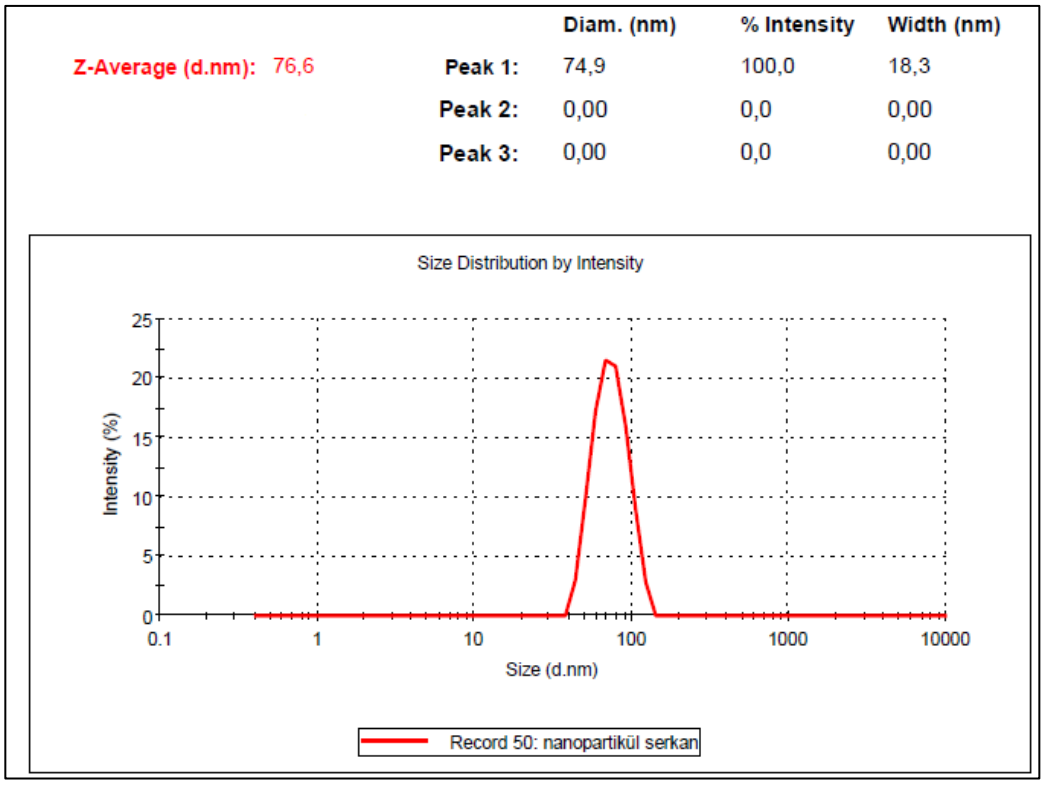
Şekil 30. LM 104 AS-FS ile oluşturulan mikropartikülün ışık mikroskopu ile elde edilen görüntüsü

Farklı pektin türleriyle oluşturulan partiküllerin ortalama büyüklüğü, MEL yükleme kapasitesi ve peristaltik pompanın ucundaki 30 G'luk iğnenin ucunu tıkama durumu değerlendirildiğinde, CP Kelco®'dan temin edilen *LM 104 AS-FS* kodlu pektin türünün diğer pektin türlerine göre daha iyi bir performans göstermesi sonucunda, tez çalışmamıza bu pektin türüyle devam edilmesine karar verilmiştir.

4.1.3. Nanopartiküllerin Karekterizasyonuna Ait Bulgular

Bölüm 3.2.1.5'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen, faktöriyel tasarıma ait 32 farklı formülasyonun ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, MEL yüklenme kapasitesi ve pH değerleri Tablo 31'de verilmiştir.

Faktöriyel tasarımdan optimum formülasyon olarak seçilen *P28*'in partikül büyüklüğü dağılımı Şekil 31'de verilmiştir.



Şekil 31. P28'e ait partikül büyüklüğü dağılımı

Tablo 31. Faktöriyel tasarıma ait formülasyonların ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel, MEL yüklenme kapasitesi ve pH değerleri (n=3)

	Part. Büyük. (nm) (ORT±GA)	Poli. ind. (ORT±GA)	Zeta Potan. (mV) (ORT±GA)	MEL Yük. Kap. (%) (ORT±GA)	pH Değeri (ORT±GA)
P1	192.7±3.2	0.203±0.034	-4.83±0.35	80.7±1.6	6.5±0.1
P2	300.3±4.3	0.761±0.067	-8.43±0.95	88.3±1.5	6.6±0.2
P3	204.3±5.2	0.853±0.101	-9.62±0.86	83.9±0.1	6.6±0.1
P4	146.7±3.2	0.784±0.034	-9.37±0.73	81.7±0.7	6.5±0.3
P5	314.0±5.5	0.798±0.084	-10.17±0.99	82.2±0.6	6.6±0.2
P6	289.7±5.2	0.874±0.017	-10.49±0.83	83.1±0.3	6.5±0.3
P7	123.3±4.3	0.654±0.185	-11.64±0.87	89.9±0.4	6.5±0.2
P8	180.3±4.8	0.875±0.135	-12.42±0.74	91.0±0.9	6.6±0.2
P9	260.0±3.6	0.245±0.118	-13.14±1.65	80.9±0.6	6.6±0.3
P10	154.7±8.3	0.789±0.236	-16.14±1.21	83.7±0.6	6.6±0.2
P11	323.7±3.2	0.348±0.219	-17.50±0.83	86.3±1.9	6.6±0.6
P12	241.3±1.2	0.759±0.202	-15.13±0.81	88.6±0.7	6.5±0.6
P13	134.7±4.3	0.687±0.185	-17.18±1.33	87.4±1.2	6.5±0.2
P14	272.3±1.2	0.497±0.152	-17.20±2.45	84.2±0.4	6.5±0.1
P15	302.7±2.4	0.571±0.067	-14.46±2.06	81.7±0.9	6.6±0.2
P16	249.7±3.2	0.569±0.169	-5.51±0.90	82.6±0.7	6.6±0.6
P17	113.0±5.5	0.689±0.185	-11.15±1.52	88.7±1.0	6.5±0.1
P18	93.3±4.3	0.697±0.152	-9.13±1.02	81.9±1.0	6.5±0.1
P19	231.7±1.2	0.675±0.118	-8.66±2.89	88.4±1.2	6.6±0.1
P20	64.3±3.2	0.658±0.101	-18.24±1.98	88.3±1.8	6.6±0.2
P21	124.0±2.1	0.791±0.135	-15.89±4.71	90.9±0.6	6.5±0.1
P22	211.3±1.2	0.711±0.101	-6.83±1.27	91.7±0.3	6.5±0.1
P23	41.3± 3.2	0.469±0.135	-13.17±2.25	90.7±0.7	6.6±0.2
P24	102.7±5.2	0.478±0.118	-8.69±1.21	92.2±0.4	6.5±0.1
P25	180.3±4.8	0.544±0.152	-16.31±4.34	86.6±2.0	6.6±0.2
P26	71.3±3.2	0.207±0.067	-15.57±5.93	88.4±0.9	6.6±0.2
P27	241.0±3.6	0.321±0.101	-7.58±0.23	87.8±0.4	6.6±0.6
P28	75.3±3.3	0.109±0.067	-24.24±1.03	94.4±0.3	6.8±0.2
P29	51.3±3.2	0.245±0.068	-10.34±2.07	85.9±0.9	6.6±0.2
P30	187.3±6.3	0.348±0.135	-10.78±1.06	90.4±0.6	6.5±0.1
P31	219.0±4.1	0.478±0.152	-16.89±4.3	90.5±0.6	6.5±0.1
P32	168.7±1.2	0.578±0.202	-18.31±1.88	91.4±0.7	6.5±0.1

4.1.4. İn Vitro Salım Çalışmalarına Ait Bulgular

4.1.4.1. Faktöriyel Tasarıma Ait Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Salım Çalışmalarına Ait Bulgular

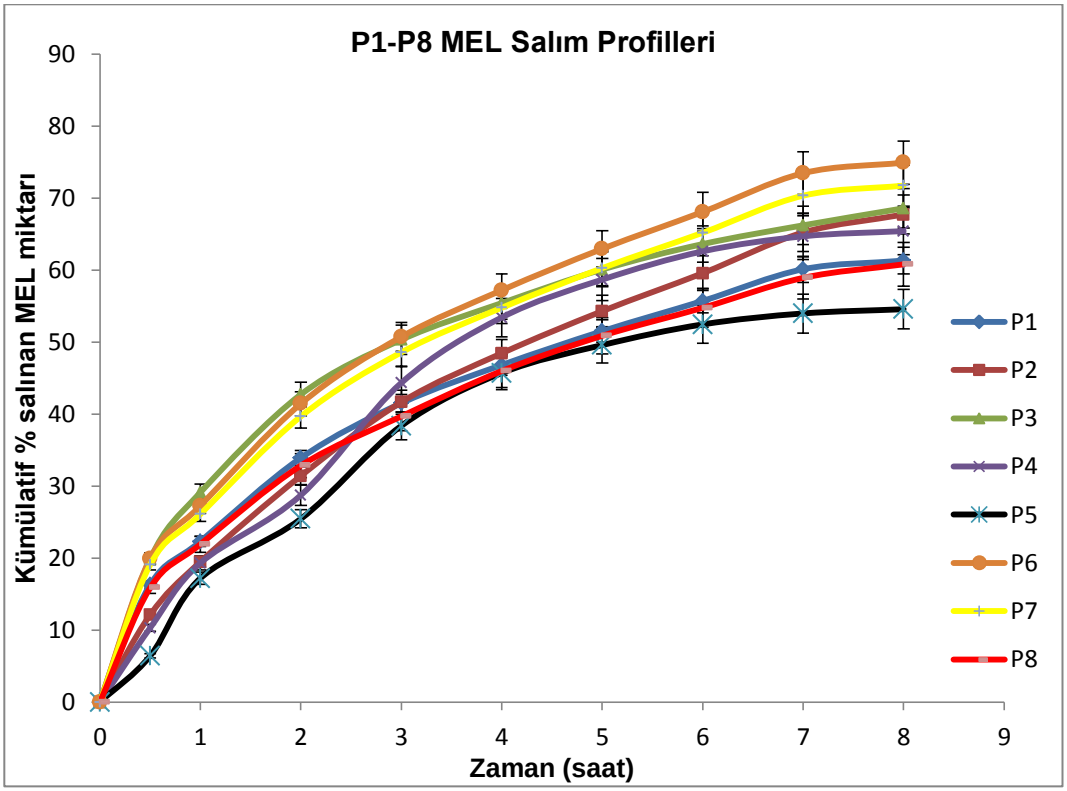
Faktöriyel tasarıma ait 32 farklı nanopartikül formülasyonu kullanılarak, Bölüm 3.2.1.6'da anlatıldığı gibi gerçekleştirilen MEL salım çalışmalarında, pH 6.8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif MEL miktarı değerleri Tablo 32'de verilmiştir.

MEL salım çalışmaları sonucunda elde edilen salım profilleri ise Şekil 32-35'de verilmiştir.

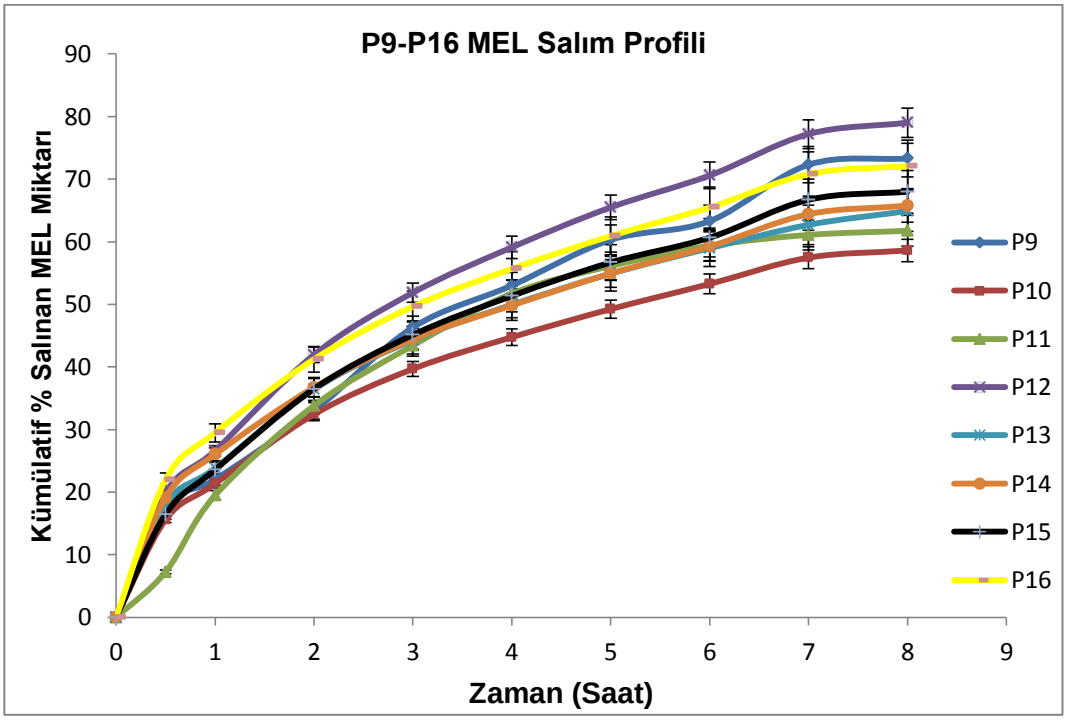
Faktöriyel tasarıma ait 32 farklı nanopartikül formülasyonundan optimum formülasyon olarak seçilen P28'in, pH 6.8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda yapısında yer alan MEL'in % 84.0±0.7'ü salınmıştır.

Tablo 32. pH 6.8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif MEL miktarı değerleri (n=6)

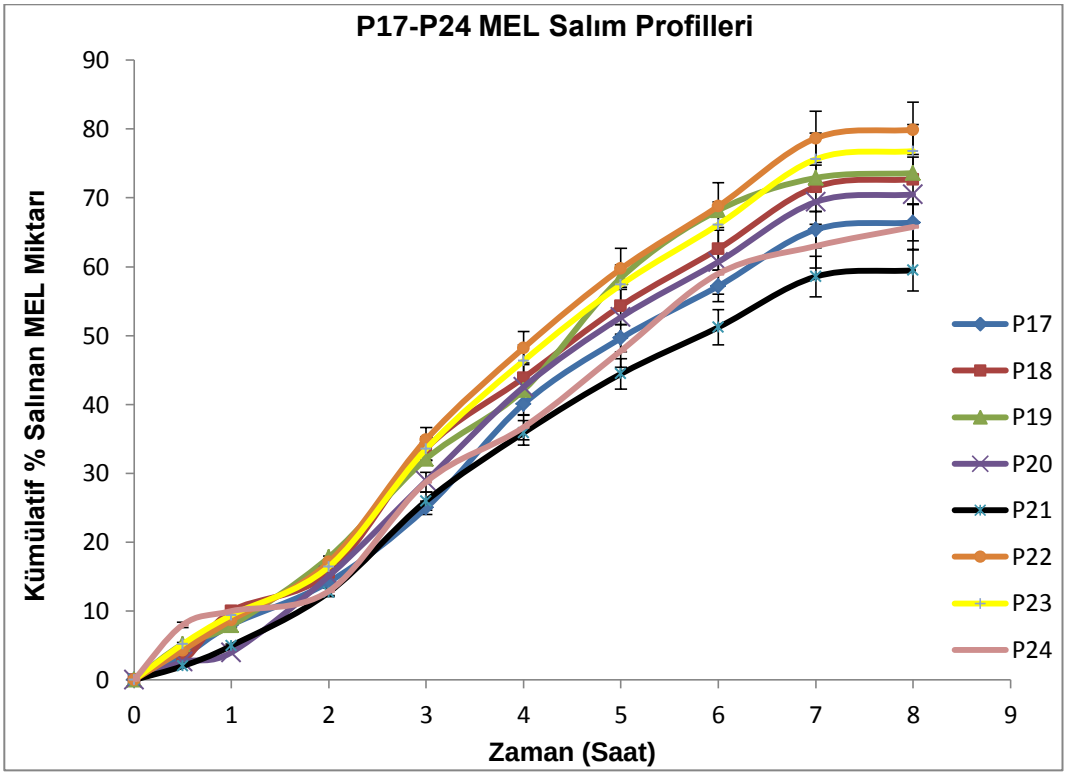
	Yığılmalı MEL salımı (%) (ORT±GA)
P1	61.3±0.2
P2	67.7±0.6
P3	68.6±0.3
P4	65.4±0.7
P5	54.5±0.5
P6	74.9±0.8
P7	71.8±1.1
P8	60.8±0.1
P9	72.6±0.8
P10	58.6±1.3
P11	61.7±0.2
P12	79.0±0.3
P13	64.9±0.4
P14	65.8±0.1
P15	68.0±0.9
P16	72.1±0.5
P17	66.4±0.8
P18	72.7±1.0
P19	73.6±0.5
P20	70.5±1.5
P21	59.5±0.4
P22	79.9±0.3
P23	76.8±0.6
P24	65.8±0.9
P25	77.7±0.7
P26	63.6±0.9
P27	66.7±0.1
P28	84.0±0.7
P29	69.9±1.4
P30	70.8±0.2
P31	73.0±0.1
P32	77.1±0.3



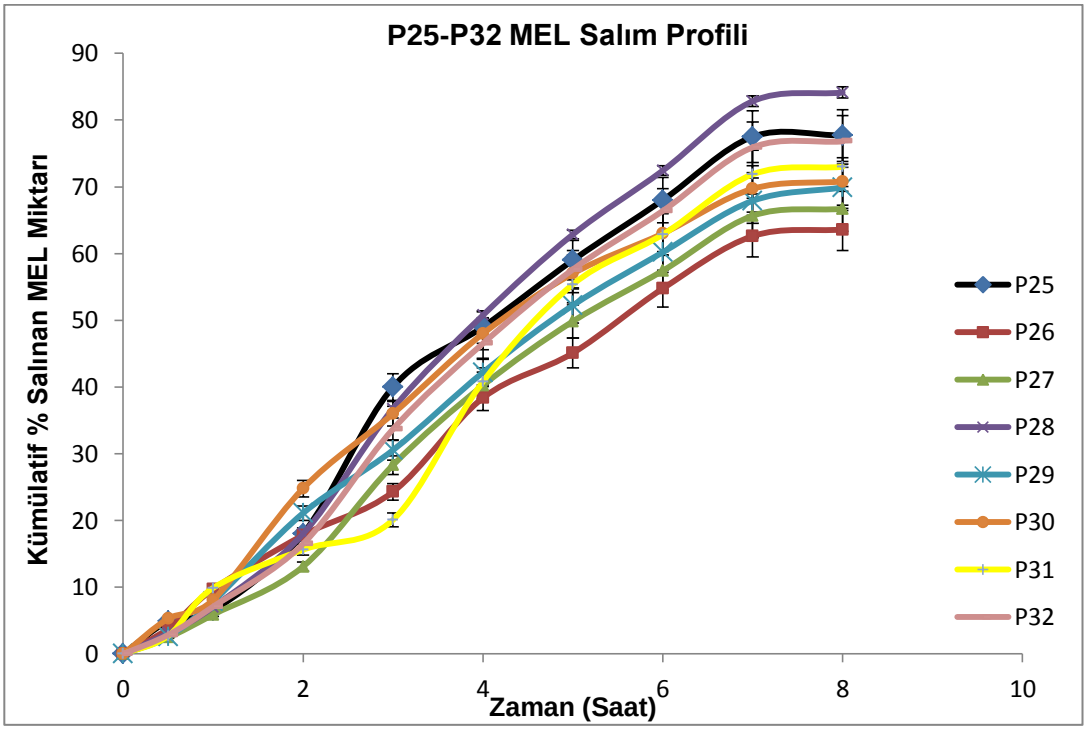
Şekil 32. P1-P8 formülasyonlarının MEL salım profilleri (n=6)



Şekil 33. P9-P16 formülasyonlarının MEL salım profilleri (n=6)



Şekil 34. P17-P24 formülasyonlarının MEL salım profilleri (n=6)



Şekil 35. P25-P32 formülasyonlarının MEL salım profilleri (n=6)

4.1.5. Pythia® Kullanılarak Yapay Sinir Ağının Oluşturulmasına Ait Bulgular

Bölüm 3.2.1.7'de anlatıldığı gibi Pythia® kullanılarak formülasyon parametreleri ile formülasyonların ortalama partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, polidispersite indeksi değerleri ve formülasyonlardan pH 6,8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif etkin madde miktarı arasındaki ilişkileri inceleyebilmek amacıyla bir yapay sinir ağı modeli oluşturulmuştur.

Oluşturduğumuz yapay sinir ağı modelinde Pythia®, en iyi uyumu 1. seviyede 5, 2. seviyede 8, 3. seviyede 10, 4. seviyede 9 ve 5. seviyede 1 nöron ile çalışarak vermiştir (Şekil 14).

4.1.5.1. Pythia® Kullanılarak Matematiksel Olarak Elde Edilen Veriler İle Laboratuvar Ortamında Elde Edilen Deneysel Verilerin Karşılaştırılmasına Ait Bulgular

4.1.5.1.1. Partikül Büyüklüğüne Ait Bulgular

Faktöriyel tasarıma ait 32 farklı formülasyona ait yapılan ölçümler sonucunda elde edilen, ortalama partikül büyüklüğü (Tablo 31) değerleri ile formülasyon parametreleri Pythia® (YSA) programına girildiğinde, yapay sinir ağı programı bu parametrelerle partikül büyüklüğü arasında çok anlamlı bir matematiksel ilişki ($r^2 > 0.950$) tanımlamıştır.

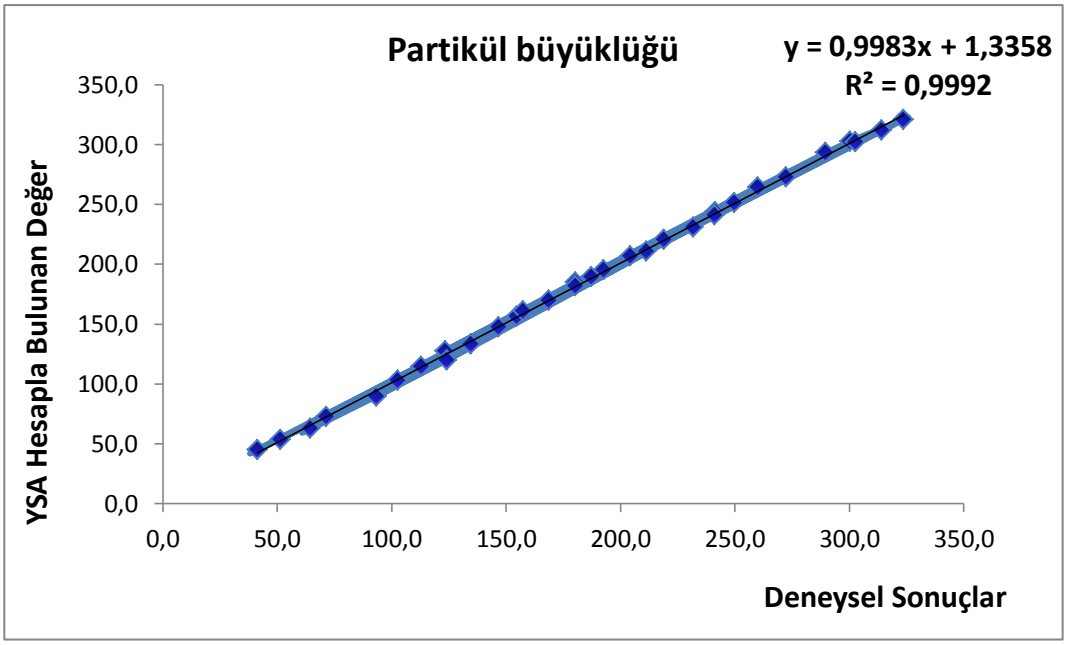
Laboratuvar ortamında, deneysel olarak elde edilen ortalama partikül büyüklüğü sonuçları ile Pythia® (YSA) programı kullanılarak matematiksel hesaplama sonucu elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Sisteme girilen formülasyon parametrelerinin laboratuvarda kullanılması ile elde edilen formülasyona ait partikül büyüklüğü değeri, sistemin önerdiği değerle çok yakın bulunmuştur (Tablo 33).

Tablo 33. Deneysel Olarak Elde Edilen ve Pythia®(YSA)'nın Matematiksel Olarak Verdiği Partikül Büyüklüğüne Ait Bulgular (n=3)

	Deneysel Olarak Elde Edilen Partikül Büyüklüğü (nm) (ORT)	Pythia® (YSA)'nın Verdiği Partikül Büyüklüğü (nm)
P1	192.7	195.1
P2	300.3	302.4
P3	204.3	206.8
P4	146.7	147.6
P5	314.0	311.9
P6	289.7	293.1
P7	123.3	127.7
P8	180.3	185.0
P9	260.0	264.5
P10	154.7	156.5
P11	323.7	320.7
P12	241.3	243.7
P13	134.7	133.5
P14	272.3	272.9
P15	302.7	302.0
P16	249.7	251.3
P17	113.0	114.5
P18	93.3	89.5
P19	231.7	230.7
P20	64.3	63.1
P21	124.0	119.8
P22	211.3	210.8
P23	41.3	45.3
P24	102.7	102.9
P25	180.3	181.8
P26	71.3	72.8
P27	241.0	241.0
P28	75.3	76.5
P29	51.3	53.5
P30	187.3	189.6
P31	219.0	220.6
P32	168.7	169.9

Laboratuvar ortamında, deneysel olarak elde edilen ortalama partikül büyüklüğü sonuçları ile Pythia® (YSA) programı kullanılarak matematiksel hesaplama sonucu elde edilen sonuçlar arasındaki regresyonel ilişki grafik olarak Şekil 36'da verilmiştir.

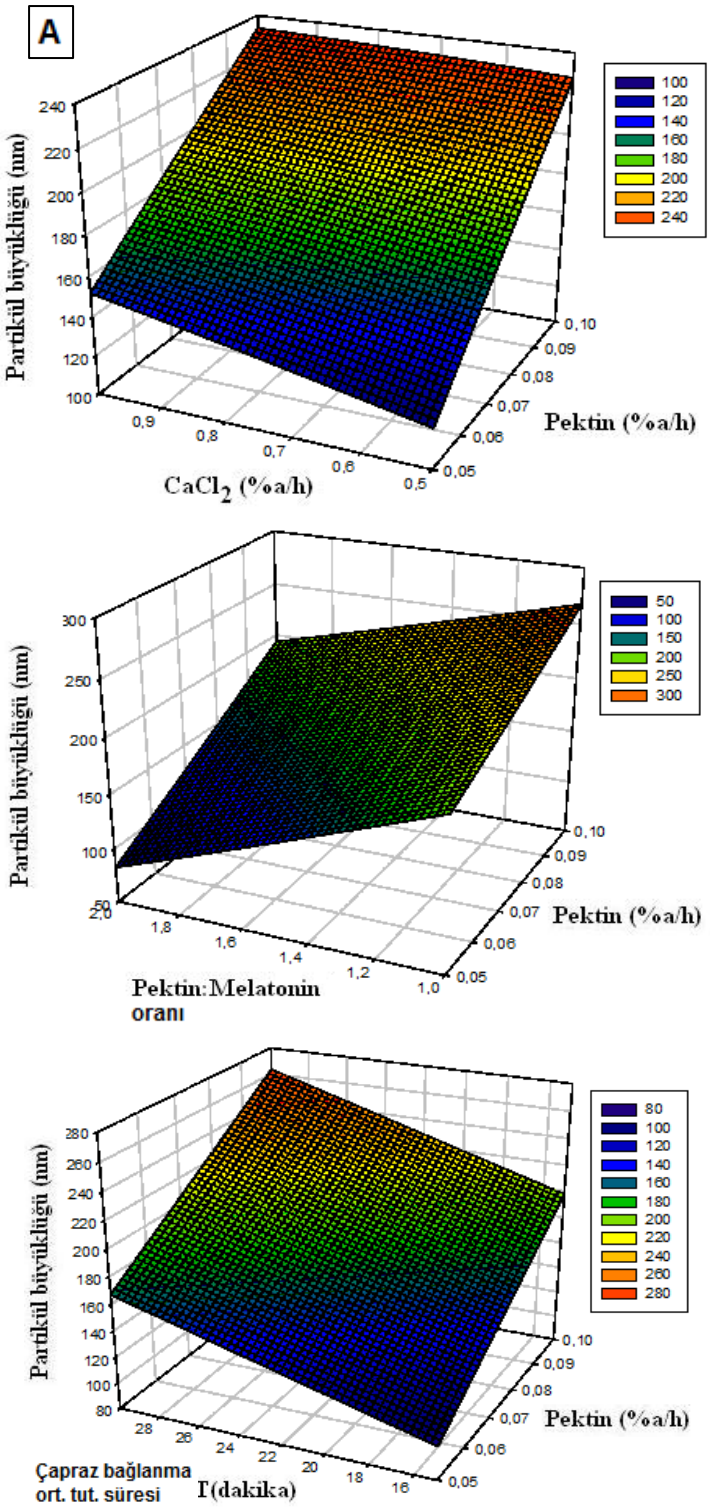


Şekil 36. Pythia® (YSA)'nın verdiği değerler ile deneysel olarak elde edilen değerler arasındaki regresyonel ilişki (partikül büyüklüğü)

Pythia®, nanopartikül formülasyonları hazırlanırken kullanılan formülasyon parametreleri ile formülasyonun sahip olduğu ortalama partikül büyüklüğü arasındaki matematiksel ilişkiyi tanımlamıştır. Bu ilişkiler üç boyutlu ortamda (3D) grafik halinde Şekil 37'de verilmiştir.

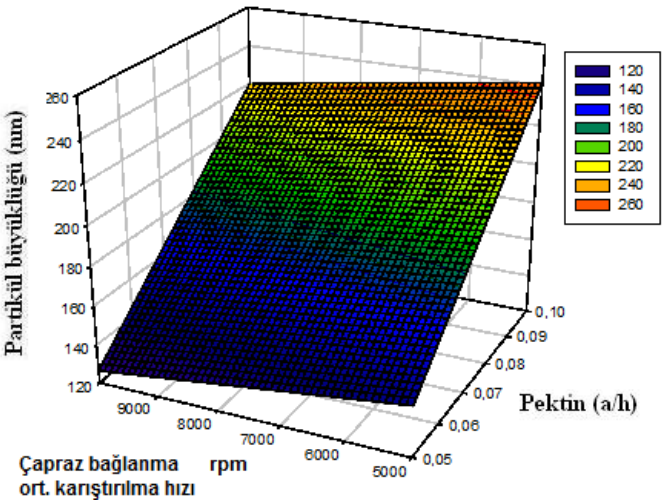
Formülasyon oluşturulurken kullanılan parametre değerleri sisteme girildiğinde, formülasyonun sahip olduğu ortalama partikül büyüklüğü değeri başarıyla tahmin edilmiştir.

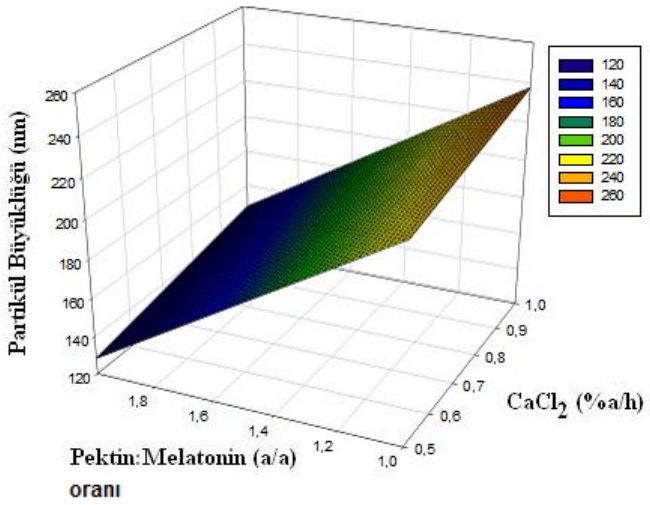
Oluşturduğumuz yapay sinir ağı modeli kullanılarak, farklı formülasyon parametreleri ışığında hazırlanacak nanopartikül formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü değeri tahmin edilebilir.

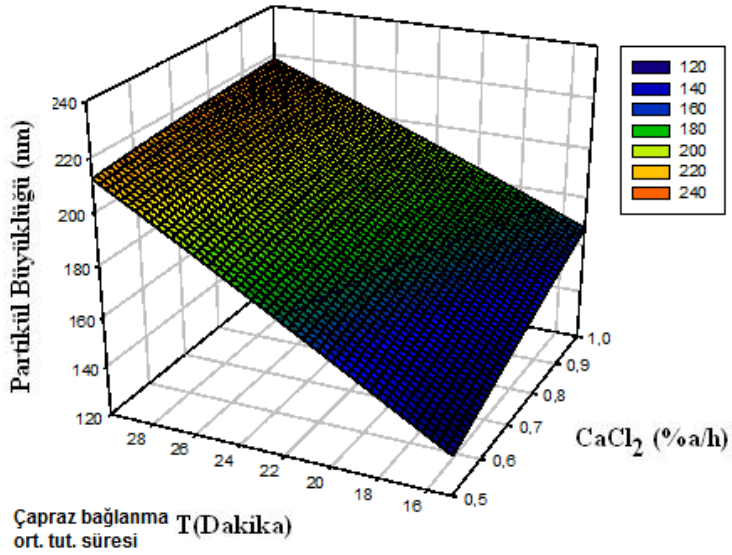


Şekil 37 A, B, C, D. MEL yüklü kalsiyum pektinat nanopartiküllerini hazırlarken kullanılan formülasyon parametreleri ile ortalama partikül büyüklüğü arasındaki ilişkiler

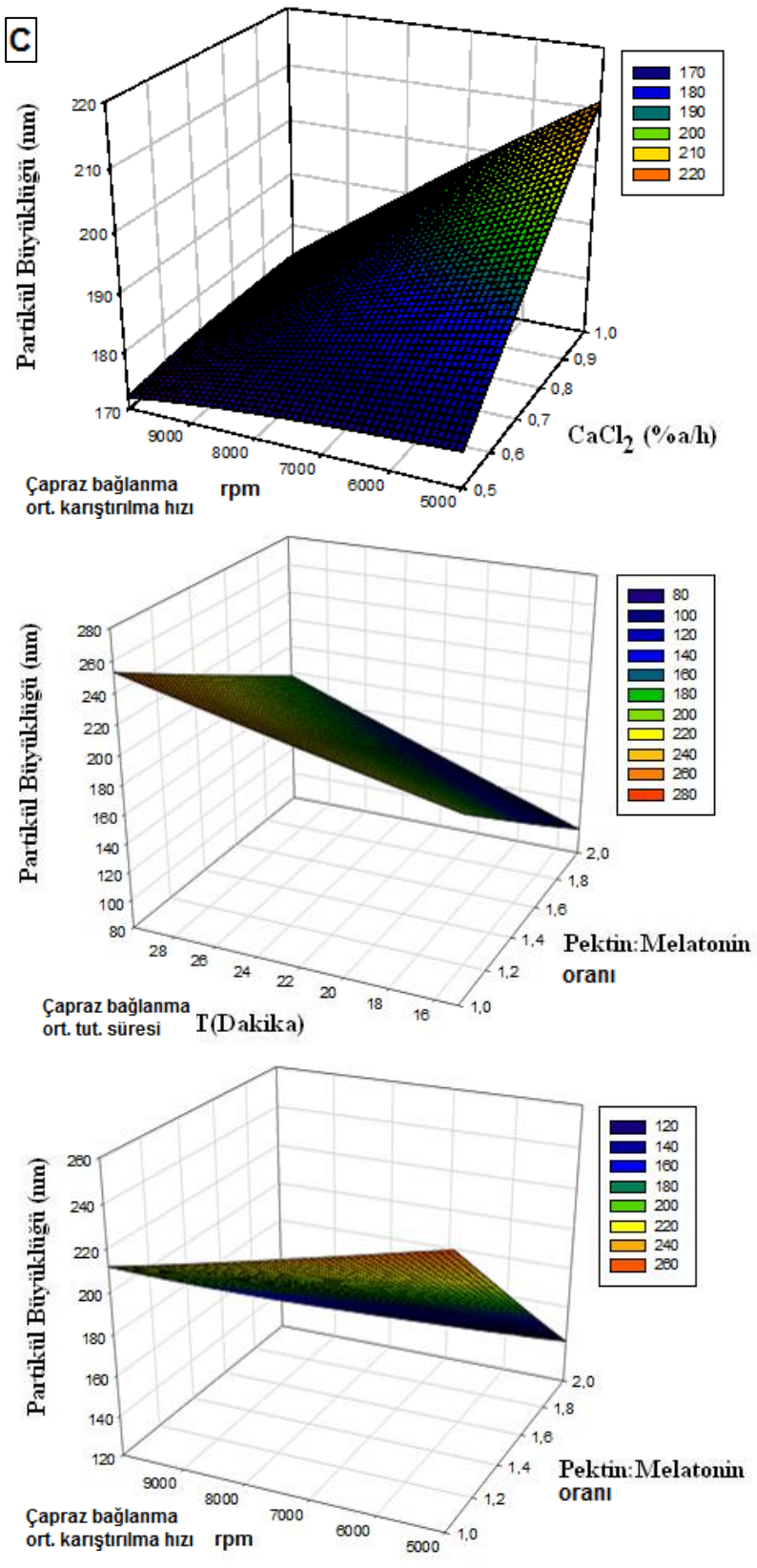
B



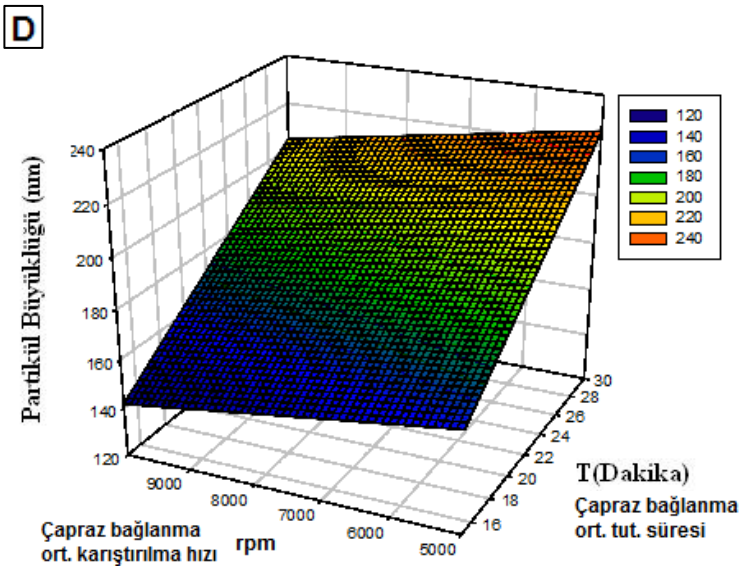




Şekil 37. Devamı



Şekil 37. Devamı



Şekil 37. Devamı

4.1.5.1.2. Yığılmalı (%) MEL Salımına Ait Bulgular

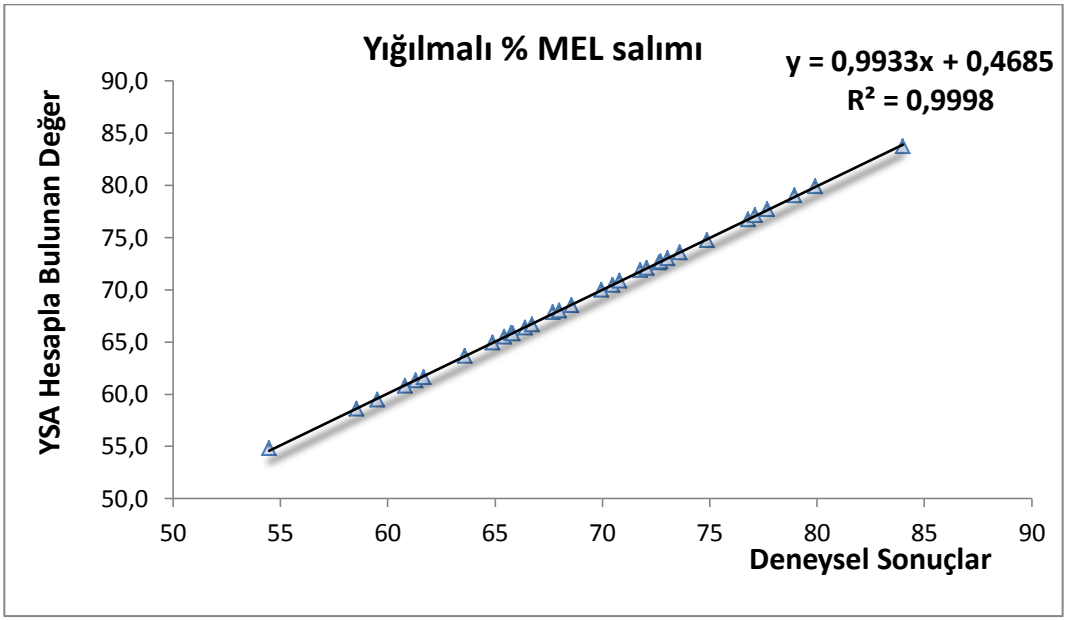
Pythia®, sisteme girilen formülasyon parametreleri ile pH 6,8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif % MEL miktarı arasındaki çok anlamlı bir matematiksel ilişki ($r^2 > 0.950$) tanımlamıştır.

Laboratuvar ortamında, deneysel olarak elde pH 6,8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif % MEL miktarı sonuçları ile Pythia® (YSA) programı kullanılarak matematiksel hesaplama sonucu elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 34).

Laboratuvar ortamında, deneysel olarak elde edilen pH 6,8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif % MEL miktarı sonuçları ile Pythia® (YSA) programı kullanılarak matematiksel hesaplama sonucu elde edilen sonuçlar arasındaki regresyonel ilişki grafik olarak Şekil 38'de verilmiştir.

Tablo 34. Yığılmalı (%) MEL Salımına Ait Deneysel Olarak Elde Edilen ve Pythia® (YSA)'nın Verdiği Bulgular (n=3)

	Deneysel Olarak Elde Edilen Yığılmalı MEL Salımı (%) (ORT)	Pythia® (YSA)'nın Verdiği Yığılmalı MEL Salımı (%)
P1	61.3	61.2
P2	67.7	67.8
P3	68.6	68.5
P4	65.4	65.5
P5	54.5	54.8
P6	74.9	74.8
P7	71.8	71.9
P8	60.8	60.8
P9	72.6	72.6
P10	58.6	58.6
P11	61.7	61.6
P12	79.0	79.0
P13	64.9	64.9
P14	65.8	65.9
P15	68.0	68.0
P16	72.1	72.1
P17	66.4	66.4
P18	72.7	72.7
P19	73.6	73.6
P20	70.5	70.4
P21	59.5	59.5
P22	79.9	79.9
P23	76.8	76.7
P24	65.8	65.8
P25	77.7	77.7
P26	63.6	63.6
P27	66.7	66.7
P28	84.0	83.8
P29	69.9	70.0
P30	70.8	70.8
P31	73.0	73.0
P32	77.1	77.2

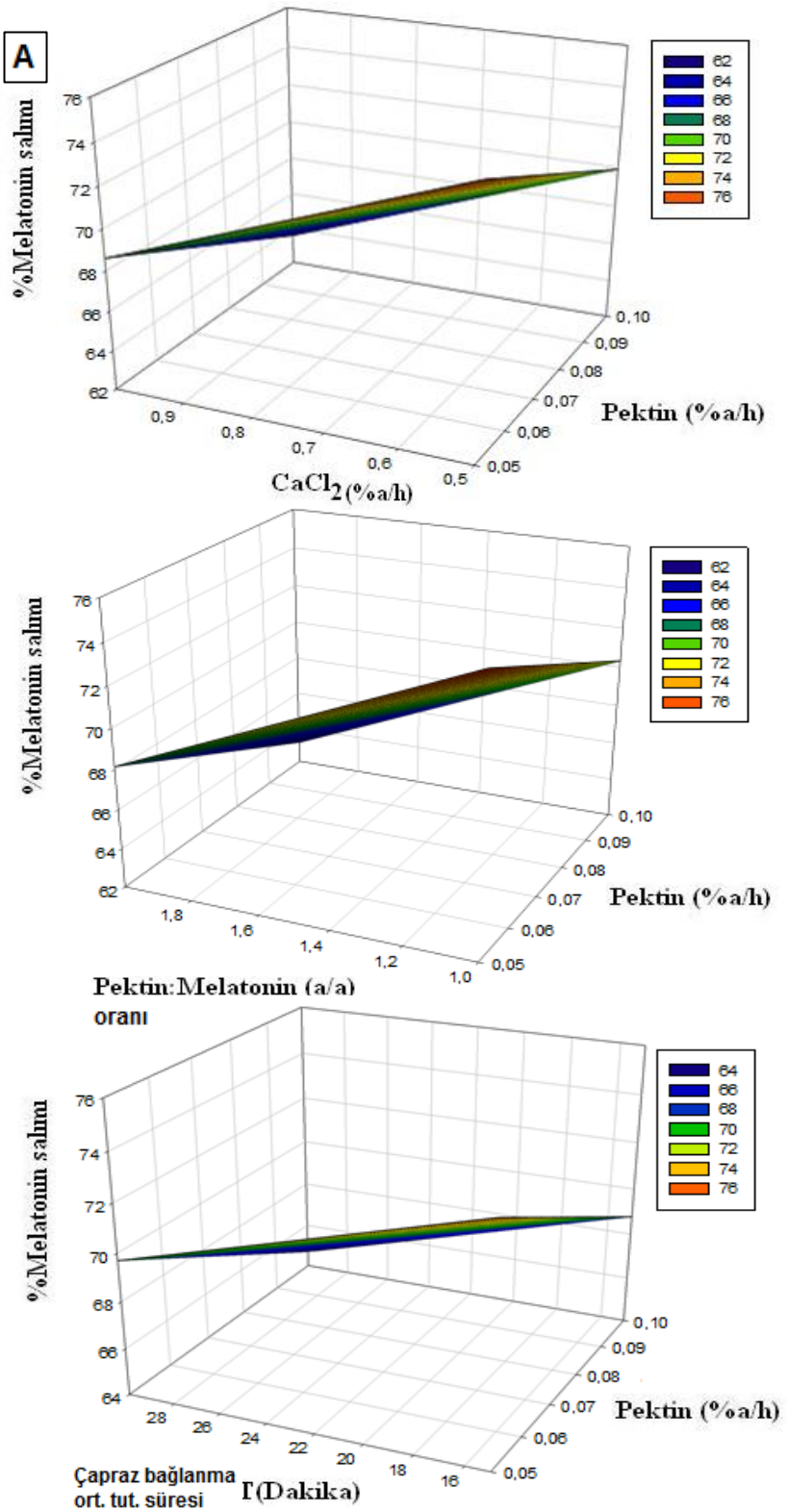


Şekil 38. Yığılmalı (%) MEL Salımında Pythia® (YSA)'nın Verdiği Değerler ile Deneysel Olarak Elde Edilen Değerler Arasındaki Regresyonel İlişki

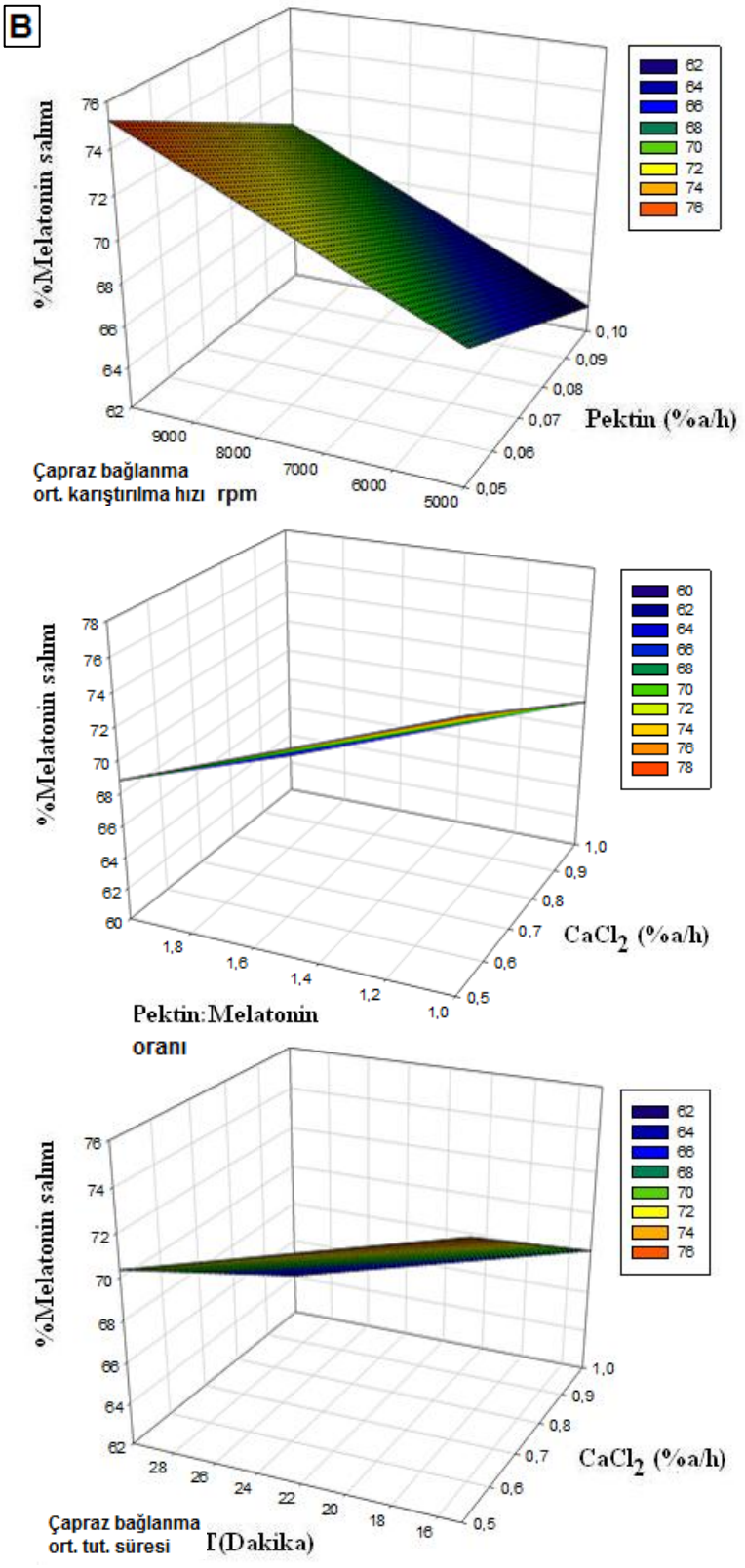
Pythia®, nanopartikül formülasyonları hazırlanırken kullanılan formülasyon parametreleri ile nanopartikül formülasyonlarından pH 6,8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif % MEL miktarı arasındaki matematiksel ilişkiyi tanımlamıştır. Bu ilişkiler üç boyutlu ortamda (3D) grafik halinde Şekil 39'da verilmiştir.

Formülasyon oluşturulurken kullanılan parametre değerleri sisteme girildiğinde, nanopartikül formülasyonlarından pH 6,8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif % MEL miktarı değeri başarıyla tahmin edilmiştir.

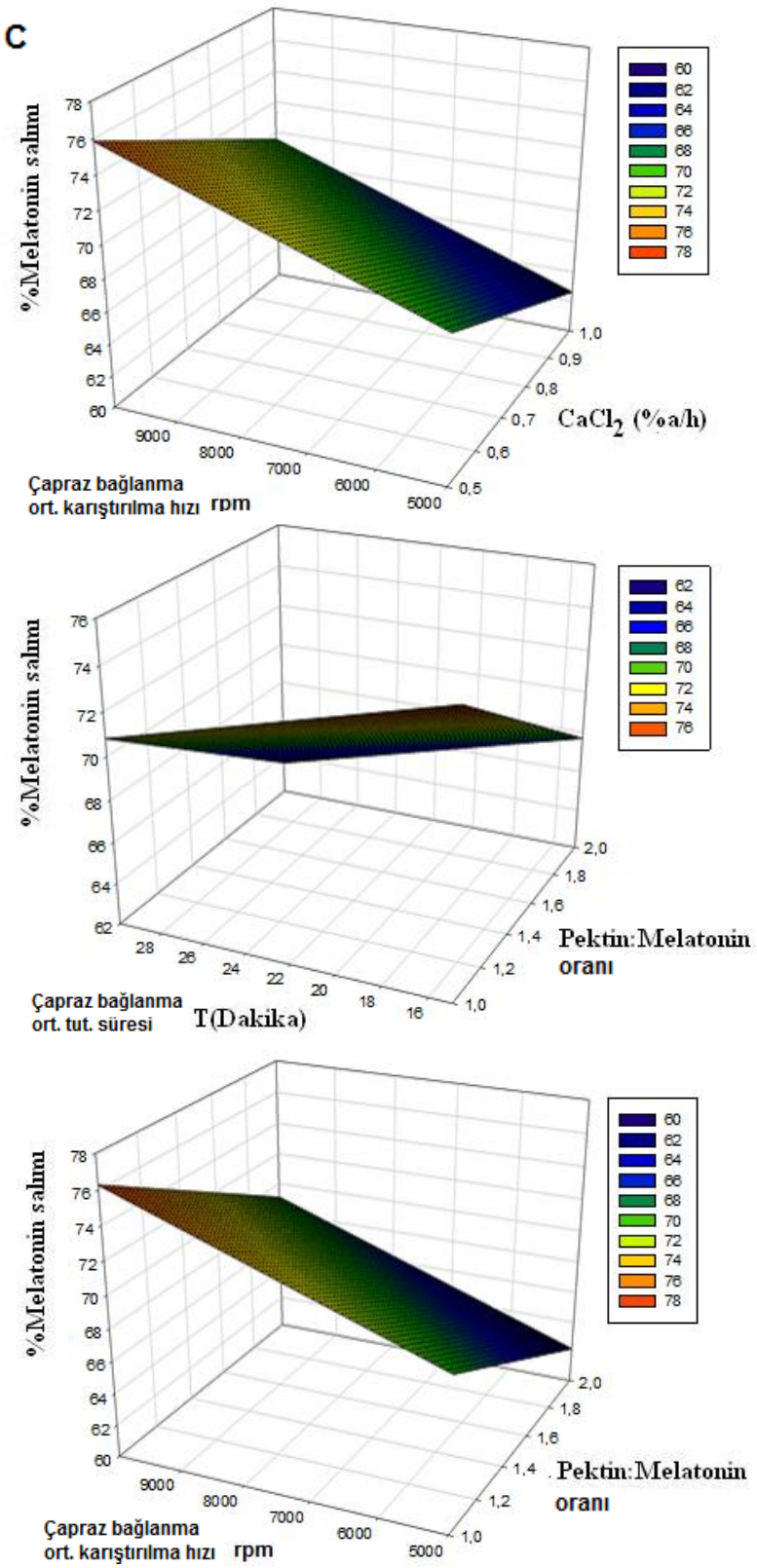
Oluşturduğumuz yapay sinir ağı modeli kullanılarak, farklı formülasyon parametreleri ışığında hazırlanacak nanopartikül formülasyonlarından pH 6,8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif % MEL miktarı değeri tahmin edilebilir.



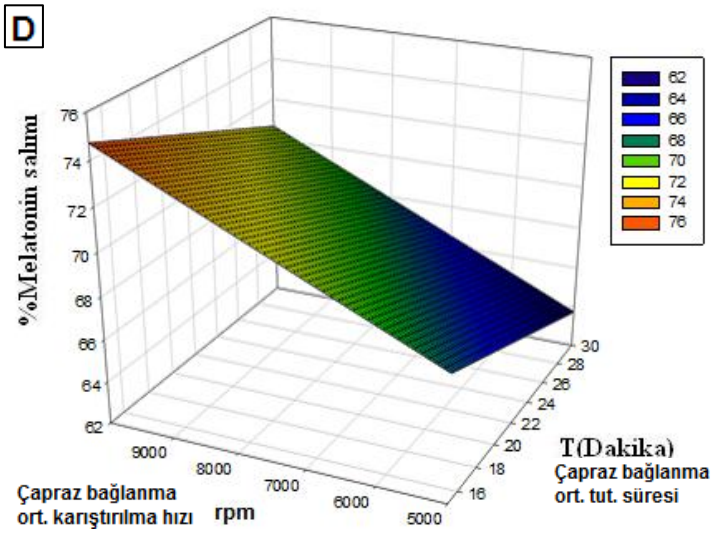
Şekil 39 A, B, C, D. MEL yüklü kalsiyum pektinat nanopartiküllerini hazırlarken kullanılan formülasyon parametreleri ile nanopartikül formülasyonlarından pH 6,8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif % MEL miktarı arasındaki ilişkiler



Şekil 39. Devamı



Şekil 39. Devamı



Şekil 39. Devamı

4.1.5.1.3. Zeta Potansiyeli ve Polidispersite İndeksine Ait Bulgular

Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen, 32 farklı formülasyona ait zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi değerleri (Tablo 31), Pythia® (YSA) programına girildiğinde, program formülasyon parametreleri ile zeta potansiyeli arasında ayrıca formülasyon parametreleri ile polidispersite indeksi arasında anlamlı bir matematiksel ilişki tanımlayamamıştır.

4.1.5.2. Pythia®'nın Test Edilmesine Ait Bulgular

Faktöriyel tasarımda yer alan 32 formülasyondan farklı olarak, Pythia®'nın tanımladığı matematiksel ilişkinin doğruluğunu kanıtlamak amacıyla P_A ve P_B olarak adlandırılan iki formülasyon daha tasarlanmıştır.

P_A ve P_B laboratuvarda hazırlandıktan sonra ortalama partikül büyüklüğü değeri ile pH 6,8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif % MEL miktarı tespit edilmiştir. Daha sonra Pythia® kullanılarak ortalama partikül büyüklüğü değeri ile pH 6,8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif % MEL miktarı tespit

edilmiştir. Elde edilen deneysel ve matematiksel sonuçlar Tablo 35'de verilmiştir.

Tablo 35. Deneysel ve matematiksel olarak elde edilen yığılmalı MEL salımı (%) sonuçları (n=6) ile partikül büyüklüğü sonuçları (n=3)

	Deneysel Olarak Elde Edilen Yığılmalı MEL Salımı (%) (ORT)	**Pythia® (YSA)'nın Verdiği Yığılmalı MEL Salımı (%)**
P_A	71.8	72.1
P_B	58.6	58.2
	Deneysel Olarak Elde Edilen Partikül Büyüklüğü (nm) (ORT)	**Pythia® (YSA)'nın Verdiği Partikül Büyüklüğü (nm)**
P_A	321	319
P_B	253	251

Deneysel sonuçlar ile Pythia®'nın önerdiği matematiksel sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$). Pythia®'nın önerdiği ortalama partikül büyüklüğü değerleri ile pH 6,8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif % MEL miktarı değerlerinin doğruluğu kanıtlanmıştır.

4.1.5.3. Faktöriyel Tasarımdan Optimum Formülasyonun Seçilmesine Ait Bulgular

Pythia® kullanılarak formülasyon parametreleri ile ortalama partikül büyüklüğü değerleri ve pH 6,8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif % MEL miktarı değerleri arasındaki matematiksel ilişki başarılı bir şekilde tanımlanmıştır (Şekil 38, 39).

Ortalama partikül büyüklüğü 100 nm civarında olan ve pH 6,8 fosfat tamponunda en fazla MEL salımı gösteren optimum formülasyon faktöriyel tasarım içerisinden Pythia® kullanılarak tespit edilmiştir.

Faktöriyel tasarım içerisinden 75,3±3,3 ortalama partikül büyüklüğü ve pH 6,8 fosfat tamponunda %84.0±0.7 kümülatif MEL salımıyla, P28 optimum formülasyon olarak seçilmiştir.

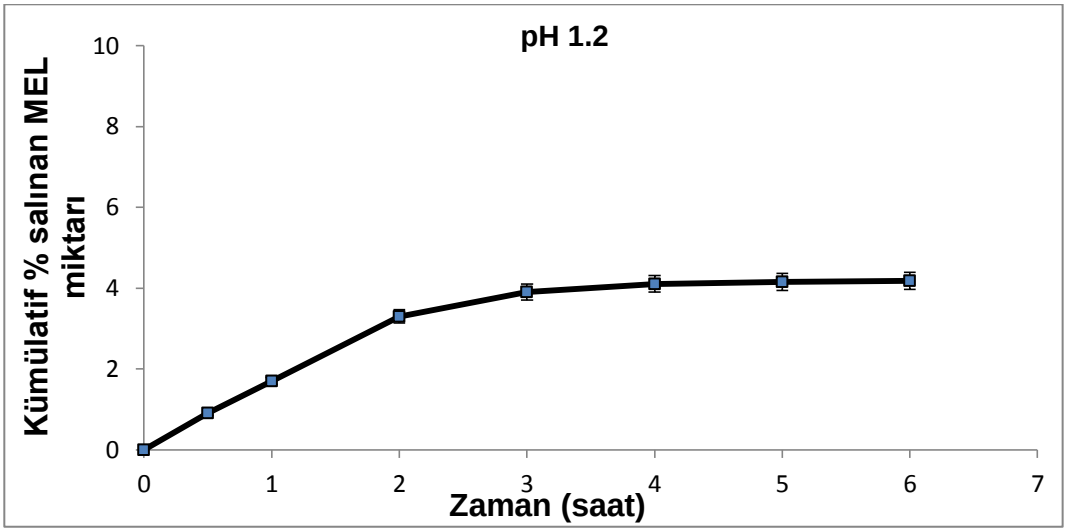
P28, TNBS ile kolit indüklenmiş sıçanlarda, MEL'in kolit üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla in vivo çalışmalarda kullanılmıştır.

4.1.6. Optimum Formülasyon Olarak Seçilen P28 Nolu Formülasyon Üzerinde Yapılan Salım Çalışmalarına Ait Bulgular

Faktöriyel tasarımdan P28 nolu nanopartikül formülasyonu optimum formülasyon olarak seçilmiştir. Bu nanopartikül formülasyonu, sıçanlara oral ve intrakolonik yoldan verilerek, TNBS ile kolit indüklenmiş sıçanlarda in vivo etkinliği değerlendirilecektir. Dolayısıyla sıçanlara oral yoldan verilen P28 nolu formülasyon etki bölgesine ulaşana kadar farklı pH değerine sahip pek çok GI bölgeden geçecektir. Bu nedenle farklı salım ortamları kullanılarak P28 nolu nanopartikül formülasyonundan MEL salımı araştırılmıştır.

4.1.6.1. pH 1.2 Mide Ortamında Yapılan Çalışmalar

Bu spesifik salım çalışmalarının ilkinde salım ortamı olarak pH 1.2 HCl tamponu (mide ortamı) kullanılmış ve P28 nolu nanopartikül formülasyonundan MEL salımı altı saat süreyle izlenmiştir. Elde edilen veriler grafik olarak Şekil 40'da verilmiştir.



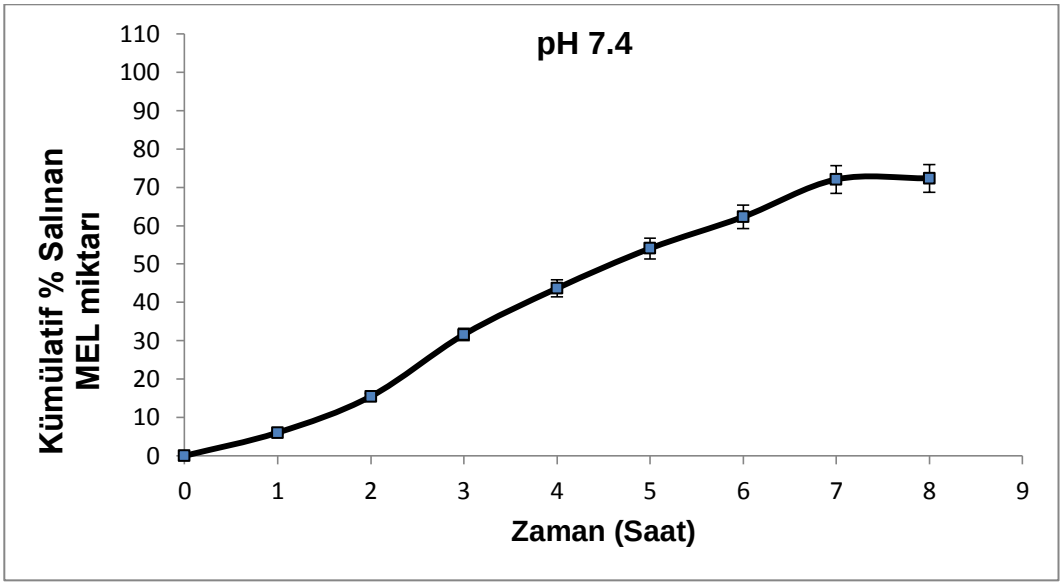
Şekil 40. pH 1.2 HCl-KCl tamponunda P28'e ait in vitro salım grafiği (n=6)

P28'in pH 1.2 HCl tamponu salım ortamı kullanılarak gerçekleştirilen in vitro salım çalışmalarında elde edilen salım profili incelendiğinde 6. saatin sonunda %4.2±0.05 MEL salımı gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

4.1.6.2. pH 7.4 Fosfat Tamponunda Yapılan Çalışmalar

Salım ortamı olarak pH 7.4 fosfat tamponu (ince bağırsak ortamı) kullanılarak gerçekleştirilen in vitro salım çalışmalarında P28 nolu nanopartikül formülasyonundan MEL salımı sekiz saat süreyle izlenmiştir.

P28'in pH 7.4 fosfat tamponu kullanılarak gerçekleştirilen in vitro salım çalışmalarında Şekil 41'deki salım profili elde edilmiştir. Sekizinci saatin sonunda % 72.5±0.3 MEL salımı gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

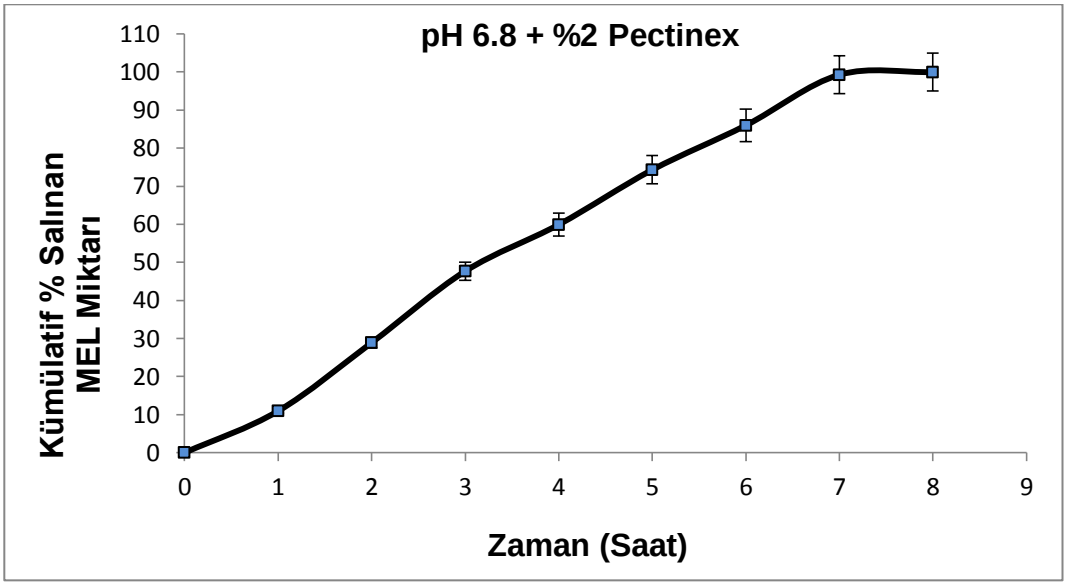


Şekil 41. pH 7.4 fosfat tamponunda P28'e ait in vitro salım grafiği (n=6)

4.1.6.3. pH 6.8 Fosfat Tamponu + Pectinex® Ortamında Yapılan Çalışmalar

İn vitro salım çalışmalarında, hazırladığımız nanopartikül formülasyonunun spesifik etki bölgesi olan kalın bağırsak ortamını daha iyi taklit edebilmek amacıyla, pH 6.8 fosfat tamponuna kalın bağırsak ortamında yaşayan anaerob bakterilerin ürettiği ve kalsiyum pektinat nanopartiküllerini yıkıma uğratan Pectinex® enzim konsantresi %2 (h/h) oranında eklenmiştir. Bu ortamda gerçekleştirilen salım çalışmalarında elde edilen veriler grafik olarak Şekil 42'de verilmiştir.

P28'in pH 6.8 fosfat tamponu + %2 Pectinex® enzim konsantresi içeren salım ortamı kullanılarak gerçekleştirilen in vitro salım çalışmalarında elde edilen salım profili incelendiğinde 7. saatin sonunda tüm MEL'in salındığı gözlemlenmiştir.

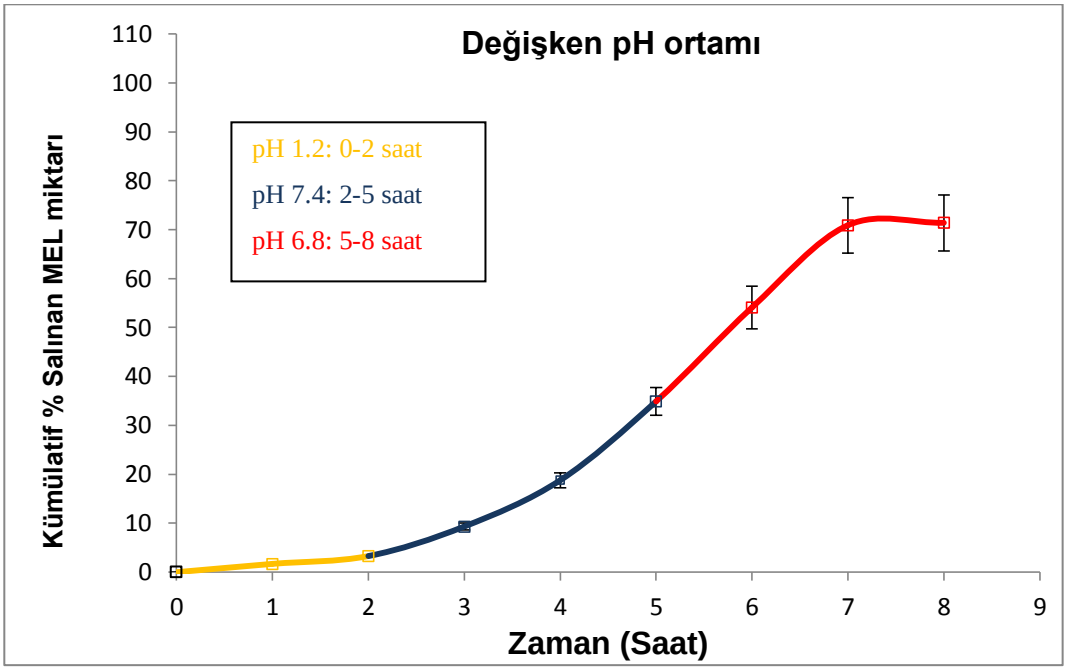


Şekil 42. pH 6.8 fosfat tamponu + %2 Pectinex enzim konsantresi içeren salım ortamındaki P28'e ait in vitro salım grafiği (n=6)

4.1.6.4. Salım Ortamının Değiştirildiği Çalışmalar

P28'den MEL salımı, salım ortamı değiştirilerek de araştırılmıştır. Oral yoldan verilen nanopartikül formülasyonu önce mideyi sonra ince bağırsakları geçerek spesifik olarak etki edeceği kalın bağırsak bölgesine taşınır.

İn vitro salım ortamı yukarıda anlatıldığı gibi düzenlenerek gerçekleştirilen salım çalışmaları sonucunda elde edilen salım profili grafik olarak Şekil 43'de verilmiştir.

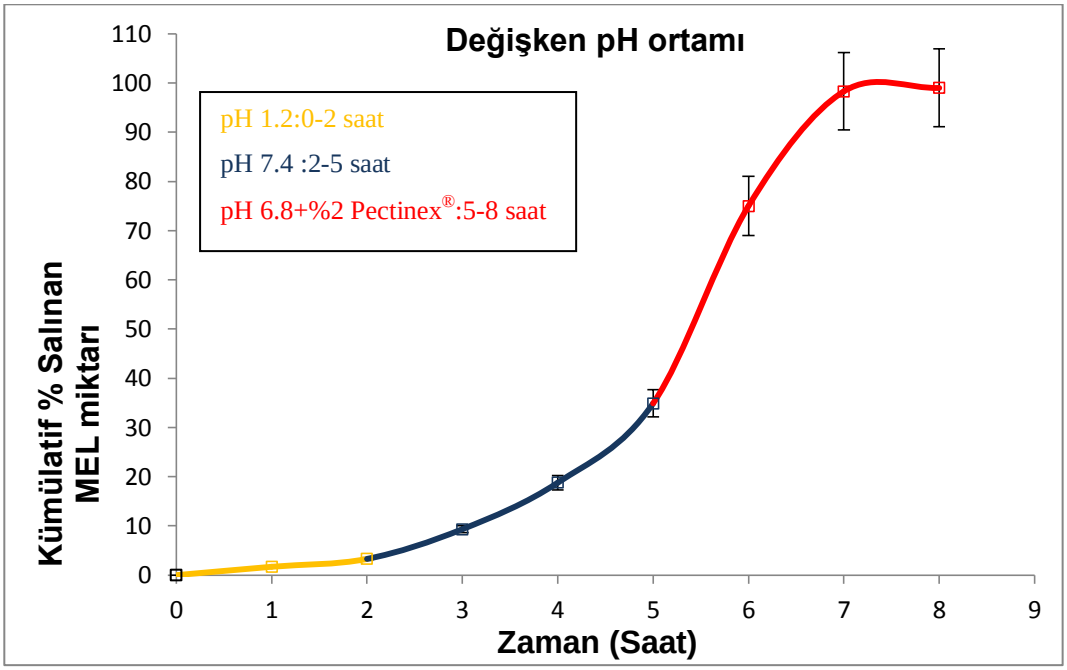


Şekil 43. Salım ortamı değiştirilerek gerçekleştirilen in vitro salım çalışmalarında P28'e ait in vitro salım grafiği (n=6)

Salım ortamı değiştirilerek gerçekleştirilen in vitro salım çalışmalarında P28 nolu nanopartikül formülasyonundan MEL salımı sekiz saat süreyle izlenmiştir. Sekizinci saatin sonunda % 71.5±0.1 salım gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

Salım ortamı değiştirilerek gerçekleştirilen bir diğer in vitro salım çalışmalarında ise 5. saatin sonunda ortam değiştirilerek kullanılan pH 6.8 fosfat tamponu yerine pH 6.8 fosfat tamponu + % 2 (h/h) Pectinex® enzim konsantresi içeren ortam kullanılmıştır.

İn vitro salım ortamı yukarıda anlatıldığı gibi düzenlenerek gerçekleştirilen salım çalışmaları sonucunda elde edilen salım profili grafik olarak Şekil 44'de verilmiştir.



Şekil 44. Salım ortamı değiştirilerek gerçekleştirilen in vitro salım çalışmalarında P28'e ait in vitro salım grafiği (n=6)

Salım ortamı değiştirilerek gerçekleştirilen in vitro salım çalışmasında 28 nolu nanopartikül formülasyonundan MEL salımı sekiz saat süreyle izlenmiştir. Salım profili incelendiğinde sekizinci saatin sonunda tüm MEL'in salındığı gözlemlenmiştir.

4.1.7. İn Vitro Salım Sonuçlarının Kinetik Olarak Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Bölüm 3.2.1.7'de anlatıldığı gibi nanopartikül formülasyonlarından MEL salımının, sıfırıncı derece, birinci derece ve Higuchi kinetiklerine uyumu regresyonel (determinasyon katsayısının 1.000'a olan yakınlığı) olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 36'da verilmiştir.

Tablo 36'da kullanılan kısaltmalar ise aşağıda verilmiştir.

kr^0: Sıfır derece hız sabiti (mg/s), r^2: Determinasyon katsayısı

RSH: Regresyonun standart hatası kr^1: Birinci derece hız sabiti (mg/s) k: Çözünme sabiti ($mg.cm^{-2}.s^{-1/2}$)

Tablo 36. Formülasyonlara ait salım verilerinin kinetik olarak incelenmesi (n=6)

	0. derece			1.derece			Q√t (Higuchi)		
	kr^0	r^2	RSH	kr^1	r^2	RSH	k	r^2	RSH
P1	0.1136	0.8663	7.01	0.0026	0.8061	0.20	2.7891	0.9898	1.58
P2	0.1220	0.9406	6.05	0.0034	0.8012	0.26	3.4739	0.9962	1.93
P3	0.0470	0.6520	9.60	0.0023	0.7436	0.21	2.9313	0.9672	3.49
P4	0.0971	0.7874	11.14	0.0023	0.6665	0.24	2.9005	0.9112	5.30
P5	0.0772	0.7664	9.71	0.0021	0.6504	0.25	2.3201	0.8966	4.84
P6	0.1065	0.9715	8.10	0.0022	0.8870	0.12	2.9899	0.9932	2.35
P7	0.1287	0.9273	7.54	0.0031	0.8143	0.23	3.6785	0.9816	2.80
P8	0.0981	0.9381	6.61	0.0027	0.8215	0.19	2.8048	0.9938	1.20
P9	0.1024	0.8841	10.35	0.0021	0.7709	0.18	2.9794	0.9710	3.89
P10	0.0897	0.9481	6.75	0.0025	0.8358	0.18	2.5341	0.9924	1.61
P11	0.1001	0.9265	7.00	0.0027	0.7985	0.21	2.8752	0.9903	1.52
P12	0.1298	0.9365	5.14	0.0028	0.8170	0.20	3.7099	0.9925	1.76
P13	0.1025	0.9246	4.46	0.0026	0.8103	0.19	2.9430	0.9885	1.74
P14	0.1005	0.9390	3.90	0.0025	0.8297	0.17	2.8720	0.9946	2.70
P15	0.1285	0.8811	4.65	0.0028	0.8018	0.21	3.1970	0.9914	1.54
P16	0.1296	0.8464	4.43	0.0024	0.8266	0.17	3.0962	0.9924	2.17
P17	0.1239	0.8631	7.75	0.0027	0.7868	0.21	3.0473	0.9884	1.81
P18	0.2055	0.8363	7.95	0.0041	0.7519	0.20	4.6060	0.9258	5.24
P19	0.0979	0.8062	13.05	0.0020	0.6936	0.21	2.8886	0.9201	4.98
P20	0.1035	0.8821	10.36	0.0023	0.7735	0.20	2.9945	0.9674	3.21
P21	0.0920	0.8839	8.48	0.0025	0.7721	0.22	2.6605	0.9684	2.81
P22	0.1213	0.8961	11.15	0.0024	0.7910	0.20	3.4940	0.9746	3.30
P23	0.1158	0.8815	11.18	0.0024	0.7768	0.20	3.3504	0.9665	3.65
P24	0.0973	0.8829	9.67	0.0023	0.7750	0.19	2.8128	0.9678	3.01
P25	0.1167	0.8862	6.76	0.0022	0.7785	0.20	3.3734	0.9699	3.47
P26	0.1168	0.8148	9.25	0.0023	0.7914	0.19	3.3253	0.9749	2.91
P27	0.1307	0.9059	6.62	0.0032	0.7885	0.25	3.0670	0.9910	1.92
P28	**0.1506**	**0.9570**	**7.06**	**0.0034**	**0.8171**	**0.24**	**4.2716**	**0.9981**	**2.21**
P29	0.1311	0.8875	8.29	0.0036	0.7171	0.34	3.8063	0.9699	3.93
P30	0.1324	0.8806	8.58	0.0036	0.7194	0.34	3.8489	0.9642	4.07
P31	0.1343	0.8974	8.77	0.0035	0.7371	0.33	3.8680	0.9748	3.63
P32	0.1512	0.8852	9.05	0.0031	0.7801	0.26	3.8117	0.9818	3.03

4.1.8. Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular

Bölüm 3.2.1.9'da anlatıldığı gibi 4^{o}C'de (buzdolabı), 25^{o}C'de (iklim dolabı) ve 40^{o}C'de (etüv) altı ay süreyle gerçekleştirilen stabilite çalışmaları sonucunda elde edilen veriler Tablo 37, 38 ve 39'da verilmiştir.

Tablo 37. 4^{o}C/ (Ortam Nemi) Ortamındaki Stabilite Sonuçları (n=3)

	PB (nm) (ORT±GA)	**PDI** (ORT±GA)	**ZP (mV)** (ORT±GA)	**pH** (ORT±GA)	**MEL Miktarı (%)** (ORT±GA)
Başlangıç	75.6±0.5	0.109±0.002	-24.24±0.17	6.8±0.1	100.1±0.6
1.Hafta	75.3±0.4	0.110±0.003	-23.90±1.55	6.8±0.2	99.8±0.1
2.Hafta	75.8±0.3	0.112±0.005	-24.10±0.64	6.9±0.1	99.6±1.2
1.Ay	75.7±0.5	0.113±0.010	-24.30±1.67	6.9±0.2	99.3±1.2
2.Ay	75.5±0.9	0.111±0.008	-24.34±0.55	6.8±0.2	99.8±0.5
3.Ay	75.7±0.6	0.111±0.006	-24.29±2.04	6.8±0.2	98.8±1.1
4.Ay	75.6±0.8	0.115±0.006	-24.30±1.54	6.8±0.1	99.5±1.5
5.Ay	76.0±0.2	0.112±0.010	-24.27±2.01	6.8±0.3	99.3±1.7
6.Ay	76.2±1.0	0.114±0.004	-24.28±2.04	6.7±0.3	100.0±0.8

Tablo 38. 25°C/ (% 60 Bağıl Nem) Ortamındaki Stabilite Sonuçları (n=3)

	PB (nm) (ORT±GA)	PDI (ORT±GA)	ZP (mV) (ORT±GA)	pH (ORT±GA)	MEL Miktarı (%) (ORT±GA)
Başlangıç	75.5±0.4	0.112±0.008	-24.30±0.45	6.9±0.1	99.5±0.4
1.Hafta	75.5±0.6	0.113±0.004	-24.31±1.74	6.8±0.1	99.4±1.8
2.Hafta	75.3±0.9	0.112±0.007	-24.38±1.84	6.8±0.0	99.3±1.4
1.Ay	75.4±1.0	0.112±0.007	-24.29±2.15	6.8±0.2	99.3±1.7
2.Ay	75.3±1.1	0.112±0.010	-24.27±0.44	6.8±0.2	99.2±1.4
3.Ay	75.8±0.5	0.116±0.009	-24.25±2.55	6.8±0.2	99.7±0.1
4.Ay	75.7±0.2	0.112±0.008	-24.30±2.62	6.8±0.2	99.2±0.7
5.Ay	75.4±0.4	0.111±0.011	-24.27±0.26	6.7±0.1	99.3±1.2
6.Ay	75.7±0.7	0.115±0.010	-24.35±2.00	6.7±0.2	98.9±1.1

Tablo 39. 40°C/ (% 75 Bağıl Nem) Ortamındaki Stabilite Sonuçları (n=3)

	PB (nm) (ORT±GA)	PDI (ORT±GA)	ZP (mV) (ORT±GA)	pH (ORT±GA)	MEL Miktarı (%) (ORT±GA)
Başlangıç	75.6±0.8	0.110±0.003	-24.34±2.05	6.8±0.2	99.8±1.0
1.Hafta	75.9±0.4	0.110±0.001	-24.38±1.92	6.8±0.2	99.4±1.0
2.Hafta	75.8±1.0	0.113±0.004	-24.25±2.54	4.5±0.1	99.3±1.4
1.Ay	76.1±0.3	0.113±0.011	-24.25±0.93	6.8±0.2	98.1±0.7
2.Ay	75.7±0.3	0.109±0.002	-24.22±1.63	6.7±0.4	99.6±0.6
3.Ay	75.8±0.2	0.111±0.005	-24.22±0.48	6.7±0.3	99.4±1.4
4.Ay	83.9±0.4	0.151±0.004	-19.77±0.80	7.3±0.3	98.9±0.9
5.Ay	88.0±1.0	0.167±0.007	-17.43±0.50	7.5±0.2	98.1±0.5
6.Ay	89.7±0.4	0.193±0.011	-15.07±0.20	7.8±0.2	97.4±0.1

4.1.9. Mukoadezyon Ölçüm Çalışmalarına Ait Bulgular

Bölüm 3.2.1.10'da anlatıldığı gibi Tablo 18'de verilen test parametreleri ve P28 kullanılarak gerçekleştirilen mukoadezyon çalışmalarında TA. XT. Plus Texture Analyser® cihazının yazılım programı bize kopma kuvvetini ve yapılan işi hesaplayarak vermiştir. Mukoadezyon işini hesaplamak için ise Bölüm 3.2.1.10'da verilen Eşitlik 3 kullanılmıştır.

Mukoadezyon çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre kopma kuvveti, yapılan iş ve mukoadezyon işi Tablo 40'da ve 41'de verilmiştir. Mukoadezyon ölçüm çalışmalarına ait kuvvet-mesafe grafikleri ise Şekil 45 ve 46'da verilmiştir.

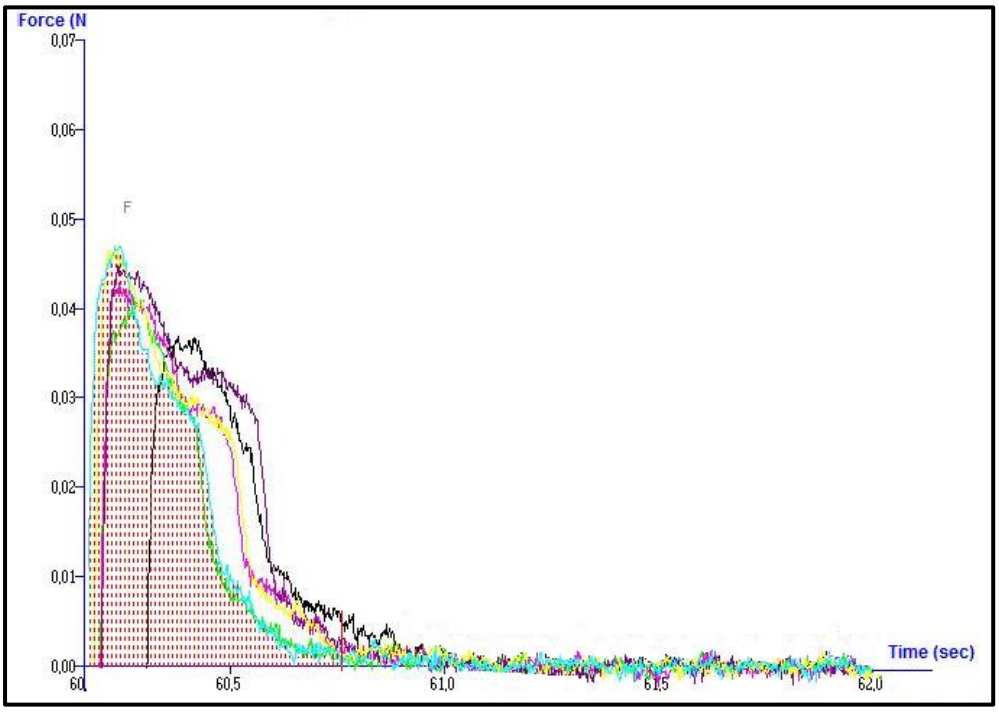
Tablo 40. Sağlıklı Kontrol Grubuyla (Grup A) Yapılan Mukoadezyon Ölçüm Çalışmalarına Ait Bulgular (n=6)

Kuvvet (N) (ORT±GA)	İş (N.mm) (ORT±GA)	Mukoadezyon İşi (mj/cm^2) (ORT±GA)
0,043±0,003	0,012±0,001	0,010±0,001

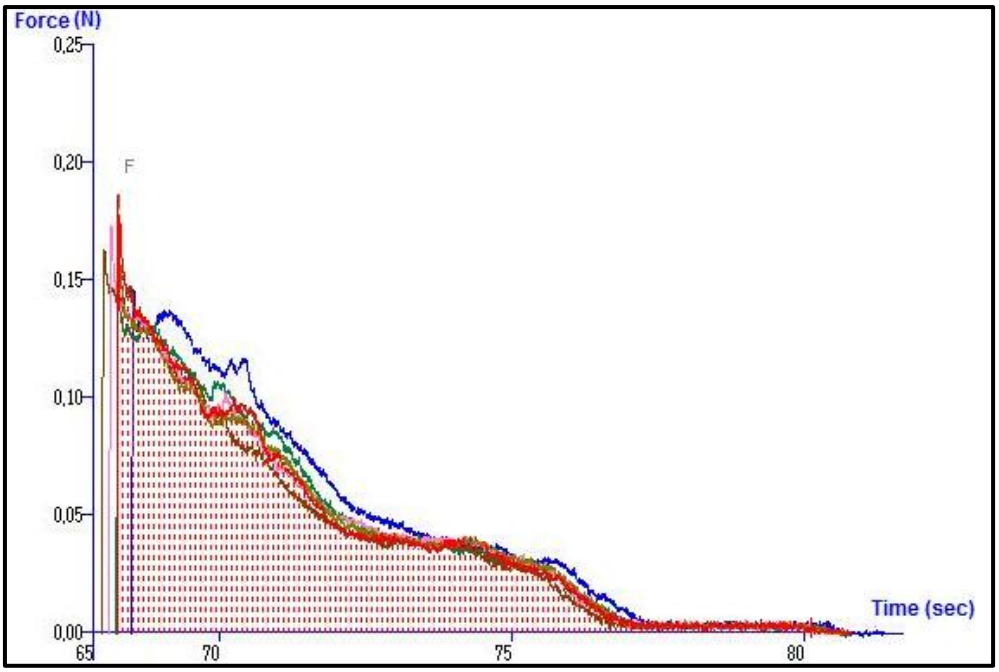
Tablo 41. TNBS ile Kolit Oluşturulup Tedavi Verilmeyen Grupla (Grup B) Yapılan Mukoadezyon Ölçüm Çalışmalarına Ait Bulgular (n=6)

Kuvvet (N) (ORT±GA)	İş (N.mm) (ORT±GA)	Mukoadezyon İşi (mj/cm^2) (ORT±GA)
0,157±0,016	0,541±0,014	0,441±0,012

Tez çalışmamızda tasarlanan P28, TNBS ile kolit oluşturulan kolon dokusuna, kolit oluşturulmayan sağlıklı dokuya göre çok daha fazla adezyon özelliği göstermiştir. Bu değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($p<0.001$).



Şekil 45. Sağlıklı kontrol grubuyla (Grup A) yapılan mukoadezyon ölçüm çalışmalarına ait kuvvet-mesafe grafiği



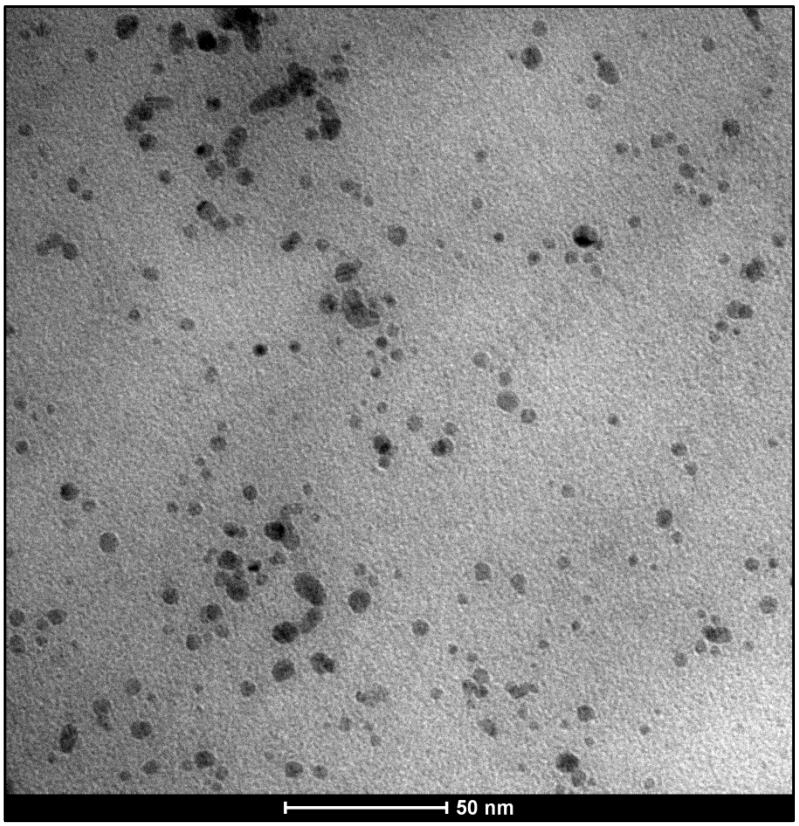
Şekil 46. TNBS ile kolit oluşturulup tedavi verilmeyen grupla (Grup B) yapılan mukoadezyon ölçüm çalışmalarına ait kuvvet-mesafe grafiği

4.1.10. Formülasyonda Bağlanmayan Ca^{+2} Miktarına Ait Bulgular

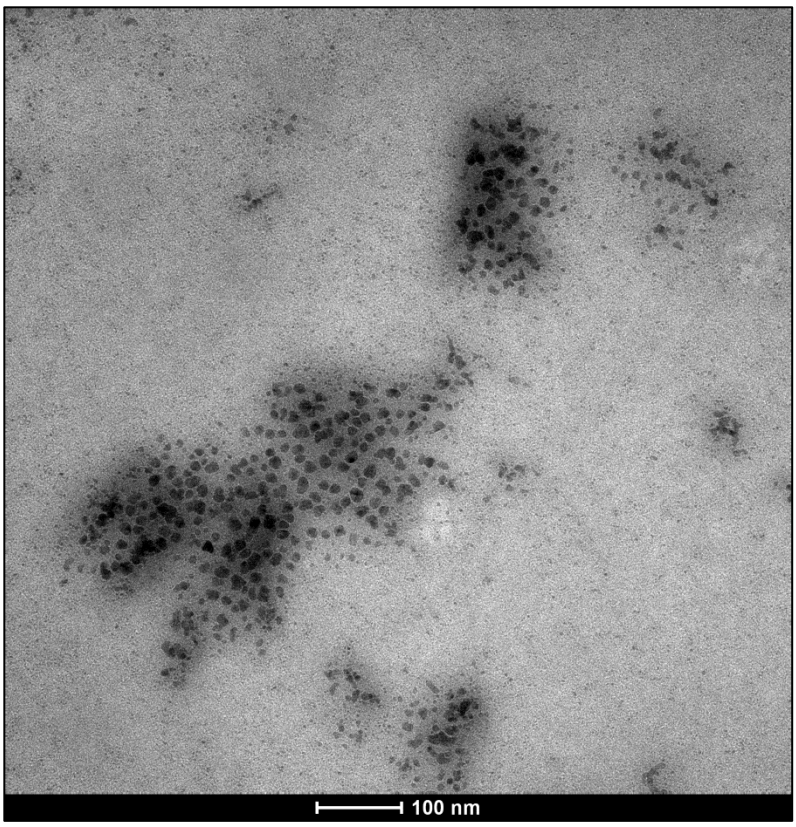
Bölüm 3.2.1.11'de anlatıldığı gibi alevli atomik emisyon spektroskopisi ile gerçekleştirilen analizler sonucunda P28'de tespit edilen, bağlanmayan (artık) Ca^{+2} miktarı 0.5±0.05 µg/mL olarak bulunmuştur.

4.1.11. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) İle Elde Edilen Görüntüler

Bölüm 3.2.1.12'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen analiz sonucunda nanopartikül formülasyonuna ait elde edilen TEM mikrografları Şekil 47'de ve Şekil 48'de verilmiştir.



Şekil 47. Nanopartikül formülasyonu (yakın çekim)



Şekil 48. Nanopartikül bulutları (uzak çekim)

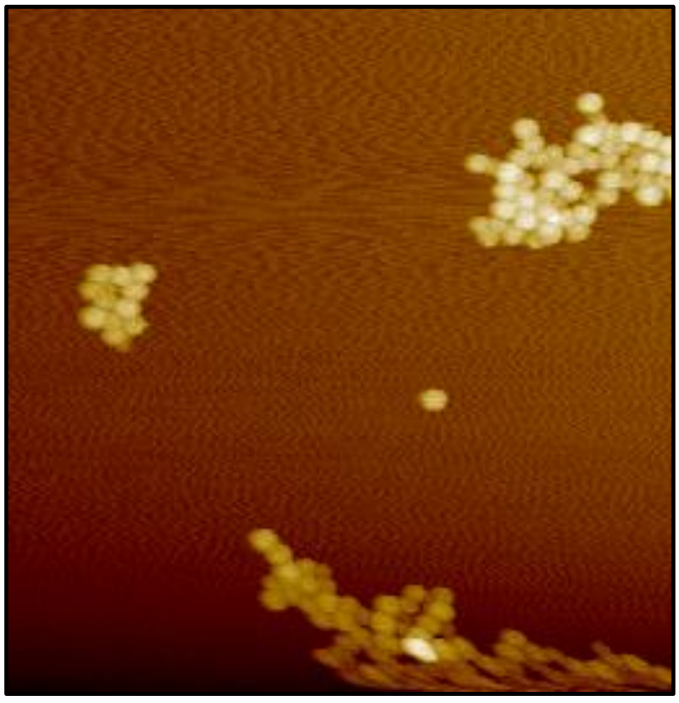
4.1.12. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) İle Elde Edilen Görüntüler

Bölüm 3.2.1.13'de anlatıldığı gibi non-contact mod ile çalışılarak gerçekleştirilen analiz sonucunda nanopartikül formülasyonuna ait elde edilen AFM mikrografları Şekil 49'de ve Şekil 50'de verilmiştir.

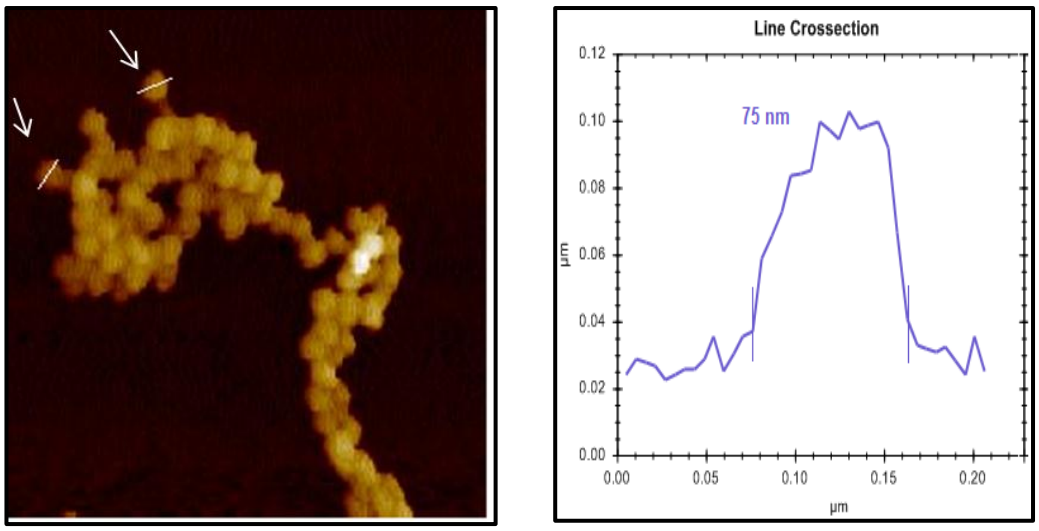
Görüntüleri elde ettikten sonra bilgisayar yazılımından yararlanarak nanopartiküllerin üç boyutlu (3D) görüntüsü (Şekil 53, Şekil 54) ve partikül büyüklüğü değeri (Şekil 51, Şekil 52) elde edilmiştir.



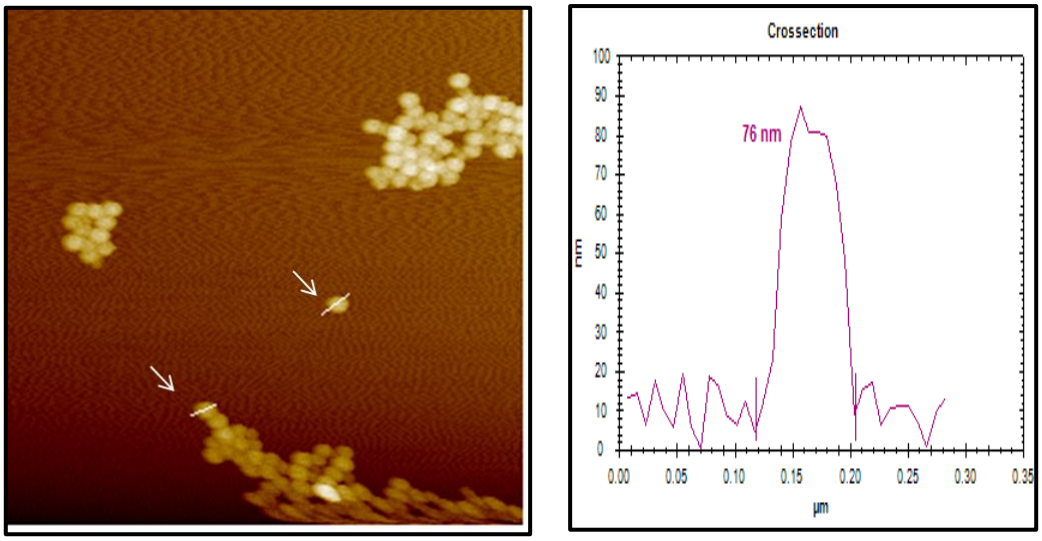
Şekil 49. P28'e ait nanopartiküllerin AFM mikrografı I



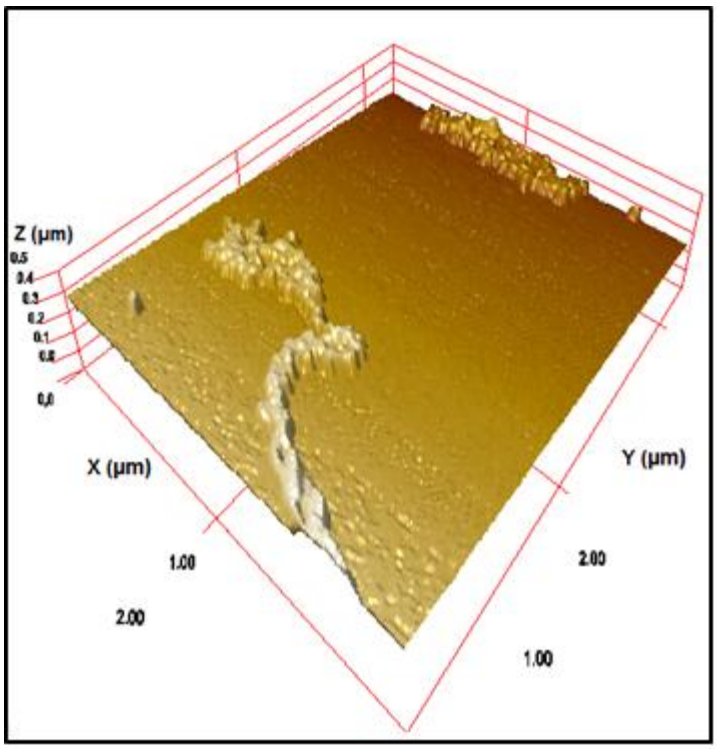
Şekil 50. P28'e ait nanopartiküllerin AFM mikrografı II



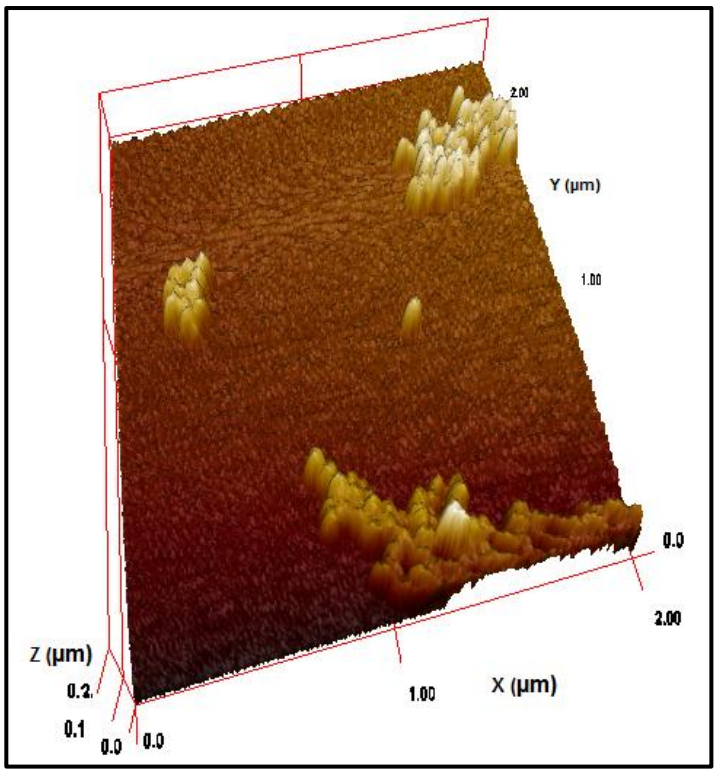
Şekil 51. Yazılımsal olarak nanopartiküllerin boyutunun tespit edilmesi I



Şekil 52. Yazılımsal olarak nanopartiküllerin boyutunun tespit edilmesi II



Şekil 53. P28'e ait nanopartiküllerin üç boyutlu (3D) gösterimi I



Şekil 54. P28'e ait nanopartiküllerin üç boyutlu (3D) gösterimi II

4.2. İN VİVO ÇALIŞMALARA AİT BULGULAR

Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen in vivo çalışmalarda, in vitro çalışmalardan elde edilen sonuçlar ışığında P28'in kullanılmasına karar verilmiştir.

TNBS ile kolit indüklenmiş sıçanlara, oral ve intrakolonik yoldan verilen MEL yüklü nanopartikül formülasyonunun kolit üzerine etkisi biyokimyasal, immünolojik ve histolojik açıdan değerlendirilmiştir.

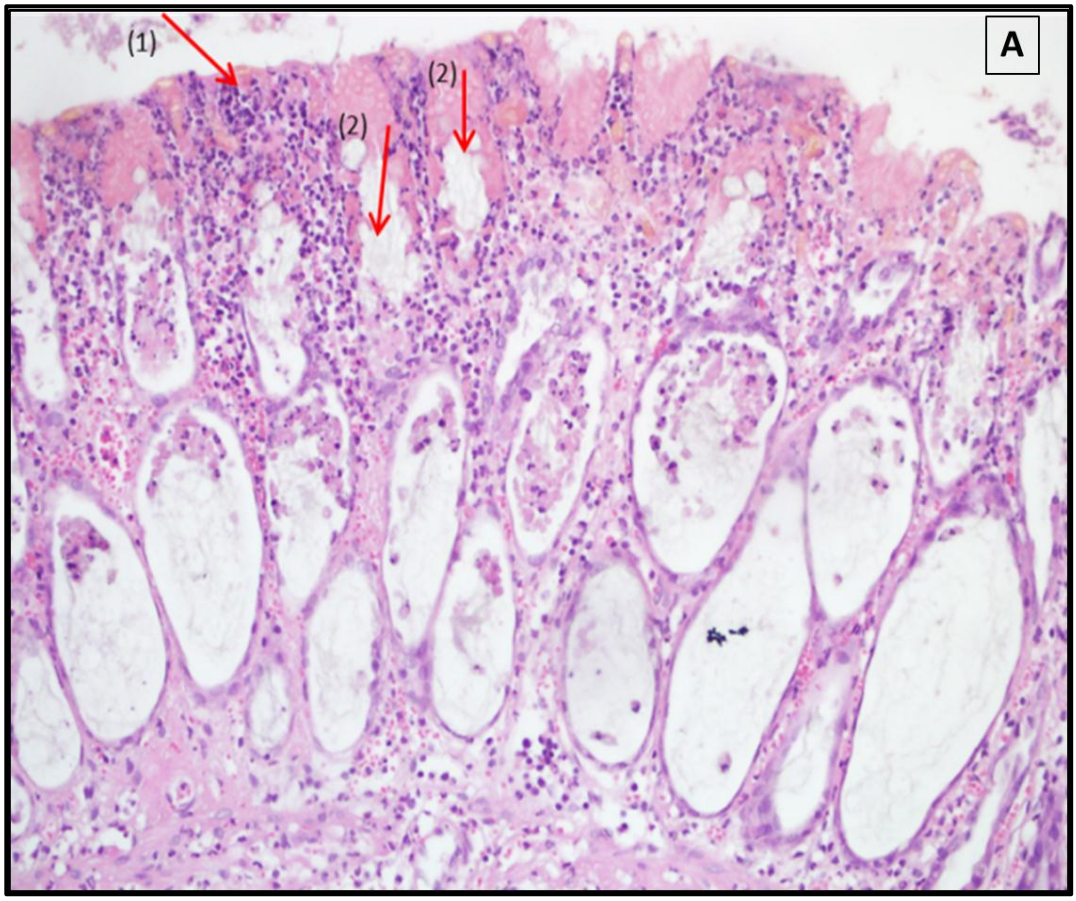
Elde edilen sonuçlar, oral ve intrakolonik yoldan verilen, MEL yüklenmeyen (boş) nanopartikül formülasyonu ile kıyaslanmıştır.

4.2.1. Kolit Oluşumuna Ait Patolojik Bulgular

Yapılan mikroskopik değerlendirmede, TNBS ile kolit indüklendikten 24 saat sonra feda edilen iki adet sıçanın kolonik dokularında yapılan patolojik incelemelerde elde edilen sonuçlara göre; tüm kesitlerde yaygın olarak izlenen mukozal iskemik nekroz öncelikli bulgudur. Kript hücrelerinin nekrozu ve dökülmesine bağlı boş kalmış görünümde kript kesitleri, luminal yüzeyde erozyon ve eksuda birikimi akut iskemik kolitin karakteristik bulguları olarak görülmektedir. İskemik nekroz mukozal düzeyde olup submukoza, muskularis propria veya subserozada mevcut değildir. Perforasyon saptanmamıştır.

Yapılan patolojik değerlendirmede Bölüm 3.2.2.3'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen kolit indükleme modeli uygun bulunmuş ve in vivo çalışmalara bu şekilde TNBS ile kolit indüklenerek devam edilmiştir.

TNBS ile kolit oluşturulan sıçanların kolonik dokularında yapılan patolojik değerlendirmeye ait ışık mikroskobu görüntüleri Resim 8A ve 8B'de gösterilmiştir.



(A) Hematoksilen&Eosin x200

Lamina propriada, mononükleer iltihabi hücre artışı (1).
Kript epitel hücrelerinin nekrozuna bağlı boş görünen kolon kriptleri, fibrin birikimi ve erozyon (2).

Resim 8. TNBS ile kolit oluşturulan sıçanlarda kolona ait ışık mikroskobu görüntüleri (A, B)



(B) Hematoksilen&Eosin x200

Kolon mukozasında subepitelyal alanda belirgin ödem (1).

Hemorajik alanlar, nekrotik oluşumlar ile karakterize iskemik kolit görünümü (2).

Tümüyle koagülasyon nekrozuna gitmiş mukoza (3).

Resim 8. Devamı

4.2.2. Gruplara Ait Kolon Örneklerinin Makroskopik Görünümü

Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen tedavi protokolünün sona ermesinin ardından sıçanlar feda edilmiştir. Resim 7'de verilen resimde gösterildiği gibi batınları açılarak tüm kolonları çıkarılmıştır. Kolonlar çıkarıldıktan hemen sonra altı farklı gruba ait kolonik doku görüntüleri Resim 9'da verilmiştir.



Grup A %0.9 NaCl verilen ve üzerinde herhangi bir işlem yapılmayan grup

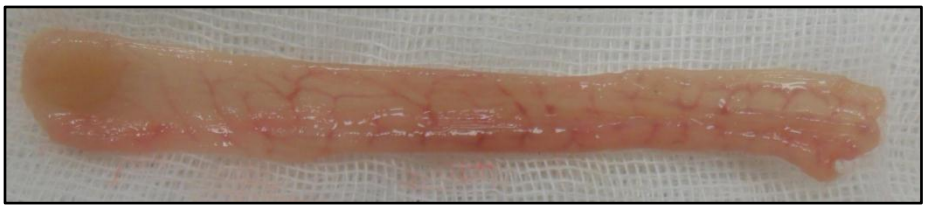


Grup B TNBS ile kolit oluşturulup, kendi haline bırakılan grup

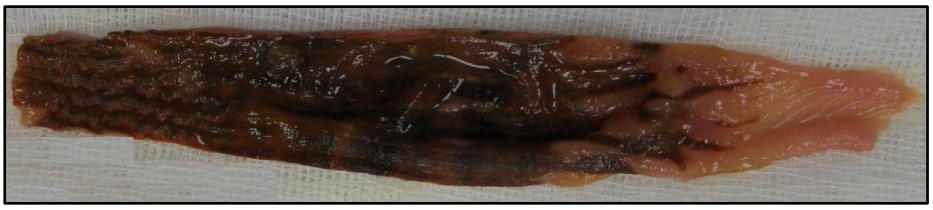


Grup C TNBS ile kolit oluşturulup, üç gün oral yoldan MEL yüklü nanopartikül formülasyonu uygulanan grup

Resim 9. Sıçanlarda kolonun makroskopik açıdan değerlendirilmesi



Grup D TNBS ile kolit oluşturulup, üç gün intrakolonik yoldan MEL yüklü nanopartikül formülasyonu uygulanan grup



Grup E TNBS ile kolit oluşturulup, üç gün oral yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan grup



Grup F TNBS ile kolit oluşturulup, üç gün intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan grup

Resim 9. Devamı

4.2.3. Sıçanlara Ait Bulgular

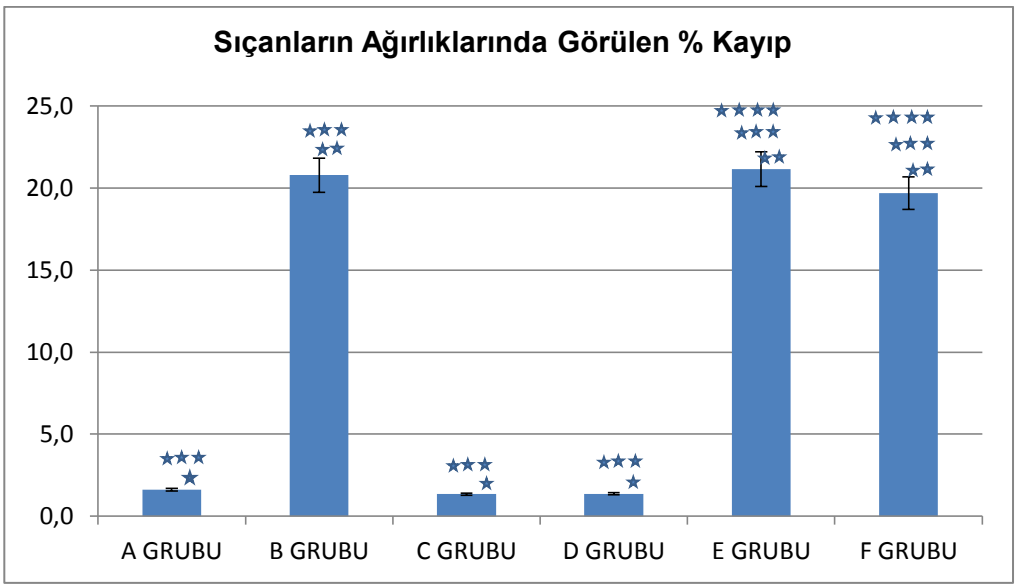
4.2.3.1. Sıçanlarda Görülen % Ağırlık Kaybına Ait Bulgular

Sıçanların ağırlıkları in vivo çalışmaların hemen başlangıcında gruplar oluşturulurken, in vivo çalışma boyunca günlük olarak ve feda edilmeden hemen önce ölçüldü.

Sıçanların in vivo çalışmaya başlandıktan hemen sonra tespit edilen ağırlıkları ile feda edilmeden hemen önce ölçülen ağırlıkları arasındaki fark karşılaştırılarak ağırlıklarında görülen % kayıp hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 42'de, grafik olarak Şekil 55'de verilmiştir.

Tablo 42. Çalışmanın sonunda sıçanların ağırlıklarında görülen % kayıp (n=8)

	A Grubu	B Grubu	C Grubu	D Grubu	E Grubu	F Grubu
% Ağırlık Kaybı (ORT±GA)	1.6±0.1	20.8±0.5	1.3±0.2	1.4±0.1	21.2±1.0	19.7±0.6



Şekil 55. Sıçanların ağırlıklarında görülen % kayıp (★ p>0.05 A, C ve D, ★★ p>0.05 B; E ve F'ye göre, ★★★ p<0.001 A, C ve D; B, E ve F'ye göre, ★★★★ p<0.05 E, F)

Sıçanlarda görülen % ağırlık kaybı çalışmasında; Grup A'da, Grup C'de ve Grup D'de sıçanların ağırlıklarında görülen % kayıp ihmal edilebilecek düzeydeyken (<%5), Grup B'de, Grup E'de ve Grup F'de ağırlık kaybı %20 civarındadır.

Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplarda (Grup C, D) görülen % ağırlık kaybı ile kontrol grubu (Grup A) arasında anlamlı bir fark yokken ($p>0.05$), boş nanopartikül formülasyonu ile tedavi edilen gruplarda (Grup E, F) ($p<0.001$) ve kolit grubunda (Grup B) ($p<0.001$) görülen % ağırlık kaybı arasında istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bir fark vardır.

Sıçanlarda görülen % ağırlık kaybı gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 43'de verilmiştir.

Tablo 43. Sıçanlarda görülen % ağırlık kaybının gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi

A→B	A→C	A→D	A→E	A→F
p<0.001	p>0.05	p>0.05	p<0.001	p<0.001
B→C	**B→D**	**B→E**	**B→F**	
p<0.001	p<0.001	p>0.05	p>0.05	
C→D	**C→E**	**C→F**		
p>0.05	p<0.001	p<0.001		
D→E	**D→F**			
p<0.001	p<0.001			
E→F				
p<0.05				

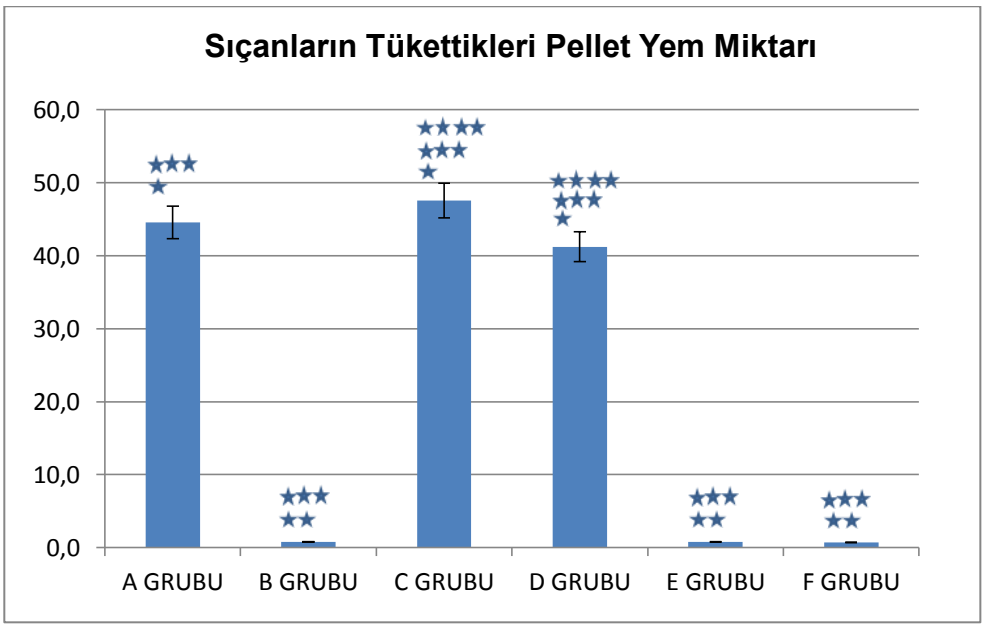
SPSS 16.0

4.2.3.2. Sıçanların Tükettikleri Pellet Yem Miktarına Ait Bulgular

Sıçanların tükettikleri pellet yem miktarı her gün düzenli olarak kaydedilmiştir. Çalışmanın sonunda elde edilen verilere göre tükettikleri toplam pellet yem miktarı Tablo 44'de, grafik olarak Şekil 56'da verilmiştir.

Tablo 44. Sıçanların tükettikleri pellet yem miktarı (n=8)

	A Grubu	B Grubu	C Grubu	D Grubu	E Grubu	F Grubu
Tüketilen Yem Miktarı (Gram) (ORT±GA)	44.6±3.7	0.8±0.2	47.6±8.7	41.2±0.9	0.8±0.1	0.7±0.1



Şekil 56. Sıçanların tükettikleri pellet yem miktarı (★ p>0.05 A; C ve D'ye göre, ★★ p>0.05 B, E ve F, ★★★ p<0.001 A, C ve D; B, E ve F'ye göre, ★★★★ p<0.05 C, D)

Kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanlar tüm çalışma boyunca bir gramdan daha az yem tükettiler. Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplardaki (Grup C, D) sıçanlar ile kontrol grubundaki (Grup A) sıçanlar ise tüm çalışma boyunca 40 gramdan fazla yem tükettiler.

Sıçanların tükettikleri pellet yem miktarı gruplararası karşılaştırıldığında, Grup A, C ve D'nin; Grup B, E ve F'ye göre daha yüksek miktarda yem tükettiği saptandı ve bu değerler istatistiksel olarak

önemli derecede anlamlıdır (p<0.001). Oral yoldan MEL tedavisi verilen gruptaki sıçanlar (Grup C) ise kontrol grubundaki sıçanlardan (Grup A) daha fazla miktarda yem tüketmiştir (p<0.05).

Kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanların tükettikleri pellet yem açısından anlamlı bir fark yoktur (p>0.05).

Sıçanların tükettikleri pellet yem miktarının gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 45'de verilmiştir.

Tablo 45. Sıçanların tükettikleri pellet yem miktarının gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi

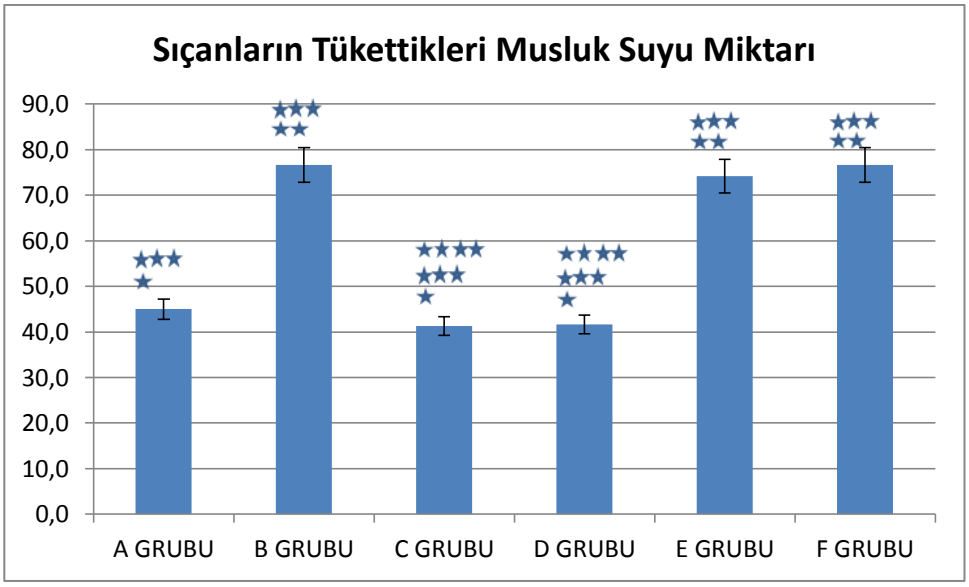
A→B	A→C	A→D	A→E	A→F
p<0.001	p>0.05	p>0.05	p<0.001	p<0.001
B→C	B→D	B→E	B→F	
p<0.001	p<0.001	p>0.05	p>0.05	
C→D	C→E	C→F		
p<0.05	p<0.001	p<0.001		
D→E	D→F			
p<0.001	p<0.001			
E→F				
p>0.05				SPSS 16.0

4.2.3.3. Sıçanların Tükettikleri Musluk Suyu Miktarına Ait Bulgular

Sıçanların tükettikleri musluk suyu miktarı her gün düzenli olarak kaydedilmiştir. Çalışmanın sonunda elde edilen verilere göre tükettikleri toplam musluk suyu miktarı Tablo 46'da, grafik olarak Şekil 57'de verilmiştir.

Tablo 46. Sıçanların tükettikleri musluk suyu miktarı (n=8)

	A Grubu	B Grubu	C Grubu	D Grubu	E Grubu	F Grubu
Tüketilen Su Miktarı (mL) (ORT±GA)	45.0±4.7	76.7±3.2	41.3±5.6	41.7±3.5	74.2±2.5	76.7±2.7



Şekil 57. Sıçanların tükettikleri musluk suyu miktarı (★ p>0.05 A, C ve D, ★★ p>0.05 B, E ve F, ★★★ p<0.001 A, C ve D; B, E ve F'ye göre, ★★★★ p>0.05 C, D)

Kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanlar, oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplardaki (Grup C, D) sıçanlardan ve kontrol grubundaki (Grup A) sıçanlardan çok daha fazla miktarda su tüketmişlerdir ($p<0.001$).

Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplardaki (Grup C, D) sıçanlar ile kontrol grubundaki (Grup A) sıçanların tükettiği su miktarı arasındaki fark anlamsızdır ($p>0.05$).

Kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanların tükettikleri musluk suyu açısından anlamlı bir fark yoktur (p>0.05).

Sıçanların tükettikleri musluk suyu miktarının gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 47'de verilmiştir.

Tablo 47. Sıçanların tükettikleri musluk suyu miktarının gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi

A→B	A→C	A→D	A→E	A→F
p<0.001	p>0.05	p>0.05	p<0.001	p<0.001
B→C	**B→D**	**B→E**	**B→F**	
p<0.001	p<0.001	p>0.05	p>0.05	
C→D	**C→E**	**C→F**		
p>0.05	p<0.001	p<0.001		
D→E	**D→F**			
p<0.001	p<0.001			
E→F				
p>0.05				

SPSS 16.0

4.2.3.4. Sıçanlarda Kolit Oluşumuna Bağlı Diyare-Kanama Durumu

Yapılan tüm in vivo çalışma boyunca tüm gruplarda yer alan hayvanların gaitaları kontrol edilmiştir. Sıçanların dışkılamasında görülen anormal davranışlar (kanamalı dışkılama, diyare) kayıt altına alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 48'de verilmiştir.

Tablo 48. Sıçanlarda kolit oluşumuna bağlı diyare-kanama durumu (n=8)

	A Grubu (n=8)	**B Grubu (n=8)**	**C Grubu (n=8)**	**D Grubu (n=8)**	**E Grubu (n=8)**	**F Grubu (n=8)**
Diyaresi olan sıçan sayısı	0/8	8/8	2/8	3/8	8/8	8/8
Kanaması olan sıçan sayısı	0/8	8/8	0/8	0/8	7/8	8/8

Kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruptaki (Grup F) sıçanların hepsinde kanama ve diyare görülmüştür. Oral yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruptaki sıçanların ise sekizinde diyare, yedisinde kanama tespit edilmiştir.

Oral yoldan MEL tedavisi verilen gruptaki (Grup C) sıçanların ikisinde, intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruptaki sıçanların üçünde sadece diyare görülmüştür.

Kontrol grubunda (Grup A) ise herhangi bir diyare ve ishal görülmemiştir.

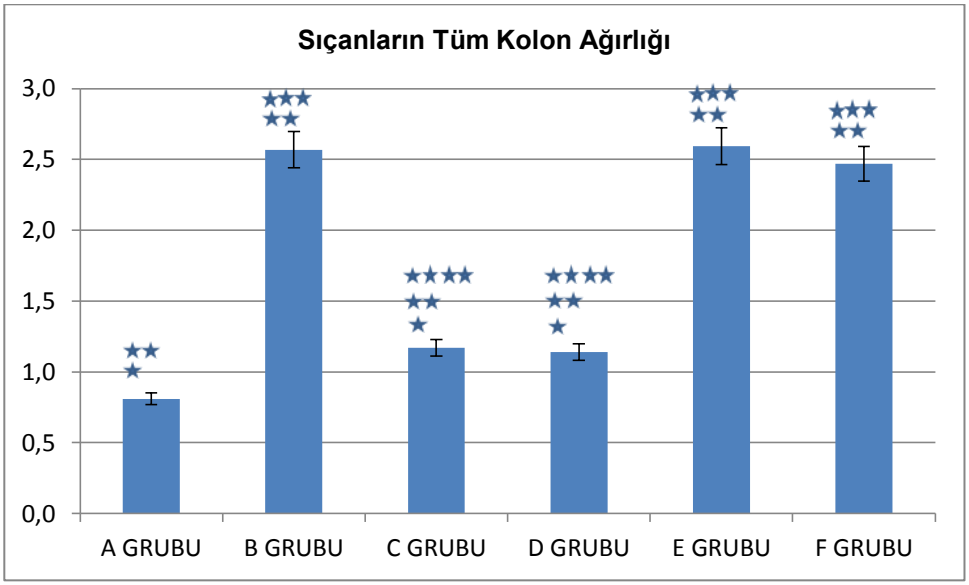
4.2.3.5. Sıçanların Tüm Kolon Ağırlığına Ait Bulgular

Sıçanlar feda edildikten hemen sonra ksifopubik median kesi ile laparatomi (Resim 7) gerçekleştirilerek sıçanların tüm kolonu çıkartılmıştır. Kolon, %0.9 NaCl ile yıkanarak gaita kalıntıları temizlenmiştir ve kurulandıktan sonra tüm kolonun ağırlığı ölçülerek kaydedilmiştir.

Elde edilen sonuçlar Tablo 49'da, grafik olarak Şekil 58'de verilmiştir.

Tablo 49. Sıçanların tüm kolon ağırlığı (n=8)

	A Grubu	B Grubu	C Grubu	D Grubu	E Grubu	F Grubu
Tüm Kolon Ağırlığı (Gram) (ORT±GA)	0.8±0.1	2.6±0.1	1.2±0.1	1.1±0.1	2.6±0.1	2.5±0.2



Şekil 56. Sıçanların tüm kolon ağırlığı (★ p<0.05 A; C ve D'ye göre, ★★ p<0.001 A, C ve D; B, E ve F'ye göre, ★★★ p>0.05 B, E ve F, ★★★★ p>0.05 C, D)

Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplardaki sıçanların tüm kolon ağırlığı (Grup C, D); kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanların tüm kolon ağırlığından anlamlı derecede çok düşüktür ($p<0.001$). Kontrol grubundaki sıçanların (Grup A) tüm kolon ağırlığı ise oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplardaki (Grup C, D) sıçanların tüm kolon ağırlığından anlamlı derecede düşüktür ($p<0.05$).

Kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanların tüm kolon ağırlığı arasında anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$).

Sıçanların tüm kolon ağırlıkları gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 50'de verilmiştir.

Tablo 50. Sıçanların tüm kolon ağırlığının gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi

A→B	A→C	A→D	A→E	A→F
p<0.001	p<0.05	p<0.05	p<0.001	p<0.001
B→C	B→D	B→E	B→F	
p<0.001	p<0.001	p>0.05	p>0.05	
C→D	C→E	C→F		
p>0.05	p<0.001	p<0.001		
D→E	D→F			
p<0.001	p<0.001			
E→F				
p>0.05				

SPSS 16.0

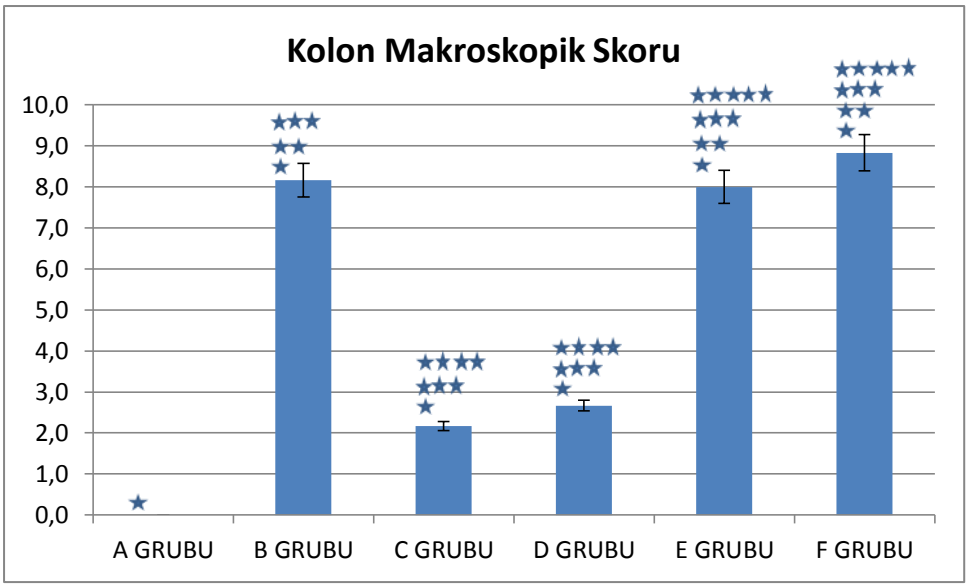
4.2.3.6. Kolon Makroskopik Skoruna Ait Bulgular

Sıçanlar feda edildikten sonra laparatomi gerçekleştirilerek çıkarılan kolonları, Bölüm 3.2.2.7'de verilen Tablo 20'de yer alan patolojik bulgular ve bunlara karşılık gelen skorlara göre makroskopik olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan makroskopik değerlendirmeye göre gruplarda yer alan sıçanların kolonik makroskopik skor değerleri Tablo 51'de, grafik olarak Şekil 59'da verilmiştir.

Tablo 51. Sıçanların kolonlarına ait makroskopik skor değerleri (n=8)

	A Grubu	B Grubu	C Grubu	D Grubu	E Grubu	F Grubu
Kolon Makroskopik Skoru (ORT±GA)	0.0±0.0	8.2±0.5	2.2±0.3	2.7±0.3	8.0±0.4	8.8±0.3



Şekil 59. Sıçanların kolonlarına ait makroskopik skor değerleri (★ p<0.001 A; B, C, D, E ve F'ye göre, ★★ p>0.05 B; E ve F'ye göre, ★★★ p<0.001 C ve D; B, E ve F'ye göre, ★★★★ p<0.05 C;D, ★★★★★ p<0.05 E, F)

Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplardaki (Grup C, D) sıçanların kolonik makroskopik skor değerleri, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanların makroskopik skor değerlerinden çok daha küçüktür ($p<0.001$). Ayrıca oral yoldan MEL tedavisi verilen gruba (Grup C) ait makroskopik skor değerleri ise intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruptaki (Grup D) sıçanların kolonik makroskopik skor değerlerinden daha küçüktür ($p<0.05$).

İntrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan grupta (Grup F) yer alan sıçanlara ait makroskopik skor değerleri oral yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan grupta (Grup E) yer alan sıçanların makroskopik skor değerlerinden daha yüksektir ($p<0.05$).

Sıçanların kolonlarına ait makroskopik skor değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 52'de verilmiştir.

Tablo 52. Sıçanların kolonlarına ait makroskopik skor değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi

A→B	A→C	A→D	A→E	A→F
p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001
B→C	B→D	B→E	B→F	
p<0.001	p<0.001	p>0.05	p>0.05	
C→D	C→E	C→F		
p<0.05	p<0.001	p<0.001		
D→E	D→F			
p<0.001	p<0.001			
E→F				
p<0.05				

SPSS 16.0

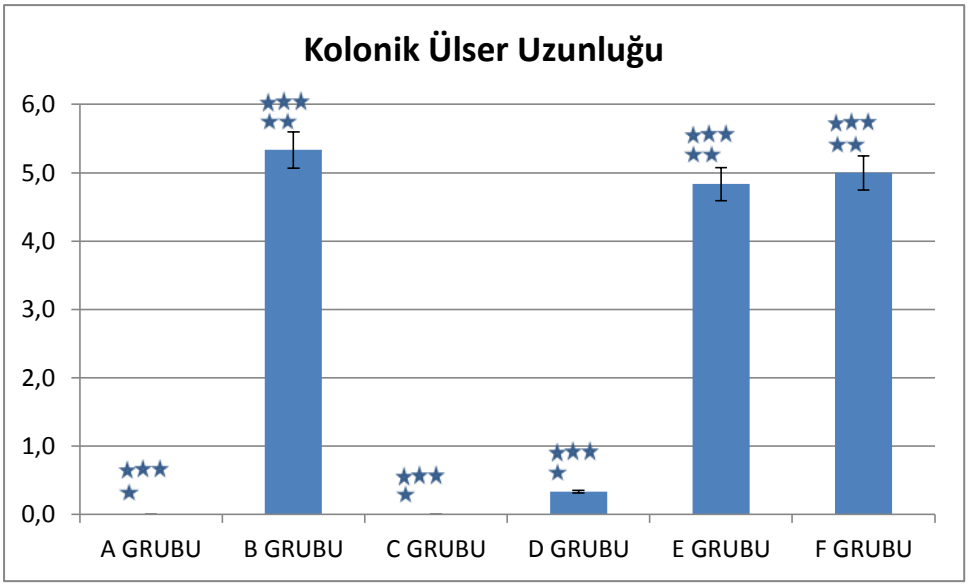
4.2.3.7. Kolonik Ülser Uzunluğuna Ait Bulgular

Sıçanlar feda edildikten sonra laparatomi gerçekleştirilerek çıkarılan kolonlarında, TNBS maruziyeti sonucunda gelişen ülser uzunluğu ölçülmüştür.

Elde edilen verilere göre kolonik ülser uzunluğu Tablo 53'de, grafik olarak Şekil 60'da verilmiştir.

Tablo 53. Sıçanların kolonik ülser uzunluğu (n=8)

	A Grubu	B Grubu	C Grubu	D Grubu	E Grubu	F Grubu
Kolonik Ülser Uzunluğu (cm) (ORT±GA)	0.0±0.0	5.3±0.8	0.0±0.0	0.3±0.5	4.8±0.3	5.0±0.4



Şekil 60. Sıçanların kolonik ülser uzunluğu (★ p>0.05 A, C ve D, ★★ p>0.05 B, E ve F, ★★★ p<0.001 A, C ve D; B, E ve F'ye göre)

Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplardaki (Grup C, D) sıçanların kolonik ülser uzunluğu değerleri, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanların ülser uzunluğu değerlerinden çok daha küçüktür ($p<0.001$). Kontrol grubundaki (Grup A) sıçanların ülser uzunluğu değeriyle ise aralarındaki fark anlamsızdır ($p>0.05$).

Kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanların kolonik ülser uzunluğu açısından anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$).

Sıçanların kolonlarına ait ülser uzunluğu değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 54'de verilmiştir.

Tablo 54. Sıçanların kolonlarına ait ülser uzunluğu değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi

A→B	A→C	A→D	A→E	A→F
p<0.001	p>0.05	p>0.05	p<0.001	p<0.001
B→C	B→D	B→E	B→F	
p<0.001	p<0.001	p>0.05	p>0.05	
C→D	C→E	C→F		
p>0.05	p<0.001	p<0.001		
D→E	D→F			
p<0.001	p<0.001			
E→F				
p>0.05				

SPSS 16.0

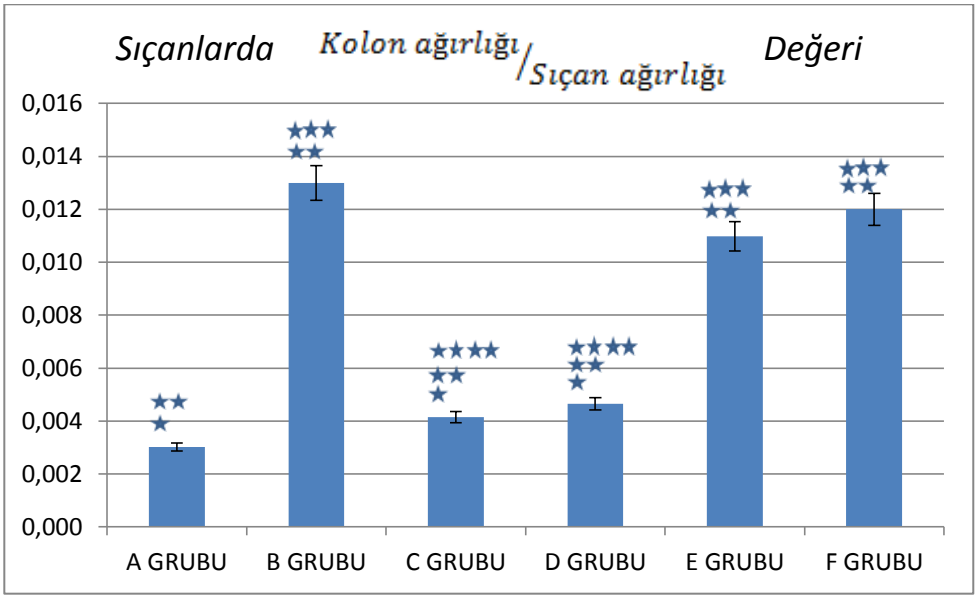
4.2.3.8. Sıçanlarda *Kolon Ağırlığı/Sıçan Ağırlığı* Değerine Ait Bulgular

Sıçanlar feda edilmeden hemen önce ağırlıkları ve laparatomi işlemi ile çıkarılan kolonlarının ağırlıkları tespit edilerek *kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı* değeri hesaplanmıştır.

Elde edilen verilere göre hesaplanan değerler Tablo 55'de, grafik olarak Şekil 61'de verilmiştir.

Tablo 55. Grupların kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı değerleri (n=8)

	A Grubu	B Grubu	C Grubu	D Grubu	E Grubu	F Grubu
$\frac{Kolon\ Ağırlığı}{Sıçan\ Ağırlığı}$ (Gram) (ORT±GA)	0.003± 0.0	0.013± 0.001	0.004± 0.0	0.005± 0.0	0.011± 0.001	0.012± 0.001



Şekil 61. Grupların kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı değerleri (★ p<0.05 A; C ve D'ye göre, ★★ p<0.001 A, C ve D; B, E ve F'ye göre, ★★★ p>0.05 B, E ve F, ★★★★ p>0.05 C, D)

Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplardaki (Grup C, D) sıçanların *kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı* değerleri, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanların *kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı* değerlerinden çok daha küçüktür ($p<0.001$). Kontrol grubundaki (Grup A) sıçanların *kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı* değerinden ise daha büyüktür ($p<0.05$).

Kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanların *kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı* değerleri açısından anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$).

Sıçanların kolonlarına ait *kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı* değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 56'da verilmiştir.

Tablo 56. Grupların kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi

A→B	A→C	A→D	A→E	A→F
p<0.001	p<0.05	p<0.05	p<0.001	p<0.001
B→C	B→D	B→E	B→F	
p<0.001	p<0.001	p>0.05	p>0.05	
C→D	C→E	C→F		
p>0.05	p<0.001	p<0.001		
D→E	D→F			
p<0.001	p<0.001			
E→F				
p>0.05				

SPSS 16.0

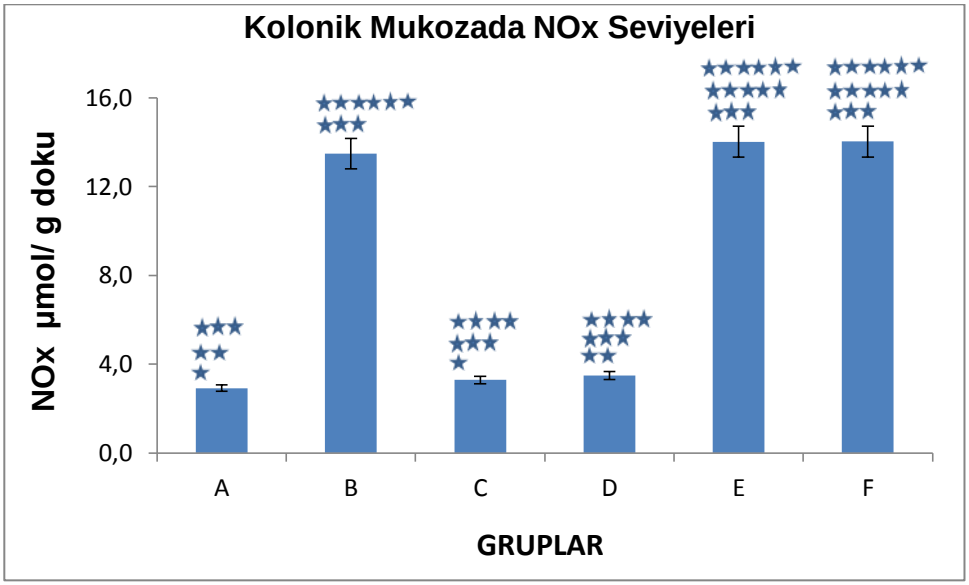
4.2.4. Kolonik Mukozada Oksidatif Stres Ölçümüne Ait Bulgular

4.2.4.1. Kolonik Mukozada NOx Seviyelerine Ait Bulgular

Bölüm 3.2.2.9.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen deneyler ve yapılan analizler sonrasında elde edilen, altı farklı gruba ait kolonik mukoza NOx seviyeleri Tablo 57'de, grafik olarak Şekil 62'de verilmiştir.

Tablo 57. Kolonik mukozada NOx seviyeleri (µmol/g doku) (ORT±GA) (n=8)

	A Grubu	B Grubu	C Grubu	D Grubu	E Grubu	F Grubu
NO_x	2.92±0.23	13.5±0.3	3.29±0.19	3.50±0.12	14.0±0.4	14.0±0.2



Şekil 62. Kolonik mukozada NOx seviyeleri (★ p>0.05 A, C, ★★ p<0.05 A, D, ★★★ p<0.001 A, C ve D; B, E ve F'ye göre, ★★★★ p>0.05 C, D, ★★★★★ p>0.05 E, F, ★★★★★★ p<0.05 B; E ve F'ye göre)

Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplardaki (Grup C, D) sıçanlara ait kolonik NOx değerleri, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanların kolonik NOx değerlerinden çok daha küçüktür ($p<0.001$). Oral yoldan MEL tedavisi verilen gruptaki (Grup C) sıçanların kolonik NOx değerleri ile kontrol grubundaki (Grup A) sıçanların kolonik NOx değerleri arasında anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$).

Oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanlara ait kolonik NOx değerleri, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptaki (Grup B) sıçanların kolonik NOx değerlerinden daha yüksektir ($p<0.05$).

Oral ve intrakolonik yoldan MEL yüklü nanopartiküllerle yapılan tedavi ile kolonik NOx değerleri düşmüştür ve NOx değerleri kontrol grubuyla (Grup A) benzer şekilde düşük bulunmuştur. Oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplarda

(Grup E, F) bu değerler yüksektir ve kolit grubuyla (Grup B) benzer bulunmuştur.

Sıçanların kolonlarına ait NOx değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 58'de verilmiştir.

Tablo 58. Kolonik mukozada NOx değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi

A→B	A→C	A→D	A→E	A→F
p<0.001	p>0.05	p<0.05	p<0.001	p<0.001
B→C	B→D	B→E	B→F	
p<0.001	p<0.001	p<0.05	p<0.05	
C→D	C→E	C→F		
p>0.05	p<0.001	p<0.001		
D→E	D→F			
p<0.001	p<0.001			
E→F				
p>0.05				

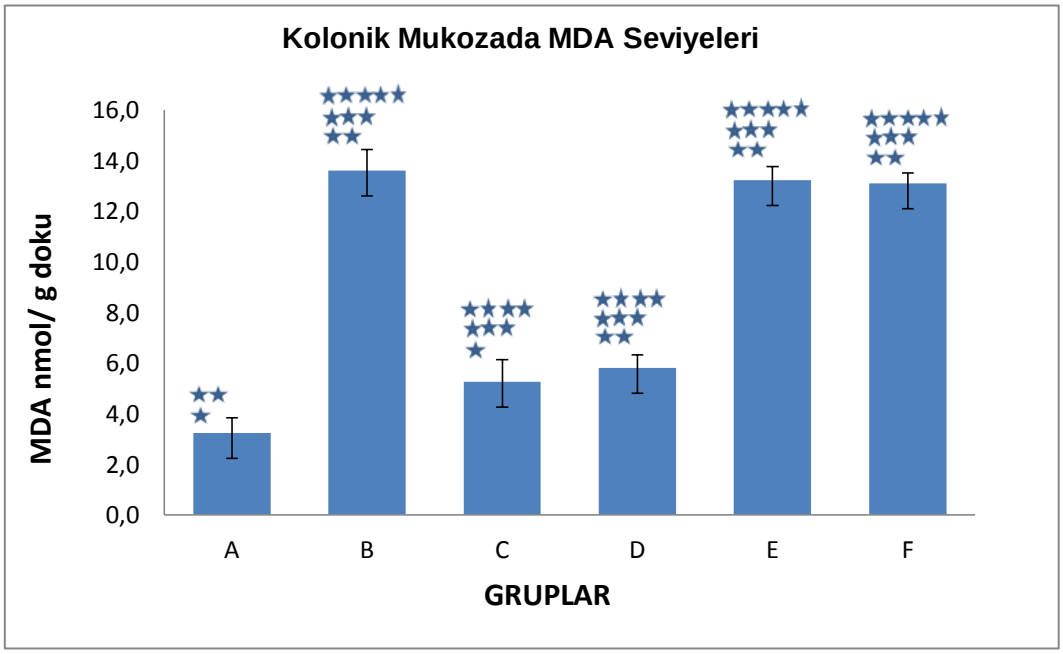
SPSS 16.0

4.2.4.2. Kolonik Mukozada MDA Seviyelerine Ait Bulgular

Bölüm 3.2.2.9.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen deneyler ve yapılan analizler sonrasında elde edilen, altı farklı gruba ait kolonik mukoza MDA seviyeleri Tablo 59'da, grafik olarak Şekil 63'de verilmiştir.

Tablo 59. Kolonik mukozada MDA seviyeleri (nmol/g doku) (ORT±GA) (n=8)

	A Grubu	B Grubu	C Grubu	D Grubu	E Grubu	F Grubu
MDA	3.23±0.40	13.6±0.6	5.26±0.59	5.81±0.34	13.22±0.40	13.1±0.3



Şekil 63. Kolonik mukozada MDA seviyeleri (★ p<0.05 A, C, ★★ p<0.001 A; D, B, E ve F'ye göre, ★★★ p<0.001 C ve D; B, E ve F'ye göre, ★★★★ p>0.05 C, D, ★★★★★ p>0.05 B, E ve F)

Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplardaki (Grup C, D) sıçanlara ait kolonik MDA değerleri, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanların kolonik MDA değerlerinden çok daha küçüktür ($p<0.001$). Kontrol grubundaki (Grup A) sıçanların kolonik MDA değerlerinden ise anlamlı derecede büyüktür ($p<0.05$).

Kolit oluşturulup tedavi verilmeyen grupta (Grup B) yer alan sıçanların kolonik MDA değerleri ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanların kolonik MDA değerleri açısından anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$).

Oral ve intrakolonik yoldan MEL yüklü nanopartiküllerle yapılan tedavi ile kolonik MDA değerleri düşmüştür (Grup C, D); MDA düzeyleri kontrol grubuyla (Grup A) benzer şekilde düşük bulunmuştur. Oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan

gruplarda (Grup E, F) bu değer yüksektir ve kolit grubuyla (Grup B) benzer düzeylerde bulunmuştur.

Sıçanların kolonlarına ait MDA değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 60'da verilmiştir.

Tablo 60. Kolonik mukozada MDA değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi

A→B	A→C	A→D	A→E	A→F
p<0.001	p<0.05	p<0.001	p<0.001	p<0.001
B→C	B→D	B→E	B→F	
p<0.001	p<0.001	p>0.05	p>0.05	
C→D	C→E	C→F		
p>0.05	p<0.001	p<0.001		
D→E	D→F			
p<0.001	p<0.001			
E→F				
p>0.05				

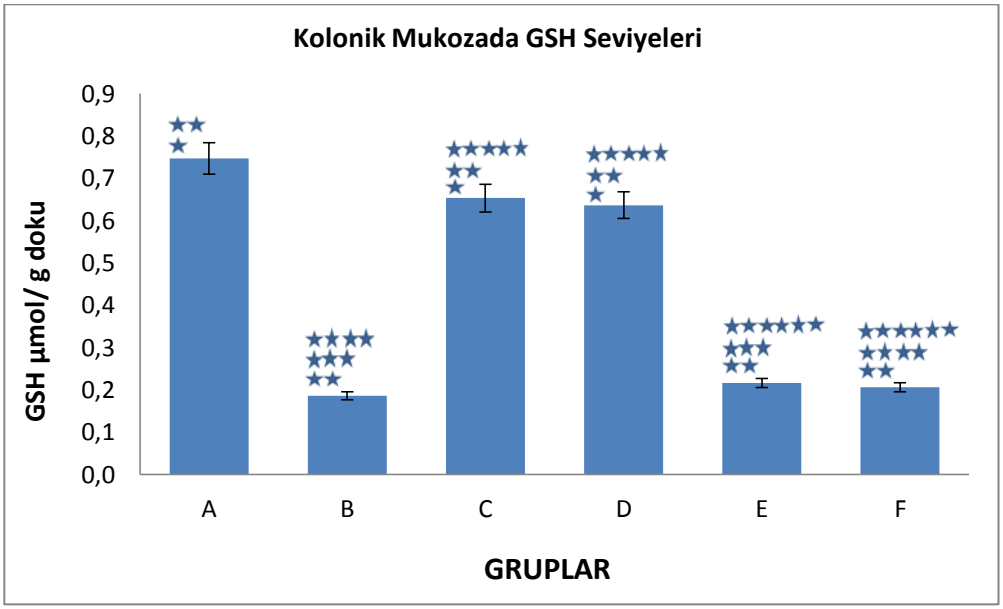
SPSS 16.0

4.2.4.3. Kolonik Mukozada GSH Seviyelerine Ait Bulgular

Bölüm 3.2.2.9.3'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen deneyler ve yapılan analizler sonrasında elde edilen, altı farklı gruba ait kolonik mukoza GSH seviyeleri Tablo 61'da, grafik olarak Şekil 64'de verilmiştir.

Tablo 61. Kolonik mukozada GSH seviyeleri (µmol/g doku) (ORT±GA) (n=8)

	A Grubu	B Grubu	C Grubu	D Grubu	E Grubu	F Grubu
GSH	0.747± 0.019	0.186± 0.014	0.654± 0.011	0.637± 0.005	0.216± 0.006	0.206± 0.007



Şekil 64. Kolonik mukozada GSH seviyeleri (★ p<0.05 A; C ve D'ye göre, ★★ p<0.001 A, C ve D; B, E ve F'ye göre, ★★★ p<0.05 B, E, ★★★★ p>0.05 B, F, ★★★★★ p<0.05 C, D, ★★★★★★ p>0.05 E, F)

Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplardaki (Grup C, D) sıçanlara ait kolonik GSH değerleri, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanların kolonik GSH değerlerinden çok daha büyüktür ($p<0.001$). Ancak kontrol grubundaki (Grup A) sıçanların kolonik GSH değerlerinden ise anlamlı derecede küçüktür ($p<0.05$).

Kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruba (Grup B) ait kolonik GSH değerleri, oral yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruptaki (Grup E) sıçanların kolonik GSH değerlerinden anlamlı derecede düşüktür ($p<0.05$). İntrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruptaki (Grup F) sıçanların kolonik GSH değerleri açısından ise aralarında anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$).

Oral ve intrakolonik yoldan MEL yüklü nanopartiküllerle yapılan tedavi ile kolonik GSH değerleri yükselmiştir. (Grup C, D). GSH

düzeyleri kontrol grubuyla (Grup A) benzer şekilde yüksek bulunmuştur. Oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplarda (Grup E, F) bu değer düşüktür ve kolit grubuyla (Grup B) benzer düzeylerde bulunmuştur.

Sıçanların kolonlarına ait GSH değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 62'de verilmiştir.

Tablo 62. Kolonik mukozada GSH değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi

A→B	A→C	A→D	A→E	A→F
p<0.001	p<0.05	p<0.05	p<0.001	p<0.001
B→C	B→D	B→E	B→F	
p<0.001	p<0.001	p<0.05	p>0.05	
C→D	C→E	C→F		
p<0.05	p<0.001	p<0.001		
D→E	D→F			
p<0.001	p<0.001			
E→F				
p>0.05				

SPSS 16.0

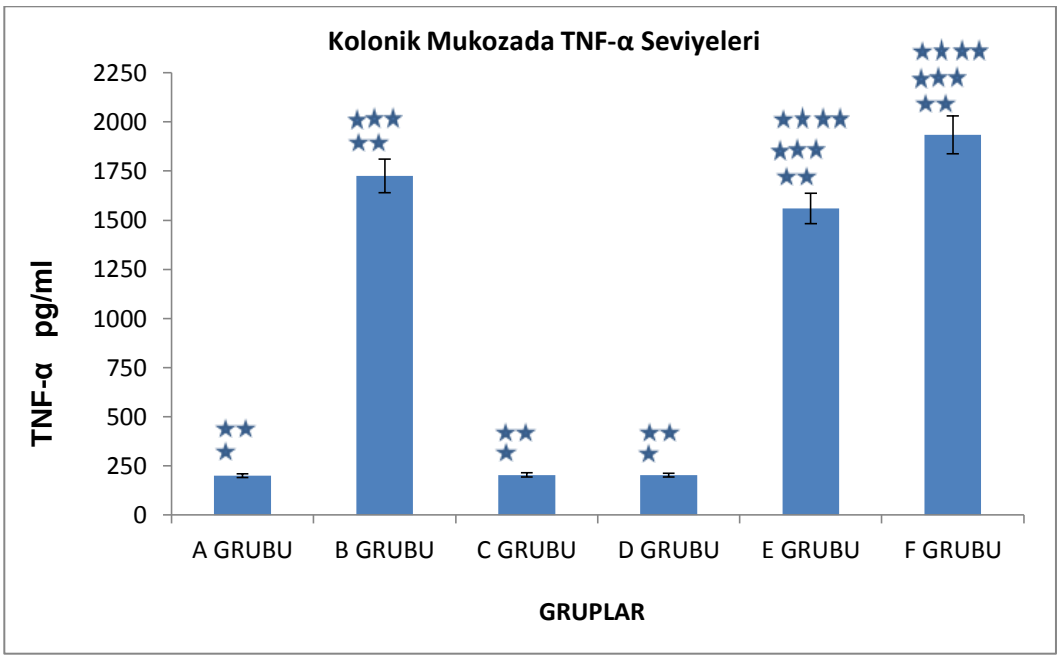
4.2.5. Kolonik Mukozada Sitokin Ölçümlerine Ait Bulgular

4.2.5.1. Kolonik Mukozada TNF-α Seviyelerine Ait Bulgular

Bölüm 3.2.2.10.1'de anlatıldığı gibi Elisa kitler kullanılarak gerçekleştirilen analizler sonucunda altı farklı grupta yer alan sıçanlara ait elde edilen kolonik mukozal TNF-α değerleri Tablo 63'de, grafik olarak Şekil 65'de verilmiştir.

Tablo 63. Kolonik mukozada TNF-α seviyeleri (pg/mL) (ORT±GA) (n=8)

	A Grubu	B Grubu	C Grubu	D Grubu	E Grubu	F Grubu
TNF-α	199.6± 26.0	1725.3± 127.2	203.7± 32.3	202.6± 32.3	1560.2± 38.6	1934.4± 117.3



Şekil 65. Kolonik mukozada TNF-α seviyeleri (★ p>0.05 A, C ve D, ★★ p<0.001 A, C ve D; B, E ve F'ye göre, ★★★ p<0.05 B; E ve F'ye göre, ★★★★ p<0.001 E, F)

Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplardaki (Grup C, D) sıçanlara ait kolonik TNF-α değerleri, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanların kolonik TNF-α değerlerinden çok daha küçüktür ($p<0.001$). Kontrol grubundaki (Grup A) sıçanların kolonik TNF-α değerleriyle ise aralarında anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$).

İntrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruptaki (Grup F) sıçanların kolonik TNF-α değerleri, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruba (Grup B) göre anlamlı derecede büyüktür ($p<0.05$). Kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptaki (Grup B) sıçanların kolonik TNF-α değerleri ise oral yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruptaki (Grup E) sıçanların kolonik TNF-α değerlerinden anlamlı derecede büyüktür ($p<0.05$).

Oral ve intrakolonik yoldan MEL yüklü nanopartiküllerle yapılan tedavi ile kolonik TNF-α değerleri düşmüştür (Grup C, D); TNF-α düzeyleri kontrol grubuyla (Grup A) benzer şekilde düşük bulunmuştur. Oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplarda (Grup E, F) bu değer çok daha yüksektir ve kolit grubuyla (Grup B) benzer düzeylerde bulunmuştur.

Sıçanların kolonlarına ait TNF-α değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 64'de verilmiştir.

Tablo 64. Kolonik mukozada TNF-α değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi

A→B	A→C	A→D	A→E	A→F
p<0.001	p>0.05	p>0.05	p<0.001	p<0.001
B→C	B→D	B→E	B→F	
p<0.001	p<0.001	p<0.05	p<0.05	
C→D	C→E	C→F		
p>0.05	p<0.001	p<0.001		
D→E	D→F			
p<0.001	p<0.001			
E→F				
p<0.001				

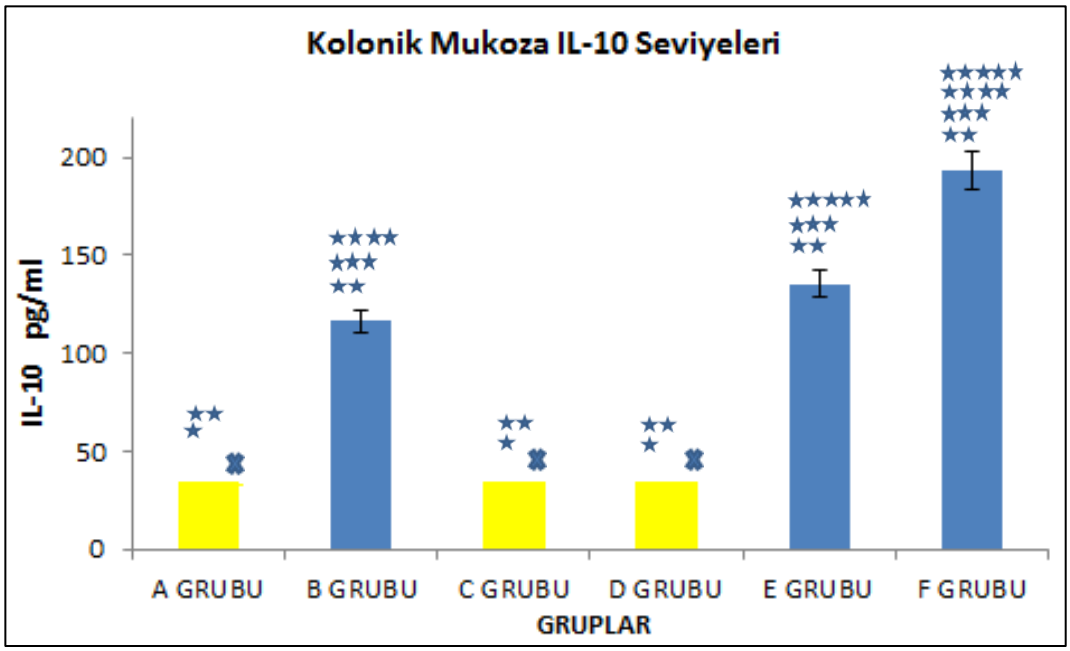
SPSS 16.0

4.2.5.2. Kolonik Mukozada IL-10 Seviyelerine Ait Bulgular

Bölüm 3.2.2.10.1'de anlatıldığı gibi Elisa kitler kullanılarak gerçekleştirilen analizler sonucunda altı farklı grupta yer alan sıçanlara ait elde edilen kolonik mukozal IL-10 değerleri Tablo 65'de, grafik olarak Şekil 66'da verilmiştir.

Tablo 65. Kolonik mukozada IL-10 seviyeleri (pg/mL) (ORT±GA) (n=8)

	A Grubu	B Grubu	C Grubu	D Grubu	E Grubu	F Grubu
IL-10	Tespit Edilebilecek Seviyenin Altında Bulunmuştur	116.3± 5.2	Tespit Edilebilecek Seviyenin Altında Bulunmuştur	Tespit Edilebilecek Seviyenin Altında Bulunmuştur	135.5± 9.9	192.9± 11.4



✖Kullanılan eBIOSCIENCE® Elisa kiti ile tespit edilebilecek en düşük IL-10 değeri **34.6 pg/mL**'dır.

Şekil 66. Kolonik mukozada IL-10 seviyeleri (★ p>0.05 A, C ve D, ★★ p<0.001 A, C ve D; B, E ve F'ye göre, ★★★ p<0.05 B, E, ★★★★ p<0.001 B, F, ★★★★★ p<0.001 E, F)

Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplardaki (Grup C, D) sıçanlara ait kolonik IL-10 değerleri, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanların kolonik IL-10 değerlerinden çok daha küçüktür (p<0.001). Kontrol grubundaki (Grup A) sıçanların kolonik IL-10 değerleriyle ise aralarında anlamlı bir fark yoktur (p>0.05). (Grup A, C ve D'nin kolonik IL-10 değerleri

tespit edilememiş olup, bu değerlerin 34.6 pg/mL'den küçük olduğu kesin olarak tespit edilmiştir.)

İntrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruptaki (Grup F) sıçanların kolonik IL-10 değerleri, oral yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruptaki (Grup E) sıçanların kolonik IL-10 değerlerinden anlamlı derecede büyüktür ($p<0.05$). Oral yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruptaki (Grup E) sıçanların kolonik IL-10 değerleri ise kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruba (Grup B) göre anlamlı derecede daha büyüktür ($p<0.05$).

Oral ve intrakolonik yoldan MEL yüklü nanopartiküllerle yapılan tedavi ile kolonik IL-10 değerleri düşmüştür (< 34.6 pg/mL) (Grup C, D). IL-10 düzeyleri kontrol grubuyla (Grup A) benzer şekilde 34.6 pg/mL'den düşük bulunmuştur. Oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplarda (Grup E, F) bu değer çok daha yüksektir ve kolit grubuyla (Grup B) benzer düzeylerde yüksek bulunmuştur.

Sıçanların kolonlarına ait IL-10 değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 66'de verilmiştir.

Tablo 66. Kolonik mukozada IL-10 değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi

A→B	A→C	A→D	A→E	A→F
p<0.001	p>0.05	p>0.05	p<0.001	p<0.001
B→C	B→D	B→E	B→F	
p<0.001	p<0.001	p<0.05	p<0.001	
C→D	C→E	C→F		
p>0.05	p<0.001	p<0.001		
D→E	D→F			
p<0.001	p<0.001			
E→F				
p<0.001				

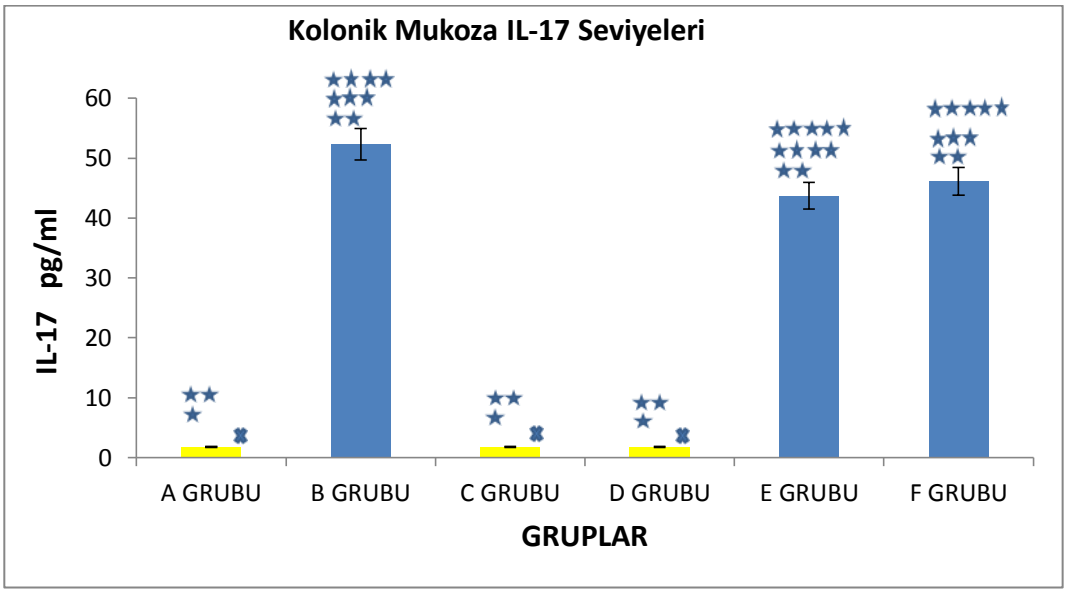
SPSS 16.0

4.2.5.3. Kolonik Mukozada IL-17 Seviyelerine Ait Bulgular

Bölüm 3.2.2.10.1'de anlatıldığı gibi Elisa kitler kullanılarak gerçekleştirilen analizler sonucunda altı farklı grupta yer alan sıçanlara ait elde edilen kolonik mukozal IL-17 değerleri Tablo 67'de, grafik olarak Şekil 67'de verilmiştir.

Tablo 67. Kolonik mukozada IL-17 seviyeleri (pg/mL) (ORT±GA) (n=8)

	A Grubu	B Grubu	C Grubu	D Grubu	E Grubu	F Grubu
IL-17	Tespit Edilebilecek Seviyenin Altında Bulunmuştur	52.3±2.0	Tespit Edilebilecek Seviyenin Altında Bulunmuştur	Tespit Edilebilecek Seviyenin Altında Bulunmuştur	43.7±2.5	46.1±1.1



✖ Kullanılan eBIOSCIENCE Elisa kiti ile tespit edilebilecek en düşük IL-17 değeri **1.77 pg**/mL'dır.

Şekil 67. Kolonik mukozada IL-17 seviyeleri (★ p>0.05 A, C ve D, ★★ p<0.001 A, C ve D; B, E ve F'ye göre, ★★★ p<0.05 B; F, ★★★★ p<0.001 B, E, ★★★★★ p>0.05 E, F)

Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplardaki (Grup C, D) sıçanlara ait kolonik IL-17 değerleri, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanların kolonik IL-17 değerlerinden çok daha küçüktür ($p<0.001$). Kontrol grubundaki (Grup A) sıçanların kolonik IL-10 değerleriyle ise aralarında anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$). (Grup A, C ve D'nin kolonik IL-17 değerleri tespit edilememiş olup, bu değerlerin 1.77 pg/mL'den küçük olduğu kesin olarak tespit edilmiştir.)

Kolit oluşturulup tedavi verilmeyen grubtaki (Grup B) gruptaki sıçanların kolonik IL-17 değerleri, intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruptaki (Grup F) sıçanların kolonik IL-17 değerlerinden anlamlı derecede daha büyüktür ($p<0.05$). İntrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruptaki (Grup F) sıçanların kolonik IL-17 değerleri ise oral yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruptaki (Grup E) sıçanların kolonik IL-17 değerlerinden anlamlı derecede daha büyüktür ($p<0.05$).

Oral ve intrakolonik yoldan MEL yüklü nanopartiküllerle yapılan tedavi ile kolonik IL-17 değerleri düşmüştür (< 1.77 pg/mL) (Grup C, D). IL-17 düzeyleri kontrol grubuyla (Grup A) benzer şekilde 1.77 pg/mL'den düşük bulunmuştur. Oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplarda (Grup E, F) bu değer çok daha yüksektir ve kolit grubuyla (Grup B) benzer düzeylerde yüksek bulunmuştur.

Sıçanların kolonlarına ait IL-17 değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 68'de verilmiştir.

Tablo 68. Kolonik mukozada IL-17 değerlerinin gruplararası istatistiksel değerlendirilmesi

A→B	A→C	A→D	A→E	A→F
p<0.001	p>0.05	p>0.05	p<0.001	p<0.001
B→C	B→D	B→E	B→F	
p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.05	
C→D	C→E	C→F		
p>0.05	p<0.001	p<0.001		
D→E	D→F			
p<0.001	p<0.001			
E→F				
p>0.05				

SPSS 16.0

4.2.6. Histolojik Çalışmalara Ait Bulgular

Altı farklı gruba ait kolon dokusu üzerinde Bölüm 3.2.2.11'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen histolojik çalışmalara ait bulgular resimlerle ilişkilendirilerek aşağıda verilmiştir.

Kontrol grubu (Grup A) Masson trikrom boyamalarında yapılan değerlendirmelerde, kolon dokusu, yüzey epiteline ait prizmatik epitel ve çok sayıda Goblet hücreleri içeren bezleriyle normal yapıda izlendi. Lamina propriya normal görünümdeydi ve tek tük mononükleer hücre infiltrasyonu ilgiyi çekiyordu. Submukoza ve tunika muskularis de normal yapıdaydı ve sürekliliğini koruyordu (Resim 10).

Kolit oluşturulan grupta (Grup B) Masson trikrom boyamalarında yapılan değerlendirmelerde, kolon dokusunda, yüzey epitel hücreleri genelde normal yapılarında izlenirken, bezlerin yapılarının bozulduğu görüldü. Yer yer mononükleer hücre infiltrasyonu olan alanlarda bezlerin kaybolduğu, buna karşın bazı bölgelerde bezlerin birbirleriyle birleşerek kistik yapılar oluşturduğu belirlendi. Lamina propriya, submukoza ve tunika muscularis' in de hücre infiltrasyonundan etkilendiği dikkati çekti (Resim 11A, 11B).

MEL yüklü nanopartikül uygulaması yapılan gruplarda oral (Grup C) (Resim 12A, 12B) ve intrakolonik (Grup D) uygulamaların (Resim 13A, 13B) her ikisinde de, yüzey ve bez epitelleri ile bağ dokusu infiltrasyonunun da oldukça normale döndüğü saptandı ve kolonik yapı normal olarak gözlendi. Ancak bazı bölgelerde kolit etkileşiminin sürdüğü ayırt ediliyordu. Yine bezlerin kaybolduğu ve kistik alanların varlığı da dikkati çekti. Gruplararasında yapılan değerlendirmede ise, doku genelinde, oral yolla uygulama yapılan gruba karşı, intrakolonik uygulamanın doku iyileştirmede daha az etkili olduğu belirlendi.

Boş nanopartikül uygulaması yapılan gruplarda ise, hem oral (Grup E) (Resim 14) hem de intrakolonik (Grup F) (Resim 15) uygulamaların her ikisinde de belirgin bir doku iyileşmesi olmadığı görüldü. Kolit grubuna benzer bulguların her iki grupta da sürdüğü belirlendi. Ancak iki grup kendi arasında karşılaştırıldığında, oral yolla uygulama yapılan grubun az düzeyde de olsa daha iyi olduğu belirlendi.

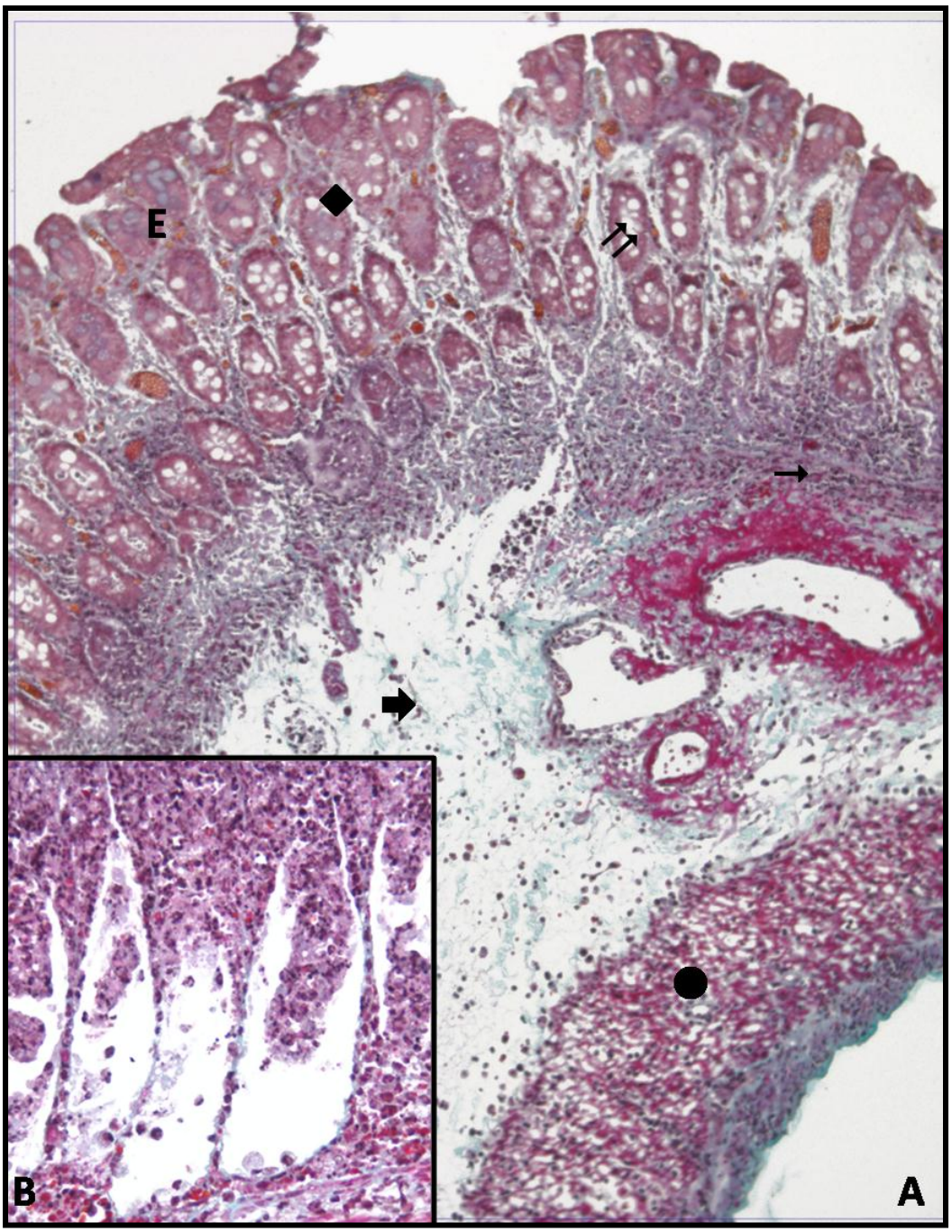


Resim 10: Kontrol grubuna (Grup A) ait kolon dokusu.

↳: Kripta, **E**: Epitel, ⇉: Goblet hücreleri, ➞: Lamina muscularis mukoza,

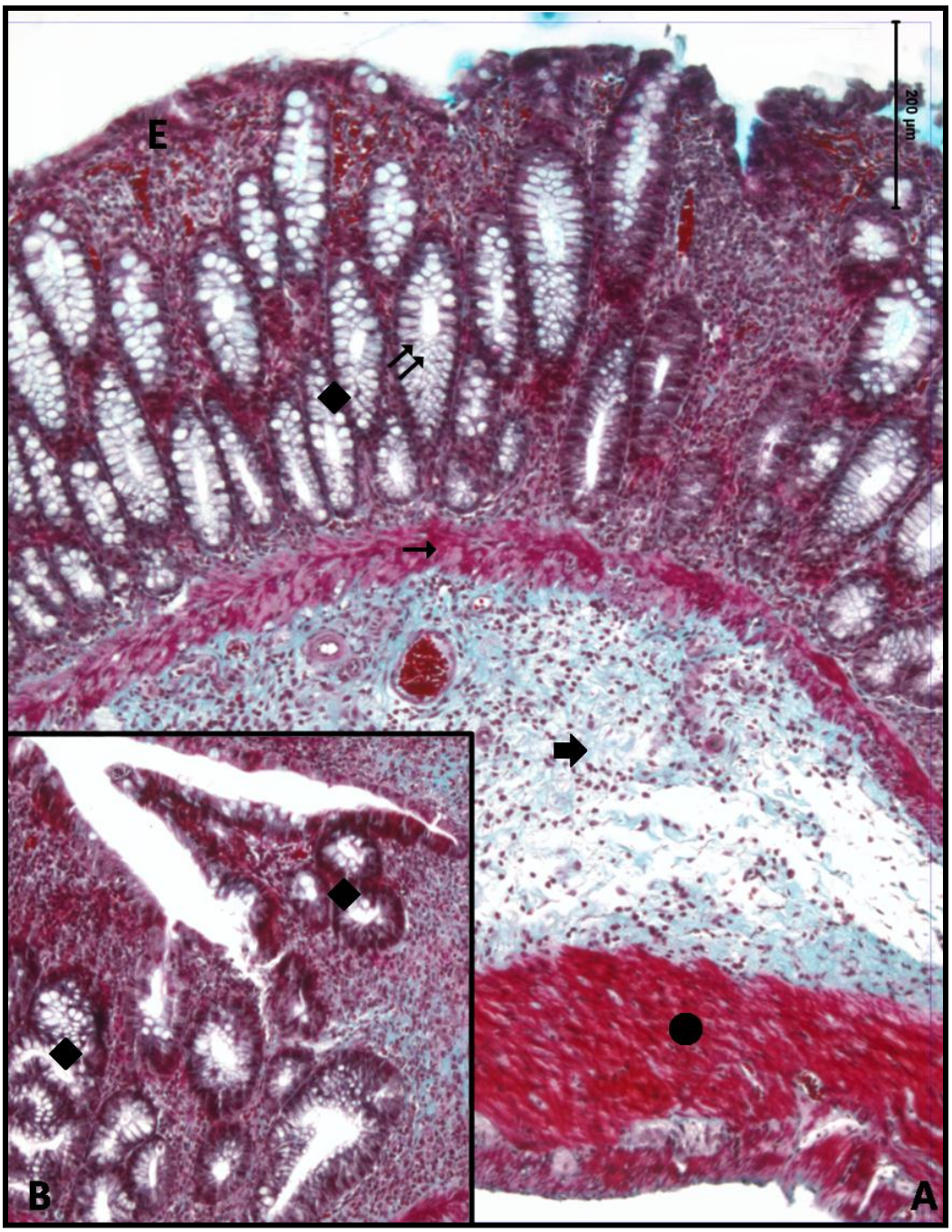
➡: Submukoza, ●: Tunica muscularis

(Masson trikrom X100)



Resim 11: Kolit oluşturulduktan sonra tedavi verilmeyen gruba (Grup B) ait kolon dokusu.
E: Epitel, ⇉: Goblet hücreleri, ◆: Bezler, →: Lamina muscularis mukoza,
➡: Submukoza, ●: Tunica muscularis

(Masson trikrom AX100, BX400)

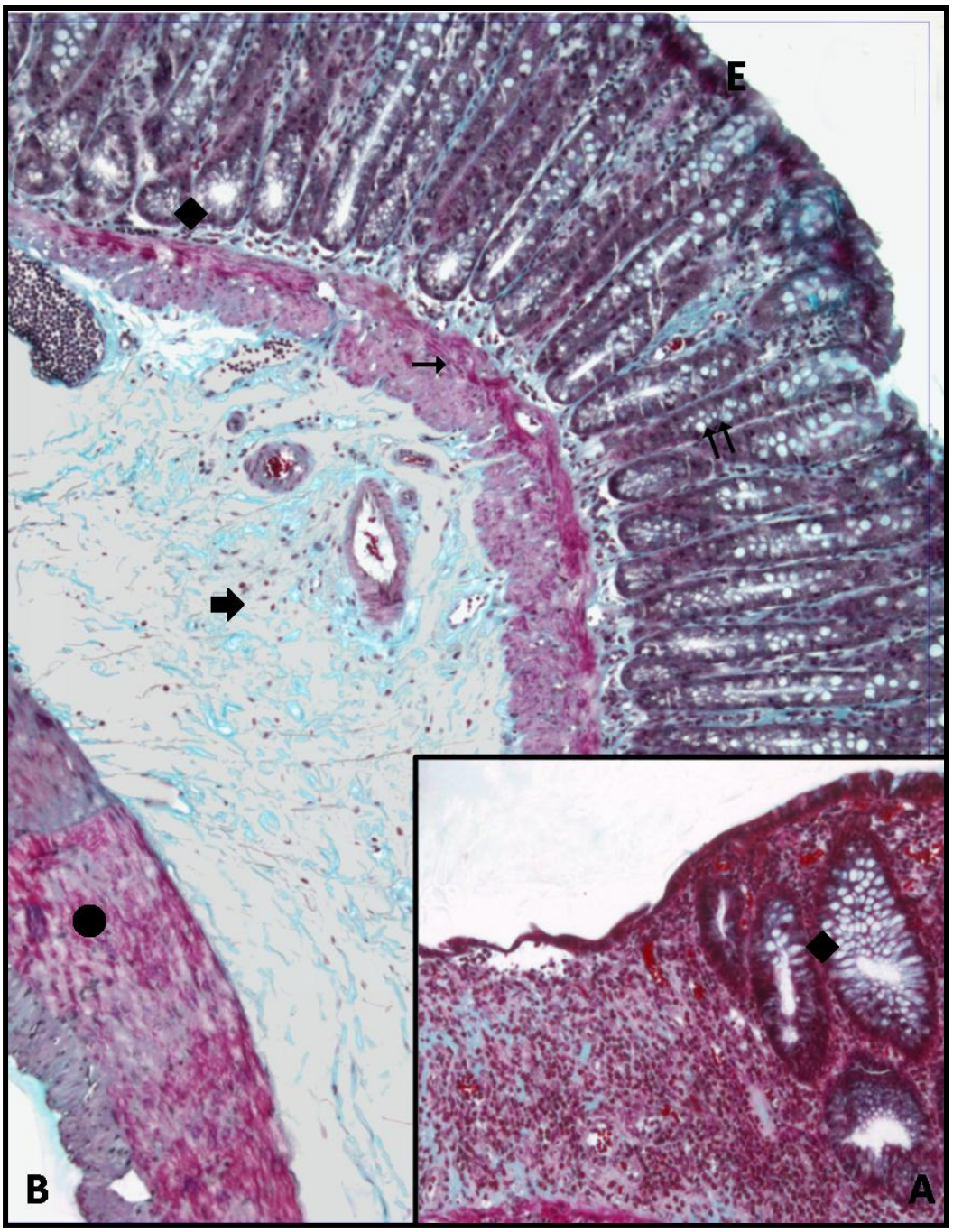


Resim 12: Kolit oluşturulduktan sonra oral yoldan MEL yüklü nanopartikül uygulaması yapılan gruba (Grup C) ait kolon dokusu.

E: Epitel, ⇉: Goblet hücreleri, ◆: Bezler, ➞: Lamina muscularis mukoza,

➡: Submukoza, ●: Tunica muscularis

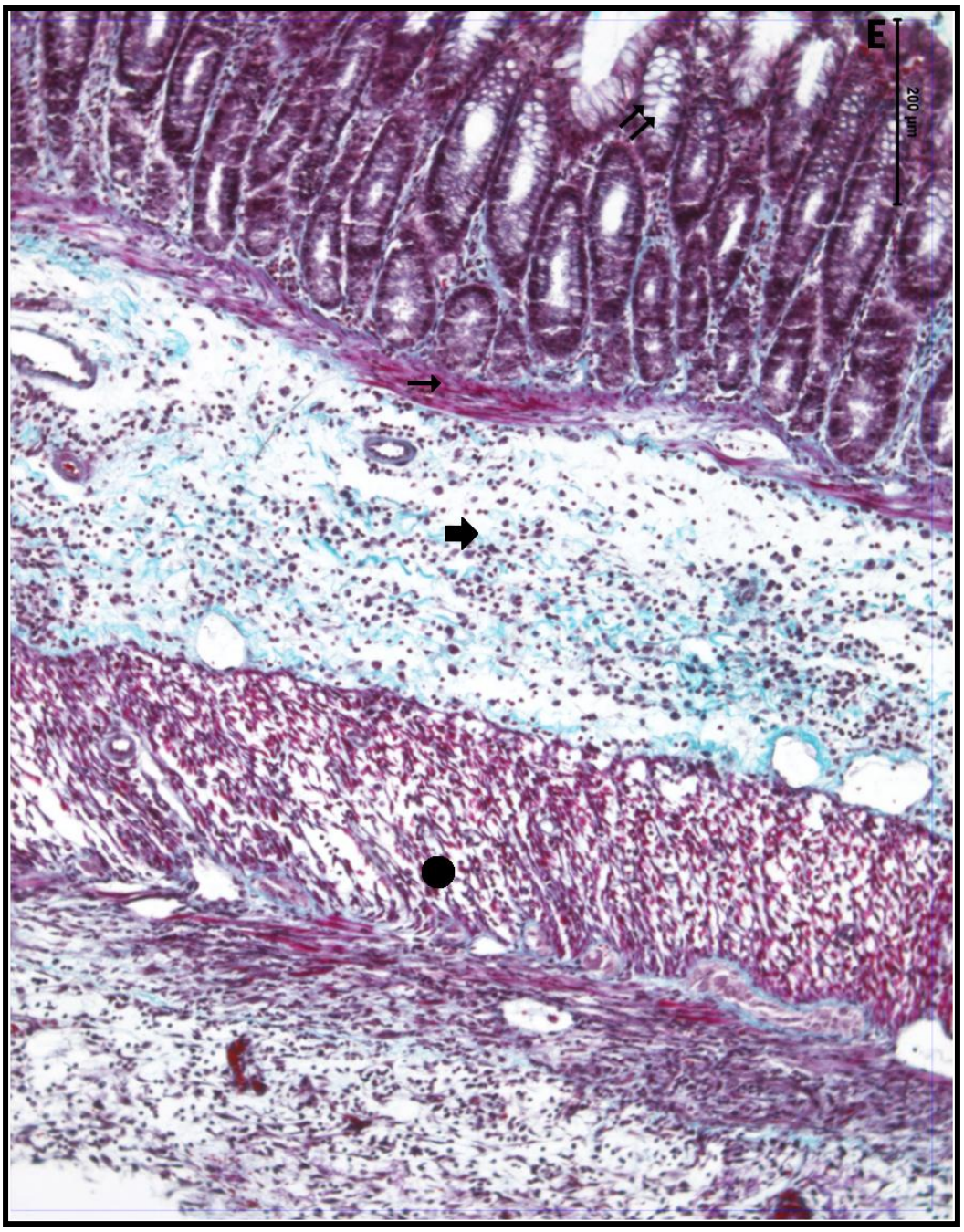
(Masson trikrom A,B X100)



Resim 13: Kolit oluşturulduktan sonra intrakolonik yoldan MEL yüklü nanopartikül uygulaması yapılan gruba (Grup D) ait kolon dokusu.

E: Epitel, ⇉: Goblet hücreleri, ◆: Bezler, ➞: Lamina muscularis mukoza, ➡: Submukoza, ●: Tunica muscularis

(Masson trikrom A,B X100)

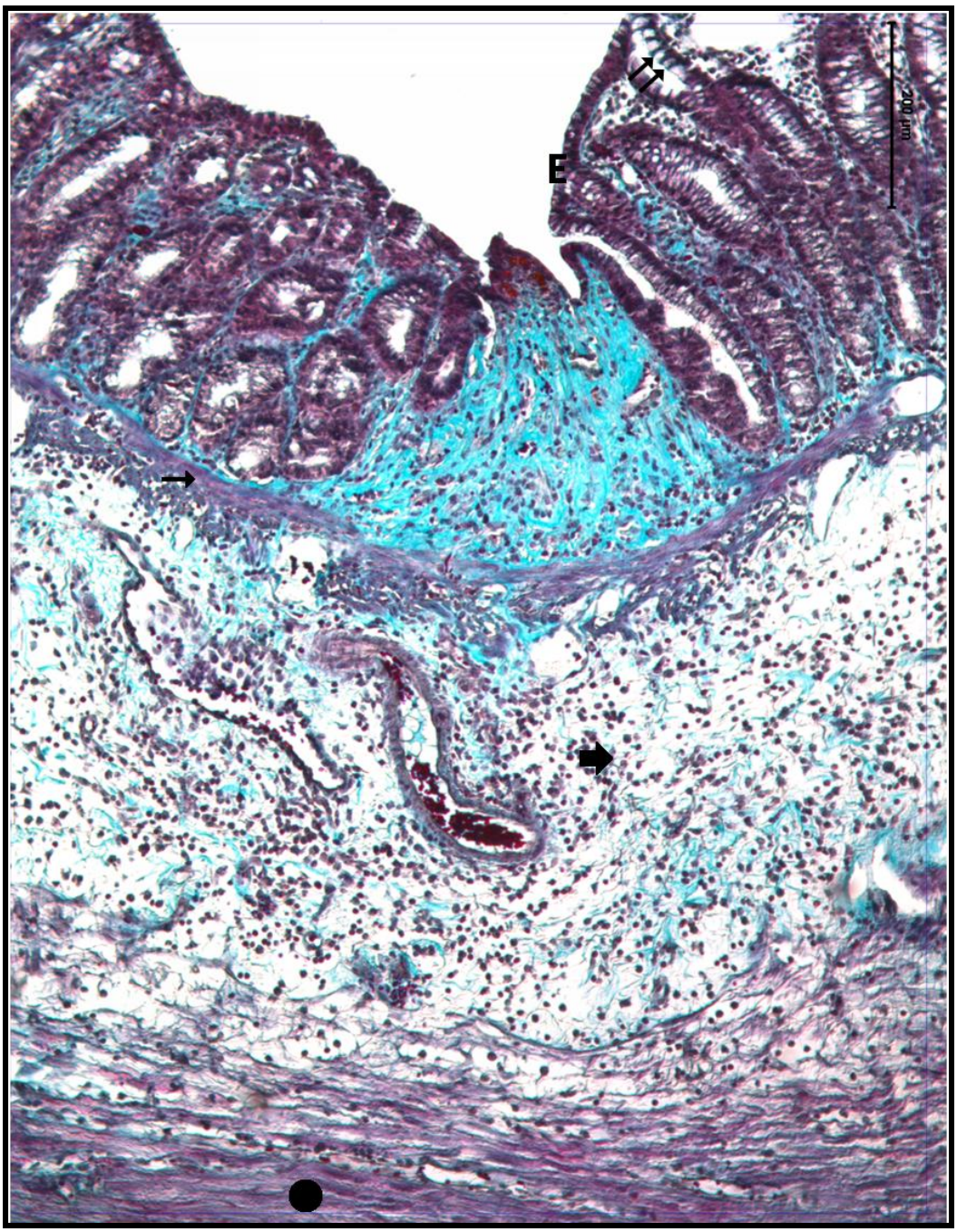


Resim 14: Kolit oluşturulduktan sonra oral yoldan boş nanopartikül uygulaması yapılan gruba (Grup E) ait kolon dokusu.

E: Epitel, ⇉: Goblet hücreleri, ➞: Lamina muscularis mukoza,

➡: Submukoza, ●: Tunica muscularis

(Masson trikrom X100).



Resim 15: Kolit oluşturulduktan sonra intrakolonik yoldan boş nanopartikül uygulaması yapılan gruba (Grup F) ait kolon dokusu.

E: Epitel, ⇉: Goblet hücreleri, ➞: Lamina muscularis mukoza,

➡: Submukoza, ●: Tunica muscularis

(Masson trikrom X100).

5. TARTIŞMA

İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH), intestinal inflamasyon ve mukozal doku hasarıyla başlayan, bozulmuş immun cevapla ilerleyen, intestinal ve ekstraintestinal belirtilere sebep olan, sık görülen kronik bir gastrointestinal sistem hastalığıdır.

İBH'nın patogenezi multifaktöriyeldir ve halen tam olarak açıklanamamıştır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar oksidatif stresin İBH'da major faktör olabileceğini vurgulamaktadır[141]. Yapılmış olan çalışmalarda İBH'da antioksidan enzim aktivetelerinde ve antioksidan düzeylerinde azalma tespit edilmiştir[42-46]. Dolayısıyla intestinal dokuların boşalan antioksidan kapasitesini artırmak ROM'nin oluşturduğu oksidatif doku hasarını azaltmada yararlı olabilir. Antioksidanların İBH'nın tedavisine farklı bir bakış açısı getirdiği düşünülmektedir[142].

İBH'da inflamasyonun başlamasıyla birlikte, bağırsaklardaki koruyucu mukus bariyerinin kalınlığı ve viskozitesi artar. Mukus sahip olduğu mekanik özelliklerle bağırsak epitelini patojenlerden ve partiküllerden korur. Ancak submikron partikül büyüklüğüne sahip ilaç taşıyıcı sistemler bu koruyucu engeli rahatlıkla aşar[143].

Mukoadhezif, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler mukus tabakasına penetre olarak GI bölgede konvansiyonel ilaçlara göre çok daha uzun süre kalır. Partiküllerin nanoboyutta olması, etkin maddelerin bağırsak epitel hücrelerinden daha kolay alınmasını sağlayarak çok daha etkili bir tedavi sürecinin oluşmasını sağlar[144].

İBH'da ROM'nin artışına bağlı olarak mukozal doku hasarı meydana gelir. İBH'da inflamasyon hücrelerinin aktiviteleri kolonik dokularda yüksek seviyelere ulaşır. Mukozal bariyer kırıldığı için intestinal lümendeki nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler makrofajlar tarafından fagosite edilir. Dolayısıyla nanopartiküller, büyük partiküllere göre çok

daha uzun süre ve çok daha yüksek konsantrasyonda inflamasyon bölgesinde kalır[145].

Yapılan bir çalışmada İBH olan bireylerden alınan gaita örnekleri üzerinde gerçekleştirilen analiz sonuçlarına göre, inflame kolonik mukozada pozitif yüklü proteinlerin konsantrasyonu artmıştır. Dolayısıyla pektin gibi negatif yüklü polimerlerle hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemler elektrostatik etkileşimlerden ötürü kolonik mukozaya çok daha iyi penetre olur[146].

Melatonin çok güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahiptir. Bu etkileri doğrudan ya da dolaylı olarak birbirinden farklı mekanizmalarla göstermektedir. Dolayısıyla İBH'da azalan antioksidan kapasiteye bağlı olarak ROM'nin neden olduğu oksidatif doku hasarının gelişmesinde yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda polimer olarak kullandığımız pektinin doğal kaynaklardan elde edilir olması, biyolojik olarak parçalanabilir olması, toksik olmaması ve sadece kalın bağırsakta yaşayan bakterilerin ürettiği enzimler tarafından parçalanabilir olması önem arz eder.

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda MEL-pektin nanopartiküllerinin İBH'daki etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. MEL'in iyonotropik jelasyon yöntemiyle, mukoadhezif karakterli nanopartiküler ilaç taşıyıcı sisteme yüklenmesiyle İBH'daki tedavi edici potansiyeli daha da artmıştır. Bu nedenlerden ötürü yaptığımız çalışmanın literatüre yeni bir bakış açısı getireceği düşüncesindeyiz.

Bu çalışmada faktöriyel tasarımla gerçekleştirilen formülasyonlar üzerinde yapılan in vitro çalışmalar ışığında elde edilen sonuçlara göre, en uygun olduğu saptanan nanopartikül formülasyonunun, TNBS ile kolit oluşturulmuş sıçanlarda kolit üzerindeki etkinliği değerlendirilmiştir.

5.1. İn Vitro Çalışmalara Ait Değerlendirmeler

5.1.1. Etkin Madde Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Değerlendirmeler

Etkin maddelerin partikül büyüklüğü ve dağılımı, formülasyon karakteristiğini, bitmiş ürün spesifikasyonunu ve ürünün biyoyararlanımını etkileyebilir.

Bölüm 3.2.1.2.1'de anlatılan yöntem kullanılarak MEL'in partikül büyüklüğü tayini yapıldı. Yapılan analizler sonunda MEL için hesaplanan ortalama partikül büyüklüğü 15.9± 0.2 µm olarak bulunmuştur.

Partikül büyüklüğü dağılım alanının darlığı veya genişliği geometrik standart sapma ile ifade edilir. MEL'in standart sapması küçük olduğu için, partikül büyüklüğü dağılımının dar olduğu kanısına varılmıştır (Şekil 16).

MEL'in kalitatif tayin yöntemlerinden biri de infrared spektrofotometrisidir. Bu yöntemde, MEL molekülünün yapısını oluşturan fonksiyonel grupların verdiği absorpsiyon bantlarından tanınma gerçekleştirilir.

Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda Şekil 17'de verilen spektrum elde edildi. Bu spektrum incelendiğinde MEL'in yapısını oluşturan fonksiyonel grupların pikleri gözlenmiştir. Bu spektrum ile literatürde verilen FT-IR spektrumunun uyumlu olduğu görülmüştür[147,148].

DSC çalışmaları melatonin ile pektin arasında etkileşme olup olmadığını görmek amacıyla yapılmıştır. Şekil 18'de verilen DSC termogramı incelendiğinde 118.0^{o}C' de görülen endotermik pik, MEL'in erime noktasını göstermektedir. Tespit ettiğimiz bu değer Saija ve ark.[149]'nın çalışmalarında elde ettiği değer ile (117.9^{o}C) benzerdir.

Şekil 19'da verilen pektine ait DSC termogramı termogramı incelendiğinde, 179.21^{o}C'de görülen pik, pektin molekülünün yapısında yer alan karboksil grubunun (-COOH) CO_2 halinde çıkışını göstermektedir. Kunzeka ve ark.[150] da çalışmalarında benzer bulgular elde etmişlerdir.

MEL ile polimer olarak kullanılan pektinin 1:1 oranındaki karışımının Şekil 20'de verilen DSC termogramı incelendiğinde, MEL'in erime noktasına ait pikte herhangi bir kayma gözlenmemiştir. Bu durum etkin madde (MEL) ile yardımcı madde (pektin) arasında herhangi bir etkileşme olmadığını göstermiştir.

Yaptığımız çalışmada miktar tayini yöntemi olarak UV spektrofotometri yöntemi seçilmiştir. MEL'in Şekil 22'de verilen UV spektrumu incelendiğinde, maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunun (λ_{max}) 278 nm olduğu gözlenmiştir. Bu dalga boyu literatür ile uyumludur[117].

MEL için pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4 tamponlarında gerçekleştirilen analitik yöntem validasyon çalışmalarının sonuçları değerlendirildiğinde, elde edilen BSS sonuçlarının % 2'den küçük olduğu görülmüştür ve bu UV spektrofotometrik metodun, MEL'in miktar tayini gerektiren tüm deneysel aşamalarda kullanılabilecek, güvenilir bir yöntem olduğuna karar verilmiştir.

MEL'in çözünürlük çalışması in vitro salım ortamı olarak kullanılacak olan pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.4'de yapılmıştır. MEL'in bu ortamlarda çözünürlüğü sırasıyla 1.93±0.01, 2.26±0.01 ve 2.61±0.02 mg/mL bulunmuştur. MEL'in intravenöz (IV) uygulanabilmesi için geliştirilen bir formülasyon çalışmasında sudaki çözünürlüğü düşük (37^{o}C'de 2.4 mg/ml) bulunmuştur. Optimum bir IV formülasyon için çözünürlüğün 2-hidroksipropil-β-siklodekstrin ve propilen glikol kullanılarak artırılması gerektiği vurgulanmıştır[113]. MEL'in transdermal olarak uygulanabilmesi için geliştirilen bir formülasyon çalışmasında sudaki

çözünürlüğü (37^{o}C'de) 2.10-2.74 mg/ml aralığında bulunmuştur[151]. Tez çalışmamızda elde ettiğimiz çözünürlük değerleri ile literatürde belirtilen değerler uyumludur.

İyonotropik jelasyon yönteminde, etkin maddelerin, formülasyonda kullanılacak polimerin çözündüğü ortamda disperse olması (çözünürlüğünün düşük olması) istenir[152]. Çalışmada polimer olarak kullanılan pektini çözebilmek için deiyonize su kullandığımızdan ötürü, MEL'in sudaki çözünürlüğünün düşük olması avantaj sağlamış ve kalsiyum pektinat nanopartiküllerine daha yüksek oranda yüklenmiştir.

5.1.2. Önformülasyon Çalışmalarına Ait Değerlendirmeler

5.1.2.1. İyonotropik Jelasyonun Değerlendirilmesi

Literatürde iyonotropik jelasyon yöntemiyle yapılan çalışmalarda etkin madde ve pektin içeren dispersiyon ortamı ya belirli bir yükseklikten enjektör kullanılarak elle çapraz bağlanma ortamına damlatılmış[153] ya da bürete konularak, aletin vanasını açmak suretiyle belirli bir yükseklikten, belirli bir hızla çapraz bağlanma ortamına damlamasını[92] sağlamışlardır.

Biz ise tez çalışmamızda, iyonotropik jelasyon yöntemi için Şekil 11'de verilen düzeneği hazırladık. Düzeneğimizde etkin madde ve pektin içeren dispersiyon ortamı bu iki literatürün aksine sürekli olarak karıştırılmaktadır. Hazırlanan düzenekte, çapraz bağlanma ortamının karıştırılması için iki farklı seçenek mevcuttur. (1) ile gösterilen manyetik karıştırıcı olup mikropartikül hazırlarken kullanılmıştır. (2) ile gösterilen ise Heidolph® homojenizatör olup, nanopartikül hazırlarken kullanılmıştır.

Kullandığımız peristaltik pompa sistemiyle, büretle damlatmada[92] karşılaşılan yer çekimi problemi ve elle yapılan

damlatmada[153] karşılaşılan farklı damlatma hızı problemlerinin önüne geçilmiştir.

Hazırlanan özel damlatma sistemi ile iğne ucu pektin tarafından tıkandığında saniyeler içinde yeni bir iğne ucu takıldığından sistemin tekrar başlatılmasına gerek kalmamıştır.

5.1.2.2. Kullanılacak Pektin Tipine Karar Verilmesinin Değerlendirilmesi

Tez çalışmamız doğrultusunda hazırladığımız kalsiyum pektinat nanopartiküllerinin sahip olduğu fizikokimyasal özellikleri optimum seviyede tutabilmek için yedi farklı pektin tipi üzerinde çalışılmıştır. Farklı pektin tiplerinin, formülasyonlarda gösterdiği performansa paralel olarak eleme yapılmış ve tek bir pektin tipi ile tez çalışmasının sürdürülmesine karar verilmiştir.

Classic AU 701, Classic CU 902, Classic CU 701, Amid CU 025 ve Amid CU 020 kodlu ürünlerin peristaltik pompa sisteminin ucunda yer alan 30 G'luk iğnenin ucunu tıkadığı, LM 101 AS ve LM 104 AS-FS kodlu ürünlerinin ise yapılan formülasyon çalışmalarının hiçbirinde iğnenin ucunu tıkamadığı görülmüştür.

LM 101 AS ve LM 104 AS-FS pektin türleri kullanılarak hazırlanan mikropartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü değerleri ve MEL yüklenme kapasiteleri karşılaştırıldığında, farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ve LM 104 AS-FS ile hazırlanan formülasyonlarda ortalama partikül büyüklüğü değerlerinin daha düşük, MEL yüklenme kapasitesinin ise daha yüksek olduğu anlaşıldı.

Dolayısıyla yapılan önformülasyon çalışmalarında, CP Kelco®'dan temin edilen *LM 104 AS-FS* kodlu pektin türünün diğer pektin türlerine göre daha iyi bir performans göstermesi sonucunda, çalışmaya bu pektin türüyle devam edilmesine karar verilmiştir.

5.1.3. Formülasyon Çalışmalarına Ait Değerlendirmeler

5.1.3.1. Nanoboyuta İnilmesinin Değerlendirilmesi

Literatürde, formülasyonda LMP kullanılarak, çapraz bağlanma ortamının karıştırılma hızının 1000 rpm ve üzerinde olduğu iyonotropik jelasyon çalışmalarında ortalama partikül büyüklüğü 100-314 nm arasında değişen nanopartiküller elde edilmiştir[94,96,154,155].

Biz de çalışmamızda, esterifikasyon derecesi (DE^{o}) 28 olan bir LMP kullandık. Çapraz bağlanma ortamının 5000 rpm'in üzerinde bir hızla karıştırılmasıyla, pektin molekülünün öğütülerek küçültülmesiyle ve formülasyonda kullanılan pektin ve $CaCl_2$ konsantrasyonlarını düşürerek, birbirini izleyen üç farklı modifikasyon gerçekleştirdik. Şekil 11'de verilen düzeneğin damlatma sisteminin ucuna normal bir enjektör yerine 30G'luk insülin iğne ucu yerleştirerek faktöriyel tasarımımıza ait ortalama büyüklüğü 41.3 ile 323.7 nm arasında değişen MEL yüklü kalsiyum pektinat nanopartikülleri elde ettik.

5.1.3.2. Nanopartiküllerin Karekterizasyonunun Değerlendirilmesi

5.1.3.2.1. Partikül Büyüklüğünün Değerlendirilmesi

Gerçekleştirilen analizler sonucunda, faktöriyel tasarımda yer alan formülasyonlara ait en büyük partikül büyüklüğünün 323.7±3.15 nm (P5), en küçük partikül büyüklüğünün ise 41.3± 3.15 nm (P23) olduğu görülmüştür (Tablo 31).

Nanopartikül formülasyonları hazırlanırken kullanılan formülasyon parametrelerinden dördü sabit tutulup, geride kalan bir tane parametrenin biri düşük diğeri yüksek iki faklı değeri karşılaştırılarak, formülasyon parametrelerinin ortalama partikül büyüklüğü üzerine olan etkileri araştırılmıştır (Şekil 37).

Nanopartikül formülasyonları hazırlanırken formülasyonda kullanılan pektin konsantrasyonu % (a/h), $CaCl_2$ konsantrasyonu % (a/h) ve nanopartiküllerin çapraz bağlanma ortamında tutulma süresi arttığında, ortalama partikül büyüklüğünün arttığı görülmüştür.

Formülasyondaki pektin:MEL oranı ve çapraz bağlanma ortamının karıştırılma hızı arttığında ise ortalama partikül büyüklüğünün azaldığı görülmüştür.

Resveratrol yüklü kalsiyum pektinat mikropartiküllerinin hazırlandığı bir çalışmada, partiküllerin çapraz bağlanma ortamında tutulma süresi arttığında ortalama partikül büyüklüğünün arttığı, pektin:etkin madde oranı arttığında ise ortalama partikül büyüklüğünün azaldığı belirtilmiştir[92].

Yapılan bir diğer iyonotropik jelasyon çalışmasında ise farklı konsantrasyonlardaki pektin ve $CaCl_2$'ün partikül büyüklüğü üzerine etkisi araştırılmıştır. Formülasyonda kullanılan pektin ve $CaCl_2$ konsantrasyonu arttığında, ortalama partikül büyüklüğünün arttığı belirtilmiştir[154].

Kun ve ark.[94] ise, çapraz bağlanma ortamının karıştırılma hızının 1000 rpm ve üzerine çıkarılmasıyla submikron partiküllerin oluşturulabileceği ve karıştırılma hızının artırılmasıyla, belirli bir değere ulaşıncaya kadar partiküllerin ortalama büyüklüğünün devamlı olarak düştüğü belirtilmiştir.

Tez çalışmamızda yukarıda verilen literatürlerde elde edilen sonuçlara paralel olarak ortalama partikül büyüklüğü değerleri elde ettik.

5.1.3.2.2. Polidispersite İndeksinin Değerlendirilmesi

Kollodial sistemlerde partikül büyüklüğü dağılımının homojenliği hakkında bilgi veren PDI değerinin 0.25'den küçük olması, partikül büyüklüğü dağılımının homojen olduğunu göstermektedir[156].

Gerçekleştirilen analizler sonucunda hazırlanan formülasyonların PDI değerlerinin 0.109±0.067 (P28) ile 0.874±0.017 (P6) arasında değiştiği görülmüştür. Optimum formülasyon olarak seçilen P28'in PDI değeri en küçük olup, partikül büyüklüğü dağılımının en homojen olduğu formülasyondur.

5.1.3.2.3. Zeta Potansiyelinin Değerlendirilmesi

Düşük metoksilli pektin (LMP) molekülünün yapısında çok fazla miktarda serbest (ester yapmamış) karboksil grubu (-COOH) bulunmaktadır. Dolayısıyla deiyonize suda iyonlaşarak negatif yüklü hale gelir. Pektin, çapraz bağlanma ortamında çözünmüş halde bulunan pozitif yüklü divalen metal iyonlarla (Ca^{+2}) elektrostatik etkileşmelere girer ve moleküller arası çapraz bağlar meydana gelir[75].

Kollodial sistemler, partiküllerin liyofilik bir yüzeye sahip olması ya da zeta potansiyelinin belirli bir kritik değerden yüksek olmasıyla kararlı hal alır. Böylelikle partiküllerin aglomerasyonu ve partiküller arası çekim engellenmiş olur. Yüksek zeta potansiyeline sahip partiküller yüksek yük yoğunluğuna sahip olduklarından karşılıklı itici kuvvetler tarafından ayrı tutulurlar. Kararlı kollodial sistemlerde zeta potansiyeli, ±25 mV civarındadır[157].

Kun ve Lee-Yong[94], LMP kullanarak insülin yüklü nanopartikül hazırladıkları bir çalışmada, formülasyon pH'sını 6.5, zeta potansiyelini ise -25 mV olarak belirlemişlerdir. Etkin madde olarak insülin kullandıkları için pH'yı 3.0'a tamponlamak zorunda kalmışlardır. Bu yapılan işlem, zeta potansiyeli değerini -25 mV'dan -12 mV'a düşürmüştür.

Opanasopit ve ark.[154] ise pektin molekülünün nötral pH'da negatif yüklü, asidik pH'larda ise yüksüz hale geldiğini belirtmişlerdir. %1 pektin içeren çözeltinin pH'sının, 2'den 6 civarına çıkarılmasıyla zeta potansiyelinin -4 mV'dan -54 mV'a yükseldiği görülmüştür.

Tez çalışmamız doğrultusunda hazırlanan formülasyonların pH değeri 6.5 civarında bulunmuştur. Optimum formülasyon olarak seçilen P28'in zeta potansiyeli ise -24,24±1,03 mV olarak tespit edilmiştir. Bu değer literatürde belirtildiği gibi ±25 mV civarında olup, hazırladığımız nanopartikül formülasyonunun raf ömrü boyunca kararlı halde kalmasını sağlamada yardımcı olur.

Yapılan bir diğer çalışmada ise, DNBS ile kolit indüklemiş sıçanların kolonik dokularındaki ülser bölgelerinde çok yüksek konsantrasyonda pozitif yüklü proteinlere rastlanmıştır. Dolayısıyla negatif yüklü kollodial ilaç taşıyıcı sistemlerin elektrostatik etkileşimlerden dolayı mukozal doku hasarı olan kolonik bölgelere daha iyi adhere olacağı düşünülmektedir[158].

Hazırladığımız nanopartikül formülasyonlarının tamamının zeta potansiyel değerlerinin negatif olduğu görülmüştür (Tablo 31). Literatürde belirtildiği gibi hazırladığımız ilaç taşıyıcı nanopartiküler sistemin negatif elektriksel yüke sahip olmasının, nanopartiküllerin mukozal doku hasarı olan kolonik bölgelere adhezyonunu arttırmada yarar sağlayacağını düşünmekteyiz.

5.1.3.2.4. MEL Yüklenme Kapasitesinin Değerlendirilmesi

Mccarron ve ark.[159] % 70-100'lük enkapsülasyon etkinliğine (etkin madde yükleme kapasitesine) sahip nanopartiküler sistemlerin, enkapsülasyon etkinliğinin süpernatan kullanılarak ölçülmesinin istatistiksel olarak daha tutarlı sonuçlar vereceğini belirtmiştir.

Sudaki çözünürlüğü (0.03 mg/mL) çok düşük olan resveratrol kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, etkin madde yüklenme kapasitesi % 97.7'den büyük bulunmuştur. Yüklenme kapasitesinin bu denli yüksek olması, pektinin Ca^{+2} ile birdenbire ve stabil bir jel

oluşturmasına ayrıca etkin maddenin sudaki çok düşük çözünürlüğüne bağlanmıştır[92].

MEL'in sudaki çözünürlüğü çok düşüktür (2 mg/mL). Hazırladığımız formülasyonların tümünde yükleme kapasitesi % 80'den büyük bulunmuştur (Tablo 31). Optimum formülasyon olarak seçilen P28'in yükleme kapasitesi ise % 94,4±0,3 bulunmuştur. MEL, pektinin çözündüğü ortamda (deiyonize su) çözünmeyip disperse olduğundan, bu ortamın $CaCl_2$ çözeltisine belirli bir yükseklikten çok küçük damlalar halinde bırakılması sonucu, hemen ortamda oluşan kalsiyum pektinat partiküllerine yüklenmiştir.

5.1.3.3. İn Vitro Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi

MEL'in nanopartikül formülasyonlarından in vitro salım özelliklerini incelemek amacıyla USP Apparatus 1 sepetleri içerisine yerleştirilen diyaliz torbası yöntemi kullanılmıştır.

Literatürde, bu yöntemle rektal jel formülasyonlarından etkin madde salımının incelendiği çalışmalara[54,136] sıkça rastlanılmaktadır.

Khopade ve ark.[160] ise, ilaç taşıyıcı partiküler sistemlerin salım profilinin izlenmesinde, modifiye döner sepet yönteminin diğer yöntemlere göre daha ayırt edici olduğunu ve formülasyonlarda yapılan değişikliklerin salım üzerindeki etkisini daha iyi ortaya çıkardığını belirtilmiştir.

5.1.3.3.1. Faktöriyel Tasarıma Ait Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Gerçekleştirilen analizler sonucunda, faktöriyel tasarımda yer alan formülasyonlara ait en yüksek kümülatif MEL salımının % 84.0±0.7 (P28), en düşük kümülatif MEL salımının ise % 54.5±0.5 (P5) olduğu görülmüştür (Tablo 31).

Nanopartikül formülasyonları hazırlanırken kullanılan formülasyon parametrelerinden dördü sabit tutulup, geride kalan bir tane parametrenin biri düşük diğeri yüksek iki faklı değeri karşılaştırılarak, formülasyon parametrelerinin pH 6.8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif MEL miktarı değerleri arasındaki ilişkiler araştırılmıştır (Şekil 39).

Nanopartikül formülasyonları hazırlanırken formülasyonda kullanılan pektin konsantrasyonu % (a/h), $CaCl_2$ konsantrasyonu % (a/h), pektin:MEL oranı ve nanopartiküllerin çapraz bağlanma ortamında tutulma süresi arttığında, % salınan kümülatif MEL miktarının azaldığı görülmüştür.

Formülasyon hazırlanırken çapraz bağlanma ortamının karıştırılma hızı arttığında ise % salınan kümülatif MEL miktarının arttığı görülmüştür.

BSA[161] ve resveratrol[92] yüklü kalsiyum pektinat partiküllerinin hazırlandığı iki farklı çalışmada, formülasyon parametrelerinin etkin madde salımı üzerine etkisi araştırılmıştır. Gerçekleştirilen in vitro salım çalışmaları sonucunda, her iki çalışmada da, formülasyonda kullanılan pektin ve $CaCl_2$ konsantrasyonu % (a/h), oluşturulan partiküllerin çapraz bağlanma ortamında tutulma süresi ve pektin:etkin madde oranı arttığında partiküllerden salınan kümülatif etkin madde miktarının azaldığı görülmüştür.

Tez çalışmamızda yukarıda verilen literatürlere paralel etkin madde salım değerleri elde ettik.

5.1.3.4. Pythia® Kullanılarak Yapay Sinir Ağının Oluşturulmasına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Pythia®, faktöriyel tasarıma ait 32 farklı formülasyondan in vivo çalışmalarda kullanılmak üzere optimum özelliklere sahip bir tek

formülasyonun belirlenmesinde ve formülasyon parametreleri ile formülasyonların sahip olduğu ortalama partikül büyüklüğü değeri, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve pH 6.8 fosfat tamponunda salınan kümülatif MEL miktarı arasındaki matematiksel ilişkilerin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Son yıllarda yapay sinir ağı modellerinin eczacılık teknolojisindeki uygulamaları giderek artış göstermektedir. Aghajani ve ark.[162] hazırladıkları parasetamol içeren nanosüspansiyon formülasyonunun PDI değerini optimum seviyede tutabilmek için bir yapay sinir ağı modellemesi yapmışlardır. Bu modellemede sürfaktan konsantrasyonunun, çözücü sıcaklığının ve kullanılan çözücülerin akış hızının formülasyonun PDI değeri üzerine olan etkisi incelenmiştir. Yapılan modelleme sayesinde nanosüspansiyon formülasyonunun PDI değeri optimum düzeyde tutulmuştur. Değim ve ark.[163] ise yaptıkları bir çalışmada, bilgisayarda oluşturdukları yapay sinir ağı modellerini kullanarak bazı etkin maddelerin molekül ağırlıklarının ve yağ/su partisyon katsayılarının deriden geçişi üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Yapılan modelleme sonucunda etkin maddelerin deriden geçişi başarıyla tahmin edilmiştir.

Pythia® kullanılarak, nanopartikül formülasyonu hazırlanırken kullandığımız formülasyon parametreleri (Tablo 14) modellenerek bir yapay sinir ağı oluşturulmuştur. Oluşturulan yapay sinir ağı sisteme öğretildikten sonra farklı formülasyon parametreleri kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının olası ortalama partikül büyüklüğü değerinin ve pH 6.8 fosfat tamponunda salınan kümülatif MEL miktarının başarıyla tahmin edilebileceği gösterilmiştir (Tablo 34).

5.1.3.4.1. Pythia® Kullanılarak Matematiksel Olarak Elde Edilen Veriler İle Laboratuvar Ortamında Elde Edilen Deneysel Verilerin Karşılaştırılmasının Değerlendirilmesi

Laboratuvar ortamında elde edilen deneysel ortalama partikül büyüklüğü (r^2=0.9992) ve % salınan kümülatif MEL miktarı (r^2=0.9998) değerleriyle, Pythia® programı kullanılarak matematiksel olarak elde edilen değerler arasında çok anlamlı bir matematiksel ilişkinin olduğu belirlenmiştir (Şekil 36, Şekil 38). Ancak deneysel olarak elde edien zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi değerleri ile matematiksel olarak elde edilen değerler arasında herhangi bir matematiksel ilişki tanımlanamamıştır.

Faktöriyel tasarımda yer alan formülasyonlardan farklı alarak tasarlanan P_A ve P_B'nin ortalama partikül büyüklüğü ve bu formülasyonlardan pH 6.8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif MEL miktarı değerleri başarıyla tahmin edilmiştir. Pythia®'nın matematiksel olarak verdiği değerler ile deneysel olarak tespit ettiğimiz değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$) (Tablo 34).

5.1.3.4.2. Pythia® Kullanılarak Faktöriyel Tasarımdan En Uygun Formülasyonun Seçilmesinin Değerlendirilmesi

Kolona özgü MEL yüklü nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması sebebiyle seçilecek nanopartikül formülasyonunun pH 6.8 fosfat tamponunda optimum MEL salım profili göstermesi beklenmektedir.

Pythia® kullanılarak gerçekleştirilen YSA modellemesi sonucunda elde edilen, ortalama partikül büyüklüğü ve formülasyonlardan pH 6.8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif MEL miktarı verileri ışığında en yüksek MEL salımının % 84 olduğu ve daha yüksek bir MEL salım değerine ulaşılamayacağı görülmüştür. Dolayısıyla faktöriyel

tasarımdan tez çalışmamızın in vivo kısmında kullanılmak üzere *P28* optimum nanopartikül formülasyonu olarak seçilmiştir.

5.1.3.5. Optimum Formülasyon Olarak Seçilen P28 Nolu Formülasyon Üzerinde Yapılan Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi

P28 nolu nanopartikül formülasyonu optimum formülasyon olarak seçilmiştir. Bu formülasyon, sıçanlara oral ve intrakolonik yoldan verilerek, TNBS ile kolit indüklenmiş sıçanlarda, kolit üzerindeki etkinliği değerlendirilmiştir. Dolayısıyla sıçanlara oral yoldan verilen P28 nolu formülasyon, etki bölgesi olan kalın bağırsaklara ulaşana kadar farklı pH değerine sahip pek çok GI bölgeden sırasıyla geçecektir. Bu nedenle farklı salım ortamları kullanılarak P28 nolu nanopartikül formülasyonundan MEL salımı araştırılmıştır.

Literatürde oral yoldan kolona hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerden etkin madde salım profilini incelemek amacıyla, ilaç taşıyıcı sistemlerin spesifik etki bölgesi olan kolona ulaşana kadar geçmek zorunda kaldığı farklı GI bölgelerin spesifik pH değerlerinin ve bu GI bölgelerden geçiş sürelerinin göz önünde bulundurulduğu salım çalışmaları tasarlanmıştır. Bu tasarımlara göre pH 1.2 HCl tamponunda (mide ortamı) ilk iki saat salım profili izlenmiştir. Ardından ortam, pH 7.4 fosfat tamponuyla (ince bağırsak ortamı) değiştirilerek bu ortamda üç saat salım profili incelenmiştir. Beşinci saatin sonunda salım ortamı bu kez pH 6.8 fosfat tamponuyla (kalın bağırsak ortamı) değiştirilerek salım profili bu ortamda üç saat izlenmiştir[164,165].

İnce bağırsaklarda pH nötrale yakındır (pH 7.4). Ancak kalın bağırsaklarda yaşayan anaerob bakterilerin karbonhidratları fermente etmeleri ile açığa çıkan asidik karakterli kısa zincirli yağ asitleri kolonik pH'yı 6.8'e çeker[8]. Dolayısıyla salım çalışmaları, bu pH farklılığı göz önünde bulundurularak yapılmıştır.

İBH'da gelişen mukozal doku hasarına bağlı olarak, ilaç taşıyıcı sistemlerden etkin madde salımını etkileyecek bir takım patofizyolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Bu patofizyolojik durumlardan en önemlileri, Gİ bölgelerin kendine has pH değerlerinin ve ilaç taşıyıcı sistemlerin Gİ bölgelerden geçiş sürelerinin değişmesidir.

İBH hastalarında distal bağırsak pH'sı sağlıklı bireylerle kıyaslandığında daha düşük bulunmuştur. ÜK'li bireylerle yapılan bir çalışmada luminal pH'nın 2.3, 2.9 ve 3.4 olduğu gözlenmiştir. CH olan bireylerde ise luminal pH değerleri sağ kolonda normal bireylere göre daha düşüktür (pH 5.3±0.3). Distal kolonda ise normal bireylere göre daha asidik bir ortam gözlenmiştir[166]. Ancak İBH'nın hangi GİS bölgesini tuttuğu, hastalığın aktif ya da pasif dönemde oluşu ve diğer pek çok faktör, luminal pH'nın hasta bireyler arasında çok fazla değişkenlik göstermesine neden olmaktadır. Dolayısıyla oral yoldan kolona hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarlanmasında Gİ bölgelerin kendine özgü birbirinden farklı pH değerlerine sahip olmasına dayanan sistemler yerine farklı ilaç hedeflendirmelerinin yapılması İBH'nın tedavisinde büyük önem arz eder[167].

İBH'nın iki değişik tipi olan ÜK (kolon) ve CH (terminal ileum)'nın bağırsağın farklı bölgelerini tutmasından dolayı hazırladığımız kolona özgü ilaç taşıyıcı sistemin midede salım yapmadan ince bağırsaklara ulaşması amaçlanmıştır. Ancak ilaç taşıyıcı sistemin ince bağırsaklarda bir miktar MEL salımı yapması bir sorun teşkil etmez.

Spesifik salım çalışmalarının ilkinde salım ortamı olarak pH 1.2 HCl tamponu (mide ortamı) kullanılmış ve nanopartikül formülasyonundan MEL salımı altı saat süreyle izlenmiştir. Elde edilen salım profili incelendiğinde, MEL salımının 4. saatin sonunda asimptota ulaştığı ve 6. saatin sonunda % 4.2±0.05 salım gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Dolayısıyla hazırladığımız nanopartikül formülasyonu oral

yoldan verildiğinde içeriğinde bulunan MEL'in çok büyük bir kısmını (> %95) salınmadan ince bağırsaklara taşıyacaktır.

Surajit ve Ka-Yun[92] da pH 1.2 HCl tamponunda yaptıkları in vitro salım çalışmasında, hazırladıkları kalsiyum pektinat partiküllerinden 6. saatin sonunda salınmadan kalan resveratrol miktarını % 93.7 olarak bulmuşlardır.

2. spesifik salım çalışmasında ise ince bağırsak ortamını taklit edebilmek amacıyla, pH 7.4 fosfat tamponu kullanılmıştır. Elde edilen salım profili incelendiğinde 8. saatin sonunda % 72.5±0.3 MEL salımı gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Nanopartikül formülasyonu pH 6.8 fosfat tamponu ile kıyaslandığında pH 7.4 fosfat tamponunda daha yavaş bir MEL salım profili göstermiştir.

3. spesifik salım çalışmasında ise nanopartikül formülasyonunun spesifik etki bölgesi olan kalın bağırsak ortamını daha iyi taklit edebilmek amacıyla, pH 6.8 fosfat tamponuna kalın bağırsak ortamında yaşayan anaerob bakterilerin ürettiği ve kalsiyum pektinat nanopartiküllerini yıkıma uğratan Pectinex® enzim konsantresi salım ortamına %2 (h/h) oranında eklenmiştir.

Elde edilen salım profili incelendiğinde 7. saatin sonunda tüm MEL'in (%100) salındığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla oral yoldan verilen nanopartikül formülasyonu kolona ulaştığında bu ortamda yaşayan anaerob bakterilerin ürettiği pektinolitik enzimlere maruz kalarak, içeriğinde bulunan tüm MEL'i salacaktır.

pH 6.8 tamponu + %2 (h/h) Pectinex® enzim konsantresinin salım ortamı olarak kullandığı bir in vitro salım çalışmasında da kalsiyum pektinat partiküllerinden 8. saatin sonunda salınmadan kalan etkin madde miktarının olmadığı (% 0) görülmüştür[92].

GI transit süreleri baz alınarak, salım ortamının değiştirildiği çalışmalara ait MEL salım profilleri incelendiğinde, 2. saatin sonunda pH 1.2 HCl tamponunda % 3.3±0.5 MEL salımı, 5. saatin sonunda pH 7.4 fosfat tamponunda %3 4.9±2.5 MEL salımı, 8.saatin sonunda pH 6.8 fosfat tamponunda ise % 71.5±0.1 MEL salımı gerçekleştiği görülmüştür. 5. saatin sonunda ortam değiştirilerek pH 6.8 tamponu + % 2 (h/h) Pectinex® enzim konsantresinin kullanıldığı salım çalışmasında ise 8. saatin sonunda tüm MEL'in (%100) salındığı gözlemlenmiştir.

Dolayısıyla bu spesifik in vitro salım çalışmasında elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, hazırladığımız P28 nolu nanopartikül formülasyon oral yoldan verildiğinde, MEL'in %3.3±0.5'i midede, %34.9±2.5'i kalın bağırsaklara ulaşana kadar ve geri kalan tüm MEL ise kalın bağırsaklarda (bu ortamda yaşayan bakterilerin sahip olduğu pektinolitik enzimlerin varlığı sayesinde) salınacaktır.

5.1.3.6. İn Vitro MEL Salımı Sonuçlarının Kinetik Olarak Değerlendirilmesi

Nanopartikül fomülasyonlarından in vitro MEL salımı çalışmaları sonucunda elde edilen değerler 0. derece, 1. derece ve √t (Higuchi) salım kinetiklerine uyum açısından incelenmiştir. Elde edilen veriler Tablo 35'de verilmiştir.

Tespit edilen salım profillerinin hangi kinetik modele daha çok uyduğunu belirlerken regresyon analizleri sonucunda elde edilen determinasyon katsayılarının büyüklüğü (1.000'a olan yakınlığı) göz önünde bulundurulmuştur.

Determinasyon katsayıları incelendiğinde hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonların salımlarının √t (Higuchi) kinetiğine daha iyi uyum sağladığı görülmektedir.

Resveratrol[92], teofilin[153] ve ondansetron[168] kullanılarak hazırlanan pektin mikropartiküllerden etkin madde salım profilleri incelenmiştir. Çalışmalarda elde edilen r^2 değerleri incelendiğinde, mikropartiküllerden etkin madde salımının √t (Higuchi) kinetiğine uyduğu gözlenmiştir.

5.1.3.7. Stabiliteye Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Optimum formülasyon olarak seçilen, P28 nolu nanopartikül formülasyonu, altı ay süreyle 25°C/%60 bağıl nem içeren iklim dolabında, 40°C/%75 bağıl nem içeren etüvde ve 4°C/ ortam nemi içeren buzdolabı ortamında bekletilerek stabilitesi değerlendirilmiştir. Elde edilen değerler Tablo 36, 37 ve 38'de verilmiştir.

4°C'de (buzdolabı) ve 25°C'de (iklim dolabı) altı ay süreyle yapılan stabilite çalışmaları sonucunda formülasyonun sahip olduğu ortalama partikül püyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, pH ve % MEL miktarı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişiklik olmamıştır ($p>0.05$).

40°C'de (etüvde) üç ay süreyle yapılan stabilite çalışmaları sonucunda formülasyonun sahip olduğu ortalama partikül püyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, pH ve % MEL miktarı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişiklik olmamıştır ($p>0.05$). Ancak 4. aydan itibaren ortalama partikül püyüklüğü, polidispersite indeksi ve pH artmaya; zeta potansiyeli ve % MEL miktarı azalmaya başlamıştır ($p>0.05$). 6. ayın sonunda elde edilen değerler, t=0 anındaki değerlerden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıdır ($p<0.05$).

Yapılan bir çalışmada kalsiyum pektinat partiküllerinin stabilitesi değerlendirilmiştir. Partiküllere yüklenen % resveratrol miktarı altı ay boyunca izlenmiştir. Bu çalışmada 4°C'de ve 25°C'de 6. ayın sonunda elde edilen değerler ile t=0 anındaki değerler arasında

istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişiklik olmamıştır ($p>0.05$). Hızlandırılmış stabilite şartlarında ise (40^oC'de) 6. ayın sonunda % 2 civarında etkin madde kaybı görülmüştür.

Yapılan bir diğer stabilite çalışmasında ise kalsiyum pektinat partiküllerine yüklenen ondansetron miktarı, 40^oC/%75 bağıl nem içeren etüvde üç ay süreyle izlenmiştir. Sürenin sonunda, etkin madde miktarında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişiklik olmadığı görülmüştür ($p>0.05$)[168].

5.1.3.8. Mukoadezyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Kolit oluşturulmayan sağlıklı kontrol grubuna (Grup A) ait kolon mukozası kullanılarak gerçekleştirilen mukoadezyon çalışmasında mukoadezyon işi 0,010±0,001 mj/cm^2 olarak ölçülmüşken, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruba (Grup B) ait kolon mukozası kullanılarak gerçekleştirilen mukoadezyon çalışmasında ise 0,441±0,012 mj/cm^2 olarak ölçülmüştür.

Mukoadezyon çalışmamızda nanopartikül formülasyonu, kolit oluşturulan kolon mukozasına, sağlıklı kolon mukozasından çok daha fazla adhere olmuştur ($p<0.001$).

Hagesaether ve ark.[169] yaptıkları bir çalışmada, farklı esterifikasyon (DE^o) ve amidifikasyon (DA^o) derecelerine sahip pektin türleri ve sodyum aljinat, divalent metal iyonu olarak ise çinko (Zn^{+2}) kullanarak, çinko pektinat ve çinko aljinat partikülleri hazırlamış, sağlıklı domuz ince bağırsak dokusu kullanarak bu partiküllerin mukoadezhif özelliklerini incelemişlerdir. Mukoadezyon çalışmasında en iyi performansı DE^o'si %27, DA^o'si %21 olan pektin türü göstermiştir. Pektinin ince bağırsak dokusuna sodyum aljinattan daha iyi adhere olduğu görülmüştür. Moleküler yapısında yalnızca ester taşıyıp amid taşımayan pektin molekülleri ise daha düşük adhezyon özelliği göstermiştir. Bu pektin

türlerinde karboksil gruplarının (-COOH) neredeyse tamamı serbest halde bulunduğundan Zn^{+2} ile çok fazla etkileşime girmiş ve meydana gelen güçlü çapraz bağlanma sonucunda pektin molekülünün hareketliliği azaldığı için bağırsak üzerinde yer alan mukus tabakasına bağlanma yeteneği azalmıştır. Biz de çalışmamızda literatürde en iyi mukoadezyon özelliği gösteren pektin türüne çok benzeyen (DE^{o}'si %28, DA^{o}'si %20) bir pektin türünü (LM 104 AS-FS) kullandık.

Yapılan bir diğer mukoadezyon çalışmasında ise, domuz kalın bağırsağı kullanarak, disk haline getirilen pektin (DE^{o}'si %29, DA^{o}'si %20) ve Carbomer 934-P'nin adezhif özellikleri değerlendirilmiştir. Pektinin, kolon dokusuna Carbomer 934-P'den daha fazla adhere olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Elde edilen bu sonuç, pektinin moleküler yapısında çok fazla miktarda yer alan -COOH gruplarının, mukus ile aralarında hidrojen bağı oluşturmasına bağlanmıştır[170].

TNBS ile kolit indüklenmiş sıçanların kolonik dokusu ve sağlıklı sıçanların kolonik dokusu kullanılarak, N-süksinil kitozan mikropartiküllerinin[171] ve metakrilat kopolimerleri ile hazırlanan nanopartiküllerin[172] mukoadezyonunun araştırıldığı çalışmalarda, ilaç taşıyıcı mikro/nanopartiküler sistemlerin TNBS ile kolit indüklenmiş kolon dokusuna, sağlıklı sıçan kolonu dokusuna kıyasla daha fazla adhere olduğu görülmüştür ($p<0.05$).

Rubinstein ve ark.[158] yaptıkları bir çalışmada, biyoadezhif karakterli negatif yüklü, pozitif yüklü ve nötral lipozomlar hazırlayarak bunların mukoadezyon özelliklerini DNBS ile kolit indüklenmiş sıçanların ve sağlıklı sıçanların kolon mukoza doku örneklerini kullanarak incelemişlerdir. Yapılan araştırmalar sonucunda DNBS ile kolit indüksiyonu sonucunda kolonik dokuda meydana gelen ülser bölgelerinde çok yüksek konsantrasyonda pozitif yüklü proteine rastlanmıştır. Negatif yüklü lipozomlar, pozitif yüklü ve nötral lipozomlara göre elektrostatik

etkileşimlerden dolayı kolit indüklenmiş kolon dokusuna daha fazla adhere olmuştur. Biz de elektriksel olarak negatif yüklü pektini polimer olarak kullanarak, iyonotropik jelasyon yöntemiyle nanopartikül formülasyonları tasarladık. Dolayısıyla pektinin sahip olduğu negatif elektriksel yük sayesinde, tasarladığımız nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemin kolondaki doku hasarı olan bölgelere daha iyi adhere olmasını sağladığını düşünmekteyiz.

5.1.3.9. Formülasyonda Bağlanmayan Ca^{+2} Miktarının Değerlendirilmesi

Alevli atomik emisyon spektroskopisi ile gerçekleştirilen analizler sonucunda P28'de tespit edilen, bağlanmayan (artık) Ca^{+2} miktarı 0.5±0.05 µg/mL'dir. Bu değer formülasyonda kullanılan Ca^{+2} miktarının %0.1'inden daha düşüktür.

β-laktam enzim inhibitörü yüklü kalsiyum pektinat mikropartiküllerinin hazırlandığı bir çalışmada, ortamda bağlanmadan kalan Ca^{+2} miktarı, alevli atomik emisyon spektroskopisi ile tespit edilmiştir. Serbest Ca^{+2} miktarı, formülasyonun başlangıcında kullanılan Ca^{+2} miktarının %0.1'inden daha düşük bulunmuştur[173].

5.1.3.10. Nanopartiküllerin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) İle Görüntülenmesinin Değerlendirilmesi

TEM ve AFM tekniklerini kullanarak elde ettiğimiz nanopartikül görüntüleri incelendiğinde, nanopartiküllerin küresel olduğu, aglomere olma eğilimi göstermediği ve tespit edilen ortalama partikül büyüklüğü değerlerinin, Malvern Zeta Nanosizer® cihazı kullanılarak tespit edilen ortalama partikül büyüklüğü değerleriyle uyum gösterdiği görülmüştür.

İnsülin yüklü kalsiyum pektinat nanopartiküllerinin hazırlandığı bir çalışmada, nanopartiküllerin görüntüsü, TEM tekniği

kullanılarak elde edilmiştir. Yapılan bu görüntüleme çalışması sonucunda kalsiyum pektinat nanopartiküllerinin küresel olduğu ve aglomere olma eğilimi göstermediği belirtilmiştir[94].

5.2. İn Vivo Çalışmalara Ait Değerlendirmeler

Tez çalışmamızın in vitro kısmında, antioksidan özellikteki MEL, iyonotropik jelasyonla kalsiyum pektinat nanopartiküllere yüklenerek kolona özgü bir formülasyon geliştirilmiştir. İn vivo kısmında ise, faktöriyel tasarım içerisinden kolona uygulanabilecek en uygun formülasyon seçilerek, TNBS ile kolit oluşturulan sıçanlara oral yoldan ve intrakolonik yoldan uygulanarak oksidatif stres üzerine etkisi biyokimyasal, immünolojik ve histolojik açılardan değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar boş nanopartiküllerin oral yoldan ve intrakolonik yoldan uygulanmasıyla kıyaslanmıştır.

İBH üzerinde yapılan in vivo çalışmalarda, hayvanlarda deneysel kolit modeli oluşturabilmek için genellikle sıçanlar kullanılmaktadır[174].

Sıçanlarda deneysel kolit modeli oluşturabilmek için yapılan çalışmalarda ise birbirinden farklı pek çok yöntemin uygulandığı görülmektedir. Asetik asit, etanol, karagen, amilopektin sülfat, dekstran sodyum sülfat (DSS), dinitro benzen sülfonik asit (DNBS) ve trinitro benzen sülfonik asit (TNBS) hayvanlarda deneysel kolit oluşturmak amacıyla kullanılan kimyasal maddelerden bazılarıdır. Kolit, sülfatlanmış polisakkaritlerin (karagen, amilopektin sülfat, dekstran sülfat) oral uygulanması veya asetik asit, tri/di-nitro benzen sülfonik asitin rektal uygulanması ile de oluşturulabilir[125].

İBH araştırmalarında kullanılacak bir hayvan modelinde bağırsakta benzer morfolojik değişiklikler ortaya çıkmalı, patofizyoloji ile klinik semptom ve bulgular insandaki İBH'ya benzer olmalıdır. Ayrıca

kullanılacak deney hayvanlarının immünolojik sistemleri ve kullanılacak kimyasal maddelerin etkileri iyi tanımlanmış olmalıdır[175].

TNBS ile oluşturulan kolit modeli, hapten ile indüklenmiş gecikmiş tip hipersensitivite sonrası oluşan kronik bir inflamasyon ve ülserasyon modelidir. Mukozal bariyer kırılarak, kullanılan doza bağımlı olarak ülserasyon ve inflamasyon gelişir. Ülserasyon ve bağırsak duvarındaki kalınlaşma sonuçlarına göre, bu model kronik kolit oluşması istendiğinde tercih edilmektedir. Histolojik olarak mukoza ve submukozada makrofaj, lenfosit, bağ dokusu mast hücreleri ve fibroblastlardan oluşmuş inflamatuvar cevap mevcuttur. Segmental ülserasyon ve inflamasyon sıktır. Kolonik İBH'nın patofizyolojisinin ve yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasında uygun bir modeldir[176].

Yapılan bir diğer çalışmada etonolde çözünmüş TNBS ile oluşturulmuş kolitteki mukozal lezyonlar, longitidunal ülserler, lenfosit infiltrasyonu, granülomlardan oluştuğundan bu modelin insandaki ülseratif kolit ve Crohn hastalığının makroskopik ve mikroskopik bulgularına benzer olduğu tespit edilmiştir[177].

Sıçanlara intrakolonik yoldan TNBS uygulayarak kolit oluşturabilmek için en uygun dozun araştırıldığı bir çalışmada, 50 mg/kg, 75 mg/kg, 100 mg/kg ve 150 mg/kg dozlarında uygulanan TNBS'nin etkinliğini patolojik açıdan değerlendirilmiştir. 50 mg/kg dozunun bazı sıçanlarda kolit oluşturmada yetersiz kaldığı, 100 mg/kg ve 150 mg/kg dozlarının ise kolonik dokuda kolit indüklemek yerine dokuyu yaktığı belirtilmiştir. Ülseratif kolit ve Crohn hastalığının makroskopik ve mikroskopik bulgularına benzer patofizyolojik modelleme yapabilmek için TNBS'nin 75 mg/kg dozunda uygulanması gerektiğini önermişlerdir[139].

Literatürde, sıçanlarda deneysel kolit modeli oluşturabilmek amacıyla, 80mg/kg dozunda intrakolonik yoldan TNBS'nin uygulandığı pek çok çalışma yer almaktadır[178,179].

Çalışmamızda, yukarıda verilen literatürlere paralel olarak, sıçanlarda kolit indüklemek amacıyla 80 mg/kg dozunda, intrakolonik yoldan TNBS kullandık.

Deney hayvanları üzerinde kolit oluşturularak MEL'in antioksidan etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalar incelendiğinde, MEL'in serum fizyolojik içerisinde (% 0.9 NaCl) formüle edilerek, intraperitoneal ve intrakolonik yollardan deney hayvanlarına uygulandığı görülmektedir. Bu çalışmalar, MEL'in deney hayvanlarına uygulanma dozu (0.5-15 mg/kg) ve uygulanma süresi (2-28 gün) açısından da değişkenlik göstermektedir (Tablo 69).

Tablo 69. Kolit oluşturulmuş deney hayvanlarında MEL uygulama yolunun, süresinin ve dozunun karşılaştırılması.

	Uygulama yolu	**Uygulama süresi (Gün)**	**Uygulama dozu (mg/kg)**
Mei ve ark.[129]	İntrakolonik	21	2.5, 5, 10
Necefli ve ark.[130]	İntraperitoneal	15	10
Nasalova ve ark.[180]	İntrakolonik+ İntraperitoneal	2	5, 10
Mazzon ve ark.[181]	İntraperitoneal	4	15
Esposito ve ark.[182]	İntraperitoneal	4	15
Akcan ve ark.[183]	İntraperitoneal	10	10
Marquez ve ark.[184]	İntraperitoneal	21	0,5, 1, 2
Li ve ark.[185]	İntrakolonik	28	2.5, 5, 10
Tahan ve ark.[127]	İntraperitoneal	3	100
Tez Çalışmamız	İntrakolonik+oral	4	10

Ayrıca yapılan kolit çalışmalarında MEL, kolit oluşturmadan önce profilaktik olarak uygulanarak ya da kolit oluşturulduktan sonra uygulanarak kolit üzerindeki etkinliği değerlendirilmiştir. Tahan ve ark.[127]

yaptıkları bir çalışmada, sıçanlara intrakolonik yoldan asetik asit verdikten beş dakika sonra, sıçanlarda kolit oluşumunu beklemeden, profilaktik amaçlı intraperitoneal yoldan 100 mg/kg dozunda MEL vermişlerdir. Nosalova ve ark.[180] ise asetik asit ile kolit oluşturdukları sıçanlara, kolit oluşumundan 30 dakika önce ve kolit oluşturulduktan 24 saat sonra ve 48 saat sonra 5 ve 10 mg/kg dozunda intraperitonal ve intrakolonik MEL uygulanmasının kolon ağırlığına ve makroskopik skora olan etkisini incelenmiştir.

Şimdiye kadar deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde, MEL'in belirli bir dozda serum fizyolojik içerisinde çözünmesi suretiyle deney hayvanlarına intraperitonal ve intrakolonik yoldan verildiği görülmüştür (Tablo 69). MEL'in deney hayvanlarına oral yoldan verildiği bir çalışmaya ise rastlanmamıştır. Biz ise, hazırladığımız MEL yüklü ilaç taşıyıcı nanopartiküler sistemi sıçanlara oral ve intrakolonik yoldan uyguladık. MEL'in TNBS ile kolit indüklenen sıçanlara, oral yoldan ve bir kolona özgü ilaç taşıyıcı nanopartiküler sistem ile verilmesinin literatüre yenilik getireceğini düşünmekteyiz.

Tedavi süresinin sonunda kolon doku örnekleri öncelikle makroskopik açıdan değerlendirilmiştir (Resim 9). Sıçanların feda edilmesinin hemen ardından alınan kolon dokusu örnekleri üzerinde biyokimyasal, immünolojik ve histolojik analizler yapılarak antioksidan özellikteki MEL'in kolit üzerindeki etkinliği incelenmiştir.

5.2.1. Sıçanlara Ait Bulguların Değerlendirilmesi

5.2.1.1. Sıçanlarda Görülen % Ağırlık Kaybının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda elde edilen verilerin güvenilir olması amacıyla çalışmaya dahil edilen sıçanların ağırlıkları arasında anlamlı fark olmamasına ve homojen gruplar oluşturulmasına özen gösterildi. Çalışma boyunca her gün sıçanların ağırlıkları düzenli olarak kaydedildi.

Çalışmanın sonunda tüm gruplarda ağırlık kaybı olduğu görüldü. Ancak sağlıklı kontrol grubunda (Grup A), oral (Grup C) ve intrakolonik (Grup D) yoldan MEL tedavisi verilen gruplarda sıçanların ağırlıklarında görülen kayıp ihmal edilebilecek düzeydeyken (< % 2), kolit oluşturulup tedavi verilmeyen grupta (Grup B) ve boş nanopartikül formülasyonu verilen gruplarda (Grup E, F) ağırlık kaybının % 20 civarında olduğu tespit edildi.

Grup A, C ve D'de görülen ağırlık kaybı kolit indüksiyonundan ve sıçanların feda edilmesinden 16 saat öncesinden itibaren sıçanlara yem verilmemesi, ayrıca anestezi alan sıçanların oral yem alımlarının azalmasına bağlanmıştır.

Kolit indüksiyonundan itibaren Grup B, E ve F'de görülen kilo kaybının diğer gruplara göre daha belirgin olduğu ve bu kaybın çalışmanın ilerleyen günlerinde de devam ettiği görüldü. Bu durum ise Grup B, E ve F'de kolit bulgularının daha şiddetli olması nedeniyle kilo kaybının da daha belirgin olması şeklinde açıklanabilir.

Klodronat yüklü nanopartiküllerin TNBS ile kolit indüklenen sıçanlardaki etkinliğinin incelendiği bir çalışmada, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen grup ile boş nanopartikül formülasyonu verilen gruplarda % 20'yi geçen bir ağırlık kaybı söz konusu iken sağlıklı kontrol grubunda herhangi bir ağırlık kaybı görülmemiştir[186].

Yaptığımız çalışmada yukarıda verilen literatüre paralel sonuçlar elde ettik.

5.2.1.2. Sıçanların Tükettikleri Pellet Yem Miktarının Değerlendirilmesi

Çalışmamız boyunca sıçanların günlük olarak tükettikleri yem miktarları düzenli olarak kaydedildi.

Kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanlar tüm çalışma boyunca 1 gramdan daha az yem tükettiler. Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplardaki (Grup C, D) sıçanlar ile kontrol grubundaki (Grup A) sıçanlar ise tüm çalışma boyunca 40 gramdan fazla yem tükettiler.

Tüm çalışma boyunca A, C ve D gruplarındaki günlük yem tüketiminin B, E ve F gruplarına oranla daha yüksek olduğu görüldü ($p<0.001$).

İBH'nın en önemli belirtileri arasında iştah kaybı yer alır. Grup B, E ve F'de pellet yem tüketimi neredeyse yok denilecek düzeyde iken, oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplar, sağlıklı kontrol grubu ile benzer düzeyde yem tüketmiştir. MEL tedavisi İBH'da görülen iştah kaybının ortaya çıkmasını engellemiştir.

5.2.1.3. Sıçanların Tükettikleri Musluk Suyu Miktarının Değerlendirilmesi

Çalışmamız boyunca sıçanların günlük olarak tükettikleri musluk suyu miktarları düzenli olarak kaydedildi.

Kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanlar; tüm çalışma boyunca oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplardaki (Grup C, D) sıçanlardan ve kontrol grubundaki (Grup A) sıçanlardan çok daha fazla su tükettiler ($p<0.001$).

Grup B, E ve F'deki sıçanların kolit indüksiyonundan sonra kolonlarında meydana gelen inflamasyonu kompanse edebilmek için içgüdüsel olarak Grup A'ya oranla çok daha fazla miktarda su tükettikleri düşünülmektedir. Grup C ve D'de yer alan sıçanların tükettikleri su miktarlarının Grup A'dan farklı olmaması ise oral ve intrakolonik yoldan

uygulanan MEL tedavisinin kolondaki inflamasyonu gerilettiğini göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada, sıçanlarda TNBS ile kolit indüklendikten sonra, sıçanların yedi gün süreyle tükettikleri yem miktarı ve musluk suyu miktarı izlenmiştir. Sıçanlarda kolit indükledikten sonra ilk üç gün yem tüketiminin 1 gramın altında olduğu ancak tükettikleri su miktarının sağlıklı kontrol grubuna göre çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$). Sıçanlar 4. gün yem tüketmeye başlamışlardır, ancak sağlıklı kontrol grubuyla kıyaslandığında tüketilen yem miktarının oldukça az olduğu bulunmuştur ($p<0.001$). Ayrıca sıçanların tükettikleri su miktarı 4. günün sonunda azalmaya başlamış ve 7. günde sağlıklı kontrol grubuyla kıyaslandığında aynı miktarda su tükettikleri görülmüştür ($p>0.05$)[139].

TNBS ile kolit oluşturulan sıçanlara oral ve intrakolonik yoldan uygulanan MEL yüklü nanopartikül formülasyonu sayesinde, sıçanların sağlıklı kontrol grubuyla benzer miktarda yem ve su tüketmesi sağlanmıştır. Çalışmamızda yukarıda verilen literatürle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

5.2.1.4. Sıçanlarda Kolit Oluşumuna Bağlı Olarak Görülen Diyare-Kanama Durumunun Değerlendirilmesi

Yapılan in vivo çalışma boyunca tüm gruplarda yer alan hayvanların gaitaları kontrol edilmiştir. Sıçanların dışkılamasında görülen anormal davranışlar (kanamalı dışkılama, diyare) kayıt altına alınmıştır.

İntrarektal yoldan TNBS verilerek kolit oluşturulan grupların (Grup B, C, D, E ve F) hepsinde 1. günden itibaren sulu dışkılama olduğu görüldü. Kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral (Grup E) ve intrakolonik (Grup F) yoldan boş nanopartikül formülasyonu verilen gruplardaki sıçanlarda ise sulu dışkılamanın yanında kanlı dışkılama da görüldü. Grup B, E ve F'de; Grup C ve D'ye oranla diyarenin

daha uzun süre devam ettiği gözlendi. Grup C'de sadece iki hayvanda Grup D'de ise üç hayvanda diyareye rastlandı. Bu iki grupta TNBS uygulaması sonunda uygulanan MEL tedavisinin kolon dokusunda çok hafif şiddetli bir inflamasyon oluşmasını sağladığından, diyarenin şiddetinin de diğer gruplara (B, E ve F) kıyasla daha hafif olduğu izlendi.

Bu bulgulara dayanarak TNBS ile oluşturulan deneysel kolit modelinde; oral (Grup C) ve intrakolonik (Grup D) yoldan uygulanan MEL yüklü nanopartikül formülasyonunun sıçanlarda görülen kolit bulguları olan sulu ve kanlı dışkılamayı azalttığı görülmüştür.

TNBS ile kolit indüklenen sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, yedi gün süreyle sıçanların dışkılama sayıları kaydedilmiştir. Sıçanlarda kolit indükledikten sonra sağlıklı kontrol grubuna oranla, ilk dört gün çok fazla sayıda ve sulu dışkılama yaptıkları görülmüştür ($p<0.05$). 4. günden sonra kolit grubunda dışkılama sayısı azalsa da sağlıklı kontrol grubuna oranla hala anlamlı derecede fazla olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$)[139].

5.2.1.5. Sıçanların Tüm Kolon Ağırlığının Değerlendirilmesi

Sıçanlar feda edildikten hemen sonra laparatomi gerçekleştirilerek sıçanların tüm kolonu çıkartılmıştır. Kolon, %0.9 NaCl ile yıkanarak gaita kalıntıları temizlenmiştir ve kurulandıktan sonra tüm kolonun ağırlığı ölçülerek kaydedilmiştir.

Boş nanopartikül formülasyonu ile tedavi edilen gruplarda (Grup E, F) ve kolit oluşturulup tedavi verilmeyen (Grup B) gruplarda tespit edilen kolon ağırlığı; oral ve intrakolonik yoldan MEL yüklü nanopartikül formülasyonu verilen gruplar (Grup C, D) ve kolit oluşturulmayan gruba (Grup A) göre çok daha fazladır ($p<0.05$).

Grup B, E ve F'de kolon ağırlığının artma nedeni olarak bu gruplarda görülen şiddetli transmural inflamasyon, diffüz nekroz, iltihabi granülomlar, ülser oluşumu, submukozal nötrofil infiltrasyonu ve TNBS'ye maruz kalan kolon epitel hücrelerin savunma olarak epitel dokuyu kalınlaştırması tahmin edilmektedir.

Grup C ve D'de, Grup A ile kıyaslandığında kolon ağırlığında az bir artış olduğu görülmekle birlikte de, bu artış Grup B, E ve F'deki kadar yüksek değildir. Bu durum, oral ve intrakolonik yoldan verilen MEL yüklü nanopartikül formülasyonunun kolon mukozasındaki inflamasyonu gerilettiğini göstermektedir.

TNBS ile kolit indüklenen sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise sıçanlara kolit üzerindeki etkinliğini değerlendirmek amacıyla intraperitoneal yoldan hidrokortizon verilmiştir. Sıçanlar feda edildikten sonra kolon ağırlığını tespit edilmiştir. Kolit oluşturulup tedavi verilmeyen grupta en yüksek (2.542 ± 0.095 g), kolit oluşturulmayan grupta en düşük (0.710 ± 0.032 g), tedavi grubunda ise bu iki değer arasında (1.479 ± 0.075 g) bulunmuştur[139].

Yaptığımız çalışmada yukarıda verilen literatüre paralel olarak, MEL tedavisi verilen gruplarda kolon ağırlığı sağlıklı kontrol grubuyla benzer şekilde düşük bulunmuştur.

5.2.1.6. Sıçanların Kolonik Makroskopik Skorunun Değerlendirilmesi

Sıçanlar feda edildikten hemen sonra çıkartılan kolon dokusu örneklerinin makroskopik değerlendirmesinde, uluslararası standardizasyona uygun olması bakımından bilimsel araştırmalarda sıkça kullanılan *Wallace Skalası*[140] ile kolondaki lezyonlar skorlandı.

Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplardaki (Grup C, D) sıçanların kolonik makroskopik skor değerleri, kolit oluşturulup

tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanların makroskopik skor değerlerinden çok daha küçüktür ($p<0.001$). Ayrıca oral yoldan MEL tedavisi verilen gruba (Grup C) ait makroskopik skor değerleri ise intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruptaki (Grup D) sıçanların kolonik makroskopik skor değerlerinden daha küçüktür ($p<0.05$).

Oral ve intrakolonik yoldan uygulanan MEL tedavisi, TNBS ile kolit indüklenmesinin ardından Grup B, E ve F ile kıyaslandığında, kolonda genel olarak çok daha hafif bir inflamasyon gelişmesini sağlamıştır.

İntrarektal yoldan uygulanan MEL tedavisi, oral yoldan uygulanan MEL tedavisine göre çok daha zor ve invaziv bir tedavidir. Sıçanlara intrakolonik yoldan MEL uygulanmadan hemen önce intraperitoneal yoldan bazı anestezik maddeler verilmiştir. Ayrıca kolit oluşturularak kolonda hasar oluşturulmuş sıçanlara, tekrar intrakolonik yoldan kolona tedavi uygulanması deney hayvanlarında ikinci bir stres etkisi yaratmıştır. Dolayısıyla bu durumun, makroskopik skorun Grup D'de Grup C'den daha yüksek bulunmasının temel nedeni olduğu düşünülmektedir.

Yapılan bir çalışmada, TNBS ile kolit indüklenen sıçanlara 10 gün boyunca, 10 mg/kg dozunda intrakolonik yoldan MEL verilerek, sıçanların kolonik dokusunda meydana gelen değişiklikler makroskopik açıdan incelenmiş ve grupların kolon dokusu örnekleri tez çalışmamızda kullandığımız Wallace Skalası'na göre skorlanmıştır. Gruplar kıyaslandığında, MEL tedavisi verilen grubun makroskopik skorunun sağlıklı kontrol grubuyla benzer şekilde düşük bulunduğu belirtilmiştir [183].

Sıçanlara oral ve intrakolonik yoldan uyguladığımız MEL tedavisi, yukarıda verilen literatüre benzer şekilde, makroskopik skorun düşmesini sağlamıştır.

5.2.1.7. Kolonik Ülser Uzunluğunun Değerlendirilmesi

Sıçanlar feda edildikten sonra çıkarılan kolonlarında, TNBS maruziyeti sonucunda gelişen ülser uzunluğu ölçülmüştür.

Yapılan makroskopik kolit değerlendirmesinde kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu verilen gruplardaki (Grup E, F) sıçanların kolondaki ülser boyutlarının diğer gruplara göre çok daha büyük olduğu görüldü ($p<0.001$). Oral yoldan MEL tedavisi verilen grupta (Grup C) sağlıklı kontrol grubu (Grup A) gibi ülsere hiç rastlanmamıştır. İntrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen grupta (Grup D) ise sadece bir sıçanda ülsere rastlanmıştır.

Oral ve intrakolonik yoldan uygulanan MEL yüklü nanopartikül formülasyonunun, sahip olduğu güçlü antioksidan özelliklerle TNBS uygulanmasını takiben submukozal ve mukozal alanda lökosit infiltrasyonuna bağlı olarak artan ROM'lerini nötralize ederek kolonik dokuda, ülser oluşmasını başarıyla engellediği düşünülmektedir.

5.2.1.8. *Kolon Ağırlığı*/*Sıçan Ağırlığı* Değerinin Değerlendirilmesi

Sıçanlar feda edilmeden hemen önce ağırlıkları, feda edildikten hemen sonra ise laparatomi işlemi ile çıkarılan kolonlarının ağırlıkları tespit edilerek kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı değeri hesaplanmıştır.

Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplardaki (Grup C, D) sıçanların *kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı* değerleri, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakiler (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardaki (Grup E, F) sıçanların *kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı* değerlerinden çok daha küçüktür ($p<0.001$).

Grup B, E ve F'de TNBS maruziyeti sonucunda ağır bir kolonik inflamasyon geliştiğinden kolon ağırlığı artmasına karşılık, bu grupta yer alan sıçanlar çok az miktarda yem tükettiklerinden vücut ağırlıklarının yaklaşık % 20'sini kaybederler. Bu iki nedenden dolayı Grup B, E ve F'nin *kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı* değeri Grup A, C ve D ile kıyaslandığında çok daha büyük bulunmuştur.

TNBS ile kolit indüklenen sıçanlarda, budesonid yüklü nanopartiküllerin etkinliğinin incelendiği bir çalışmada, sıçanların *kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı* değerleri karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda tedavi verilen grubun *kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı* değeri, kolit oluşturulup tedavi verilmeyenlere kıyasla çok daha düşük bulunmuştur[172].

Yaptığımız çalışmada, MEL tedavisi verilen gruplarda yukarıda verilen literatürle benzer şekilde daha düşük *kolon ağırlığı/sıçan ağırlığı* değeri görülmüştür.

5.2.2. Kolonik Mukozada Oksidatif Stres Ölçümüne Ait Bulguların Değerlendirilmesi

İBH'nın patogenezi pek çok faktöre bağlıdır ancak son yıllarda yapılan çalışmalar oksidatif stresin İBH'da major faktör olabileceğini vurgulamaktadır[141]. Yapılmış olan bazı çalışmalar, oksidatif stresin İBH'da major faktör olabileceğini kanıtlar niteliktedir. İBH'da antioksidan enzim aktivetelerinde ve kolonik antioksidan düzeylerinde sağlıklı bireylere göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma tespit edilmiştir[42-46].

Yukarıda verilen bilgiler ışığında tez çalışmamızda MEL yüklü nanopartikül formülasyonunun oksidatif stres üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere, kolonik mukozada nitrik oksitin stabl son ürünü olan NOx seviyesi, lipit peroksidasyonun son ürünü olan MDA seviyesi ve

kolonik bir antioksidan olan GSH seviyesi ölçülerek elde edilen sonuçlar gruplar arasında kıyaslanmıştır.

5.2.2.1. Kolonik Mukozada NOx Seviyelerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

İBH'da ve çeşitli kimyasal maddeler kullanılarak oluşturulan deneysel kolit modellerinde inflamatuvar süreç, nötrofil, monosit ve lenfosit gibi lökositlerin kolon mukozasına infiltrasyonu ile ortaya çıkar. Lökositler inflame kolonik dokudaki reaktif oksijen metabolitlerinin ana kaynağıdır. Reaktif oksijen metabolitleri, lipid membranların peroksidasyonu, protein denatürasyonu ve DNA hasarı yaparak, hücre ve doku düzeyinde doğrudan ve dolaylı yoldan çeşitli hasarlara yol açar.

Bu inflamatuvar süreçte azot oksit (NOx), makrofajların kullandığı önemli bir mediyatördür. Kolonik dokunun TNBS'ye maruziyeti ile makrofajlarda NOx sentetaz enzimi stimüle olur ve aktif hale gelen makrofajlardan aşırı miktarda NOx salınır. NOx, hem kendisi sitotoksiktir hem de zincir reaksiyonlar sonucu kendisinden daha toksik ROM'ların oluşmasına neden olur. Makrofajlardan yüksek konsantrasyonda NOx salınması kolonik dokuda lokal doku hasarı oluşmasına öncülük eder. Dokularda NOx seviyesinin yüksek olması oksidatif stresin arttığını gösterir[187].

Bizim beklentimiz, MEL tedavisi verilen gruplarda (Grup C, D), boş nanopartikül formülasyonu verilen gruplara (Grup E, F) kıyasla daha düşük kolonik NOx düzeyleri elde etmektir.

Kolonik doku NOx seviyeleri değerlendirildiğinde, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen grup (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu verilen gruplarda (Grup E, F), oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplara (Grup C, D) kıyasla daha yüksek kolonik NOx düzeyi saptanmıştır ($p<0.001$). Oral ve intrakolonik

yoldan verilen MEL yüklü nanopartikül formülasyonu sayesinde sıçanların kolonik NOx seviyelerinin düşmesi sağlanmıştır.

Oral (Grup E) ve intrakolonik (Grup F) yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanmasının, kolonik NO_x düzeyleri üzerinde iyileştirici bir etkisi görülmemiştir.

TNBS[129] ve DNBS[188] ile kolit indüklenmiş sıçanlarda MEL tedavisinin kolonik doku NO_x seviyesine olan etkisinin incelendiği iki farklı çalışmada, kolit oluşturulup MEL tedavisi verilen grupların kolonik NO_x seviyesinde, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruplara kıyasla anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p<0.05$). Araştırıcılar kolonik NO_x seviyesindeki düşüşü, MEL'in makrofajlardaki ve kolon epitel hücrelerindeki nüklear faktör kappa-β'nin aktivasyonunu inhibe ederek, ¡NOS'un ekspresyonunu transkripsiyon seviyesinde bloke etmesine dayandırmaktadır. Ayrıca MEL, kolonik dokunun TNBS ve DNBS'ye maruziyeti sonucu diğer mekanizmalarla oluşan NO_x ve $ONOO^-$ radikallerini süpürerek bunların zararlı etkilerini ortadan kaldırmıştır.

Zingarelli ve ark.[189] ise DNBS ile kolit indüklenen sıçanların kolonik dokuları üzerinde yaptıkları analizde, çok yüksek konsantrasyonda nitrolanmış protein tespit etmişlerdir.

Yapılan birçok klinik çalışmada da, Crohn hastalığı ve ülseratif kolit hastalığı olan bireylerden alınan kolonik doku biyopsilerinde yapılan analizler sonucunda ¡NOS aktivitesi artmış olarak bulunmuştur. Buna bağlı olarak da kolonik dokunun NO_x seviyeleri, sağlıklı bireylere kıyasla daha yüksek bulunmuştur[190].

Tez çalışmamızda oral ve intrakolonik yoldan MEL yüklü nanopartiküllerle yapılan tedavi sayesinde, yukarıda verilen literatürlere paralel olarak, makrofajlardan yüksek konsantrasyonda NO_x salımı ve

buna bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stres kaynaklı kolonik doku hasarı engellenmiştir.

5.2.2.2. Kolonik Mukozada MDA Seviyelerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Hücre membranındaki poliansatüre yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri ile hızla reaksiyona girmesi sonucu lipid peroksidasyonu meydana gelir. Oluşan lipid peroksil radikalleri, hidroperoksidlere, hidroperoksidler de daha zararlı radikal özelliği olan aldehitlere dönüşürler. Bu aldehidler içinde en çok bilineni malondialdehid'dir (MDA). Dolayısıyla bir dokuda MDA seviyesinin artması, serbest oksijen radikallerinin ve bunlara bağlı olarak da oksidatif doku yıkımının arttığını gösterir[191].

Yaptığımız çalışmada, oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi uyguladığımız gruplarda (Grup C, D) boş nanopartikül formülasyonu verilen gruplara (Grup E, F) kıyasla daha düşük kolonik MDA seviyeleri elde etmeyi hedefledik.

Kolonik doku MDA seviyeleri değerlendirildiğinde, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen grup (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu verilen gruplarda (Grup E, F), oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplara (Grup C, D) kıyasla daha yüksek MDA düzeyi saptanmıştır ($p<0.001$). Oral ve intrakolonik yoldan verilen MEL yüklü nanopartikül formülasyonu sıçanlarda kolonik MDA seviyelerinin düşmesini sağlamıştır.

Oral (Grup E) ve intrakolonik (Grup F) yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanması, kolonik MDA düzeylerini düşürmemiştir.

TNBS ile temas eden kolonik dokuda artan ROM seviyelerine bağlı olarak hücre membranlarındaki poliansatüre yağ asitlerinin

oksidasyonu artar. Buna bağlı olarak da Grup B, E ve F'de MDA düzeyleri yüksek bulunmuştur. Ancak oral ve intrakolonik yoldan verilen MEL yüklü nanopartikül tedavisiyle (Grup C ve D), kolonun TNBS maruziyeti ile düşen antioksidan kapasitesi arttırılarak, ROM'lerinin yağ asitlerini oksidasyonu azaltılmış ve MDA düzeyleri Grup B, E ve F'ye kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.001$).

TNBS[129] ve DNBS[188] ile kolit indüklenmiş sıçanlarda MEL tedavisinin kolonik doku MDA seviyesine olan etkisinin incelendiği iki farklı çalışmada da, kolit oluşturulup MEL tedavisi verilen grupların kolonik MDA seviyesinde, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruplara kıyasla anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p<0.05$). Araştırıcılar MEL tedavisinin, kolonun antioksidan kapasitesini artırarak lipid peroksidasyonunu önlediğini ve buna bağlı olarak MEL tedavisi verilen gruplarda, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruptakilere kıyasla daha düşük kolonik MDA seviyeleri tespit edildiğini belirtmiştir.

Yapılan bir klinik çalışmada, ülseratif kolit hastalarından kolon biyopsi örnekleri alınarak lipid peroksidasyonuna bağlı kolonik doku hasarını ölçmek amacıyla kolonik MDA seviyeleri araştırılmıştır. Antioksidan omega 3 yağ asidi verilen grupta, herhangi bir ilaç verilmeyen ülseratif kolit grubuna oranla çok daha düşük kolonik MDA düzeyi saptanmıştır ($p<0.05$)[192].

Tez çalışmamız doğrultusunda sıçanlara intrakolonik ve oral yoldan uygulanan MEL tedavisi, yukarıda verilen literatürlerle benzer şekilde, TNBS uygulanması sonucunda kolonik dokuda yüksek konsantrasyonlara ulaşan serbest radikallari, lipit peroksidasyonuna neden olmadan süpürerek etkisiz hale getirmiştir.

5.2.2.3. Kolonik Mukozada GSH Seviyelerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Glutatyon (GSH), kolonik dokuda bulunan, tripeptit yapısında endojen bir hücre içi antioksidandır. GSH'ın doğrudan ve dolaylı olarak serbest radikalleri süpürücü etkisi vardır. Yapılan birçok çalışmada, İBH'da ve çeşitli kimyasal maddeler kullanılarak oluşturulan deneysel kolit modellerinde intestinal mukozada oksidatif stresin varlığı gösterilmiştir. Serbest radikallerin artışı ile kolonik dokuda yer alan antioksidanlar tükenmeye başlar. GSH seviyesinde gözlenen azalma da kolonik hasarın en önemli göstergelerinden biridir[193].

Oral ve intrakolonik yoldan antioksidan tedavi verilen gruplarda (Grup C, D), boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplara (Grup E, F) kıyasla daha yüksek kolonik GSH düzeyleri elde etmeyi amaçladık.

Kolonik doku GSH seviyeleri değerlendirildiğinde, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen grup (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu verilen gruplarda (Grup E, F), oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplara (Grup C, D) kıyasla daha düşük GSH düzeyi saptanmıştır ($p<0.001$). Oral ve intrakolonik yoldan verilen MEL yüklü nanopartikül formülasyonu sıçanlarda kolonik GSH seviyelerinin yükselmesini sağlamıştır.

Oral (Grup E) ve intrakolonik (Grup F) yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanması, kolonik antioksidan seviyelerinde herhangi bir artış sağlamamıştır.

TNBS ile kolit indüksiyonu sonucunda birbirinden farklı birçok inflamasyonel süreç ile kolonik dokuda ROM seviyeleri artar. Serbest radikallerin artışı neticesiyle hücre içi ve hücre dışında yer alan pek çok antioksidanın kapasitesi düşer. Buna bağlı olarak da Grup B, E ve F'de

kolonik GSH düzeyleri düşük bulunmuştur. Ancak oral ve intrakolonik yoldan verilen antioksidan tedaviyle (Grup C ve D), MEL'in sahip olduğu güçlü antioksidan özelliklerle, kolonun TNBS maruziyeti ile düşen antioksidan kapasitesi arttırılmıştır. GSH düzeyleri Grup B, E ve F'ye göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

Sido ve ark.[194] 65 sağlıklı, 33 ülseratif kolitli ve 33 Crohn hastalığı olan birey üzerinde yaptığı bir klinik çalışmada, bireylerden biyopsiyle kolon dokusu örnekleri alıp, tespit ettikleri GSH düzeylerini gruplararasında kıyaslamışlardır. ÜK ve CH olan bireylerde GSH sentezinde prekürsör olarak rol oynayan plazma sistein ve sistin düzeyleri ile kolonik GSH düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede çok düşük bulunmuştur ($p=10^{-6}$).

MEL'in asetik asit ile kolit oluşturulan sıçanlardaki etkinliğinin araştırıldığı iki farklı çalışmada, kolonik GSH düzeyleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, sıçanlarda kolit oluşturulmasıyla birlikte artan ROM düzeylerine bağlı olarak kolonik antioksidanların (GSH) tükendiği ancak MEL tedavisinin bu durumu tersine çevirerek kolonik GSH düzeylerini anlamlı ölçüde arttırdığı belirtilmiştir[127,180].

Oral ve intrakolonik yoldan uygulanan MEL tedavisiyle, yukarıda verilen literatürlere paralel olarak, kolonik antioksidan GSH düzeylerinin artması sağlanarak kolonik dokunun bütünlüğünün korunmasını sağlanmıştır. MEL doğrudan ve dolaylı olarak sahip olduğu güçlü antioksidan özelliklerle, kolonda TNBS maruziyeti sonucunda artan ROM'lerini süpürmüştür.

5.2.3. Kolonik Mukozada Sitokin Ölçümlerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

İmmün cevabın düzenlenmesinde hücreler arasındaki iletişimi sağlayan glikoprotein yapısındaki bileşiklere sitokin denir.

İBH'da ROM'lerine bağlı olarak kolonik doku hasarının gelişimi sürecinde, inflamasyonlu bağırsak mukozasında yer alan immün hücreler ve kolon epiteliyal hücreleri tarafından birçok proinflamatuvar sitokin üretilir. Bu proinflamatuvar sitokinler, inflamatuvar cevabın başlamasında çok önemli rol oynarlar. Ayrıca oluşan inflamatuvar cevabın devam ettirilmesini engelleyen antiinflamatuvar sitokinlerin varlığı da gösterilmiştir[195].

Tez çalışmamızda TNF- α, IL–17 ve IL–10'a ait Elisa kitleri kullanarak, bu sitokinlerin kolon mukozasındaki seviyelerini tespit edip, gruplararasında karşılaştırma yaptık.

5.2.3.1. Kolonik TNF-α Seviyelerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

İBH'da doku hasarının gelişimi sürecinde, inflamasyonlu bağırsak mukozasında yer alan makrofajlar, lenfositler ve kolon epiteliyal hücreleri tarafından en başta TNF-α ve IL-17 olmak üzere birçok proinflamatuvar sitokin üretilmekte ve bu proinflamatuvar sitokinler inflamatuvar cevabın başlamasında çok önemli rol oynamaktadırlar. Dokularda TNF-α düzeylerinin yüksek olması, inflamasyonun başladığını ve hızla devam ettiğini gösterir[196].

Yaptığımız çalışmada, boş nanopartikül formülasyonu verilen gruplarda (Grup E, F), oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplara (Grup C, D) kıyasla daha yüksek kolonik TNF-α düzeyleri elde etmeyi amaçladık.

Kolonik doku TNF-α seviyeleri değerlendirildiğinde, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen grup (Grup B) ile oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu verilen gruplarda (Grup E, F), oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplara (Grup C, D) kıyasla daha yüksek TNF-α düzeyi saptanmıştır ($p<0.001$). Oral ve intrakolonik yoldan

verilen MEL yüklü nanopartikül formülasyonu sıçanlarda kolonik TNF-α seviyelerinin düşmesini sağlamıştır.

Oral (Grup E) ve intrakolonik (Grup F) yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanması, kolonik TNF-α seviyelerinde herhangi bir düşüş sağlamamıştır.

TNBS ile temas eden kolonik dokuda birbirinden farklı inflamatuvar süreçler sonucunda kolonik TNF-α düzeyleri artar. Buna bağlı olarak da Grup B, E ve F'de TNF-α düzeyleri yüksek bulunmuştur. Ancak oral ve intrakolonik yoldan (Grup C, D) verilen MEL yüklü nanopartikül tedavisiyle, kolonda TNBS maruziyeti ile artan inflamasyon azaltılarak TNF-α düzeyleri, Grup B, E ve F'ye göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.001$).

Asetik asit[127] ve DNBS[128] ile kolit oluşturulan sıçanların kolonik TNF-α düzeylerinin ölçüldüğü iki farklı çalışmada, MEL tedavisinin kolonik TNF-α düzeylerine olan etkisi incelenmiştir. Kolit oluşturulup, MEL tedavisi verilen grupların TNF-α düzeylerinde, kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruplara kıyasla anlamlı derecede düşüş görülmüştür ($p<0.05$). Elde edilen sonuçlar ışığında, MEL'in antioksidan özelliklerinin yanında kuvvetli antiinflamatuvar özelliğinin de olduğu anlaşılmıştır.

ÜK ve CH olan bireylerde yapılan birçok klinik çalışmada, kolonik TNF-α düzeylerinin normal sağlıklı bireylere göre çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir. TNF-α, İBH patogenezinde mukozal immun yanıtta önemli rol oynayan proinflamatuvar bir sitokindir[197,198].

Oral ve intrakolonik yoldan MEL yüklü nanopartikül formülasyonu ile yapılan tedavi, yukarıda verilen literatürle benzer şekilde, lökositlerin bağırsak endoteliyal hücrelerine yapışmalarını stimüle eden proinflamatuvar sitokinlerden biri olan kolonik TNF-α'nın düzeylerini düşürerek, doku hasarının en önemli sebeplerinden biri olan lökosit

infiltrasyonunu ve buna bağlı olarak gelişen kolonik inflamasyonu azaltmıştır.

5.2.3.2. Kolonik IL-10 Seviyelerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Yapılan bir immünolojik çalışmada, İBH'da proinflamatuvar sitokinlerin konsantrasyonları artarken, IL-10 gibi oluşan inflamatuvar cevabın devam ettirilmesini engelleyen antiinflamatuvar sitokinlerin de artan immün cevabı azaltabilmek, immün sistemde bir denge oluşturabilmek için sentezinin arttığı saptanmıştır[199].

Yaptığımız çalışmada, oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplarda (Grup C, D), boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplara (Grup E, F) kıyasla daha düşük kolonik IL-10 düzeyleri elde etmeyi hedefledik.

Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen grupların (Grup C, D) ve sağlıklı kontrol grubunun (Grup A) kolonik IL-10 değerleri, kitin tespit edebileceği değerden (< 34.6 pg/mL) düşük bulunmuştur.

Kolonik doku IL-10 seviyeleri değerlendirildiğinde, Grup B, E ve F'de; Grup A, C ve D'ye göre daha yüksek IL-10 düzeyi saptanmıştır ($p<0.001$). Oral ve intrakolonik yoldan verilen MEL yüklü nanopartikül formülasyonu sıçanlarda kolonik IL-10 seviyelerinin düşmesini sağlamıştır.

Oral (Grup E) ve intrakolonik (Grup F) yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanması, kolonik IL-10 seviyelerinde herhangi bir düşüş sağlamamıştır.

IL-10 intestinal mukozal immuniteyi ve sitokinler arası bağlantıyı konrol etme potansiyeline sahip bir sitokindir. Bundan dolayı İBH tedavisinde biyolojik olarak antiinflamatuvar bir etkiye sahiptir. Makrofajlardan TNF-α ve IL-17 gibi proinflamatuvar sitokinlerin artmış üretimi, ancak inflamatuavar süreci regüle eden IL- 10'un da artması sayesinde kontrol altında tutulur. Bu hadisenin de intestinal mukozada

inflamasyonal doku hasarı meydana gelmesini engellediği düşünülmektedir. Kolonik inflamasyon, MEL tedavisi verilen gruplarda çok daha az geliştiği için bu gruplarda (Grup C, D) boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplara (Grup E, F) kıyasla çok daha düşük kolonik IL-10 değerleri elde edilmiştir. Ancak TNBS'ye maruz kalma sonucu Grup B, E ve F'de çok şiddetli bir kolonik inflamasyon gelişmiştir. Dolayısıyla bu inflamasyonal yanıtı geriletip doku hasarını azaltabilmek için kolonik IL-10 seviyeleri yükselmiştir.

Yapılan birçok çalışmada MEL'in, deney hayvanlarında çeşitli kimyasallar kullanılarak oluşturulan kolit modellerinde gösterdiği koruyucu etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, kolit oluşturulan deney hayvanlarında meydana gelen kolonik inflamasyonu baskılayabilmek için antiinflamatuvar özellikteki kolonik IL-10 düzeylerinin arttığı belirtilmiştir. Kolit oluşturulup MEL tedavisi verilen gruplarda ise kolonik IL-10 düzeylerinin düştüğü görülmüştür. MEL'in bu koruyucu etkisi, hayvanların bağışıklık sistemini modüle ederek, TNF-α ve IL-17 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu baskılamasına; IL-4 ve IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu ise arttırmasına bağlanmıştır[180,200,201].

Kucharzik ve ark.[202] yaptıkları klinik çalışmada 44 ÜK'li, 40 CH olan bireyde ve 30 sağlıklı gönüllüde Elisa kiti kullanarak serum IL-10 düzeylerini ölçmüş ve gruplararasında kıyaslama yapmışlardır. ÜK (144±44 pg/ml) ve CH (132±32 pg/ml) olan bireylerde sağlıklı kontrol grubuyla (44±9.5 pg/ml) kıyaslandığında çok yüksek serum IL-10 değerleri tespit edilmiştir ($p<0.001$). Araştırıcılara göre antiinflamatuvar karakterdeki IL-10 değeri, kolonda artan inflamasyonu baskılayabilmek, kompanse edebilmek için yükselmiştir.

5.2.3.3. Kolonik IL-17 Seviyelerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

İBH'da doku hasarının gelişimi sürecinde üretilen proinflamatuvar sitokinlerden biri de IL-17'dir. Kolonik dokuda inflamatuvar

cevabın başlamasında önemli bir rol oynamaktadır. Dokularda IL-17 düzeylerinin yüksek olması, inflamasyonun başladığını ve hızla devam ettiğini gösterir[196].

Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen gruplarda (Grup C, D), boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplara (Grup E, F) kıyasla daha düşük kolonik IL-17 düzeylerinin elde edilmesi amaçlanmıştır.

Oral ve intrakolonik yoldan MEL tedavisi verilen grupların (Grup C, D) ve sağlıklı kontrol grubunun (Grup A) kolonik IL-17 değerleri, kitin tespit edebileceği değerden (< 1.77 pg/mL) düşük bulunmuştur.

Kolonik doku IL-17 seviyeleri değerlendirildiğinde, Grup B, E ve F'de; Grup A, C ve D'ye göre daha yüksek IL-17 düzeyi saptanmıştır ($p<0.001$). Oral ve intrakolonik yoldan verilen MEL yüklü nanopartikül formülasyonu sıçanlarda kolonik IL-17 seviyelerinin düşmesini sağlamıştır.

Oral (Grup E) ve intrakolonik (Grup F) yoldan boş nanopartikül formülasyonu uygulanması, kolonik IL-17 seviyelerinde herhangi bir düşüş sağlamamıştır.

IL-17, TNF-α gibi proinflamatuvar sitokin ailesinde yer alır ve TNF-α ile sinerjistik olarak haraket ederek kolonik mukozada TNBS maruziyeti ile gelişen inflamasyonal sürecin başlamasında görev yapar. TNBS uygulanması sonucu Grup B, E ve F'de şiddetli bir kolonik inflamasyon gelişmiştir. Bu büyük inflamasyonal yanıtı başlatabilmek ve kolonik dokuyu savunabilmek için kolonik IL-17 seviyeleri sağlıklı kontrol grubuna oranla çok yükselmiştir ($p<0.001$). Oral ve intrakolonik yoldan MEL yüklü nanopartikül formülasyonuyla yapılan tedavi sonucunda, MEL'in, Th_{17} hücreleri üzerinden gösterdiği kuvvetli antiinflamatuvar etki sayesinde Grup C, D'de çok daha düşük kolonik IL-17 değerleri elde edilmiştir.

Yapılan birçok klinik çalışmada, İBH'da kolon epiteliyal hücrelerinde görülen şiddetli inflamasyona sinyal düzeyinde aracılık eden IL-17'nin sağlıklı bireylerle kıyaslandığında kolonik düzeylerinin arttığı belirtilmiştir. Bu artışın nedeni olarak ise kolondaki artmış inflamasyon gösterilmiştir[203,204].

5.2.4. Histolojik Bulguların Değerlendirilmesi

Kolonik doku örneklerinin Masson trikrom boyamalarıyla yapılan değerlendirmelerde, TNBS ile kolit oluşturulup tedavi verilmeyen grupta (Grup B) mononükleer hücre infiltrasyonu olan alanlarda bezlerin kaybolduğu, buna karşın bazı bölgelerde bezlerin birbirleriyle birleşerek kistik yapılar oluşturduğu belirlendi. Lamina propriya, submukoza ve tunika muscularis'in de hücre infiltrasyonundan etkilendiği dikkati çekti (Resim 10A, 10B). Oral ve intrakolonik yoldan MEL yüklü nanopartikül formülasyonuyla yapılan tedavi sonucunda (Grup C, D), yüzey ve bez epitelleri ile bağ dokusu infiltrasyonunun da oldukça normale döndüğü saptandı ve kolonik yapı normal olarak gözlendi (Resim 11A, 11B; 12A, 12B). Ayrıca oral yolla uygulama yapılan gruba (Grup C) oranla, intrakolonik uygulamanın (Grup D) doku iyileştirmede daha az etkili olduğu belirlendi. Boş nanopartikül uygulaması yapılan grupların (Grup E, F) her ikisinde de belirgin bir doku iyileşmesi olmadığı görüldü. Kolit grubuna benzer bulguların her iki grupta da sürdüğü belirlendi. Ancak iki grup kendi arasında karşılaştırıldığında, oral yolla uygulama yapılan grubun (Grup E) az düzeyde de olsa intrakolonik yolla uygulama yapılan gruba (Grup F) göre daha iyi olduğu belirlendi.

Oral ve intrakolonik yoldan MEL yüklü nanopartikül formülasyonuyla yapılan tedavi sonucunda kolonik yapı normal olarak gözlenmiştir. TNBS uygulanmasını takiben, kolonik dokuda mononükleer hücre infiltrasyonu, immün ve epiteliyal hücrelerden salınan ROM miktarı, serbest radikal konsantrasyonu ve tüm bunlara bağlı olarak oksidatif stres artar. Kalsiyum pektinat nanopartikülleri içerisine formüle edilen, kuvvetli

antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip MEL, kolonda artmış olan oksidatif stresi azaltarak meydana gelebilecek doku hasarını en asgari seviyede tutmuştur. Sıçanlara, intrakolonik yoldan nanopartikül formülasyonu uygulanmadan hemen önce ip yoldan anestezik maddeler enjekte edilmiştir. Sıçanlar belirli süre anestezi altında kalmışlardır. Ayrıca intrakolonik uygulama esnasında kullanılan gavaj TNBS'nin inflame ettiği tüm kolona tekrar temas ederek ikinci bir inflamasyon oluşturabilir. Bu iki nedenden ötürü oral yoldan yapılan tedavi, intrakolonik yoldan yapılan tedaviye göre daha başarılı bulunmuştur.

Farklı kimyasal maddeler kullanılarak kolit indüklenen sıçanlarda, MEL tedavisinin kolit üzerindeki etkileri incelenmiştir. Kolit oluşturulup tedavi verilmeyen grupların ve kolit oluşturulup MEL tedavisi verilen grupların histolojik doku örnekleri karşılaştırıldığında, MEL tedavisinin tez çalışmamızda elde ettiğimiz histolojik sonuçlara paralel olarak, kolonik mukozal epitelyum ve kript dokularının bütünlüğünü koruduğu, hafif bir inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve submukozal ödem görüldüğü tespit edilmiştir. MEL tedavisiyle birlikte, kimyasal uygulanması sonucu gelişen histopatolojik bulguların anlamlı düzeyde gerilediği, nekrotik ve fibrotik oluşumlara rastlanılmadığı belirtilmiştir. MEL tedavisi sayesinde morfolojik olarak hücresel yapıların bütünlüğü korunmuştur[127,130,181].

6. SONUÇ

İyonotropik jelasyon yöntemiyle, kolona hedeflendirilmiş MEL yüklü kalsiyum pektinat nanopartikül formülasyonunun hazırlanmasının ve TNBS ile kolit oluşturulmuş sıçanlar üzerinde etkisinin incelendiği bu tez çalışmamızda aşağıdaki sonuçlara varılmıştır:

❖ İn vitro çalışmalara ait sonuçlar:

- Önformülasyon çalışmalarında, yedi farklı pektin tipiyle makro boyutlarda çalışılarak, pektin tiplerinin formülasyonlarda gösterdiği performansa paralel olarak eleme yapılmış ve LM 104 AS-FS ile tez çalışmasının sürdürülmesine karar verilmiştir.
- Literatürlerde verilen basit iyonotropik jelasyon yöntemi, birbirini izleyen üç ayrı basamakla modifiye edilerek partiküler büyüklüğün nanoboyuta inmesi (41.3-323.7 nm) sağlanmıştır.
- Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan formülasyon parametrelerinin, oluşturulan partiküller üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 32 farklı formülasyondan oluşan 2^5 faktöriyel tasarım yapılmıştır.
- Faktöriyel tasarımda yer alan formülasyonların hepsi laboratuvarda hazırlandıktan sonra, her birinin partikül büyüklüğü (41.3±3.2 - 323.7±3.2 nm), polidispersite indeksi (0.109±0.067 - 0.875±0.135), zeta potansiyeli (-24.24±1.03 - -4.83±0.35 mV), MEL yüklenme kapasitesi (% 80.7±1.6 - % 94.4±0.3), pH'sı (6.5±0.1 - 6.8±0.2) ve formülasyonlardan pH 6.8 fosfat tamponunda 8. saat sonunda salınan kümülatif % MEL miktarı (% 54.5±0.5 - % 84.0±0.7) değerleri saptanmıştır.
- Pythia® (YSA) kullanılarak yapılan modelleme sonucunda, formülasyon parametreleri ile elde edilen veriler arasındaki matematiksel ilişki başarıyla tanımlanmıştır. Farklı formülasyon parametreleri kullanılarak hazırlanan formülasyonların olası partikül büyüklüğü ve formülasyonlardan pH 6.8 fosfat tamponunda 8. saat

sonunda salınan kümülatif MEL miktarı değerleri başarıyla tahmin edilmiştir.

- Pythia®'dan elde edilen veriler doğrultusunda, faktöriyel tasarımı oluşturan formülasyonlardan P28 (pektin kons. %0.05 (a/h), $CaCl_2$ kons. %0.5 (a/h), pektin:MEL oranı 1:1, çapraz bağlanma ortamında tutulma süresi 15 dakika, çapraz bağlanma ortamının karıştırılma hızı 10000 rpm) optimum nanopartikül formülasyonu olarak seçilmiştir.
- P28 formülasyonundan MEL salım profili, farklı salım ortamlarının kullandığı spesifik salım çalışmalarında izlenmiştir. P28'in, Pectinex® içeren salım ortamlarında içeriğinde yer alan MEL'in tamamını (% 100) saldığı görülmüştür.
- Tüm nanopartikül formülasyonlarından MEL salımının √t (Higuchi) kinetiğine daha iyi uyum sağladığı görülmüştür.
- P28 ile gerçekleştirilen mukoadezyon çalışmalarında, elde edilen mukoadezyon işi sonuçları kıyaslandığında, nanopartikül formülasyonunun kolit oluşturulan sıçan kolon dokusuna (0,441±0,012), sağlıklı kolon dokusuna (0,010±0,001) göre çok daha iyi adhere olduğu görülmüştür.
- P28'in 4^oC'de ve 25^oC'de altı ay süreyle, 40^oC'de ise üç ay süreyle stabilitesinin bozulmadığı tespit edilmiştir.
- P28 hazırlanırken bağlanmadan kalan Ca^{+2} miktarı 0.5±0.05 µg/mL olarak bulunmuş olup, başlangıçtaki Ca^{+2} miktarının % 0.1'inden daha düşüktür.
- TEM ve AFM teknikleri kullanılarak nanopartiküllerin görüntüsü elde edilmiştir. Nanopartiküllerin küresel olduğu ve aglomere eğiliminin olmadığı tespit edilmiştir.

❖ İn vivo çalışmalara ait sonuçlar:

- MEL'in İBH üzerindeki etkisi, TNBS ile deneysel kolit oluşturulan sıçanlar üzerinde incelenmiştir. Elde edilen patolojik bulgular

TNBS'nin sıçanlarda başarıyla deneysel kolit modeli oluşturduğunu göstermiştir.

- Sıçanlara ait kolonik oksidatif stres parametre (NO_x, MDA ve GSH) düzeyleri, kolonik sitokin (TNF-α, IL-10 ve IL-17) seviyeleri ve histolojik bulgular değerlendirildiğinde, oral ve intrakolonik yoldan P28 tedavisi uygulanan sıçanlarda, sağlıklı kontrol grubuyla paralel sonuçlar elde edilmiştir. Buna karşın, boş nanopartikül formülasyonu verilen sıçanlarda ise kolit grubuyla paralel sonuçlar elde edilmiştir.
- Oral ve intrakolonik yoldan P28 tedavisi uygulanan sıçanlarda boş nanopartikül formülasyonu verilen sıçanlara kıyasla, kolonik NO_x ve MDA düzeyleri azalmış, GSH düzeyleri ise artmıştır. Kolitte görülen oksidatif strese bağlı kolonik doku hasarı MEL tedavisiyle engellenmiştir.
- Oral ve intrakolonik yoldan P28 tedavisi uygulanan sıçanlarda boş nanopartikül formülasyonu verilen sıçanlara kıyasla, proinflamatuvar TNF-α, IL-17 ve antiinflamatuvar IL-10 sitokin düzeyleri azalmıştır. TNBS maruziyeti sonucunda artan kolonik inflamasyon MEL tedavisiyle engellenmiştir.
- Histolojik bulgulara göre, oral ve intrakolonik yoldan P28 ile yapılan tedavi sonucunda kolonik mukozanın normale döndüğü ve kolonik yapının normal olarak gözlendiği saptanmıştır. Buna karşın, boş nanopartikül uygulaması verilen sıçanlarda belirgin bir doku iyileşmesi olmadığı görülmüştür.

  Oral yoldan uygulanan tedavinin intrakolonik yoldan uygulanan tedaviye oranla doku iyileştirmede daha fazla etkili olduğu belirlenmiştir.

❖ Sonuç olarak,

- Kolona hedeflendirilmiş MEL yüklü, kalsiyum pektinat nanopartikül formülasyonu geliştirilerek literatüre yenilik getirilmiştir.
- Kolonik oksidatif stres parametreleri, kolonik sitokin düzeyleri ve histolojik bulgular birlikte değerlendirildiğinde, hazırlanan MEL yüklü, kalsiyum pektinat nanopartikül formülasyonunun İBH'da etkili olabileceği kanısına varılmıştır.

7. ÖZET

İnflamatuvar bağırsak hastalığı modelinde nanopartiküler sistemlerin in vitro / in vivo değerlendirilmesi

Bu çalışmada, melatonin kullanılarak kolona hedeflendirilmiş, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması, bunların karakterize edilmesi, hazırlanan formülasyonların in vitro salım çalışmalarının yapılması ve yapay sinir ağı modellemesi sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda uygun olduğuna karar verilen formülasyonun, TNBS ile kolit indüklenmiş sıçanlarda kolit üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Modifiye edilen iyonotopik jelasyon yöntemiyle, 2^5 faktöriyel tasarım uygulanarak 32 adet farklı melatonin yüklü, kalsiyum pektinat nanopartikül formülasyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartikül formülasyonları partikül büyüklüğü, zeta potansiyel, PDI parametreleri kullanılarak karakterize edilmiştir. İn vitro salım çalışmaları gerçekleştirilmiş ve mukoadezyon özellikleri incelenmiştir.

AFM ve TEM teknikleri kullanılarak nanopartiküllerin görüntüsü elde edilmiştir.

Yapay sinir ağı modellemesi sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda uygun olduğuna karar verilen P28, (pektin kons. %0.05 (a/h), $CaCl_2$ kons. %0.5 (a/h), pektin:MEL oranı 1:1, çapraz bağlanma ortamında tutulma süresi 15 dakika, çapraz bağlanma ortamının karıştırılma hızı 10000 rpm) seçilerek in vivo çalışmalarda kullanılmıştır.

İn vivo çalışmalarda Wistar erkek sıçanlar kullanılmıştır. TNBS ile kolit oluşturulan sıçanlara, oral ve intrakolonik yoldan 10 mg/kg dozunda MEL yüklü nanopartikül formülasyonu, dört gün süreyle verilmiş

ve elde edilen sonuçlar oral ve intrakolonik yoldan boş nanopartikül formülasyonu verilen sıçanlarınki ile karşılaştırılmıştır.

Tedavinin sonunda kolon dokusundaki oksidatif parametreler (NO_x, MDA ve GSH) ve sitokin düzeyleri (TNF-α, IL-10 ve IL-17) ölçülmüştür. Oral ve intrakolonik yoldan melatonin tedavisi uygulanan gruplarda kolonik NO_x ve MDA düzeyleri boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplara kıyasla anlamlı olarak azalmış, GSH düzeyleri ise anlamlı olarak artmıştır. Ayrıca proinflamatuvar TNF-α, IL-17 ve antiinflamatuvar IL-10 sitokin düzeyleri ise anlamlı olarak azalmıştır.

Histolojik bulgalara göre, oral ve intrakolonik yoldan melatonin yüklü nanopartikül tedavisi uygulanan gruplarda doku iyileşmesinin, boş nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplara kıyasla daha iyi olduğu görülmüştür. Ayrıca oral yoldan uygulanan tedavinin, intrakolonik yoldan uygulanan tedaviye oranla doku iyileştirmede daha fazla etkili olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, hazırlanan melatonin yüklü nanopartikül formülasyonunun, İBH'da oksidatif strese bağlı olarak gelişen kolonik doku hasarında etkili olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Melatonin, pektin, nanopartikül, yapay sinir ağı, TNBS, antioksidan, oksidatif stres, sitokin, inflamatuvar bağırsak hastalığı, kolit, Crohn hastalığı

8. SUMMARY

In vitro / in vivo evaluation of nanoparticular systems in inflammatory bowel disease model.

The aim of this study was to develop a colon specific nanoparticular drug carrier system of melatonin, characterization of them, conducting in vitro release studies of the prepared formulations and to determine the effect of the formulation which was found to be suitable as a result of artifical neural network modelling, on TNBS induced colitis in rats.

32 different melatonin loaded calcium pectinate nanoparticle formulations prepared with 2^5 factorial design applied modified ionotropic gelation method. Prepared nanoparticle formulations characterized by particle size, zeta potential and polydispersity index parameters. The in vitro release studies were performed and mucoadhesion were investigated.

AFM and TEM techniques are used to obtain nanoparticle images.

P28, (pectin cons. %0.05 (w/v), $CaCl_2$ cons. %0.5 (w/v), pectin:MEL ratio 1:1, cross-linking time 15 minutes, agitation speed of cross-linking medium 10000 rpm) which was found to be suitable as a result of artifical neural network modelling was used in in vivo studies.

Wistar male rats were used in in vivo studies. 10 mg/kg melatonin loaded nanoparticle formulation was administered by oral and intracolonic route to TNBS induced colitis rats for four days. The obtained results are compared with the results of the rats which was applied blank nanoparticle formulation**.**

At the end of the treatment, oxidative parameters (NO_x, MDA ve GSH) of the colonic tissue and cytokine levels was evaluated. Colonic

tissue NO_x and MDA levels in the group treated with melatonin by oral and intracolonic route were found to be lower compared to the groups which applied blank nanoparticle formulation. Colonic tissue GSH levels in the group treated with melatonin by oral and intracolonic route were found to be higher compared to the groups which applied blank nanoparticle formulation. Also proinflammatory TNF-α, IL-17 levels and antiinflammatory IL-10 levels of the group treated with melatonin by oral and intracolonic route were found to be lower compared to the groups which applied blank nanoparticle formulation.

According to histological findings, the tissue healing in the group treated with melatonin loaded nanoparticle formulation by oral and intracolonic route was found better than the group applied blank nanoparticle formulation. In addition, the treatment which was given by oral route was found more effective than the treatment which was given by intracolonic route in tissue healing.

The results of the experiments showed that, melatonin loaded nanoparticle formulation can be effective in colonic tissue damage which develops due to oxidative stress in IBD.

Keywords: Melatonin, pectin, artifical neural network, TNBS, antioxidant, oxidative stress, cytokin, inflammatory bowel disease, colitis, Crohn's disease.

9. KAYNAKLAR

1. Dortunç B. Kolona ilaç taşıyan sistemler. içinde: Gürsoy A. Z. Kontrollü Salım Sistemleri. İstanbul: Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj Sanayi; 2002. s. 283-297.

2. Yıldırım M. Gastrointestinal sistem anatomisi. İnsan Anatomisi. 6. Baskı İstanbul: Nobel Tıp Yayınları; 2004. s. 160-186.

3. Tuğcu-Demiröz F, Acartürk F. Kolona özgü ilaç taşıyıcı sistemler. FABAD J Pharm Sci 2002; 27, 117-134

4. Friend DR. Issues in oral administration of locally acting glucocorticosteroids for treatment of inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther 1998; 12(7): 591-603.

5. Rubinstein A. Microbially controlled drug delivery to the colon. Biopharm Drug Dispos 1990; 11(6): 465-475.

6. Schultz M, Scholmerich J, Roth HC. Rationale for probiotic and antibiotic treatment strategies in inflammatory bowel diseases. Dig Dis 2003; 21, 105-28.

7. El Yamani J, Mizon C, Capon C, Colombel JF, Fournet B, Cortot A, Mizon J. Decreased fecal exoglycosidase activities identify a subset of patients with active Crohn's disease. Clin Sci 1992; 83 (4): 409-415.

8. Evans DF, Pye G, Bramley R, Clark AG, Dyson TJ, Hardcastle JD. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. Gut 1988; 29(8): 1035-1041.

9. Fallingborg J, Christensen LA, Jacobson BA, Rasmussen SN. Very low intraluminal colonic pH in patients with active ulcerative colitis. Dig Dis Sci 1993; 38(11): 1989-1993.

10. Mrsny RJ. The colon as a site for drug delivery. J Control Release 1992; 22: 15-34.

11. Rao SSC, Read NW, Brown C, Bruce C, Holdsworth CD. Studies on the mechanism of bowel disturbance in ulcerative colitis. Gastroenterology 1987; 93(5): 934-940.

12. Reddy SM, Sinha VR, Reddy DS. Novel oral colon specific drug delivery systems for pharmacotherapy of peptide and nonpeptide drugs. Drugs of Today 1999; 35: 537-580.

13. Stenson WF: Inflammatory bowel disease. In Goldman L, Ausiello D (eds): Cecil textbook of medicine, 22nd edition, 2004; 861-868.

14. Kodner IJ, Fry RD, Fleshman JW, Birnbaum EH. Colon, rectum, and anus. Chap. 26 in Schwartz SI (ed.): Principles of Surgery, 6th Edition. New York: McGraw-Hill Co. ; 1993. s. 1191-1306

15. Kwon JH, Peppercorn MA, Farrell RJ. Diagnostic features of inflammatory bowel disease. Gastro Endosc News 2002; 53: 28-29.

16. Kovacs M, Muller KE. Diagnostic yield of upper endoscopy in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. J Crohn's Colitis 2012; 6(1): 86–94.

17. Rutgeerts P, Geboes K. Understanding inflammatory bowel disease The Clinician's Perspective. Eur J Surg Suppl 2001; 167(8): 66-72

18. Head KA, Jurenka JS. Inflammatory bowel disease part I: Ulcerative colitis-pathophysiology and conventional and alternative treatment options. Altern Med Rev 2003; 8(3): 247-283.

19. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling regulation of the immune response in normal and critically ill states. Crit Care Med 2000; 28: 3-12.

20. Sartor R. Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. Gastroenterol Clin North Am 1995; 24: 475-507.

21. Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. J Clin Invest 1995; 95: 55-65.

22. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidan antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik Gelişim 1998; 11: 336-341.

23. Southorn PA. Free radicals in medicine. 2. Involvement in human disease. Mayo Clin Proc 1988; 63: 390-408.

24. D'Odorico A, Bortolan S, Cardin R. Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 2001; 36(12): 1289-1294.

25. Sohal RS, Orr WC. The redox stress hypothesis of aging. Free Radic Biol Med 2012; 52: 539–555.

26. Wendland BE, Aghdassi E, Tam C. Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn disease. Am J Clin Nutr 2001; 74(2): 259-264.

27. Alzoghaibi MA, Al Mofleh IA, Al-Jebreen AM. Lipid peroxides in patients with inflammatory bowel disease. Saudi J Gastroenterol 2007; 13(4): 187-190.

28. Markovitz M, Rozen P, Pero R, Tobi M, Miller D. Hydrogen peroxide induced adenosine diphosphate ribosyl transferase (ADPRT) response in patients with inflammatory bowel disease. Gut 1988; 29: 1680–1686

29. Sedghi S, Keshavarzian A, Klamut M, Eiznhamer D, Zarling E. Elevated breath ethane levels in active ulcerative colitis. Evidence for excessive lipid peroxidation. Am J Gastroenterol 1994; 89: 2217–2221.

30. Tüzün A, Erdil A, İnal V, Aydın A, Bağcı S, Yeşilova Z, Sayal A, Karaeren N, Dağalp K. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. Clin Biochem 2002; 35: 569-572.

31. Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 1996; 41(10): 2078-2086.

32. Circu ML, Aw TY. Intestinal redox biology and oxidative stress. Semin Cell Dev Biol 2012; (23): 729– 737.

33. Kallinowski F, Wassmer A, Hofmann MA. Prevalence of enteropathogenic bacteria in surgically treated chronic inflammatory bowel disease. Hepatogastroenterology 1998; 45(23): 1552-1558.

34. Schmassmann A, Halter F. Local or systemic treatment of inflammatory bowel diseases? Ther Umsch 1993; 50(2): 94-99.

35. Vitti RA, Meyers F, Knight LC, Siegel JA, Malmud LS, Fisher RS. Quantitative distrubition of radiolabeled 5-aminosalicylic acid enemas in patients with left- sided ulcerative colitis. Dig Dis Sci 1989; 34(11): 1792-1797.

36. Das KM, Farag SA. Current medical therapy of inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2000; 6(4): 483-489.

37. Travis S, Feagan BG, Rutgeerts P, Deventer S. The future of inflammatory bowel disease management: Combining progress in trial design with advances in targeted therapy. J Crohn's Colitis 2012; 6(2): 250-259.

38. Ng SC, Kamm MA. Therapeutic strategies for the management of ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis 2009; 15(6): 935-950.

39. Ardizzone S. Drugs used in ulcerative colitis. Orphanet encyclopedia. Italy: 2003.

40. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. Nutrition Reviews 2012; 70(5): 257–265.

41. Kruidenier L, Verspaget HW. Antioxidants and mucosa protectives: realistic therapeutic options in inflammatory bowel disease? Mediators Inflamm 1998; 7: 157-162.

42. Neuman MG, Nanau RM. Inflammatory bowel disease: Role of diet, microbiota, life style. Transl Res 2012; 160: 29-44.

43. Zhu H, Li YR. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. Exp Biol Med 2012; 237: 474-480.

44. Li G, Lee M, Liu AB, Yang Z, Lin Y, Shih W J, Yang CS. The antioxidant and anti-inflammatory activities of tocopherols are independent of Nrf2 in mice. Free Radic Biol Med 2012; 52: 1151–1158

45. Amrouche-Mekkioui I, Djerdjouri B. N-acetylcysteine improves redox status, mitochondrial dysfunction, mucin-depleted crypts and epithelial hyperplasia in dextran sulfate sodium-induced oxidative colitis in mice. Eur J Pharmacol 2012; 691: 209–217.

46. Brückner M, Westphal S, Domschke W, Kucharzik T, Lügering A. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate shows therapeutic antioxidative effects in a murine model of colitis. J Crohn's Colitis 2012; 6: 226–235.

47. Xiao B, Merlin D. Oral colon-specific therapeutic approaches toward treatment of inflammatory bowel disease. Expert Opin Drug Deliv 2012; 9(11): 1393-407.

48. Bauer KH, Wohlschlegel C. Review about novel pharmaceutical excipients for colon targeting. Drugs Mad Ger 1992; 35(3): 85-89.

49. Şengel-Türk CT, Hasçiçek C, Gönül N. Kolona hedeflenen ilaç taşıyıcı sistemler. Ankara Ecz Fak Derg 2006; 35 (2): 125-148.

50. Tuğcu-Demiröz F, Acartürk F, Takka S. Investigation of the colon spesific dosage forms of ondansetron with natural polymers. Pharmazie 2006; 61: 916-919.

51. Kumar SR, Tiwari A. Carbohydrate polymers: Applications and recent advances in delivering drugs to the colon Carbohydr Polym 2012; 88: 399– 416.

52. Acartürk F, Celkan A. Comparison of guar gum from different sources for the preparation of prolonged-release or colon-specific dosage forms. Pharm Dev Techn 2009; 14(3): 271-277.

53. Tuğcu-Demiröz F, Acartürk F, Takka S, Konuş-Boyunağa O. In-vitro in-vivo evaluation of mesalazine guar gum matrix tablets for colonic drug delivery. J Drug Target 2004; 12(2): 105-112.

54. Esiringü F. Antioksidan içeren kolona özgü jel tipi ilaç şekli üzerine çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2010.

55. Tozaki H, Komoike J, Tada C, Maruyama T, Terabe A, Suzuki T, Yamamoto A. Chitosan capsules for colon specific drug delivery: Improvement of insulin absorption from the rat colon. J Pharm Sci 1997; 86(9): 1016-1021.

56. Milojevic S, Newton SM, Cumming JH, Gibson RG, Botham RL, Rings SG, Stockham M, Allwood M. Amylose as a coating for drug delivery to the colon: Preparation and in vitro evaluation using 5-aminosalycilic acid pellets. J Control Release 1996; 38: 75-84.

57. Vervoot L, Kinget R. In vitro degredation by colonic bacteria of inulin HP incorporated in Eudragit RS films. Int J Pharm 1996; 129: 185-190.

58. Rubinstein A, Nakar D, Sintov A. Chondroitin sulphate: A potential biodegradable carrier for colon-specific drug delivery. Int J Pharm 1992; 84: 141-150.

59. Sahoo SK, Parveen S. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. Nanomed-Nanotechnol Biol Med 2012; 8: 147–166.

60. Collnot EM, Ali H, Lehr CM. Nano and microparticulate drug carriers for targeting of the inflamed intestinal mucosa. J Control Release 2012; 161: 235–246.

61. Tabata Y, Ikada Y. Phagocytosis of polymer microspheres by macrophages. Adv Polymer Sci 1990; 94: 107–141.

62. Lamprecht A, Schafer U, Lehr CM. Size-dependent bioadhesion of micro and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. Pharm Res 2001; 18: 788–793.

63. Lamprecht A, Yamamato H, Takeuchi H, Kawashima Y. A pH sensitive microsphere system for the colon delivery of tacrolimus containing nanoparticles. J Control Release 2005; 104: 337-346.

64. Makhlof A, Tozuka Y, Takeuchi H. pH-sensitive nanospheres for colon-specific drug delivery in experimental induced colitis rat model. Eur J Pharm and Biopharm 2009; 72: 1-8.

65. Lamprecht A, Pertuit D. 5-amino salicylic acid bound nanoparticles for the therapy of inflammatory bowel disease. J Control Release 2007; 123: 211-218.

66. Şengel-Türk CT, Gönül N. Preparation and in vitro evaluation of meloxicam-loaded PLGA nanoparticles on HT-29 human colon adenocarcinoma cells. Drug Dev Ind Pharm 2012; 38(9): 1107-1116.

67. Dutta RK, Sahu S. Development of oxaliplatin encapsulated in magnetic nanocarriers of pectin as a potential targeted drug delivery for cancer therapy. Results Pharm Sci 2012; 2: 38–45.

68. Lower ES. Pectin and derived acids manufacture properties uses. SOFW Journal 1992; 118(14): 845-846.

69. The Merck Index, Fourteenth Edition, Merck and Co., Inc., USA, 2006.

70. Ashford M, Jell JT, Attwood D, Sharma H, Woodhead P. An evaluation of pectin as a carrier for drug targeting to the colon. J Control Release 1993; 26: 213-220.

71. Baytop T. : Farmakognozi. 1. Cilt, s. 57-58, İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Yayınları. 1989

72. Lower ES. Pectin and derived acids manufacture properties uses. SOFW Journal 1993; 119(3): 169-174.

73. Silva JA, Goncalves MP. Rheological study into the ageing process of high methoxyl pectin/sucrose aqueous gels. Carbohydr Polym 1994; 24: 235-245.

74. Silva JA. Influence of temperature on the dynamic and steady-shear rheology of pectin dispersion. Carbohydr Polym 1994; 23: 77-87.

75. Rodriguez M, Jose L, Jato V, Torres D. Design of a new multiparticulate system for potential site-specific and controlled drug delivery to the colonic region. J Control Release 1998; 55: 67-77.

76. Lower ES. Pectin and derived acids manufacture properties uses. SOFW Journal 1993; 119(1): 42-44.

77. Schultz A, Ashby-Hughes B, Taylor R, Gillis DE, Wilkins M. Effects of pectin on diarrhea in critically ill tube-fed patients receiving antibiotics. Am J Crit Care 2000; 9(6): 403-411.

78. Eliaz I, Hotchkiss AT, Fishman ML, Rode D. The effect of modified citrus pectin on urinary excretion of toxic elements. Phytother Res 2006; 20(10): 859-864.

79. Marounek M, Volek Z, Skřivanová E, Tuma J. Effects of amidated pectin alone and combined with cholestyramine on cholesterol

homeostasis in rats fed a cholesterol-containing diet. Carbohydr Polym 2010; 80(3): 989–992.

80. Aydin Z, Akbuga J. Preparation and evaluation of pectin beads. Int J Pharm 1996; 137: 133-136.

81. Rubinstein A, Radai R, Ezra M, Pathak S, Rokem JS. In vitro evaluation of calcium pectinate: A potential colon specific drug delivery carrier. Pharm Res 1993; 10(2): 158-263.

82. Rubinstein A, Radai R. In vitro and in vivo analysis of colon specific of calcium pectinate formulations. Eur J Pharm Biopharm 1995; 41(5): 291-295.

83. Meshali MM, Gabr KE. Effect of interpolymer complex formation of chitosan with pectin or acacia on the release behaviour of chlorpromazine HCl. Int J Pharm 1993; 89: 177-181.

84. Turkoglu M, Ugurlu T, Akarsu G, Gurer SU. Colonic delivery of compression coated nisin tablets using pectin/HPMC polymer mixture. Eur J Pharm Biopharm 2007; 67(1): 202-210.

85. Turkoglu M, Ugurlu T. In vitro evaluation of pectin/HPMC compression coated 5-aminosalicylic acid tablets for colonic delivery. Eur J Pharm Biopharm 2002; 53: 65-73.

86. Ugurlu T, Turkoglu M, Özaydın T. In vitro evaluation of compression coated glycyl-l-histidyl-l-lysine–Cu(II) (GHK–Cu^{2+}) loaded microparticles for colonic drug delivery. Drug Dev Ind Pharm 2011; 37(11): 1282-1289.

87. Hodges LA, Connolly SM, Band J, Mahony OB, Ugurlu T, Turkoglu M. Scintigraphic evaluation of colon targeting pectin/HPMC tablets in healthy volunteers. Int J Pharm 2009; 370: 144-150.

88. Sriamornsak P, Prakongpan S, Puttipipatkhachorn S, Kennedy RA. Development of sustained release theophylline pellets coated with calcium pectinate. J Control Release 1997; 47: 221-232.

89. Wakarly Z, Fell JT, Attwood D, Parkins D. Studies on drug release from pectin/ethylcellulose film coated tablets: A potential colonic delivery systems. Int J Pharm 1997; 153: 219-224.

90. Krögel I, Bodmeier R. Evaluation of an enzyme containing capsular shaped pulsatile drug delivery system. Pharm Res 1999; 16(9): 1424-1429.

91. Önder HN. Pektin ile multipartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması ve değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: Marmara Üniversitesi; 1998.

92. Surajit D, Ka-Yun NG. Resveratrol loaded calcium pectinate beads. J Pharm Sci 2010; 99(2): 840-860.

93. Sriamornsak P. Effect of calcium concentration, hardening agent and drying condition on release characteristics of oral proteins from calcium pectinate gel beads. Eur J Pharm Sci 1999; 8(3): 221-7.

94. Kun C, Lee-Yong L. Insulin loaded calcium pectinate nanoparticles: Effects of pectin molecular weight and formulation pH. Drug Dev Ind Pharm 2004; 30(4): 359-367.

95. Burapapadh K, Takeuchi H, Sriamornsak P. Novel pectin-based nanoparticles prepared from nanoemulsion templates for improving in vitro dissolution and in vivo absorption of poorly water soluble drug. Eur J Pharm Biopharm 2012; 82: 250-261.

96. Sharmaa R, Ahuja M, Kaurb H. Thiolated pectin nanoparticles: Preparation, characterization and ex vivo corneal permeation study. Carbohydr Polym 2012; 87: 1606-1610.

97. Reiter RJ. Melatonin: Clinical relevance. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2003; 17(2): 273 – 285.

98. Arendt J, Skene DJ. Melatonin as a chronobiotic. Sleep Med Rev 2005; 9: 25-39.

99. Touitou Y, Auzeby A, Camus F, Djeridane Y. Daily profiles of salivary and urinary melatonin and steroids in healthy prepubertal boys. J Pediatr Endocrinol Metab 2009; 22: 1009-1015.

100. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? J Pineal Res 2007; 42: 28-42.

101. Bubenik GA, Blask DE, Brown GM, Maestroni GJ, Pang SF, Reiter RJ, Viswanathan M, Zisapel N. Prospects of the clinical utilization of melatonin. Biol Signals Recept 1998; 7(4): 195-219.

102. Maestroni GJ. Melatonin as therapeutic agent in experimental endotoxic shock. J Pineal Res 1996; 20(2): 84–89.

103. Turek FW, Gillette MU. Melatonin, sleep and circadian rhythms: Rationale for development of specific melatonin agonists. Sleep Medicine 2004; 5: 523–532.

104. Reiter RJ. The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage. Neurochem Int 1995; 27(6): 453-460.

105. Akbulut GK, Gönül B, Akbulut H. Differential effects of pharmacological doses of melatonin on malondialdehyde and glutathione levels in young and old rats. Gerontology 1999; 45(2): 67-71.

106. Reppert SM, Weaver DR, Godson C. Melatonin receptors step in to the light: Cloning and classification of subtypes. Trends Pharmacol Sci 1996; 17: 100-102.

107. Rodriguez-Naranjo MI, Moya ML. Comparative evaluation of the antioxidant activity of melatonin and related indoles. J Food Compost Anal 2012; 28(1): 16-22.

108. Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Flores LJ, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. Acta Biochim Pol 2007; 54: 1-9.

109. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. Eur J Pharmacol 2001; 426: 1-10.

110. Melatonin [online]. Available from: URL:

http://en.wikipedia.org/wiki/Melatonin

111. Melatonin [online]. Available from: URL:

http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/ProductinfoInforma Sheet/2/m5250pis.Par.0001.File.tmp/m5250pis.pdf

112. Bechgaard E, Lindhardt K, Martinsen L. Intranasal absorption of melatonin in vivo bioavailability study. Int J Pharm 1999; 182(1): 1-5.

113. Vlachou M, Eikosipentaki A, Xenogiorgis V. Pineal hormone melatonin: Solubilization studies in model aqueous gastrointestinal environments. Curr Drug Deliv 2006; 3(3): 255-265.

114. Johns JR, Chenboonthai C, Johns NP, Saengkrasat A, Kuketpitakwong R, Porasupatana S. An intravenous injection of melatonin: Formulation, stability, pharmacokinetics and pharmacodynamics. JAASP 2012; 1(1): 32-43.

115. Kikwai L, Kanikkannan N, Babu RJ, Singh M. Effect of vehicles on the transdermal delivery of melatonin across porcine skin in vitro. J Control Release 2002; 83(2): 307-311.

116. Lee BJ, Choi HG, Kim CK, Parrott KA, Ayres JW, Sack RL. Solubility and stability of melatonin in propylene glycol and 2-hydroxypropyl-ß-cyclodextrin vehicles. Arch Pharm Res 1997; 20(6): 560-565.

117. Sorouraddin MH, Rashidi MR. Simultaneous spectrofluorimetric and spectrophotometric determination of melatonin and pyridoxine in pharmaceutical preparations by multivariate calibration methods. Il Farmaco 2005; 60(5): 451-458.

118. Andrisano V, Bertucci C, Battaglia A, Cavrini V. Photostability of drugs: Photodegradation of melatonin and its determination in commercial formulations. J Pharm Biomed Anal 2000: 23(1): 15-23.

119. Maharaj DS, Glass BD. The identification of the UV degradants of melatonin and their ability to scavenge free radicals. J Pineal Res 2002; 32(4): 257–261.

120. Hector AB, Breda KV, George R, Testa C, Norris R. Stability of melatonin in an extemporaneously compounded sublingual solution and hard gelatin capsule. Int J Pharm Compd 2009; 13(2): 170-174.

121. Daya S, Walker RB, Glass BD, Anoopkumar-Dukie S. The effect of variations in pH and temperature on stability of melatonin in aqueous solution. J Pineal Res 2001; 31(2):155–158.

122. Tomas-Zapico C, Coto-Montes A. Melatonin as antioxidant under pathological processes. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov 2007; 1(1): 63-82.

123. Bettahi I, Guerrero JM, Reiter RJ, Osuna C. Physiological concentrations of melatonin inhibit the norepinephrine-induced activation of prostaglandin-E_2 and C-AMP production in rat hypothalamus: A mechanism involving inhibiton of nitric oxide synthase. J Pineal Res 1998; 25: 34-40.

124. Fischer TW, Kleszczyński K, Hardkop LH, Kruse N, Zillikens D. Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin. J Pineal Res 2012 (In press).

125. Kim HS, Berstad A. Experimental colitis in animal models. Scand J Gastroenterol 1992; 27(7): 529-537.

126. Cevik H, Erkanli G, Ercan F, Isman CA, Yegen BC. Exposure to continuous darkness ameliorates gastric and colonic inflammation in the rat: both receptor and non-receptor-mediated processes. J Gastroenterol Hepatol 2005; 20: 294-303.

127. Tahan G, Gramignoli R, Marongiu F, Aktolga S, Cetinkaya A. Melatonin expresses powerful antiinflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic acid induced colitis in rats. Dig Dis Sci 2011; 56(3): 715-720.

128. Mei Q, Yu JP, Xu JM, Wei W, Xiang L, Yue L. Melatonin reduces colon immunological injury in rats by regulating activity of macrophages. Acta Pharmacol Sin 2002; 23(10): 882-886.

129. Mei Q, Xu JM, Xiang L, Hu YM, Hu XP, Xu ZW. Change of nitric oxide in experimental colitis and its inhibition by melatonin in vivo and in vitro. Postgrad Med J 2005; 81: 667-672.

130. Necefli A, Tulumoglu B, Giris M, Barbaros U, Gunduz M, Olgac V, Guloglu R, Toker G. The effect of melatonin on TNBS induced colitis. Dig Dis Sci 2006; 51: 1538–1545.

131. Chen M, Mei Q, Xu J, Lu C, Fang H, Liu X. Detection of melatonin and homocysteine simultaneously in ulcerative colitis. Clin Chim Acta 2012; 413: 30–33.

132. Lu WZ, Gwee KA, Moochhalla S, Ho KY. Melatonin improves bowel symptoms in female patients with irritable bowel syndrome: A double blind placebo controlled study. Aliment Pharmacol Ther 2005; 22(10): 927-934.

133. Chojnacki C, Wisniewska-Jarosinska M, Walecka-Kapica E, Klupinska G, Jaworek J, Chojnacki J. Evaluation of melatonin effectiveness in the adjuvant treatment of ulcerative colitis. J Physiol Pharmacol 2011; 62(3): 327-34.

134. Racovita S, Vasiliu S, Popa M, Luca C. Polysaccharides based on micro and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. Rev Roum Chim 2009; 54(9): 709-718.

135. Martin TB, Dodd PM, Jayaraman A. Polydispersity for tuning the potential of mean force between polymer grafted nanoparticles in a polymer matrix. Phys Rev Lett 2013; 110(1): 1-5.

136. Perumal S, Jabaris SL, Balaraman M. Preparation and evaluation of mesalamine collagen in situ rectal gel: A novel therapeutic approach for treating ulcerative colitis. Eur J Pharm Sci 2012; 56(7); 456-463.

137. Surajit D, Ka-Yun NG. Colon specific delivery of reveratrol: Optimization of multi-particulate calcium-pectinate carrier. Int J Pharm 2010; 385: 20-28.

138. Tuğcu-Demiröz F. Kontrollü salım yapan biyoadezif yeni vajinal ilaç şekilleri üzerinde çalışmalar. Doktora Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2009.

139. Motavallian-Naeini A, Andalib S, Rabbani M, Mahzouni P, Afsharipour M, Minaiyan M. Validation and optimization of experimental colitis induction in rats using 2,4,6-trinitro benzene sulfonic acid. Res Pharm Sci 2012; 7(3): 159-169.

140. Wallace JL, MacNaughton WK, Morris GP, Beck PL. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. Gastroenterology 1989; 96: 29-36.

141. Kim YJ, Kim EH, Hahm KB. Oxidative stress in inflammation based gastrointestinal tract diseases. Challenges and opportunities. J Gastroenterol Hepatol 2012; 27: 1004-1010.

142. Singh UP, Singh NP, Busbee B, Guan H, Singh B, Price RL, Taub DD, Mishra MK, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Alternative medicines as emerging therapies for inflammatory bowel diseases. Int Rev Immunol 2012; 31(1): 66-84.

143. Meissner Y, Pellequer Y, Lamprecht A. Nanoparticles in inflammatory bowel disease: Particle targeting versus pH-sensitive delivery. Int J Pharm 2006; 316: 138–143.

144. Ensign LM, Cone Ra, Hanes J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. Adv Drug Deliv Rev 2012; 64: 557-570.

145. Lamprecht A, Ubrich N, Yamamoto H, Schafer U, Takeuchi H. Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of inflammatory bowel disease. J Pharmacol Exp Ther 2001; 299(2): 775-781.

146. Christer GB, Peterson D, Elisabeth E, Taha Y. A new method for the quantification of cationic proteins in feces: Establishment of normal levels and clinical application in patients with inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2002; 97(7): 1755-1762.

147. Severcan F, Sahin I, Kazancı N. Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes evidence from fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and differential scanning calorimetry. Biochim Biophys Acta 2005; 1668: 215-222.

148. Bongiorno D, Ceraulo L, Ferrugia M. ^{1}H-NMR and FT-IR study of the state of melatonin confined in membrane models: location and interactions of melatonin in water free lecithin and AOT reversed micelles. ARKIVOC 2004; 58: 251-262.

149. Saija A, Tomaino A, Trombetta D, Pellegrino ML, Tita B, Caruso S, Castelli F. Interaction of melatonin with model membranes and possible implications in its photoprotective activity. Eur J Pharm Biopharm 2002; 53(2): 209-15.

150. Einhorn-Stolla U, Kunzeka H, Dongowski G. Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins. Food Hydrocolloids 2007; 21: 1101–1112.

151. Kandimalla KK, Kanikkannan N, Singh M.Optimization of a vehicle mixture for the transdermal delivery of melatonin using artificial neural networks and response surface method. J Controlled Release 1999; 61: 71–82.

152. Patil JS, Kamalapur MV, Marapur SC, Shiralshetti SS. Ionotropically gelled novel hydrogel beads: Preparation, characterization and in vitro evaluation. Indian J Pharm Sci 2011; 73(5): 504-9.

153. Sriamornsak P, Nunthanid J. Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: I. Preparation and in vitro release studies. Int J Pharm 1998; 160: 207-212.

154. Opanasopit P, Apirakaramwong A, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Ruktanonchai U. Development and characterization of pectinate micro/nanoparticles for gene delivery. AAPS Pharm Sci Tech 2008; 9(1): 67-74.

155. Dutta RK, Sahu S, Reddy VR. Synthesis, characterization, and in vitro release of diclofenac sodium from hybrid nanostructured magnetite-calcium pectinate. J Nanopart Res 2012; 14: 1038-1052.

156. Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. Eur J Pharm Biopharm 2008; 69(1): 1-9.

157. Patil S, Sandberg A, Heckert E, Self W, Seal S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. Biomaterials 2007 28(31): 460-467.

158. Jubeh TT, Barenholz Y, Rubinstein A. Differential adhesion of normal and inflamed rat colonic mucosa by charged liposomes. Pharm Res 2004; 21(3): 447-453.

159. Mccarron PA, Donnelly RF, Marouf W. Celecoxib loaded poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared using a novel and controllable

combination of diffusion and emulsification steps as part of the salting-out procedure. J Microencapsul 2006; 23: 480-498.

160. Jain NK, Khopade AJ. Long circulating multiple-emulsion system for improved delivery of an anticancer agent. Drug Deliv 1999; 6: 107-110.

161. Atyabi F, Inanloo K, Dinarvand R. Bovine serum albumin loaded pectinate beads as colonic peptide delivery system: Preparation and in vitro characterization. Drug Deliv 2005;12: 367-375.

162. Aghajani M, Shahverdi AR, Amani A. The use of artificial neural networks for optimizing polydispersity index (PDI) in nanoprecipitation process of acetaminophen in microfluidic devices. AAPS Pharm Sci Tech 2012; 13(4): 1293-1301.

163. Degim TI, Hadgraft J, Ilbasmis S, Ozkan Y. Prediction of skin penetration using artificial neural network (ANN) modelling. J Pharm Sci 2003; 92(3): 656-64.

164. Mastiholimath VS, Dandagi PM, Jain SS, Gadad AP, Kulkarni AR. Time and pH dependent colon specific, pulsatile delivery of theophylline for nocturnal asthma. Int J Pharm 2007; 328(1): 49-56.

165. Dupuis G, Chambin O, Génelot C, Champion D, Pourcelot Y. Colonic drug delivery: influence of cross-linking agent on pectin beads properties. Drug Dev Ind Pharm 2006; 32(7): 847-855.

166. Sasaki Y, Hada R, Nakajima H, Fukuda S, Munakata A. Improved localizing method of radiopill in measurement of entire gastrointestinal pH profiles: Colonic luminal pH in normal subjects and patients with Crohn's disease. Am J Gastroenterol 1997; 92(1): 114-118.

167. Nugent SG, Kumar D, Rampton DS, Evans DF. Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosalicylates and other drugs. Gut 2001; 48(4): 571-577.

168. Mahajan HS, Tatiya VB, Nerkar PP. Ondansetron loaded pectin based microspheres for nasal administration: In vitro and in vivo studies. Powder Technology 2012; 221: 168–176.

169. Hagesaether E, Byeb R, Sande SA. Ex-vivo mucoadhesion of different zinco pectinate hydrogel beads. Int J Pharm 2008; 347: 9–15.

170. Thirawong N, Nunthanid J, Puttipipatkhachorn S, Sriamornsak P. Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: An in vitro evaluation using texture analyzer. Eur J Pharm Biopharm 2007; 67: 132–140.

171. Mura C, Nácher A, Merino M, Merino-Sanjuan M, Cardad C, Ruizd A, Manconia M, Loya G. N-Succinyl-chitosan systems for 5-aminosalicylic acid colon delivery: In vivo study with TNBS induced colitis model in rats. Int J Pharm 2011; 416: 145-154.

172. Makhlof A, Tozuka Y, Takeuchi H. pH sensitive nanospheres for colon specific drug delivery in experimentally induced colitis rat model. Eur J Pharm Biopharm 2009; 72: 1-8.

173. Bourgeois S, Gernet M, Pradeau D, Andremont A, Fattal E. Evaluation of critical formulation parameters influencing thebioactivity of β-lactamases entrapped in pectin beads. Int J Pharm 2006; 324: 2-9.

174. Elson CO, Cong Y, Mc Cracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. Immunol Rev 2005;206: 260-76.

175. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol 2003; 3: 521-533.

176. Velde AA, Marleen I, Daniel V, Hommes W. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. Inflamm Bowel Dis 2006; 12: 995-999.

177. Pizarro TT, Arseneau KO, Bamias G. Rat models for the study of Crohn`s disease. Trends Mol Med. 2003; 9: 218-222.

178. Azılı C. TNBS ile oluşturulan deneysel kolit modelinde infliximab'ın ekstra intestinal tutulumlar üzerine etkisi. Doktora Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2007.

179. Nakai M, Sudo K, Yamada Y, Kojima Y, Kato T, Saito K, Moiwaki H, Seishima M. The role of the tumor necrosis factor receptor in 2,4,6-tri nitro benzene sulfonic acid induced colitis in rats. Dig Dis Sci 2005; 50: 1669-1676.

180. Nosalova V, Zeman M, Cerná S, Navarová J, Zakálová M. Protective effect of melatonin in acetic acid induced colitis in rats. J Pineal Res 2007; 42(4): 364-70.

181. Mazzon E, Esposito E, Crisafulli C. Melatonin modulates signal transduction pathways and apoptosis in experimental colitis. J Pineal Res 2006; 41: 363–373.

182. Esposito E, Mazzon E, Riccardi L. Matrix metalloproteinase-9 and metalloproteinase-2 activity and expression is reduced by melatonin during experimental colitis. J Pineal Res 2008; 45(2): 166-173.

183. Akcan A, Kucuk C, Sozuer E, Esel D, Akyildiz H, Akgun H, Muhtaroglu S, Aritas Y. Melatonin reduces bacterial translocation and apoptosis in trinitro benzene sulphonic acid-induced colitis of rats. World J Gastroenterol. 2008; 14(6): 918–924.

184. Marquez E, Sanchez-Fidalgo S, Calvo JR. Acutely administered melatonin is beneficial while chronic melatonin treatment aggravates the evolution of TNBS-induced colitis. J Pineal Res 2006; 40: 48 -55.

185. Li JH, Yu JP, Yu HG. Melatonin reduces inflammatory injury through inhibiting NF-kappaB activation in rats with colitis. Mediators Inflamm 2005; 205:185–193.

186. Niebel W, Walkenbach K, Béduneau A, Pellequer Y, Lamprecht A. Nanoparticle-based clodronate delivery mitigates murine experimental colitis. J Control Release 2012; 160: 659-665.

187. Rokutan K, Kawahara T, Kuwano Y, Tominaga K, Nishida K, Teshima-Kondo S. NO_x enzymes and oxidative stress in the immunopathology of the gastrointestinal tract. Semin Immunopathol 2008; 30(3): 315-327.

188. Cuzzocrea S, Mazzon E, Serraino I, Lepore V, Terranova ML, Ciccolo A, Caputi AP. Melatonin reduces dinitro benzene sulfonic acid induced colitis. J Pineal Res 2001; 30: 1-12.

189. Zingarelli B, Szabo C, Salzman AL. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. Gut 1999; 45: 199–209.

190. Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JD. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. Lancet 1993; 341: 465–466.

191. Alzoghaibi MA, Mofleh IA, Jebreen AM. Lipid peroxides in patients with inflammatory bowel disease. Saudi J Gastroenterol 2007; 13(4):187-190.

192. Barbosa S, Cecchini R, El Kadri MZ, Marchesan Rodriguez MA, Burini RC, Dichi I. Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil ω-3 fatty acids. Nutrition 2003; 19: 837-842.

193. Oz HS, Chen TS, McClain CJ, de Villiers WJ. Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. J Nutr Biochem 2005 May; 16(5): 297-304.

194. Sido B, Hack V, Hochlehnert A, Lipps H, Herfarth C, Dröge W. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. Gut 1998; 42: 485-492.

195. Muzes G, Molnar B, Tulassay Z, Sipos F. Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases. World J Gastroenterol 2012; 18(41): 5848-5861.

196. Thomson AB, Gupta M, Freeman HJ. Use of the tumor necrosis factor blockers for Crohn's disease. World J Gastroenterol. 2012 21;18(35): 4823-4854.

197. Murch SH, Lamkin VA, Savage MO. Serum concentrations of released tumor necrosis factor-alpha in chronic inflammatory bowel disease. Gut 1991; 32: 913-917.

198. MacDonald TT, Hutchings P, Choy M-Y, Murch S, Cooke A. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-y measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. Clin Exp Immunol 1990; 81: 301-305.

199. Schmitt EG, Haribhai D, Williams JB, Aggarwal P, Jia S, Charbonnier LM. IL-10 produced by induced regulatory T-cells, which controls colitis and pathogenic situations during immunotherapy. J Immunol 2012; 189(12): 5638-5648.

200. Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inglin R, Markus W. Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: Cytokine profile and dose dependency. Digestion 2000; 62: 240–248.

201. Raghavendra V, Singh V, Kulkarni SK, Agrewala JN. Melatonin enhances Th_2 cell mediated immune responses. Mol Cell Biochem 2001; 221: 57-62.

202. Kucharzik T, Stoll R, Lugering N, Domschke W. Circulating antiinflammatory cytokine IL-10 in patients with inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol 1995; 100: 452-456.

203. Motilva V, Garcia S, Talero E, Ilanes M. New paradigms in chronic intestinal inflammation and colon cancer: Role of melatonin. J Pineal Res 2011; 51: 44-60.

204. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin-17 in inflammatory bowel disease. Gut 2003; 52: 65-70.

10. EKLER

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/ 42-6864 02/04/**2012**
KONU :

Sayın
Prof.Dr.Füsun ACARTÜRK
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Füsun ACARTÜRK, K.Gonca AKBULUT ve Serkan YENER'den oluşan, G.Ü.ET-12.026 kod numaralı ve ***"Kolona Özgü Partiküler Sistemler Üzerine Çalışmalar"*** başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-12.026 and entitled ***"Studies on Colon-Specific Particular Systems"*** is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Commitee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste

Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Serkan

Soyadı: Yener

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara; 17.06.1985

İş Tecrübesi: Kale Eczanesi sahibi ve mesul müdürü - (2009-)

Eğitimi:

- Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 2009- (Yüksek Lisans)
- Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 2004-2008 (Lisans)
- Fethiye Kemal Mumcu Anadolu Lisesi 1997-2004
- Abdi İpekçi İlköğretim Okulu 1992-1997

Yabancı Dili: İngilizce

Bilimsel Etkinlikleri:

- **Projeler:**

1. **Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP):**

   "Kolona Özgü Mikropartiküler Sistemler Üzerine Çalışmalar" 02/2012-40.

12. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimi planlayıp yöneten, yapılan çalışmaların her aşamasında yanımda olarak bana yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, benden hoşgörü ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili tez danışman hocam **Sayın Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK**'e

Çalışmalarım sırasında bilimsel katkılarını, bilgi ve deneyimlerini benden hiç bir zaman esirgemeyen hocam **Sayın Prof. Dr. Nevin Çelebi**'ye

Her ihtiyacım olduğunda yoğun temposuna rağmen yardımıma koşan, fikirleri ve tecrübeleriyle benden ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, beni her zaman motive eden hocam **Sayın Prof. Dr. İ. Tuncer DEĞİM**'e

Bilgi birikimlerinden faydalandığım, bana karşı her zaman içten ve anlayışlı olan **Sayın Prof. Dr. Zelihagül DEĞİM'e, Sayın Prof. Dr. Sevgi TAKKA'ya, Sayın Doç. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN'e ve Sayın Doç. Dr. Figen TIRNAKSIZ'a**

Mukoadezyon çalışmalarım sırasında bütün özverisiyle bana yardımcı olan **Sayın Dr. Ecz. Fatmanur TUĞCU-DEMİRÖZ'e**

Çalışmalarım sırasında gösterdikleri destek için **Sayın Dr. Ecz. Sibel TAMER'e, Sayın Dr. Ecz. Tuba İNCEÇAYIR'a ve Uzm. Ecz. Şeyda AKKUŞ'a**

Yardımını benden hiçbir zaman esirgemeyen, güler yüzü, ilgisi ve sonsuz desteği ile ihtiyacım olan her an yanımda olan değerli arkadaşım **Sayın Uzm. Ecz. Serdar TORT'a**

Masasını her zaman benimle paylaşan, güler yüzünü, desteğini ve dostluğunu benden hiç esirgemeyen arkadaşım **Sayın Uzm. Ecz. Başaran MUTLU'ya**

Yardımlarından dolayı **Fatma ÇELİK'e**

Hayata adım attığım ilk günden beri sonsuz ilgi ve sevgileri ile verdiğim her kararda bana destek olan, bana her zaman inanan, güvenen ve her zaman yanımda olan **ANNEM'e ve BABAM'a**

Her koşulda yanımda olan, karşılaştığım tüm zorluklara benimle birlikte göğüs geren, anlayışı, sevgisi ve desteğiyle beni hiç yalnız bırakmayan, bana güvenen ve moral veren biricik **EŞİM'e**

ÇOK TEŞEKKÜR EDERİM...