



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**İPEK FİBROİN BAZLI İLAÇ YÜKLÜ HİDROJELLERİN
İNFLAMATUVAR BARSAK HASTALIĞINDA
DEĞERLENDİRİLMESİ**

AYŞEGÜL YILDIZ

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

TEMMUZ 2024



**İPEK FİBROİN BAZLI İLAÇ YÜKLÜ HİDROJELLERİN İNFLAMATUVAR
BARSAK HASTALIĞINDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ayşegül YILDIZ

**DOKTORA TEZİ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirim, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ayşegül YILDIZ

04/07/2024

İPEK FİBROİN BAZLI İLAÇ YÜKLÜ HİDROJELLERİN İNFLAMATUVAR BARSAK HASTALIĞINDA DEĞERLENDİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Ayşegül YILDIZ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2024

ÖZET

Tez çalışmasının amacı inflamatuvar bağırsak hastalığının (İBH) tedavisi için ipek fibroin temelli mesalazin ve kitozan:TNF- α siRNA polipeksi yüklü 3B biyobaskı ile üretilmiş oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının geliştirilmesi, in vitro karakterizasyonu ve in vivo etkinliğinin gösterilmesidir. Bu amaç doğrultusunda ipek böceği kozalarından ipek fibroin üretimi gerçekleştirilmiş ve ipek fibroin, hyaluronik asit ve sodyum aljinat kullanılarak bir seri biyomürekkep formülasyonları hazırlanmıştır. Optimum biyomürekkep formülasyonunun içeriği 75:75:50 ipek fibroin:sodyum aljinat: hyaluronik asit olarak belirlenmiştir. Kitozan:TNF- α polipeksi geliştirilmesi çalışmaları yapılmış ve 40/1 oranında kitozan: TNF- α siRNA içeren P-40 kodlu polipeks optimum olarak belirlenmiştir. Daha sonra biyomürekkep formülasyonları ile 3B biyobaskı yöntemiyle Kitozan/TNF- α polipeksi ve mesalazin yüklü hidrojel formülasyonları üretilmiştir. Hidrojellerin diferansiyel taramalı kalorimetre, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi, X-ışını kırınımı analizleri sonucunda formülasyon bileşenleri arasında geçimsizlik olmadığı tespit edilmiştir. Termogravimetrik analizle hidrojellerin termal stabilitesi analiz edilmiş ve hidrojellerin termal stabilitesi düşük bulunmuştur. Oral hidrojinin şişme indeksi 366 ± 67 , rektal hidrojinin şişme indeksi 404 ± 56 olarak tespit edilmiştir. 24 saat sonunda rektal hidrojinin %75,9'nun, oral hidrojinin ise %31,2'sinin in vitro parçalanmaya uğradığı gözlenmiştir. Mekanik analizlerde kopma uzaması değerleri oral hidrojel için $30,7\pm6,5$, rektal hidrojel için $38,4\pm4,5$; gerilme direnci değerleri ise oral hidrojel için $0,017\pm0,002$ mPa, rektal hidrojel için ise $0,016\pm0,001$ mPa olarak ölçülmüştür. Her iki hidrojinin de hem sağlıklı hem İBH oluşturulmuş kolon dokusuna mukoadesyon sağladığı görülmüştür. Morfolojik analizlerde hidrojellerin bulutsu ve homojen bir görüntüye sahip olduğu, liyofilize hidrojellerin ise poröz bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Her iki hidrojelden de mesalazin ve TNF- α siRNA salımı 24 saat boyunca devam etmiş, hidrojeller uzatılmış salım profili göstermiştir. Hücre kültürü çalışmaları kapsamında RAW 264.7 hücre hattı kullanılarak sitotoksisite ve in vitro TNF- α gen susturma çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda formülasyonların sitotoksik olmadığı ve oral hidrojinin TNF- α genini %46,53 oranında, rektal hidrojinin ise TNF- α genini %45,06 oranında susturduğu belirlenmiştir. İn vivo çalışmalar kapsamında İBH modeli oluşturulmuş Balb/c türü farelerde çalışma kapsamında hazırlanmış formülasyonlar ile uygulanan tedavi sonucunda fizyolojik, makroskobik ve mikroskobik ve biyokimyasal belirteçlerinde de önemli derecede iyileşme sağlanmıştır. Bu tez çalışmasında 3B biyobaskı yöntemiyle üretilmiş, mesalazin ve kitozan/TNF- α siRNA polipeksi yüklü ipek fibroin temelli hidrojel formülasyonlarının İBH tedavisinde kullanıma potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Bilim Kodu : 1020
Anahtar Kelimeler : İnflamatuvar bağırsak hastalığı, ipek fibroin, 3B biyobaskı teknolojisi, hidrojel
Sayfa Adedi : 347
Danışman : Prof. Dr. Füsün ACARTÜRK

EVALUATION OF SILK FIBROIN-BASED DRUG LOADED HYDROGELS IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

(Ph. D. Thesis)

Ayşegül YILDIZ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

July 2024

ABSTRACT

The aim of the thesis is to develop, in vitro characterization and in vivo efficacy of silk fibroin-based mesalazine and chitosan:TNF- α siRNA polyplex loaded, 3D bioprinted oral and rectal hydrogel formulations for the treatment of inflammatory bowel disease (IBD). For this purpose, silk fibroin was produced from silkworm cocoons and a series of bioink formulations were prepared using silk fibroin, hyaluronic acid and sodium alginate. The optimum bioink formulation content was determined as 75:75:50 silk fibroin:sodium alginate:hyaluronic acid. Studies were carried out to develop chitosan:TNF- α polyplex and P-40 coded polyplex containing 40/1 chitosan:TNF- α siRNA was determined to be optimum. Then, Chitosan/TNF- α polyplex and mesalazine-loaded hydrogel formulations were produced using bioink formulations with the 3D bioprinting method. As a result of differential scanning calorimetry, Fourier transform infrared spectrometry and X-ray diffraction analyzes of the hydrogels, it was determined that there was no incompatibility between the formulation components. Thermal stability of hydrogels was analyzed by thermogravimetric analysis and the thermal stability of hydrogels was found to be low. The swelling index of the oral hydrogel was found to be $366\pm 67\%$, and the swelling index of the rectal hydrogel was $404\pm 56\%$. It was observed that 75.9% of the rectal hydrogel and 31.2% of the oral hydrogel were degraded in vitro after 24 hours. In mechanical analysis, elongation at break values $30.7\pm 6.5\%$ for oral hydrogel and $38.4\pm 4.5\%$ for rectal hydrogel; tensile strength values were measured as 0.017 ± 0.002 mPa for oral hydrogel and 0.016 ± 0.001 mPa for rectal hydrogel. It was observed that both hydrogels provided mucoadhesion to both healthy and IBD-induced colon tissue. In morphological analysis, it was observed that the hydrogels had a cloudy and homogeneous structure, while the lyophilized hydrogels had a porous structure. The release of mesalazine and TNF- α siRNA from both hydrogels continued for 24 hours, and the hydrogels showed an prolonged release profile. Cytotoxicity and in vitro TNF- α gene silencing studies were performed using the RAW 264.7 cell line within the scope of cell culture studies. As a result of these studies, it was found that the formulations were not cytotoxic and the gene silencing efficiency of the oral hydrogel was 46.53% and the rectal hydrogel was 45.06%. As a result of the treatment applied with the formulations prepared within the scope of the thesis, significant improvement was achieved in the physiological, macroscopic, microscopic and biochemical markers of Balb/c type mice, for which an IBD model was created within the scope of in vivo studies. In this thesis, it was concluded that silk fibroin-based hydrogel formulations loaded with mesalazine and chitosan/TNF- α siRNA polyplex produced by 3D bioprinting method have the potential to be used in the treatment of IBD.

Science Code : 1020
Key Words : Inflammatory bowel disease, silk fibroin, 3D bioprinting technology, hydrogel
Page Number : 347
Supervisor : Prof. Dr. Füsün ACARTÜRK

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince her zaman yanımda olan, bana yol gösteren, yeni ufuklar açan, bilgisini, desteğini ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen, akademik hayatım boyunca her zaman örnek alacağım çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Füsün Acartürk'e; tez dönemim boyunca her zaman yanımda olan, karşılaştığım tüm sorunların çözülmesinde yardımcı olan, bilgi ve tecrübeleriyle bana her zaman yol gösteren, tezimde büyük emeği olan Doç. Dr. Başaran Mutlu Ağardan'a; tez izleme jürimde yer alarak değerli fikirleri ve bilgileri ile çalışmalarına yön veren Prof. Dr. Asuman Bozkır ve Prof. Dr. Sibel İlbasmış Tamer'e; beni her zaman destekleyen, ihtiyacım olduğu zamanlarda bana tecrübeleriyle fikir ve moral veren Prof. Dr. Fatma Nur Tuğcu Demiröz ve Doç. Dr. Serdar Tort'a; desteklerini her daim hissettiğim ve akademik olarak gelişmemde katkı sağlayan Prof. Dr. Figen Tırnaksız, Prof. Dr. Sevgi Takka, Prof. Dr. Zeynep Şafak Teksin, Prof. Dr. Tuba İnceçayır ve Dr. Öğr. Üyesi Tahir Emre Yalçın'a; yakın ilgi ve desteğini gördüğüm Sayın Dr. Öğr. Üyesi Duygu Yılmaz Usta'ya; bütün doktora sürecim boyunca her mutlu anımda yanımda olan, ne zaman bir umutsuzluğa düşsem hiç tereddütsüz yardımına koşan, çalışma arkadaşı olmanın yanında bana birer kardeş olan Arş. Gör. Seval Olğaç, Arş. Gör. Eylül Su Saral Acarca, Arş. Gör. İlayda Biçici ve Ecz. Aysel Yılmaz'a; birlikte çalışmaktan her zaman mutlu olduğum ve yardımlarıyla bana destek olan arkadaşlarım Arş. Gör. Sinem Saar, Arş. Gör. Adnan Altuğ Kara, Arş. Gör. Emre Tunçel, Arş. Gör. Dr. Burcu Timur, Arş. Gör. Tamer Tekin, Arş. Gör. Şeyma Edisan, Arş. Gör. Gözde Bebek'e ve anabilim dalımızdaki araştırma görevlisi arkadaşlarıma; tez dönemim boyunca ne zaman bir sorunla karşılaştım her zaman bana destek olan Dr. Ecz. Mehmet Birir, Dr. Ecz. Yasin Turanlı'ya; bölüm sekreterimiz Fatma Çelik'e; in vivo deneylerimde benimle birlikte çözüm arayan ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Mürşide Ayşe Demirel ve Hacer Şirin'e; histoloji çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Ahmet Ceylan ve Dr. Öğr. Üyesi Özge Özgenç Çınar'a; hücre kültürü çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Begüm Yurdakök Dikmen ve Arş. Gör. Recep Uyar'a; sabır, yardım ve desteklerinden dolayı Oğuz Yakut'a; tüm hayatım boyunca destek ve güçlerini her daim hissettiğim, bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip olan ailem olmalarından dolayı her zaman gurur duyduğum canım annem Ayla Yıldız, canım babam Servet Yıldız ve canım kardeşim Eren Furkan Yıldız'a; Tezimi BAP-02/2020-20 kodlu proje ile destekleyen Gazi Üniversitesi'ne; Doktora Burs Programı çerçevesinde eğitimimi ve 222S191 kodlu proje ile tez çalışmalarımı destekleyen TÜBİTAK'a; 100/2000 YÖK Doktora Bursu çerçevesinde doktora eğitimimi ve tez çalışmalarımı destekleyen Yükseköğretim Kurulu'na sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xvii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xxi
RESİMLERİN LİSTESİ	xxx
SİMGELER VE KISALTMALAR	xxxv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gastrointestinal Sistem	3
2.1.1. Gastrointestinal sistemin fizyolojik ve anatomik özellikleri	3
2.1.2. Gastrointestinal sistemden geçiş süresi	5
2.1.3. Gastrointestinal sistem pH'sı	5
2.1.4. Gastrointestinal sistemden absorpsiyon	7
2.2. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları: Crohn Hastalığı ve Ülseratif Kolit	7
2.2.1. İnflamatuvar bağırsak hastalığı lokalizasyonu	10
2.2.2. İnflamatuvar bağırsak hastalığında tedavi yaklaşımları	11
2.2.3. Hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar	12
2.2.4. Hastalığın tedavisinde yenilikçi tedavi yöntemleri	13
2.2.5. Aljinat, hyaluronik asit ve inflamatuvar bağırsak hastalığında kullanımları	13
2.2.6. İnflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisinde rektal ve oral uygulamalar	16

	Sayfa
2.2.7. İnflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisinde uzatılmış salım yapan ilaç taşıyıcı sistemler	18
2.3. İpek Fibroin	20
2.3.1. İpek fibroinin kimyasal yapısı	20
2.3.2. İpek fibroinin özellikleri	22
2.3.3. İpek fibroinin elde ediliş yöntemleri	23
2.3.4. İpek fibroinin kullanım alanları	24
2.3.5. İpek fibroinin inflamatuvar bağırsak hastalığında kullanımı	25
2.4. Gen Tedavisi	26
2.4.1. Gen susturma teknolojisi	26
2.4.2. RNA interferans	27
2.4.3. RNA interferans stratejileri ve mekanizması	27
2.4.4. RNAi mekanizmasının bileşenleri	29
2.4.5. siRNA yapısı ve özellikleri	30
2.4.6. siRNA temelli ilaç taşıyıcı sistemler	31
2.4.7. siRNA'nın inflamatuvar bağırsak hastalığında kullanımı	33
2.5. Üç Boyutlu Baskı ve Üç Boyutlu Biyobaskı Teknolojileri	34
2.5.1. Üç boyutlu baskı teknolojisi	34
2.5.2. Üç boyutlu biyobaskı teknolojisi	36
2.5.3. Temel üç boyutlu biyobaskı teknolojileri	36
2.5.4. Ekstrüzyon temelli 3B biyobaskı	38
2.5.5. Üç boyutlu biyobaskı teknolojinin kullanım alanları	40
2.5.6. Üç boyutlu biyobaskı teknolojinin farmasötik alanda kullanımı	40
2.6. Hidrojeller	41
2.6.1. Hidrojel üretim yöntemleri	42
2.6.2. Hidrojellerin çapraz bağlama yöntemleri	44

	Sayfa
2.6.3. Hidrojeller ve 3B biyobaskı	45
2.6.4. Hidrojellerin inflamatuvar bağırsak hastalığında kullanımları	46
2.7. Mesalazin	47
2.7.1. Mesalazinin Fizikokimyasal Özellikleri	47
2.7.2. Mesalazin etki mekanizması	48
2.7.3. Mesalazinin farmakokinetik özellikleri	48
2.7.4. Mesalazinin yan etki profili, stabilitesi ve toksisitesi	50
2.7.5. Mesalazinin inflamatuvar bağırsak alanında kullanımı	51
2.8. Tezin Yenilikçi Yönü	52
3. GEREÇ VE YÖNTEM	55
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	57
3.1.1. Kullanılan cihazlar	57
3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler	57
3.1.3. Kullanılan kitler	59
3.1.4. Kullanılan yazılımlar	59
3.1.5. Kullanılan hücre hattı	59
3.1.6. İn vitro ve in vivo deneylerde kullanılan çözeltiler	59
3.2. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmaları	61
3.2.1. Mesalazinin miktar tayini yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu	61
3.2.2. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizleri	65
3.2.3. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR-ATR) analizi	67
3.2.4. X-ışını kırınımı (XRD) analizi	67
3.3. İpek fibroin eldesi ve karakterizasyonu	67
3.3.1. Protein miktar tayini yönteminin geliştirilmesi	67

	Sayfa
3.3.2. İpek fibroin eldesi için optimizasyon çalışmaları	68
3.3.3. İpek fibroinin karakterizasyonu çalışmaları	71
3.4. Ön Formülasyon Çalışmaları.....	73
3.4.1. Üç boyutlu biyobaskı için gerekli biyomürekkep formülasyonlarının hazırlanması amacıyla yapılan ön çalışmalar	73
3.5. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları	83
3.5.1. Oral uygulama için optimum formülasyonun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar	83
3.5.2. Rektal uygulama için optimum formülasyonun belirlenmesi için yapılan çalışmalar	86
3.5.3. Oral ve rektal uygulamada kullanılmak üzere 3B biyobaskı için optimum biyomürekkep formülasyonlarının hazırlanması	88
3.6. Optimum Oral ve Rektal Biyomürekkep Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları.....	88
3.7. Oral ve Rektal Uygulama İçin Sadece Mesalazin Yüklü Optimum Hidrojel Formülasyonlarının 3B Biyobaskı İşlemi	89
3.8. Sadece Mesalazin Yüklü Optimum Oral ve Rektal Hidrojel Formülasyonları ile Yapılan in Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları	90
3.9. TNF- α Geninin Susturulması Amacıyla Hazırlanan Formülasyonlar.....	91
3.9.1. Kitozan:TNF- α siRNA polilekslerinin hazırlanması	91
3.9.2. Kitozan:TNF- α siRNA polilekslerinin karakterizasyonu.....	92
3.10. Hücre Kültürü Çalışmaları	93
3.10.1. İn vitro TNF- α gen susturma çalışmaları	94
3.10.2. Sitotoksosite çalışmaları.....	96
3.11. Kitozan:TNF- α siRNA Polileksi ile Fizyolojik Sıvılarda Stabilite Çalışmaları	99
3.12. TNF- α siRNA ve Mesalazin İçeren Optimum Oral ve Rektal Hidrojel Formülasyonlarının 3B Biyobaskı Yöntemiyle Hazırlanması	99

	Sayfa
3.13. TNF- α siRNA ve mesalazin içeren oral ve rektal formülasyonların karakterizasyon çalışmaları	100
3.13.1. DSC analizleri	101
3.13.2. FTIR analizleri	101
3.13.3. XRD analizleri	101
3.13.4. Termogravimetrik analizler	101
3.13.5. Şişme kapasitesi ölçümleri	102
3.13.6. İn vitro parçalanma deneyi	103
3.13.7. Mekanik testler	103
3.13.8. Mukoadezyon deneyleri	104
3.13.9. Morfolojik analizler	105
3.14. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları	105
3.15. İn Vivo Çalışmalar	106
3.15.1. Deney hayvanlarında dekstran sodyum sülfat ile inflamatuvar bağırsak hastalığı modeli oluşturulması	108
3.15.2. Deney gruplarına uygulanan tedavi protokolü	109
3.15.3. Kolon dokusu örneklerinin alınması ve değerlendirilmesi	112
3.15.4. Kolon dokularının homojenizasyonu ve biyokimyasal çalışmalar için hazırlanması	114
3.15.5. Kolon mukozasında yapılan biyokimyasal çalışmalar	114
3.15.6. Histolojik analizler	116
3.16. İstatistiksel Değerlendirme	117
4. BULGULAR	119
4.1. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmaları	119
4.1.1. Mesalazinin miktar tayini yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu	119
4.1.2. DSC Analizleri	130

	Sayfa
4.1.3. FTIR Analizleri	140
4.1.4. XRD Analizleri	144
4.2. İpek fibroin eldesi ve karakterizasyonu.....	148
4.2.1 Protein miktar tayini yönteminin geliştirilmesi	148
4.2.3 İpek fibroin eldesi için optimizasyon çalışmaları	149
4.2.4. İpek fibroinin karakterizasyon çalışmaları	155
4.3. Önformülasyon Çalışmaları	158
4.3.1. Üç boyutlu biyobaskı için gerekli biyomürekkep formülasyonlarının hazırlanması amacıyla yapılan ön çalışmalar	158
4.4. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları	164
4.4.1. Oral uygulama için optimum formülasyonun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar	164
4.4.2. Rektal uygulama için optimum formülasyonun belirlenmesi için yapılan çalışmalar	165
4.4.3. Oral ve rektal uygulamada kullanılmak üzere 3B biyobaskı için optimum biyomürekkep formülasyonlarının hazırlanması	167
4.5. Optimum Oral ve Rektal Biyomürekkep Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları.....	167
4.5.1. Viskozite, yüzey gerilimi ölçümleri ve akış tipinin belirlenmesi	167
4.6. Oral ve Rektal Uygulama İçin Sadece Mesalazin Yüklü Optimum Hidrojel Formülasyonlarının 3B Biyobaskı İşlemi	170
4.7. Sadece Mesalazin Yüklü Optimum Oral ve Rektal Hidrojel Formülasyonları ile İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları	171
4.8. TNF-a Geninin Susturulması Amacıyla Hazırlanan Formülasyonlar.....	172
4.8.1. Kitozan:TNF- α siRNA polipekslerinin karakterizasyonu	172
4.9. Hücre Kültürü Çalışmaları	174
4.9.1. İn vitro gen susturma çalışmaları.....	174

	Sayfa
4.9.2. Sitotoksosite çalışmaları	177
4.10. Kitozan:TNF- α siRNA Polileksi ile Fizyolojik Sıvılarda Stabilite Çalışmaları.....	180
4.11. TNF- α siRNA ve Mesalazin İçeren Oral ve Rektal Formülasyonların 3B Biyobaskı Yöntemiyle Hazırlanması	181
4.12. TNF- α siRNA ve Mesalazin İçeren Oral ve Rektal Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmaları	182
4.12.1. DSC analizleri	182
4.12.2. FTIR analizleri	183
4.12.3. XRD analizleri	185
4.12.4. TGA analizleri	185
4.12.5. Şişme kapasitesi ölçümleri	187
4.12.6. İn vitro parçalanma deneyi.....	188
4.12.7. Mekanik testler	189
4.12.8. Mukoadezyon deneyleri.....	191
4.12.9. Morfolojik analizler	193
4.13. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları	194
4.13.1. Oral formülasyonların in vitro çözünme hızı çalışmaları	194
4.13.2. Rektal formülasyonların in vitro çözünme hızı çalışmaları	197
4.13.3. Salım kinetiklerinin belirlenmesi.....	200
4.14. İn vivo çalışmalar.....	202
4.14.1. Farelerin fizyolojik özelliklerine ait bulgular	203
4.14.2. Gruplara ait kolon örneklerinin makroskobik görünümü.....	214
4.14.3. Kolon mukozasında yapılan biyokimyasal çalışmalara ait bulgular	214
4.14.4. Histolojik çalışmalara ait bulgular	219
5. TARTIŞMA.....	239

Sayfa

5.1. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	240
5.1.1. Mesalazinin miktar tayini yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu	240
5.1.2. DSC Çalışmaları	242
5.1.3. FTIR Çalışmaları	243
5.1.4. XRD Analizleri	245
5.2. İpek fibroin eldesi ve karakterizasyon çalışması bulguları	245
5.2.1. Protein miktar tayini yönteminin geliştirilmesi	246
5.2.2. İpek fibroin eldesi için optimizasyon çalışmaları	246
5.2.3. İpek fibroinin karakterizasyon çalışmaları	251
5.3. Önformülasyon çalışmalarının bulgularının değerlendirilmesi	252
5.4. Formülasyon geliştirme çalışmalarının bulgularının değerlendirilmesi	256
5.4.1. Oral uygulama için optimum biyomürekkep formülasyonun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmaların bulgularının değerlendirilmesi	256
5.4.2. Rektal uygulama için optimum biyomürekkep formülasyonun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmaların bulgularının değerlendirilmesi	257
5.5. Optimum oral ve rektal formülasyonlarının karakterizasyon çalışmalarının bulgularının değerlendirilmesi	257
5.6. Sadece mesalazin yüklü optimum oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının 3B biyobaskısı ve in vitro çözünme hızı çalışmalarının bulgularının değerlendirilmesi	259
5.7. TNF- α geninin susturulması amacıyla formülasyonların hazırlanması ve bu formülasyonların karakterizasyon çalışmaları bulgularının değerlendirilmesi	261
5.8. Hücre kültürü çalışmalarının bulgularının değerlendirilmesi	262
5.8.1. TNF- α gen susturma çalışmalarına ait bulguların değerlendirilmesi	262
5.8.2. Sitotoksosite çalışmalarına ait bulguların değerlendirilmesi	264

Sayfa

5.9. Kitozan:TNF- α siRNA polileksi ile fizyolojik sıvılarda stabilite çalışmalarının bulgularının değerlendirilmesi	266
5.10. TNF- α siRNA ve mesalazin içeren oral ve rektal formülasyonların 3B biyobaskı yöntemiyle hazırlanması ve karakterizasyon çalışmaları bulgularının değerlendirilmesi	267
5.10.1. DSC analizlerinin bulgularının değerlendirilmesi	267
5.10.2 FTIR analizlerinin bulgularının değerlendirilmesi	267
5.10.3. XRD analizlerinin bulgularının değerlendirilmesi	268
5.10.4. Termogravimetrik analiz bulgularının değerlendirilmesi	269
5.10.5. Şişme kapasitesi analizleri bulgularının değerlendirilmesi	270
5.10.6. İn vitro parçalanma deneyi bulgularının değerlendirilmesi	271
5.10.7. Mekanik testlerin bulgularının değerlendirilmesi	271
5.10.8. Mukoadesyon deneylerinin bulgularının değerlendirilmesi	273
5.10.9. Morfolojik analiz bulgularının değerlendirilmesi	274
5.11. İn vitro çözünme hızı çalışmalarının bulgularının değerlendirilmesi	275
5.11.1. Oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının in vitro çözünme hızı çalışmalarının bulgularının değerlendirilmesi	275
5.11.2. Salım kinetikleri bulgularının değerlendirilmesi	278
5.12. İn vivo çalışmaların bulgularının değerlendirilmesi	281
5.12.1. Farelerin fizyolojik özelliklerine ait bulguların değerlendirilmesi	281
5.12.2. Gruplara ait kolon örneklerinin makroskobik görünümü.....	287
5.12.3. Kolon mukozasında yapılan biyokimyasal çalışmalara ait bulgular	289
5.12.4 Histolojik çalışmalara ait bulguların değerlendirilmesi	295
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	301

	Sayfa
KAYNAKLAR.....	303
EKLER.....	339
ÖZGEÇMİŞ	344



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Sağlıklı insanlarda gastrointestinal sistemden ortalama geçiş süreleri.....	5
Çizelge 2.2. Sağlıklı insanlarda gastrointestinal sistem ortalama pH değerleri	6
Çizelge 2.3. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının karakteristik özellikleri	8
Çizelge 2.4. İnflamatuvar bağırsak hastalığında sitokinlerin rolü.....	10
Çizelge 2.5. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının tedavisinde konvansiyonel olarak kullanılan ilaçlar	12
Çizelge 2.6. İnflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisinde siRNA'nın kullanıldığı çalışmalar	33
Çizelge 2.7. 3B Biyobaskı teknolojilerinin karşılaştırılması.....	38
Çizelge 2.8. Hidrojellerin çapraz bağlanma yöntemleri.....	45
Çizelge 2.9. İpek fibroinin 3B biyobaskı teknolojisinde biyomürekkep olarak kullanıldığı çalışmalar	46
Çizelge 3.1. İpek fibroin eldesinin optimizasyonu için yapılan deney tasarımı	71
Çizelge 3.2. Liyofilize ipek fibroin eldesinin optimizasyonu için yapılan deney tasarımı.....	71
Çizelge 3.3. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında geliştirilen biyomürekkep formülasyonlarının içeriği ve basılabilirlik parametresinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan baskı parametreleri	74
Çizelge 3.4. Sabit hacimde hazırlanan biyomürekkep formülasyon içerikleri .	79
Çizelge 3.5. Farklı aljinat tipleri ile hazırlanan oral biyomürekkep formülasyonları kullanılarak üretilen hidrojel formülasyonlarının 3B baskı parametreleri	84
Çizelge 3.6. Farklı aljinat tipleri ile hazırlanan rektal biyomürekkep formülasyonları kullanılarak üretilen hidrojel formülasyonları için 3B baskı parametreleri	87
Çizelge 3.7. Optimum oral ve rektal biyomürekkep formülasyonlarının içerikleri	88
Çizelge 3.8. Optimum oral ve rektal sadece mesalazin yüklü hidrojel formülasyonları için baskı parametreleri.....	90

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.9. Çalışmada kullanılan TNF- α siRNA'ların baz dizilimleri.....	91
Çizelge 3.10. Kitozan-TNF- α siRNA polilekslerini hazırlamak için kullanılan oranlar	92
Çizelge 3.11. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hidrojel formülasyonlarının kodları ve içerikleri	94
Çizelge 3.12. İn vitro gen susturma etkinliği değerlendirilen formülasyonlar	95
Çizelge 3.13. Sitotoksosite tayini yapılan materyaller ile sitotoksosite tayini için kullanılan stok ve test çözeltilerinin derişimleri	98
Çizelge 3.14. Sitotoksosite tayini yapılan formülasyonlar	98
Çizelge 3.15. O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 kodlu hidrojel formülasyonlarının içerikleri	100
Çizelge 3.16. Mukoadesyon deneyi için kullanılan test parametreleri	104
Çizelge 3.17. İn vivo çalışmalar için oluşturulan deney grupları	107
Çizelge 3.18. DSS ile inflamatuvar bağırsak hastalığı oluşumunu takip etmek için kullanılan skorlama	109
Çizelge 3.19. Makroskobik skorlama kriterleri	113
Çizelge 3.20. Histopatolojik değışikliklerin skorlanması için kriterler.....	116
Çizelge 4.1. Mesalazinin distile su içindeki deney içi kesinlik analizi sonuçları.....	122
Çizelge 4.2. Mesalazinin 0,1 N HCl tamponu içindeki deney içi kesinlik analizi sonuçları.....	122
Çizelge 4.3. Mesalazinin pH 1,2 tamponu içindeki deney içi kesinlik analizi sonuçları.....	122
Çizelge 4.4. Mesalazinin pH 6,8-1 tamponu içindeki deney içi kesinlik analizi sonuçları.....	123
Çizelge 4.5. Mesalazinin pH 6,8-2 tamponu içindeki deney içi kesinlik analizi sonuçları.....	123
Çizelge 4.6. Mesalazinin pH 7,4 içindeki deney içi kesinlik analizi sonuçları..	123
Çizelge 4.7. Mesalazinin distile su içindeki deneyler arası kesinlik bulguları..	124
Çizelge 4.8. Mesalazinin 0,1 N HCl çözeltisi içindeki deneyler arası kesinlik bulguları.....	124

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.9. Mesalazinin pH 1,2 tamponu içindeki deneyler arası kesinlik bulguları.....	124
Çizelge 4.10. Mesalazinin pH 6,8-1 tamponu içindeki deneyler arası kesinlik bulguları.....	124
Çizelge 4.11. Mesalazinin pH 6,8-2 tamponu içindeki deneyler arası kesinlik bulguları.....	124
Çizelge 4.12. Mesalazinin pH 7,4 tamponu içindeki deneyler arası kesinlik bulguları.....	125
Çizelge 4.13. Mesalazinin distile su içindeki doğruluk ve yüzde geri elde analizinin sonuçları	127
Çizelge 4.14. Mesalazinin 0,1 N HCl çözeltisi içindeki doğruluk ve yüzde geri elde analizinin sonuçları	127
Çizelge 4.15. Mesalazinin pH 1,2 tamponu içindeki doğruluk ve yüzde geri elde analizinin sonuçları	127
Çizelge 4.16. Mesalazinin pH 6,8-1 tamponu içindeki doğruluk ve yüzde geri elde analizinin sonuçları	127
Çizelge 4.17. Mesalazinin pH 6,8-2 tamponu içindeki doğruluk ve yüzde geri elde analizinin sonuçları	127
Çizelge 4.18. Mesalazinin pH 7,4 tamponu içindeki doğruluk ve yüzde geri elde analizinin sonuçları	128
Çizelge 4.19. Mesalazinin farklı ortamlardaki LOD ve LOQ değerleri.....	128
Çizelge 4.20. Zamk giderme işlemi sonucunda uzaklaşan serisin miktarının gravimetrik olarak analiz sonuçları	150
Çizelge 4.21. İpek fibroin çözeltisi için miktar tayini sonuçları (n=3, Ortalama $\pm$ SS)	151
Çizelge 4.22. Liyofilize ipek fibroin için miktar tayini sonuçları (n=3, Ortalama $\pm$ SS)	151
Çizelge 4.23. İpek fibroin eldesinde santrifüj işleminin optimizasyonu sonuçları.....	155
Çizelge 4.24. İpek fibroin eldesi için optimum işlem koşulları	155
Çizelge 4.25. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında geliştirilen biyomürekkep formülasyonlarının yüzey gerilimi, viskozite ölçüm sonuçları ve basılabilirlikleri (n=3).....	159

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.26. Sabit hacimde hazırlanan biyomürekkep formülasyonlarının viskozite, yüzey gerilimi ve basılabilirlik analizi sonuçları (n=3)..	159
Çizelge 4.27. Çapraz bağlama süresi optimizasyonu için % ağırlık kaybı değerleri (n=3).....	160
Çizelge 4.28. Farklı aljinat tipleri kullanılarak hazırlanan biyomürekkep formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları sonuçları (n=3).	164
Çizelge 4.29. Optimum oral ve rektal biyomürekkep formülasyonlarının viskozite ve yüzey gerilimi değerleri (n=3).....	167
Çizelge 4.30. Sadece mesalazin yüklü oral ve rektal hidrojellerin piyasa preparatlarıyla salım profillerinin karşılaştırılması amacıyla hesaplanan f2 ve f2 değerleri	172
Çizelge 4.31. Kitozan: TNF- α siRNA polipekslerinin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri (n=3)	174
Çizelge 4.32. Oral hidrojel formülasyonu için gerilme direnci ve kopma uzaması değerleri	190
Çizelge 4.33. Rektal hidrojel formülasyonu için gerilme direnci ve kopma uzaması değerleri	191
Çizelge 4.34. Sağlıklı ve inflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulmuş dokuda oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının mukoadesyon sonuçları (n=3)	191
Çizelge 4.35. Oral formülasyonlara TNF- α siRNA eklenmesinin formülasyonlardan mesalazin salımına etkisinin değerlendirilmesi amacıyla siRNA içermeyen oral formülasyon referans kabul edilerek hesaplanan f1 ve f2 değerleri	194
Çizelge 4.36. Rektal formülasyonlara TNF- α siRNA eklenmesinin formülasyonlardan mesalazin salımına etkisinin değerlendirilmesi amacıyla siRNA içermeyen oral formülasyon referans kabul edilerek hesaplanan f1 ve f2 değerleri	198
Çizelge 4.37. O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 formülasyonlarından mesalazin salımının farklı salım kinetiklerine göre değerlendirme sonuçları	201
Çizelge 4.38. O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 formülasyonlarından TNF- α siRNA salımının farklı salım kinetiklerine göre değerlendirme sonuçları	202
Çizelge 4.39. Gruplara göre farelerin % ağırlık kaybı değerleri	203

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. İnsan gastrointestinal sistemi.....	3
Şekil 2.2. Ülseratif Kolit ve Crohn Hastalığı lokalizasyonları.....	11
Şekil 2.3. İnflamatuvar bağırsak hastalığının konvansiyonel tedavisinde piramit yaklaşımı	12
Şekil 2.4. Aljinatın kimyasal yapısı	14
Şekil 2.5. Hyaluronik asitin kimyasal yapısı	16
Şekil 2.6. İpek böceği kozasının temel bileşenleri	21
Şekil 2.7. İpek fibroinin kimyasal yapısı	21
Şekil 2.8. İpek fibroin yapısının şematik gösterimi. A: Disülfid bağları ile bağlanan ağır zincir (N-terminal, β -tabakaları, Amorf ve C-terminal) ve hafif zincir. B:İpek böceği kozası genel yapısı.....	22
Şekil 2.9. İpek fibroin eldesinin şematik gösterimi	24
Şekil 2.10. RNA interferans mekanizması	29
Şekil 2.11. siRNA yapısı	30
Şekil 2.12. Etkili bir siRNA taşıyıcı sistem formülasyon tasarımı da karşılaşılabilecek kritik adımlar	32
Şekil 2.13. 3B baskı yönteminin temel işlem basamakları	35
Şekil 2.14. Üç boyutlu biyobaskı teknolojileri.....	37
Şekil 2.15. Farklı mekanizmaya sahip ekstrüzyon temelli 3B biyobaskı teknolojileri.....	39
Şekil 2.16. Hidrojellerin sınıflandırılması.....	41
Şekil 2.17. Mesalazinin kimyasal yapısı	47
Şekil 3.1. Tez kapsamında yapılan çalışmaların şematik gösterimi.....	56
Şekil 3.2. Biyomürekkeplerin hazırlanma işlemi	74
Şekil 3.3. Mesalazin yüklü biyomürekkep formülasyonlarının hazırlanma basamakları	82

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. Mesalazinin 0,1 N HCl çözeltisi içindeki çözeltisinin 200-800 nm aralığında UV-VIS spektrumu (A), mesalazinin pH 1,2 tamponu içindeki çözeltisinin 200-800 nm aralığında UV-VIS spektrumu (B)	119
Şekil 4.2. Mesalazinin distile su içindeki çözeltisinin 200-800 nm aralığında UV-VIS spektrumu (A), mesalazinin pH 6,8-1 tamponu içindeki çözeltisinin 200-800 nm aralığında UV-VIS spektrumu (B).....	119
Şekil 4.3. Mesalazinin pH 6,8-2 tamponu içindeki çözeltisinin 200-800 nm aralığında UV-VIS spektrumu (A), mesalazinin pH 7,4 tamponu içindeki çözeltisinin 200-800 nm aralığında UV-VIS spektrumu (B)	120
Şekil 4.4. Mesalazinin pH 1,2 tamponu içindeki çözeltisinin 300 nm dalga boyundaki kalibrasyon doğrusu (A) Mesalazinin 0,1 N HCl tamponu içindeki çözeltisinin 300 nm dalga boyundaki kalibrasyon doğrusu (B).....	120
Şekil 4.5. Mesalazinin distile su içindeki çözeltisinin 330 nm dalga boyundaki kalibrasyon doğrusu (A), mesalazinin pH 6,8-1 tamponu içindeki çözeltisinin 330 nm dalga boyundaki kalibrasyon doğrusu (B).....	121
Şekil 4.6. Mesalazinin pH 6,8-2 tamponu içindeki çözeltisinin 330 nm dalga boyundaki kalibrasyon doğrusu (A), mesalazinin pH 7,4 tamponu içindeki çözeltisinin 330 nm dalga boyundaki kalibrasyon doğrusu (B).....	121
Şekil 4.7. Mesalazin dışındaki formülasyon bileşenlerinin distile su içindeki 200-800 nm arasındaki UV spektrumları (A), mesalazin dışındaki formülasyon bileşenlerinin 0,1 N HCl çözeltisi içindeki 200-800 nm arasındaki UV spektrumları (B).....	125
Şekil 4.8. Mesalazin dışındaki formülasyon bileşenlerinin pH 1,2 tamponu içindeki 200-800 nm arasındaki UV spektrumları (A), mesalazin dışındaki formülasyon bileşenlerinin pH 6,8-1 tamponu içindeki 200-800 nm arasındaki UV spektrumları (B).....	126
Şekil 4.9. Mesalazin dışındaki formülasyon bileşenlerinin pH 6,8-2 tamponu içindeki 200-800 nm arasındaki UV spektrumları (A), Mesalazin dışındaki formülasyon bileşenlerinin pH 7,4 tamponu içindeki 200-800 nm arasındaki UV spektrumları (B).....	126
Şekil 4.10. Mesalazinin distile sudaki çözeltisinin 37 °C'deki 24 saatlik stabilite deneyi sonuçları (A), mesalazinin 0,1 N HCl tamponundaki çözeltisinin 37 °C'deki 24 saatlik stabilite deneyi sonuçları (B)	129

Şekil	Sayfa
Şekil 4.11. Mesalazinin pH 1,2 tamponundaki çözeltisinin 37 °C'deki 24 saatlik stabilite deneyi sonuçları (A), mesalazinin pH 6,8-1 tamponundaki çözeltisinin 37 °C'deki 24 saatlik stabilite deneyi sonuçları (B)	129
Şekil 4.12. Mesalazinin pH 6,8-2 tamponundaki çözeltisinin 37 °C'deki 24 saatlik stabilite deneyi sonuçları (A), mesalazinin pH 7,4 tamponundaki çözeltisinin 37 °C'deki 24 saatlik stabilite deneyi sonuçları (B)	129
Şekil 4.13. Mesalazinin DSC termogramı	130
Şekil 4.14. Hyaluronik asitin DSC termogramı	130
Şekil 4.15. İpek fibroinin DSC termogramı	131
Şekil 4.16. Kitozanın DSC termogramı	131
Şekil 4.17. Sodyum aljinat-Protanal CR8223'ün DSC termogramı	131
Şekil 4.18. Sodyum aljinat-Protanal CR8133'ün DSC termogramı	132
Şekil 4.19. Mesalazin, ipek fibroin ve mesalazin:ipek fibroin 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları	132
Şekil 4.20. Mesalazin, hyaluronik asit ve mesalazin:hyaluronik asit 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları	133
Şekil 4.21. Mesalazin, sodyum aljinat-Protanal CR8133 ve mesalazin:aljinat Protanal CR8133 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları	133
Şekil 4.22. Mesalazin, sodyum aljinat-Protanal CR8223 ve mesalazin:sodyum aljinat-Protanal CR8223 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları	134
Şekil 4.23. Mesalazin, kitozan ve mesalazin:kitozan 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları	134
Şekil 4.24. İpek fibroin, sodyum aljinat-Protanal CR8223 ve ipek fibroin:sodyum aljinat-Protanal CR8223 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları	135
Şekil 4.25. Hyaluronik asit, sodyum aljinat-Protanal CR8223 ve hyaluronik asit: sodyum aljinat-Protanal CR8223 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları	135
Şekil 4.26. Hyaluronik asit, sodyum aljinat-Protanal CR8133 ve hyaluronik asit: sodyum aljinat Protanal-CR8133 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları	136

Şekil	Sayfa
Şekil 4.27. Hyaluronik asit, kitozan ve hyaluronik asit: kitozan 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları.....	136
Şekil 4.28. İpek fibroin, kitozan ve ipek fibroin:kitozan 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları	137
Şekil 4.29 İpek fibroin, sodyum aljinat-Protanal CR8133 ve ipek fibroin:sodyum aljinat-Protanal CR8133 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları	137
Şekil 4.30. İpek fibroin, hyaluronik asit ve ipek fibroin:hyaluronik asit 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları	138
Şekil 4.31. Kitozan, sodyum aljinat-Protanal CR8133 ve Kitozan:sodyum aljinat- Protanal CR8133 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları.....	138
Şekil 4.32. Kitozan, sodyum aljinat-Protanal CR8223 ve Kitozan:sodyum aljinat-Protanal CR8223 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları	139
Şekil 4.33. Mesalazin, kitozan, ipek fibroin, sodyum aljinat-Protanal CR8223, hyaluronik asit ve mesalazin ile formülasyonda kullanılan polimerlerin 1:1 fiziksel karışımlarının DSC termogramları	139
Şekil 4.34. Mesalazin, kitozan, ipek fibroin, sodyum aljinat-Protanal CR8133, hyaluronik asit ve mesalazin ile formülasyonda kullanılan polimerlerin 1:1 fiziksel karışımlarının DSC termogramları	140
Şekil 4.35. Mesalazinin FTIR spektrumu	140
Şekil 4.36. İpek fibroinin FTIR spektrumu	141
Şekil 4.37. Hyaluronik asitin FTIR spektrumu	141
Şekil 4.38. Sodyum aljinat-Protanal CR8223'ün FTIR spektrumu	142
Şekil 4.39. Sodyum aljinat-Protanal CR8133'ün FTIR spektrumu	142
Şekil 4.40. Kitozanın FTIR spektrumu	143
Şekil 4.41. Mesalazin, kitozan, ipek fibroin, sodyum aljinat-Protanal CR8223 ve hyaluronik asitin fiziksel karışımının FTIR spektrumu	143
Şekil 4.42. Mesalazin, kitozan, ipek fibroin, sodyum aljinat-Protanal CR8133 ve hyaluronik asitin fiziksel karışımının FTIR spektrumu	144
Şekil 4.43. Mesalazinin XRD difraktogramı	144
Şekil 4.44. İpek fibroinin XRD difraktogramı	145

Şekil	Sayfa
Şekil 4.45. Hyaluronik asitin XRD difraktogramı	145
Şekil 4.46. Sodyum aljinat-Protanal CR8223 ün XRD difraktogramı	146
Şekil 4.47. Sodyum aljinat-Protanal CR8133 ün XRD difraktogramı	146
Şekil 4.48. Kitozanın XRD difraktogramı	147
Şekil 4.49. Mesalazin, kitozan, ipek fibroin, sodyum aljinat-Protanal CR8223 ve hyaluronik asitin fiziksel karışımının XRD difraktogramı	147
Şekil 4.50. Mesalazin, kitozan, ipek fibroin, sodyum aljinat-Protanal CR8133 ve hyaluronik asitin fiziksel karışımının XRD difraktogramı	148
Şekil 4.51. İpek fibroin çözeltisinden protein miktar tayini için Bradford yöntemiyle elde edilen kalibrasyon doğrusu	149
Şekil 4.52. Liyofilize ipek fibroinden protein miktar tayini için Bradford yöntemiyle elde edilen kalibrasyon doğrusu	149
Şekil 4.53. İpek fibroin çözeltisi için ekstraksiyon ajanı tipinin elde edilen ipek fibroinin protein içeriğine etkisinin istatistiksel analiz sonuçları (ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).....	151
Şekil 4.54. Liyofilize ipek fibroin için ekstraksiyon ajanı tipinin elde edilen ipek fibroinin protein içeriğine etkisinin istatistiksel analiz sonuçları (ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).....	152
Şekil 4.55. İpek fibroin çözeltisi için diyaliz membranının MWCO değerinin elde edilen ipek fibroinin protein içeriğine etkisinin istatistiksel analiz sonuçları (ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$)	152
Şekil 4.56. Liyofilize ipek fibroin için diyaliz membranının MWCO değerinin elde edilen ipek fibroinin protein içeriğine etkisinin istatistiksel analiz sonuçları (ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$)	153
Şekil 4.57. İpek fibroin çözeltisi için diyaliz süresinin elde edilen ipek fibroinin protein içeriğine etkisinin istatistiksel analiz sonuçları (ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).....	153
Şekil 4.58. Liyofilize ipek fibroin için diyaliz süresinin elde edilen ipek fibroinin protein içeriğine etkisinin istatistiksel analiz sonuçları (ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).....	154
Şekil 4.59. İpek fibroin çözeltisi için santrifüj işleminin elde edilen ipek fibroinin protein içeriğine etkisinin istatistiksel analiz sonuçları (ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).....	154

Şekil	Sayfa
Şekil 4.60. Optimum ipek fibroin ve ticari ipek fibroinin DSC termogramları	156
Şekil 4.61. Optimum ipek fibroin ve ticari ipek fibroinin FTIR spektrumları	157
Şekil 4.62. Optimum ipek fibroin ve ticari ipek fibroinin sirküler dikroizm spektrogramları	158
Şekil 4.63. Çapraz bağlama süresi optimizasyonu için istatistiksel analiz sonuçları	161
Şekil 4.64. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında geliştirilen B3/100-50-25 biyomürekkep ve H3/100-50-25 hidrojel formülasyonundan mesalazinin in vitro salım profili (n=3, Ortalama±SS).	162
Şekil 4.65. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında geliştirilen B4/100-50-50 biyomürekkep ve H4/100-50-50 hidrojel formülasyonundan mesalazinin in vitro salım profili (n=3, Ortalama±SS).	162
Şekil 4.66. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında geliştirilen B6/100-25-75 biyomürekkep ve H6/100-25-75 hidrojel formülasyonundan mesalazinin in vitro salım profili (n=3, Ortalama±SS).	163
Şekil 4.67. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında geliştirilen B7/75-75-50 biyomürekkep ve H7/75-75-50 hidrojel formülasyonundan mesalazinin in vitro salım profili (n=3, Ortalama±SS).	163
Şekil 4.68. Farklı aljinat tipleri kullanılarak geliştirilen oral hidrojel formülasyonlarından mesalazinin in vitro salım profilleri (n=3, Ortalama±SS)	165
Şekil 4.69. Farklı aljinat tipleri kullanılarak geliştirilen rektal hidrojel formülasyonlarından mesalazinin in vitro salım profilleri (n=3, Ortalama±SS)	166
Şekil 4.70. Optimum oral biyomürekkep formülasyonunun (P8223- B7/oral) A: Kayma hızı-viskozite B: Kayma hızı-kayma gerilimi grafikleri.....	168
Şekil 4.71. Optimum rektal biyomürekkep formülasyonunun (P8133- B7/rektal) A: Kayma hızı-viskozite B: Kayma hızı-kayma gerilimi grafikleri	168
Şekil 4.72. P8223-B7/oral ve P8133-B7/rektal biyomürekkep formülasyonlarının frekansa karşı kayıp modülü (G'') ve depolama modülü (G') ölçümleri grafiği	169
Şekil 4.73. P8223-B7/oral ve P8133-B7/rektal biyomürekkep formülasyonlarının kayma gerilimine karşı kayıp modülü (G'') ve depolama modülü (G') ölçümleri grafiği	170

Şekil	Sayfa
Şekil 4.74. Sadece mesalazin içeren oral hidrojel formülasyonundan (O-Mes) ve oral piyasa preparatı Pentasa® tabletten (O-Ticari) mesalazinin salım profilleri (n=3, Ortalama±SS).....	171
Şekil 4.75. Sadece mesalazin içeren rektal hidrojel formülasyonundan (R-Mes) ve rektal piyasa preparatı Salofalk® supozituvardan (R-Ticari) mesalazinin salım profilleri (n=3, Ortalama±SS).....	172
Şekil 4.76. İn vitro TNF- α gen susturma çalışması sonuçları (n=3).	176
Şekil 4.77. Oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının geliştirilmesinde kullanılan polimerlerin, mesalazinin ve TNF- α siRNA'nın farklı derişimlerde RAW 264.7 hücrelerindeki sitotoksosite sonuçları (n=12)	178
Şekil 4.78. Oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının RAW 264.7 hücrelerindeki sitotoksosite sonuçları (n=3).	179
Şekil 4.79. O-Mes-P-40 hidrojel formülasyonunun DSC termogramı.....	182
Şekil 4.80. R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonunun DSC termogramı.....	183
Şekil 4.81. O-Mes-P-40 hidrojel formülasyonunun ve liyofilize formülasyonun FTIR spektrumu	184
Şekil 4.82. R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonunun ve liyofilize formülasyonun FTIR spektrumu	184
Şekil 4.83. Oral ve rektal 3B basılmış hidrojel formülasyonlarının XRD difraktogramları	185
Şekil 4.84. Oral hidrojel formülasyonun (O-Mes-P-40) TGA analiz sonucu	186
Şekil 4.85. Rektal hidrojel formülasyonun (R-Mes-P-40) TGA analiz sonucu...	186
Şekil 4.86. O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonların şişme indeksini gösteren grafik (n=3).....	187
Şekil 4.87. O-Mes-P-40 kodlu hidrojel formülasyonu için % parçalanma-zaman grafiği (n=3).....	188
Şekil 4.88. R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonu için % parçalanma-zaman grafiği (n=3)	189
Şekil 4.89. O-Mes-P-40 kodlu hidrojel formülasyonu için gerilim (mPa)'e karşı gerinim (%) grafiği (n=3)	190
Şekil 4.90. R-Mes-P-40 kodlu hidrojel formülasyonu için gerilim (mPa)'e karşı gerinim (%) grafiği (n=3)	190

Şekil	Sayfa
Şekil 4.91. Sağlıklı dokuda O-Mes-P-40 (A) ve R-Mes-P-40 (B) kodlu hidrojel formülasyonlarının kuvvet (N)- mesafe (mm) grafikleri (n=3).....	192
Şekil 4.92. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulmuş dokuda O-Mes-P-40 (A) ve R-Mes-P-40 (B) kodlu hidrojel formülasyonlarının kuvvet (N)- mesafe (mm) grafikleri (n=3).....	192
Şekil 4.93. O-Mes, O-Mes-Serbest, O-Mes-P-40 hidrojel formülasyonlarından ve Pentasa® tabletten (O-Ticari) mesalazinin salım profili (n=3, Ortalama±SS).....	195
Şekil 4.94. O-Mes-Serbest ve O-Mes-P-40 hidrojel formülasyonlarından TNF- α siRNA'nın salım profili (n=3, Ortalama±SS).....	196
Şekil 4.95. R-Mes, R-Mes-Serbest, R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonlarından ve Salfofalk® supozituvardan (R-Ticari) mesalazinin salım profili (n=3, Ortalama±SS).....	198
Şekil 4.96. Serbest TNF- α siRNA ve polipeks yüklü 3B biyobasılan rektal formülasyonlardan TNF- α siRNA'nın salım profili (n=3, Ortalama±SS).....	199
Şekil 4.97. İn vivo gruplar için farelerin ağırlıklarının güne bağlı olarak değişimi	203
Şekil 4.98. İn vivo deneyler boyunca fare başına günlük tüketilen ortalama yem miktarı (n=4-6, Ortalama±SH, **: p<0,001)	204
Şekil 4.99. İn vivo deneyler boyunca fare başına günlük tüketilen ortalama su miktarı ns: p>0,05, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p<0,0001)	205
Şekil 4.100. Farelerin tüm kolon ağırlıkları (n=4-6) (Ortalama±SH).....	206
Şekil 4.101. Farelerin kolon ağırlığı/fare ağırlığı değerleri (n=4-6) (Ortalama±SH)	207
Şekil 4.102. Farelerin dalak ağırlığı değerleri (n=4-6) (Ortalama±SH).....	208
Şekil 4.103. Farelerin dalak ağırlığı/fare ağırlığı değerleri (n=4-6, Ortalama±SH).....	209
Şekil 4.104. Farelerin karaciğer ağırlığı değerleri (n=4-6, Ortalama±SH, ns: p>0,05, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p<0,0001)	210
Şekil 4.105. Farelerin karaciğer ağırlığı/fare ağırlığı değerleri (n=4-6, Ortalama±SH, ns: p>0,05, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p<0,0001).....	211
Şekil 4.106. Farelerin kolon uzunluğu değerleri (n=4-6, Ortalama±SH)	212

Şekil	Sayfa
Şekil 4.107. Farelerin kolon dokularına ait makroskopik skor değerleri (n=4-6, Ortalama±SH, ns: p>0,05, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p <0,0001).....	213
Şekil 4.108. Farelerin kolon dokularındaki TNF-α seviyeleri (n=4-6, Ortalama±SH; ns: p>0,05, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p <0,0001).....	215
Şekil 4.109. Farelerin kolon dokularındaki IL-6 seviyeleri (n=4-6, Ortalama±SH; ns: p>0,05, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p <0,0001).....	216
Şekil 4.110. Farelerin kolon dokularındaki IL-12 seviyeleri (n=4-6, Ortalama±SH; ns: p>0,05, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p <0,0001).....	217
Şekil 4.111. Farelerin kolon dokularındaki NO seviyeleri (n=4-6, Ortalama±SH; ns: p>0,05, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p <0,0001).....	218
Şekil 4.112. Farelerin kolon dokularındaki MDA seviyeleri (n=4-6, Ortalama±SH; ns: p>0,05, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p <0,0001).....	219
Şekil 4.113. Histomorfolojik skora.....	229
Şekil 4.114. İmmunohistokimyasal skora sonuçları	237

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. DSC analizlerinin gerçekleştirildiği cihaz.....	66
Resim 3.2. Protein miktar tayini yöntemi için hazırlanan standart çözeltilerin görüntüsü	68
Resim 3.3. İpek fibroin eldesi için kullanılan ipek böceği kozaları	69
Resim 3.4. İpek fibroin eldesi işlem basamakları	70
Resim 3.5. Yüzey gerilimi ölçümleri için kullanılan cihaz, ölçümü yapılan biyomürekkep çözeltisinden elde edilen asılı damlanın yazılımdaki kamera görüntüsü ve yazılımda yüzey gerilimi değerinin hesaplandığı ekranın görüntüsü	75
Resim 3.6. Viskozite ölçümlerinde kullanılan viskometre	77
Resim 3.7. Hidrojel formülasyonlarının hazırlanması için kullanılan 3B biyoyazıcı ve yazılım	78
Resim 3.8. A: 3B biyoyazıcı kullanılarak basılan hidrojellerin şekilsel tasarımı B: Hidrojellerin 3B baskı sonrası görüntüsü	78
Resim 3.9. Hazırlanan biyomürekkep formülasyonlarının görünüşü	80
Resim 3.10. Franz difüzyon hücresi kullanılarak yapılan salım çalışmasının düzeneği	83
Resim 3.11. İn vitro çözünme hızı çalışmalarının gerçekleştirildiği cihaz	86
Resim 3.12. Rektal uygulanmak üzere hazırlanan biyomürekkep formülasyonlarının baskısı için kullanılan tasarım	87
Resim 3.13. Hidrojel formülasyonlarına ait tasarımlar. A: Oral formülasyon B: Rektal formülasyon	90
Resim 3.14. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan yatay jel elektroforez cihazı	92
Resim 3.15. RAW 264.7 hücrelerinin mikroskop görüntüsü	93
Resim 3.16. İn vitro gen susturma çalışmalarında kullanılan ELISA kitine ait plaka görüntüsü	96
Resim 3.17. Sitotoksosite çalışmalarına ait plaka görüntüleri.....	99
Resim 3.18. Termogravimetrik analizlerin gerçekleştirildiği cihaz.....	102
Resim 3.19. Morfolojik analizlerde kullanılan taramalı elektron mikroskobu	105

Resim	Sayfa
Resim 3.20. Farelerin yerleştirildiği tekli kafeslerin görüntüsü	108
Resim 3.21. İnflamatuvar bağırsak hastalığı modeli oluşmuş rektal kanaması olan bir farenin görüntüsü	109
Resim 3.22. Farelerde tedavide kullanılmak üzere 3B biyobaskı yöntemiyle hazırlanmış hidrojellerin görüntüsü. A: Oral hidrojeller B: Rektal hidrojeller	110
Resim 3.23. Farelere oral hidrojellerin uygulanması.....	111
Resim 3.24. Farelere rektal hidrojellerin uygulanması.....	112
Resim 3.25. Midline insizyonla farelerin batinlarının açılması ve kolonlarının çıkarılması.....	113
Resim 4.1. Polipleks oluşturmak için optimum kitozan-TNF- α siRNA oranının belirlenmesi için yapılan jel retardasyon çalışması ile elde edilen jel görüntüleri	173
Resim 4.2. P-40'ın fizyolojik ortamlarda in vitro stabilite çalışmasının jel görüntüleri. Şekilde yer alan "P" polipleks haldeki siRNA'yı (P-40), "N" ise naked (serbest) haldeki siRNA'yı belirtmek için kullanılmıştır.....	180
Resim 4.3. 3B biyoyazıcı ile basılan oral ve rektal hidrojel formülasyonların görüntüleri. A: O-Mes B: R-Mes	181
Resim 4.4. 3B biyobasılmış hidrojellerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri. A: Liyofilize oral (O-Mes-P-40) hidrojel, B: Liyofilize rektal (R-Mes-P-40) hidrojel, C: O-Mes-P-40 kodlu hidrojel, D:R-Mes-P-40 kodlu hidrojel	193
Resim 4.5. O-Mes-Serbest ve O-Mes-P-40 hidrojel formülasyonları ile yapılan in vitro çözünme hızı çalışması sırasında ortamdan alınmış örnekler ile gerçekleştirilen jel retardasyon çalışması sonucu elde edilen jel görüntüleri. A: O-Mes-Serbest, B:O-Mes-P-40	196
Resim 4.6. R-Mes-Serbest ve R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonları ile yapılan in vitro çözünme hızı çalışması sırasında ortamdan alınmış örnekler ile gerçekleştirilen jel retardasyon çalışması sonucu elde edilen jel görüntüleri. A: R-Mes-Serbest, B:R-Mes-P-40	200
Resim 4.7. Gruplara ait kolon örneklerinin makroskobik görünümü	214
Resim 4.8. Negatif kontrol grubunda (Grup NK) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B:20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama, Sarı oklar: Kadeh hücreleri).....	220

Resim	Sayfa
Resim 4.9. Pozitif kontrol grubunda (Grup PK) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B ve C:20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama, Yeşil oklar: lenfoid hücre infiltrasyonları, Lp: lamina propria, Sm: submukoza, LF: Lenf folikülleri, Tm: Tunika).....	221
Resim 4.10. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup O-Boş) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama, Sarı oklar: Kadeh hücreleri)	222
Resim 4.11. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral ticari Pentasa® (500 mg) preparatı uygulanan grupta (Grup O-Ticari) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama, Sarı oklar: Kadeh hücreleri).....	223
Resim 4.12. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral mesalazin yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup O-Mes) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama, Sarı oklar: Kadeh hücreleri).....	223
Resim 4.13. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral mesalazin ve kitozan:TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup O-Mes-P-40) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama, Sarı oklar: Kadeh hücreleri)	224
Resim 4.14. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral kitozan:TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup O-P-40) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama, Sarı oklar: Kadeh hücreleri).....	225
Resim 4.15. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup R-Boş) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama)	225
Resim 4.16. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal kitozan:TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup R-P-40) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama)	226

Resim	Sayfa
Resim 4.17. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal mesalazin yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup R-Mes) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama).....	227
Resim 4.18. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal mesalazin ve kitozan/TNF- α siRNA polipleksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (R-Mes-P-40) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama)	227
Resim 4.19. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal ticari Salofalk® (500 mg) supozituar uygulanan grupta (Grup R-Ticari) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama, LF: Lenf folikülleri).....	228
Resim 4.20. Negatif kontrol grubunda (Grup NK) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme).....	230
Resim 4.21. Pozitif kontrol grubunun (Grup PK) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B ve C: 20x büyütme, LF: Lenf folikülleri)	230
Resim 4.22. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup O-Boş) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)	231
Resim 4.23. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral ticari Pentasa® (500 mg) preparatı uygulanan grupta (Grup O-Ticari) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)	231
Resim 4.24. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral mesalazin yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup O-Mes) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)	232
Resim 4.25. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral mesalazin ve kitozan:TNF- α siRNA polipleksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup O-Mes-P-40) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)	232

Resim**Sayfa**

Resim 4.26. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral kitozan:TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup O-P-40) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)	233
Resim 4.27. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup R-Boş) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)	233
Resim 4.28. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal kitozan:TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup R-P-40) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)	234
Resim 4.29. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal mesalazin yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup R-Mes) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)	234
Resim 4.30. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal mesalazin ve kitozan:TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup R-Mes-P-40) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)	235
Resim 4.31. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal ticari Salofalk® (500 mg) supozituar uygulanan grupta (Grup R-Ticari) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)	235

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
cm	Santimetre
dak	Dakika
g	Gram
m	Metre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mPa	Milipaskal
N	Newton
nm	Nanometre
rpm	Dakika başına düşen devir sayısı
s	Saniye
sa	Saat

Kısaltmalar

Açıklamalar

ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
AUC	Eğri altında kalan alan
BSS	Bağıl standart sapma
CD	Sirküler dikroizm
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
DSS	Dekstran sodyum sülfat
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GIS	Gastrointestinal sistem
H&E	Hematoksilen ve eozin

Kısaltmalar	Açıklamalar
IL-12	İnterlökin-12
IL-6	İnterlökin-6
ISO	Uluslararası Standartlar Teşkilatı
İBH	İnflamatuvar bağırsak hastalığı
LOD	Tespit sınırı
LOQ	Tayin sınırı
MDA	Malondialdehit
NO	Nitrik oksit
PBS	Fosfatla tamponlanmış izotonik çözelti
RNA	Ribonükleik asit
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SH	Standart hata
siRNA	Susturucu ribonükleik asit
SS	Standart sapma
TNBS	Trinitrobenzen sülfonik asit
TNF- α	Tümör nekrozis faktör alfa
USP	Amerikan Farmakopesi
UV-Vis	Ultraviole ve görünür spektroskopi
XRD	X-ışını kırınımı difraktometresi

1. GİRİŞ

İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH), Crohn hastalığı ve ülseratif kolit olmak üzere iki ana şekilde ortaya çıkan, kolonun veya rektumun ülserizasyonuna bağlı olarak kendini gösteren kronik bir hastalıktır. Hastalığın temel olumsuz yönleri hastanın yaşam kalitesini düşürmesi ve kronik seyreden bir hastalık olması sebebiyle sürekli tedavi gerektirmesine bağlı olarak yüksek tedavi maliyetleridir. Ayrıca hastalığın tedavisinde kullanılan geleneksel ajanlar uzun süreli ve yüksek dozda kullanıma bağlı olarak şiddetli yan etkilere sebep olabilmektedir. Bu sebeplerle hastalığın tedavisi için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. İpek fibroin, ipek böceklerinin kozalarından elde edilen protein yapısında bir biyopolimerdir. Biyouyumlu ve biyoparçalanır olması, antiinflamatuvar etki göstermesi ve yara iyileştirici özelliklere sahip olması sebebiyle İBH tedavisi için kullanım potansiyeline sahiptir.

Mesalazin İBH tedavisi amacıyla sıklıkla kullanılan bir aminosalisilatıdır. Tedavide kullanılan günlük mesalazin dozu yaklaşık 3 gramdır ve bu yüksek doz ile uzun süreli kullanımdan kaynaklı şiddetli yan etkiler görülmektedir.

siRNA gen susturma amacıyla kullanılan spesifik bir baz dizisidir. İBH'nın patogeneğinde proinflamatuvar bir sitokin olan tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) önemli rol oynamaktadır. İBH'nın tedavisinde siRNA kullanılarak TNF- α üretiminin baskılanması yaklaşımları dikkat çekmektedir.

Üç boyutlu (3B) biyobaskı teknolojisi ile biyolojik materyal içeren sistemler bilgisayar kontrollü tasarımlarla elde edilmektedir. Baskı için 'biyo-mürekkep' adı verilen materyaller kullanılır. Bu teknolojinin başlıca avantajı, kişiye özel üretim yapılmasına imkân sağlaması, üretilen materyallerin biyotaklit özelliklerinin fazla olması ve böylelikle canlı uyum sağlayabilmesidir.

Hidrojeller, hidrofilik polimer zincirlerinin kovalent bağlarla çapraz bağlanması ya da molekül içi fiziksel etkileşimlerle bir arada tutularak birleşmesi ile oluşan üç boyutlu ağ yapısıdır. Başlangıç şekillerini koruyarak yüksek miktarda su veya biyolojik sıvıyı absorblayabilmeleri ve şişmiş durumda yumuşak ve porozitesi yüksek bir yapıya

sahip olmaları ayrıca canlı dokulara büyük oranda benzemeleri nedeniyle tedavide sıklıkla tercih edilen ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Hidrojeller çapraz bağlanarak yüklenen maddelerin hastalık bölgesine korunarak taşınmasına olanak sağlarlar; intrakolonik ve oral uygulanabilmelerinden dolayı inflamatuvar barsak hastalığı tedavisi için uygun ilaç taşıyıcı sistemlerdir.

Tez çalışmasının amacı 3B biyobaskı teknolojisiyle üretilmiş, tek başına ve birlikte mesalazin ve kitozan/TNF- α siRNA polipleksi içeren ipek fibroin-temelli hidrojel ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesidir.

Böylece, antiinflamatuvar bir biyopolimer olan ipek fibroin temelli hidrojellere yüklenen mesalazin ve TNF- α siRNA'nın birlikte kullanımı ile sinerjik etki oluşturularak İBH tedavisinin etkinliğinin artırılması hedeflenmektedir.

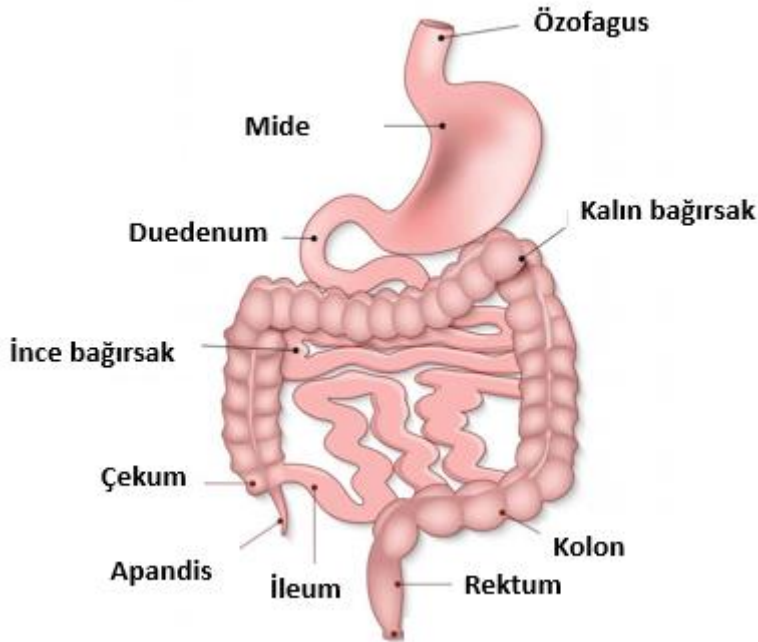
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gastrointestinal Sistem

Gastrointestinal sistem, temel fonksiyonu karbonhidratlar, proteinler, yağlar, mineraller ve vitaminler gibi temel besinlerin sindirimi, emilimi, sindirilmemiş besin kalıntılarının vücuttan uzaklaştırılması olan sindirim sistemi olarak da bilinen sistemdir. Gastrointestinal sistem ile vücuda alınan besinler ve diğer maddeler gastrointestinal sistem boyunca ilerleyerek kan dolaşımına katılır (Friedman, Bar-Shira ve Sklan, 2003).

2.1.1. Gastrointestinal sistemin fizyolojik ve anatomik özellikleri

Gastrointestinal kanal, ağız, farinks, özofagus, mide, ince bağırsaklar, kolon ve rektumdan oluşmaktadır (Şekil 2.1). Dişler, dudak, dil, çene, tükürük bezleri, pankreas, karaciğer ve safra kesesi ise gastrointestinal kanal dışında yer alan sindirime yardımcı gastrointestinal sistemde yer alan organlardır (Shaheen, 2006).



Şekil 2.1. İnsan gastrointestinal sistemi (Carmicheal ve Mills, 2019)

Mide gastrointestinal kanalda yer alan en geniş organdır. Anatomik olarak corpus, fundus, pilorik antrum ve pilorik kanal olmak üzere 4 kısımdan oluşmaktadır. Bu kısımlardan fundus ve corpus midede sindirilmeyen besinler için depo görevi görmektedir. Antrum ise peristaltik hareketler ile midenin boşaltılmasını sağlamaktadır. (El Samaligy, 2010). Midenin iç yüzünde yer alan mukozada mide salgısını sağlayan bezler yer almaktadır. Midenin temel görevi maddelerin ön sindirimini sağlamaktır.

İnce bağırsaklar gastrointestinal kanalda yer alan, ortalama 5 metre uzunluğunda gastrointestinal sistemin absorpsiyon bölgesidir. Duodenum, jejunum ve ileum olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır. Duodenum 25 cm, jejunum ortalama 2 metre ve ileum ise ortalama 2,5 metre uzunluğundadır. Bu bölümlerden duodenum hareketsizdir ve safra ve pankreas salgıları duodenuma boşalmaktadır. İnce bağırsağın diğer bölümleri olan jejunum ve ileum ince bağırsağın peristaltik hareketlerinden sorumlu bölgeleridir ve bu peristaltik hareketler periton tabakası altında yer alan düz kaslar tarafından gerçekleştirilmektedir. Jejunum ileuma göre damar yönünden daha zengindir. İnce bağırsağın bu bölümlerinde iç yüzeyi kaplayan mukozada yer alan kıvrım ve çıkıntılar yüzey alanının genişlemesini sağlamaktadır ve bu sayede bu bölgeden absorpsiyon artar. Yine mukozada yer alan bez hücreleri ince bağırsak sindirim salgısını sağlamaktadır.

Kalın bağırsaklar gastrointestinal kanalda yer alan gastrointestinal sistemin son kısmını oluşturan bölümdür, uzunluğu yaklaşık 1,5 metredir. Kalın bağırsaklar çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve rektumdan oluşmaktadır (Macfarlane ve Macfarlane, 1997). Kalın bağırsaklarda, ince bağırsaklarda absorpsiyonun artmasını sağlayan kıvrım ve çıkıntılar bulunmamaktadır, dolayısıyla kalın bağırsakların yüzey alanı daha küçüktür. Gastrointestinal sistemin bu bölümünde sindirim enzimleri bulunmaz. Kalın bağırsakların temel işlevi suyun ve elektrolitlerin absorplanması olduğu için bu bölgede ilerleyen içerik giderek katılaşmaktadır (Tuğcu-Demiröz ve Acartürk, 2002).

Oral yoldan ilaç uygulamasında çeşitli fizyolojik faktörler önemli rol oynamaktadır. Bunlar gastrointestinal sistemden geçiş süresi, gastrointestinal sistem pH'sı ve gastrointestinal sistemden absorpsiyondur.

2.1.2. Gastrointestinal sistemden geçiş süresi

Gastrointestinal sistemden geçiş süresi, çeşitli faktörlere göre değişim göstermektedir (izelge 2.1) (Wen ve Park, 2010).

Mideden geçiş süresi, açlık-tokluk durumu, alınan maddenin sıvı veya katı olması, maddenin büyüklüğü gibi faktörlerden etkilenmektedir. Sıvı haldeki maddeler mideden daha hızlı geçerken, katı maddelerde mideden geçiş süresi uzamaktadır (Gürsoy, 2002). Ayrıca küçük boyutlu maddeler mideyi sindirim aşamasında geçebilirken, büyük boyutlu maddelerin mideyi geçmesi için midenin boşalması gerekmektedir (Arora, Ali, Ahuja, Khar ve Baboota, 2005). Mideden geçiş süresi ortalama 2-4 saat arasında değişmektedir. İnce bağırsaktan geçiş hızı açlık-tokluk durumu, alınan maddenin özellikleri gibi faktörlerden bağımsız olarak ortalama 3 saattir. Kolondan geçiş süresi ortalama 13 saat olarak bilinmektedir, ancak alınan maddenin özelliklerine göre bu süre uzayabilmektedir. Sıvı maddelerin ve partiküler sistemlerin kolondan geçiş süresi katı sistemlere göre daha uzundur, bunun nedeni sıvı ve partiküler sistemlerin bütün kolona yayılması, katı sistemlerin ise kolonda etkili olan itici kuvvetler yardımıyla daha hızlı ilerlemesidir. Kolonda kalış süresi kontrollü salım sistemleri tasarlanarak uzatılabilmektedir (Dortunç, 2002; Friend, 2005).

Çizelge 2.1. Sağlıklı insanlarda gastrointestinal sistemden ortalama geçiş süreleri (Lu ve Wang, 2017)

Gastrointestinal sistem bölgesi	Açlık durumu (saat)	Tokluk durumu (saat)
Mide	2	4
Duedonum	0,26	0,26
Jejenum	1,70	1,70
İleum	1,30	1,30
Çekum	4,50	4,50
Kolon	13,50	13,50

2.1.3. Gastrointestinal sistem pH'sı

Gastrointestinal sistem organlarının pH'sı açlık ve tokluk durumuna göre değişmektedir (izelge 2.1).

Sağlıklı insanlarda mide pH'sı açlık durumunda 0,9-3,5 arasında değişmektedir, ancak yiyeceklerle birlikte bu değer 6'ya kadar çıkabilmektedir. Midede bulunan su, tuz, mukus, hidroklorik asit ve enzimle mide pH'sını oluşturan etmenlerdir. İnce bağırsaklarda pH mideye oranla çok daha yüksek olup, ince bağırsaklar boyunca pH değerinin arttığı görülmektedir. İleumda pH değeri 7,4'e çıkmaktadır ancak çekumda pH değeri tekrar 6,4'e düşmektedir. Kolon bölgesinde pH değeri ortalama 6,8'dir (Çizelge 2.2) (Lu, Li ve Wang, 2017; Hua ve diğerleri, 2015).

Çizelge 2.2. Sağlıklı insanlarda gastrointestinal sistem ortalama pH değerleri (Lu, Li ve Wang, 2017)

Gastrointestinal sistem bölgesi	Açlık durumu	Tokluk durumu
Mide	0,9-3,5	4,3-6
Duodenum	5,0-7,0	5,4
Jejunum	6,0-7,0	5,4-6,0
İleum	6,6-7,4	6,6-7,4
Çekum	6,4	6,4
Kolon	6,8	6,8

Gastrointestinal sistem pH'sı sağlıklı ve hasta olma durumuna göre değişiklik göstermektedir. İnflamatuvar bağırsak hastalığına sahip hastalar ve sağlıklı gönüllülerle yapılan bir çalışmada inflamasyonun pH değerlerine etkisi değerlendirilmiştir. Bu çalışmada 12 sağlıklı, 12 ülseratif kolit ve 11 Crohn hastalığına sahip gönüllüde, gastrointestinal sistem pH değerleri ölçülmüştür. Çalışmaya göre mide pH değerinin sağlıklı gönüllülerde 0,95-2,6 arasında (ortalama 1,95) değiştiği, Crohn hastalığına sahip gönüllülerde 1,5-4,1 (ortalama 2,4) ve ülseratif kolitli gönüllülerde ise 1,55-4,4 (ortalama 1,95) arasında değiştiği gözlenmiştir. Duodenum pH değeri, sağlıklı gönüllülerde 6,15-7,35 (ortalama 6,72), Crohn hastalığına sahip ve ülseratif kolitli gönüllülerde 6,0-8,53 (ortalama 6,75), olarak bulunmuştur. Jejunum ve ileum pH değeri sağlıklı gönüllülerde 6,8-7,88 (ortalama 7,5) olarak ölçülürken Crohn hastalığına sahip ve ülseratif kolitli gönüllülerde 7,75-9,2 (ortalama 7,95) olarak ölçülmüştür. Kolon pH değeri ise sağlıklı gönüllülerde 5,2-7,07 (ortalama 6,12), Crohn hastalığına sahip ve ülseratif kolitli gönüllülerde 5,9-7,7 (ortalama 6,65), olarak bulunmuştur (Press ve diğerleri, 1998). Çalışma sonucunda hasta bireylerin gastrointestinal sistem pH değerlerinin sağlıklı bireylere göre değişkenlik gösterdiği sonucuna varılmıştır.

2.1.4. Gastrointestinal sistemden absorpsiyon

Özellikle oral yoldan ilaç uygulamasında, gastrointestinal sistemden absorpsiyon çeşitli faktörlere bağlı olarak gerçekleşen bir süreçtir. Fizyolojik faktörler ve hastalık durumu gastrointestinal sistemden absorpsiyonu önemli ölçüde etkileyen faktörlerdir. Gastrointestinal sistemden absorpsiyon hem maddenin özelliklerine hem de fizyolojik özelliklere bağlı olarak paraselüler veya transselüler yol ile (pasif difüzyon) ya da aktif taşıma ile gerçekleşebilmektedir. Paraselüler yol ile hidrofilik, transselüler yol ile lipofilik maddelerin absorpsiyonu gerçekleşmektedir.

Mideden absorpsiyon çok düşük miktarda da olsa mümkündür. Mideden genellikle glikoz, aminoasitler ve bazı yağda çözünen maddeler gibi basit maddelerin absorpsiyonu gerçekleşmektedir. Gastrointestinal sistemde absorpsiyonun büyük bir kısmı ince bağırsaklarda gerçekleşmektedir. İnce bağırsaklar gastrointestinal sistemin absorpsiyon bölgesi olarak bilinmektedir. İnce bağırsağın mukozasında yer alan kıvrımlar ve çıkıntılar yüzey alanının artmasını sağlamaktadır ve ince bağırsağın yüzey alanı yaklaşık 4.500 m²'dir. Kolonda ince bağırsağa göre çok daha sıkı hücreler arası bağlantı bulunduğu için kolondan absorpsiyon ince bağırsağa oranla düşüktür. Kolondan absorpsiyon kolonun ilk kısmında gerçekleşmektedir. Ancak bu bölgede ilaçların mukozaya ile temas sürelerinin artırılması ile kolon bölgesinden absorpsiyonun artırılması mümkündür (Dortunç, 2002; Watts ve Illum, 1997; Mikio, Shiga, Hayashi ve Awazu, 1988).

2.2. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları: Crohn Hastalığı ve Ülseratif Kolit

İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH), Crohn hastalığı ve ülseratif kolit olmak üzere iki ana şekilde oluşan, kolonun veya rektumun ülserizasyonuna bağlı olarak kronik ishal, kanama ve karın ağrısı ile kendini gösteren ve gastrointestinal bölgenin inflamasyonu ile karakterize kronik olarak seyreden bir hastalıktır (Argollo ve diğerleri, 2017; Rodriguez-Nogalez ve diğerleri, 2016a; Fiocchi, 1998). Hastalık sırasında akut alevlenmelerin görülmesi ve hastalığın kronik seyretmesinden kaynaklı olarak yaşam boyu tedavi gerektiren bu hastalıkta, hastanın yaşam kalitesinin düşmesi ve sürekli tedaviye bağlı olarak oluşan maliyetlerin artması hastalığın başlıca olumsuz yönlerindendir. Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı,

histolojik, klinik ve endoskopik yönler açısından farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar Çizelge 2.3'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının karakteristik özellikleri (Nikolaus ve Schreiber, 2007; Kwon ve diğerleri, 2002)

		Crohn hastalığı	Ülseratif kolit
Semptomlar	Abdominal ağrı	Sıklıkla şikayet edilen, belirgin, özellikle sağ alt kadranda	Kramplar şeklinde, özellikle sol alt kadranda
	Diyare	Erişkin bireylerde sıklıkla, çocuklarda gözlenmeyebilir	Erişkinlerde sıklıkla, konstipasyonlar birbirini izleyen şekilde görülebilir
	Hematokezya	Hastaların %20-%30'unda, özellikle distal hastalığı olanlarda görülmektedir	Aktif hastalarda sürekli görülmektedir, hastalığın aktivitesine göre yoğunluk değişebilir
	Beslenme bozukluğu	Sık	Ara sıra
	Hipozomi	Ara sıra	Nadiren
	Abdominal şişkinlik	Görülebilir	Sadece şiddetli hastalıkta görülebilir
	Perianal hastalık	Hastaların yaklaşık %30'unda	Görülmez
	Obstrüktif semptomlar	Sık	Görülmez
	Abdominal kitle	Sık	Nadiren
Komplikasyonlar	Apse	Perianal hastalıkta sıklıkla, nadiren karında	Nadiren
	Toksik megakolon	Görülmez	Nadiren
	İleus	Ara sıra	Nadiren
	Hepatit	Nadiren	Ara sıra
	Eritema nodozum	Ara sıra	Nadiren
	Artralji/artrit	Çok sık	Sık
	Piyoderma gangrenozum	Çok nadir	Nadiren
	Primer sklerozan kolanjit	Nadiren	Ara sıra (%5-%15)
Laboratuvar Bulguları	Akut reaktif protein (CRP)	Sık	Kapsamlı veya şiddetli hastalıkta
	Anemi	Sık	Şiddetli hastalıkta
	Makrositozis	Görülebilir (Kronik ileal tutulum)	Nadiren
	Hipoalbünemi	Sık	Şiddetli hastalıkta
	pANCA	+	++
	ASCA	++	+
Histolojik Bulgular		Transmural inflamasyon	Mukozal inflamasyon
		Granülom	Kript abseleri
Radyolojik Bulgular		Bağırsak duvarı kalınlaşması	Toksik mega kolon
		Yağ birikimi	
		Obstrüksiyon	

Çizelge 2.3. (devam) İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının karakteristik özellikleri (Nikolaus ve Schreiber, 2007; Kwon ve diğerleri, 2002)

Endoskopik Bulgular	İnce bağırsak tutulumu	Sıklıkla	Nadiren
	Rektal tutulum	%30-%50	Hemen hemen her zaman
	Tekdüze, sürekli hastalık	Seyrek	Her zaman
	Boyuna, polisiklik ülserler ("salyangoz izi")	Sıklıkla	Görülmez
	İleumun parke taşı görünümü	Sıklıkla	Görülmez
	İnflamasyonlu bölgelerdeki normal mukoza	Sıklıkla	Görülmez
	Daralma	Ara sıra	Nadiren
	Mukozal ödem	Ara sıra	Sıklıkla
	Ülserasyon	Derin	Genellikle düz ve geniş çaplı
	Çevresel inflamasyon	Nadiren	Sıklıkla
Tutulum Gösterilen Bölgeler		Gastrointestinal kanalın herhangi bir kısmında tutulma gözlenebilir (sıklıkla ileum)	Sadece rektum ve kolonda tutulma gözlenir

Crohn hastalığı gastrointestinal kanalın her yerinde gözlenebilmekle beraber, birincil olarak ince bağırsakta ileumda görülürken, ülseratif kolit sadece kolon bölgesinde gözlenmektedir. Her iki hastalık belirtileri, bulguları ve seyirleri açısından çok benzemektedirler. Bu hastalıkların bağırsak dışı organlarda komplikasyon oluşturmaları ve malinite potansiyelleri bulunduğu için oldukça önemli hastalıklardır (Stenson, 2004; Kodner ve diğerleri, 1993).

Hastalığın etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir, ancak hastalığa genetik yatkınlık gösteren bireylerde bağırsak kanalında bulunan bakterilere karşı gelişen bir immün yanıtın kaynaklandığı tahmin edilmektedir (Rodriguez-Nogalez ve diğerleri, 2016b; Taylor, Jang ve Rotter, 2001; Xavier ve Podolsky, 2007). Bazı interlökinler ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) gibi proinflamatuvar sitokinler hastalık sırasında salgılanmaktadır. İnflamatuvar bağırsak hastalığında sitokinlerin rolü Çizelge 2.4'te gösterilmiştir. Bu sitokinler, bağırsakta bağırsak fibroblastlarını, nötrofilleri ve makrofajları biriktirme yeteneğine sahiptir ve biriken bu fibroblastlar, bağırsakta darlık oluşumuna yol açan bağırsak fibrozuna neden olmaktadır. Bağırsakta birikmiş nötrofiller, matriks bozulmasını indüklemek için elastaz salgılar ve bağırsakta biriken

makrofajlar, bağırsak matrisinin bozulmasına, epitel hasarına, endotel aktivasyonuna ve vasküler bozulmaya neden olan sitokinleri üretir. Ayrıca bu sitokinlerin salgılanması adaptif immün sistemin aktivasyonuna neden olmaktadır. Doku hasarıyla birlikte bağırsak duvarının lümenal antijenlere maruziyeti artmaktadır, bu durum da hem doğal hem de adaptif immün sistemin aktivasyonuna neden olmaktadır. İmmün sistemin aktivasyonu ile devam eden inflamasyon durumu kronik inflamasyon ile sonuçlanmaktadır. TNF- α , çeşitli hücre tipleri üzerinde pleiotropik etkileri olan bir sitokindir. İnflamatuvar yanıtın düzenleyicilerinden biridir ve birçok otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde rol aldığı bilinmektedir. TNF- α bağırsak homeostazında önemli bir rol oynamaktadır. Bağırsak epitelinin yenilenmesi sırasında epitel hücrelerin düzenlenmesi, epitel bariyer bütünlüğünün korunması, yara iyileşmesi ve mukozal onarım gibi birçok fizyolojik süreçte yer almaktadır (Sharl, 2015).

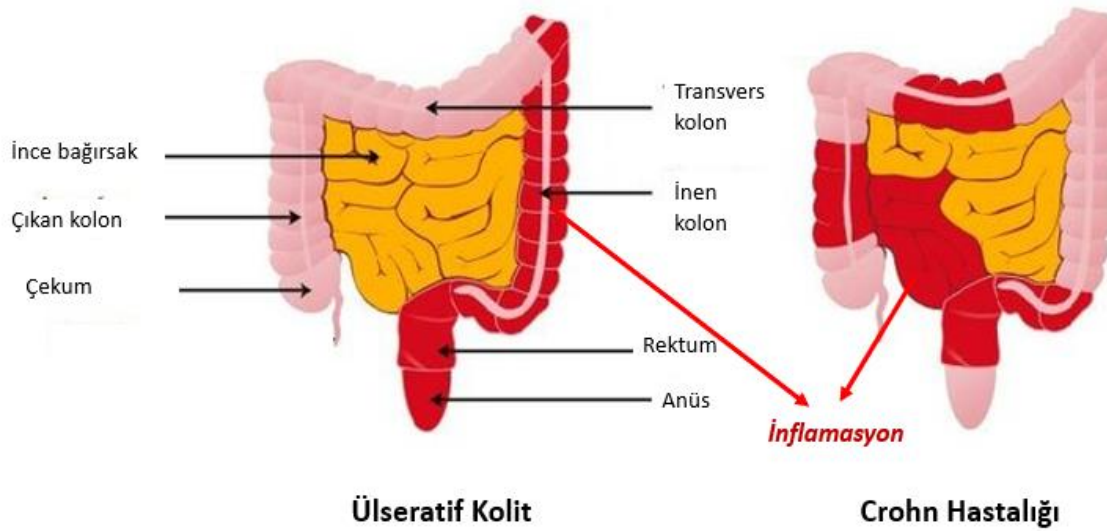
Çizelge 2.4. İnflamatuvar bağırsak hastalığında sitokinlerin rolü (Sanchez-Muñoz, Dominguez-Lopez ve Yamamoto-Furusho, 2008)

Sitokin türü	Ülseratif Kolit	Crohn Hastalığı
TNF- α	Artar	Artar
TL1 α	Bilinmiyor	Artar
IL-6	Artar	Artar
IL-18	Rolü yok	Rolü var ama bütün hastalarda değil
TGF- β	Açık değil	Açık değil
IL-10	Açık değil	Artar
IL-4	Açık değil	Açık değil
IL-12	Artar	Artar
IL-23	Rolü var	Rolü var
IL-27	Açık değil	Artar
IL-17	Artar	Artar
IL-13	Artar	Rolü yok
IL-5	Artar	Rolü yok

2.2.1. İnflamatuvar bağırsak hastalığı lokalizasyonu

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının lokalizasyonu farklılık göstermektedir. Ülseratif kolitte inflamasyon bölgeleri kolondan rektuma kadar uzanırken, Crohn hastalığında inflamasyon gastrointestinal kanalın her yerinde gözlenebilir, ancak inflamasyon ileumda baskındır (Şekil 2.2). Crohn hastalığında kolonda inflamasyon %30-40 oranında gözlenmektedir.

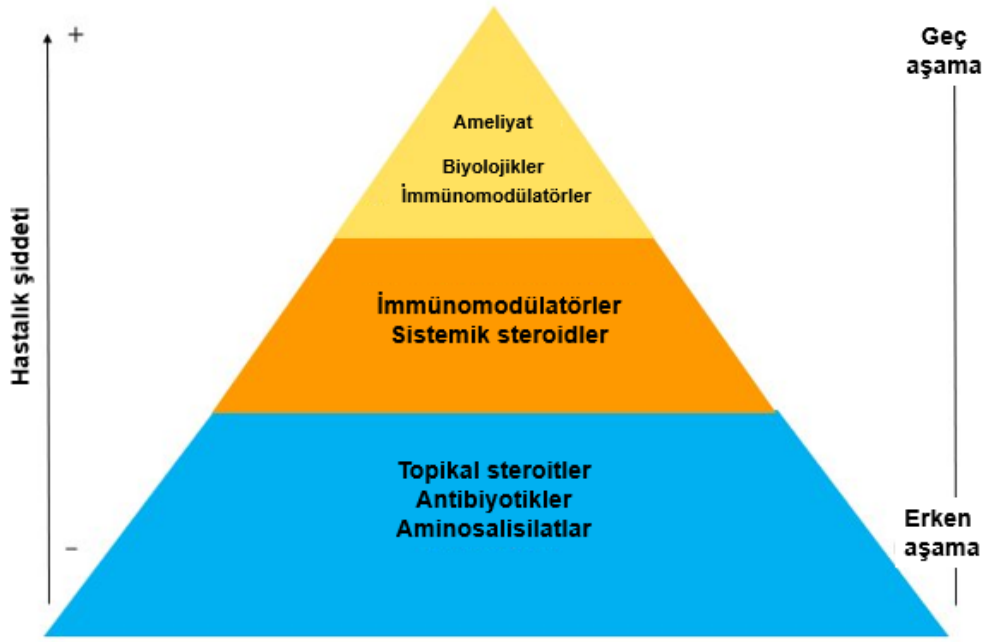
Ülseratif kolit hastalığında, hastalık tutulum bölgelerine göre çeşitli isimler alabilmektedir. Hastalık sadece rektum bölgesinde tutulmuşsa proktit, proksimal bölgeye yayın sigmoidal kolon bölgesinde tutulmuşsa proktosigmoit, splekin fleksuraya kadar tutulmuşsa distal kolit ve çekuma kadar bütün kolon tutulmuşsa pankolit şeklinde isimlendirilmektedir (Kovacs ve Muller, 2012).



Şekil 2.2. Ülseratif Kolit ve Crohn Hastalığı lokalizasyonları (Youshia ve Lamprecht, 2016)

2.2.2. İnflamatuvar bağırsak hastalığında tedavi yaklaşımları

İnflamatuvar bağırsak hastalığının tedavi stratejileri akut alevlenmeler sırasında semptomların giderilmesi ve bu alevlenmelerin tekrarlanmasını önlemek ve geciktirmek olarak sıralanabilir (Rodriguez-Nogalez ve diğerleri, 2016a). Yani mevcut tedavi stratejileri, hastalığa neden olan faktörleri ortadan kaldırmak yerine, hastalık semptomlarının giderilmesini amaçlamaktadır (Pithadia ve Jain, 2011). Bu stratejiler arasında daha az dozlama ve daha az yan etki elde etmek amacıyla birden çok tedavi ajanının bir arada kullanıldığı sistemler yer almaktadır (Rodriguez-Nogales ve diğerleri, 2016a). İnflamatuvar bağırsak hastalığının konvansiyonel tedavisinde kullanılan ilaçların, inflamasyonun lokalizasyonu, aktivitesi ve miktarına bağlı olarak uygulama yolu ve dozu değişebilmektedir. İnflamatuvar bağırsak hastalığının konvansiyonel tedavisi için piramit yaklaşımı kullanılmaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. İnflamatuvar bağırsak hastalığının konvansiyonel tedavisinde piramit yaklaşımı (Ribaldone ve diğerleri, 2020)

2.2.3. Hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar

İnflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde aminosalisilatlar, immünosupresanlar, kortikosteroidler, biyolojikler ve antibiyotikler gibi tedavi edici ajanlar kullanılmaktadır. Hastalığın tedavisinde konvansiyonel olarak kullanılan ilaçlar Çizelge 2.5'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının tedavisinde konvansiyonel olarak kullanılan ilaçlar (Coskun, Vermeire ve Nielsen, 2017; Takedatsu, Mitsuyama ve Torimura, 2015)

Kortikosteroidler	Aminosalisilatlar	İmmunomodülatörler	Biyolojikler	Antibiyotikler
Budesonid	Mesalazin	Azatiyopürin	İnfliximab	Metronidazol
Hidrokortizon	Sülfasalazin	6-merkaptopürin	Adalimumab	Siprofloksasin
Metilprednizolon	Olsalazin	Takrolimus	Certozilumab	Rifaksimin
	Balsalazid	Siklosporin	Vedolizumab	
		Metotreksat	Natalizumab	
			Ustekinumab	
			Golimumab	

2.2.4. Hastalığın tedavisinde yenilikçi tedavi yöntemleri

İnflamatuvar bağırsak hastalığının konvansiyonel tedavisinde kullanılan kortikosteroidler, aminosalisilatlar, immünosupresanlar ve biyolojikler gibi tedavi edici ajanların uzun süreli kullanımlarında görülen şiddetli yan etkiler ve tedavi maliyetleri yeni tedavi stratejilerinin araştırılmasını beraberinde getirmektedir (Bernstein ve diğerleri, 2016; Siegel, 2011; Connell ve diğerleri, 1994). Bu amaçla JAK inhibitörleri (tofacitinib, filgotinib, peficitinib), vitamin D, Sfingozin-1-fosfat reseptör modülatörleri (ozanimod, etrasimod, amiselimod), TNF- α -siRNA (gen susturucular) gibi tedavi edici ajanlar hastalığın tedavisinde potansiyel kullanıma sahiptir.

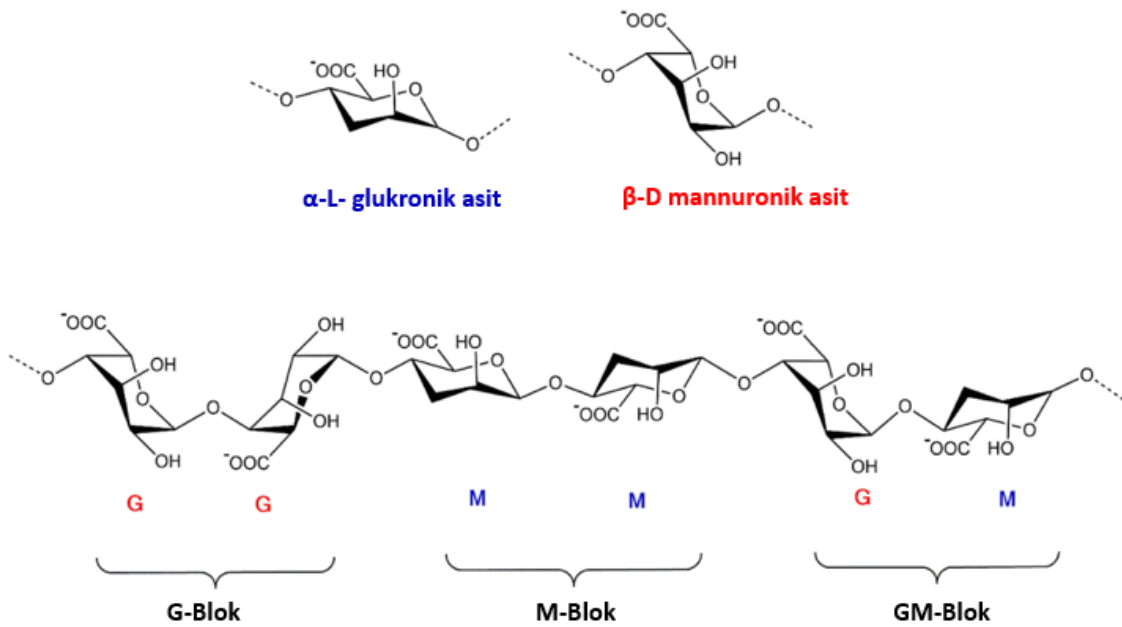
İnflamatuvar barsak hastalığının patogeneğinde proinflamatuvar bir sitokin olan tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) önemli bir rol oynamaktadır (Iqbal ve diğerleri, 2018). İnflamatuvar bağırsak hastalığının tedavi stratejileri arasında anti-TNF- α tedavi stratejisi bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar anti TNF- α tedavisinin histolojik ve endoskopik hastalık aktivitesini azalttığını, immün hücrelerin aktivasyonunu inhibe ettiğini, hücre adezyon moleküllerinin ve proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu aşağı doğru düzenlediğini, apoptozu modüle ettiğini göstermektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarla anti-TNF- α tedavisinin güçlü bir lokal etkiye neden olduğu, ancak sistemik bir etkiye neden olmadığı ve bağırsak dokusundaki derişiminin serum seviyelerine kıyasla klinik ve kalıcı bir yanıtla daha iyi korele olabileceği gösterilmiştir (Peyrin-Biroulet ve diğerleri, 2021; Jang ve diğerleri, 2021).

Gen susturma teknolojisi kullanılarak TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretiminin baskılanması yaklaşımı dikkat çekmektedir (Guo, Jiang ve Gui, 2016; Kriegel ve Amiji 2011).

2.2.5. Aljinat, hyaluronik asit ve inflamatuvar bağırsak hastalığında kullanımları

Aljinat kahverengi alglerden veya su yosunlarından üretilen polisakkarit yapıda bir biyopolimerdir. Farklı oranlarda ve farklı düzenlemelerde β -D mannuronik asit (M-blok) ve α -L-glukronik asit (G-blok) yapılarını içermektedir (Şekil 2.4). Bu blokların birleşimine ve yerleşimine göre aljinatların yapısı, molekül ağırlığı ve viskozite

değerleri değişmektedir (Sinha ve Kumria, 2001). Aljinatların molekül ağırlığı 32.000-420.000 g/mol arasındadır (Lee ve Mooney, 2012). Aljinatın yapısında G-blokta bulunan sodyum iyonu ile Ca^{+2} , Ba^{+2} , Sr^{+2} , Zn^{+2} gibi katyonlar arasındaki iyon değişimi ile aljinat jel yapısı oluşmaktadır. Aljinatların viskozite değerleri hazırlama yöntemine göre değişim gösterebilir. Viskozite değeri, polimerizasyon derecesi ve molekül ağırlığı arasında lineer bir ilişki bulunmaktadır. Polimerizasyon derecesi ve molekül ağırlığı arttıkça viskozite değerleri de artmaktadır. Aljinatlar viskozite değerlerine göre, düşük, orta ve yüksek viskoziteli olarak sınıflandırılmaktadır. Aljinatların viskozitesi, pH değeri düştükçe artmaktadır. Yapıdaki karboksil gruplarının hidrojen bağı oluşturmasıyla, pH=3-3,5 arasında viskozite maksimuma ulaşmaktadır (Lee ve Mooney, 2012). Aljinatların viskozite değerleri, şişme ve erozyon özelliklerini etkiler, bu özellikler de ilaç taşıyıcı sistemlerde ilacın salım profilini doğrudan etkilemektedir. Aljinatlar, biyouyumluluk, biyoparçalanabilirlik, düşük toksisite, kolay bulunabilme ve düşük maliyet gibi özellikleri sayesinde eczacılık alanında ve biyomedikal uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Gombotz ve Wee, 1998).

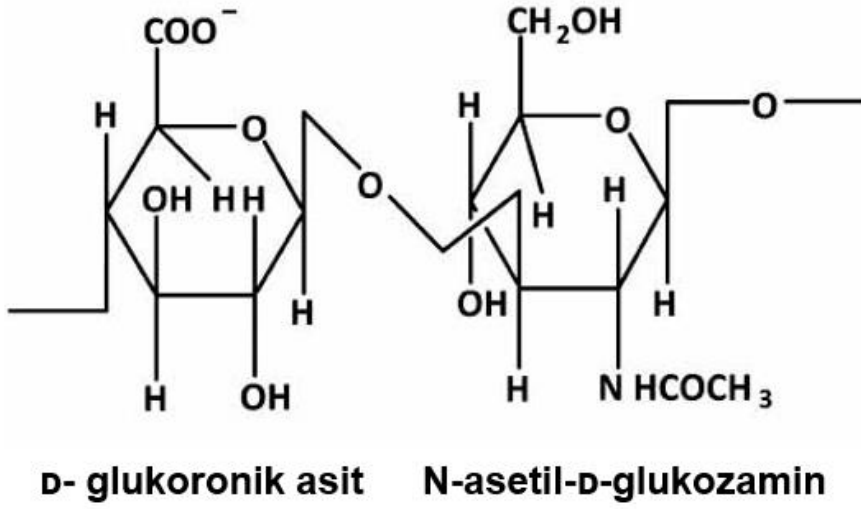


Şekil 2.4. Aljinatın kimyasal yapısı (Abasalizadeh ve diğerleri, 2020)

Aljinatın mide ülserlerine ve özofagal reflüye karşı koruyucu bir özelliği olduğu ve inflamatuvar bağırsak hastalığında proinflamatuvar sitokinlerin üretimini

baskılayarak inflamasyonu azalttığı bilinmektedir (Poynard, Vernisse ve Agostini, 1998; Dettmar ve diğerleri, 2006; Pi ve diğerleri, 2022). Ayrıca bağırsak mikrobiyotasını düzenleyerek, ülseratif kolit oluşumunu ve hastalığın ilerlemesini önlediği kanıtlanmıştır (Fu ve diğerleri, 2023). Aljinat temelli ilaç taşıyıcı sistemlerin pH duyarlı ve bölgeye özgü bir salım profili göstermesi, ayrıca mukoadhezif yapısı da aljinatın inflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisinde tercih edilme sebeplerindendir (Swastha ve diğerleri, 2023). Yapılan bir çalışmada, ülseratif kolit oluşturulmuş sıçan modelinde, sodyum aljinatın IL-6, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin aktivitesini inhibe ederek ve LTB₄, PGE₂ gibi eikosanoidlerin sentezini inhibe ederek inflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (Mirshafiey ve diğerleri, 2005). Bir diğer çalışmada sodyum aljinatın ülseratif kolit oluşturulmuş fare modellerinde oral uygulanması ile, mukus tabakasının kalınlaşması ve müsin salgılanmasını teşvik ederek mukozal iyileşmeyi artırdığı gösterilmiştir (Yamamoto ve diğerleri, 2013). Wang ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada ise aljinat temelli mikrokürelerin, sıçanlarda kolonik mukoza hasarını azaltarak kolon bölgesinde iyileşme sağladığı, mukozada bulunan inflamatuvar mediatörlerin, sitokinlerin sentezini ve gen ekspresyonunu azaltarak inflamatuvar yanıtın azalmasını sağladığı bulunmuştur (Wang ve diğerleri, 2016).

Hyaluronik asit insan vücudunun biyolojik sıvılar ve bağ doku gibi bölgelerinde yaygın olarak bulunan glikozaminoglikan yapısında bir biyomakromoleküldür (Volpi ve diğerleri, 2009). Hyaluronik asit, glikosidik β -1,3 bağıyla bağlanan D-glukuronik asit ve N-asetil-D-glukozaminden oluşan disakkarit birimlerini içeren doğrusal bir yapıdadır (Şekil 2.5). Bu biyomakromolekül kondrositler, fibroblastlar ve sinoviyositler tarafından sentezlenmektedir. Hyaluronik asit yüksek molekül ağırlığına sahiptir, molekül ağırlığı 10.000 kDa'a kadar çıkabilmektedir. Yüksek molekül ağırlığına sahip olması, polianyonik bir yapıda olması ve dallanmayan zincir yapısı sayesinde özel bir reolojik karakteri bulunmaktadır. Hyaluronik asit viskoelastik bir yapıya sahiptir. Viskozitesi molekül ağırlığına bağlı olarak artış göstermektedir. Hyaluronik asit biyouyumlu, biyoparçalanabilir, toksik olmama ve mukoadhezif bir biyopolimer olması nedeni ile eczacılık alanında ve biyomedikal alanda tercih edilmektedir.



Şekil 2.5. Hyaluronik asitin kimyasal yapısı (Sayed Aly, 2008)

İnflamatuvar bağırsak hastalığında mukozal epitel yapısı inflamasyona bağlı olarak bozulmaktadır. Bu epitel yapıdan glukozaminoglikan kaybı ile protein kaybı ve ödem oluşmaktadır. İnflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisinde hyaluronik asitin uygulanması ile ödem oluşumunun azaldığı ve mukozal bariyerlerin yeniden inşa olduğu bildirilmiştir (Murch ve diğerleri, 1993). Ayrıca hyaluronik asitin yara iyileştirici özelliği de bulunmaktadır ve CD44 reseptörleri aracılığı ile hücre hareketliliğini uyardığı gösterilmiştir. İnflamatuvar bağırsak hastalığında CD44 seviyesinin arttığı bilinmektedir (Wittig ve diğerleri, 2002; Johnson ve Ruffell, 2009). CD44, hücre migrasyonunda rol oynadığından, inflamatuvar sitokinler tarafından CD44-HA bağlanmasının modülasyonu, immün hücre alımında etkili olmakta ve yara iyileşmesini hızlandırmaktadır (Chen ve Abatangelo, 1999).

2.2.6. İnflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisinde rektal ve oral uygulamalar

Rektal uygulama düşük çözünürlüğe, stabiliteye ve permeabiliteye sahip ilaçlar için uygun bir uygulama yoludur. Oral yoldan uygulama zorluğu yaşanan bilinci kapalı, kusma refleksine sahip, pediatrik ve geriatric hastalar için rektal uygulama tercih edilmektedir. Rektal uygulama ile lokal etki sağlanabilir ve karaciğer ilk geçiş metabolizması elimine edilmiş olur. Ayrıca rektum diğer uygulama bölgelerine göre daha düşük enzimatik aktiviteye sahip olduğu için nispeten daha stabil bir bölge

olarak kabul edilir. Genel olarak rektal uygulama, karaciğerde yüksek ilk geçiş etkisine sahip, üst gastrointestinal sistemde sınırlı absorpsiyona sahip, mide mukozasında tahrişe neden olan ve gastrointestinal sistemde kolay parçalanabilen düşük stabiliteye sahip ilaçlar için uygun bir uygulama yoludur. Genel olarak rektal uygulama için kullanılan ilaç şekillerinin tahrişe neden olmaması, uygulama bölgesinde iyi bir tutulma göstermesi ve hasta uyuncunun yüksek olması gerekmektedir (Esiringü ve diğerleri, 2016). Rektal uygulama genelde hastalar tarafından çok fazla tercih edilmese de inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi intestinal bölge hastalıklarının tedavisi için uygun bir yoldur. Rektal uygulama için kullanılan çözelti formundaki ilaç şekilleri sızma eğiliminde olduğu için, hidrojeller tedavi etkinliğini artırmak için dikkat çekici ilaç şekilleri haline gelmiştir. Rektal uygulama ile özellikle inflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde doğrudan inflamasyon bölgesine ilaç taşınması mümkündür (Purohit, Hanning ve Wu 2018, Tuğcu-Demiröz, Acartürk ve Takka, 2006; Esiringü ve diğerleri., 2016). Ancak inflamatuvar bağırsak hastalığında rektal ilaç uygulaması ile kolonda ilacın uzun süre kalması gerektiği için diyareli hastalarda etkili olmamaktadır. Ayrıca rektal uygulama Crohn hastalığında ülseratif kolitli hastalara göre daha az etkilidir. Seoane-Viaño ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada inflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisinde rektal uygulanmak üzere takrolimus yüklü 3B basılmış supozituar formülasyonları geliştirilmiş ve ülseratif kolit oluşturulmuş sıçanlarda bu formülasyonun etkili olduğu gözlenmiştir (Seoane-Viaño ve diğerleri,2020). Bir diğer çalışmada ise rektal uygulanmak üzere budesonid yüklü köpük formülasyonu geliştirilmiş ve bu formülasyonun İBH tedavisindeki etkinliği değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda bu formülasyonun özellikle ülseratif kolit tedavisinde etkili olduğu ve oral uygulamaya yanıt vermeyen hastalarda kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Sandborn ve diğerleri, 2015).

Oral uygulama yolu, ilaç tedavisinde sıklıkla tercih edilen ve hasta uyuncunun en fazla olduğu ilaç uygulama yollarından bir tanesidir. Kolay uygulama, sistemik dolaşıma doğrudan geçiş olmadığı için genellikle daha az şiddetli ilaç reaksiyonlarının görülmesi, ilaç tedavisinin istenilen zaman kesilebilmesi, ucuz ve kolay üretim imkânı sağlaması gibi avantajları bulunmaktadır (Giovannitti ve Trapp, 1991; Sastry, Nyshadham ve Fix, 2000). Hastaların ilacı kendi kendine uygulayabilme imkanı ve oral uygulama yolunun düşük maliyetli olması hasta

uyuncunun artmasını sağlamaktadır. Gastrointestinal sistemdeki en yüksek emilim ince bağırsaklarda gerçekleştiği için, özellikle sistemik etkinin sağlanabilmesi amacıyla oral ilaç uygulama yolu tercih edilmektedir. Oral uygulama yolu İBH tedavisi için en ideal yol olarak ve hastaların ilk tercih ettiği uygulama yolu olarak kabul edilmektedir. Moody ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada, İBH'ye sahip 200 hastaya hastalığın tedavisi için oral uygulama, rektal uygulama veya kombine tedaviden hangisini tercih ettikleri sorulmuştur. Bu hastalar arasından Crohn hastalığına sahip 77 kişi, ülseratif kolitli 75 kişi tercihlerini belirtmiştir. Sonuçlara göre Crohn hastalığına sahip hastaların %82'si, ülseratif kolitli hastaların ise %80'i hastalığın tedavisi için oral uygulama yolunu tercih etmiştir (Moody ve diğerleri 1997). Oral uygulama ilaçların doğrudan bağırsak mukozasına erişimini sağlamaktadır (Xiao ve Berlin, 2012). Ancak bu uygulama yolunun en büyük dezavantajları, midenin asidik koşulları ve mide-bağırsak kanalı boyunca bulunan enzimlerdir. Dolayısıyla özellikle inflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisi için oral uygulanmak üzere geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerin, ilacı üst gastrointestinal sistemdeki şartlardan koruyacak şekilde tasarlanması gerekmektedir (Amidon, Brown ve Dave, 2015; Zu ve diğerleri, 2021). Kim ve diğerleri, İBH tedavisi için oral uygulanmak üzere biyolojik bir ajan olan infliximab yüklü nanopartikül formülasyonu geliştirmiş ve bu formülasyonun tedavi etkinliğini İBH oluşturulmuş fare modelinde değerlendirmiştir. Çalışma sonucuna göre oral uygulanan nanopartikül formülasyonunun İBH tedavisinde etkili olduğu ve tedavi için potansiyele sahip olduğu gözlenmiştir (Kim ve diğerleri, 2020).

2.2.7. İnflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisinde uzatılmış salım yapan ilaç taşıyıcı sistemler

İlaç taşıyıcı sistemler, ilaçların vücuda salım hızını, zamanını ve yerini kontrol ederek terapötik bir maddenin vücuda verilmesini sağlayan bir formülasyon veya tıbbi cihaz olarak tanımlanmaktadır. Tabletler, kapsüller, merhemler, şuruplar gibi konvansiyonel ilaç taşıyıcı sistemlerin en büyük dezavantajları, biyoyararlanımın düşüklüğü, dozlama sıklığının çok olması, yüksek ilk geçiş etkisi, düşük eliminasyon ve plazmadaki ilaç seviyesindeki dalgalanmadır. Bu dezavantajlardan dolayı konvansiyonel ilaç taşıyıcı sistemlerle istenen terapötik etkinin elde edilmesi zordur. Kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler, maksimum etkinlik ve güvenlik elde edilmesi

amacıyla ilacın belli bir hızda ve hedef bölgeye özgü salınmasını sağlayan ilaç taşıyıcı sistemlerdir ve konvansiyonel ilaç taşıyıcı sistemlerde karşılaşılan problemlerin önüne geçmek amacıyla geliştirilmiştir. Kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerle kandaki ilaç seviyesi sabit tutulabilir ve ilacın dozunun sürekli terapötik pencere içinde kalması sağlanır. Kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler ilaç salım mekanizmasına göre çeşitli başlıklar altında değerlendirilebilir (Adepu ve Ramakrishna, 2021).

Uzatılmış salımlı sistemler kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerden bir tanesidir. Bu sistemler, tek bir doz ilaç uygulanmasından sonra sürekli olarak uzun süreli terapötik etki elde etmek amacıyla tasarlanmış sistemlerdir. Uzatılmış salım yapan ilaç taşıyıcı sistemler ile;

- İlaç uygulama sıklığı azalır, buna bağlı olarak hasta uyuncu artar,
- Terapötik etkinlik artar,
- Plazma ilaç seviyesi sabit tutulur, plazma ilaç seviyesinde dalgalanma meydana gelmez,
- Uygulanan ilaç dozu azaltılabilir, böylece düşük dozla yüksek etki elde edilmesi sağlanabilir,
- Kontrollü ilaç salımı ve buna bağlı olarak kontrollü absorpsiyon sağlanabilir,
- Potens ilaçların güvenliği artırılabilir,
- Kısa yarılanma ömrüne sahip ilaçlar için terapötik etkinlik süresi artırılabilir,
- Hem lokal hem de sistemik yan etkiler azaltılabilir (Rathnaparkhi ve Gupta, 2013; Tapaswi ve Verma, 2013, Patel ve diğerleri, 2011).

İnflamatuvar bağırsak hastalığının konvansiyonel tedavisinde kullanılan ilaçlar, yüksek doz, uzun süreli tedaviye bağlı yüksek yan etki profili ve yüksek maliyet gibi dezavantajlara sahiptir. İnflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisi için uzatılmış salım yapan ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ile hem bu dezavantajların önüne geçilmesi hem de bu ilaç taşıyıcı sistemlerin avantajlarından faydalanılması mümkündür (Asha ve diğerleri, 2020). İnflamatuvar bağırsak hastalığı türlerinden olan Crohn hastalığında gastrointestinal kanalın her yerinde inflamasyon görülebilirken, ülseratif kolitte inflamasyon bölgesi kolon ile sınırlıdır. Bu inflamasyonların tedavisi ise inflamasyon bölgesine ulaşan ilaç miktarına bağlıdır.

Konvansiyonel ilaç taşıyıcı sistemlerde inflamasyon bölgesine ulaşan ilaç miktarını artırmak amacıyla yüksek doz kullanılabilmektedir ancak bu yüksek doz yan etki riskini artırmaktadır. İBH tedavisinde uzatılmış salımlı ilaç taşıyıcı sistemler ile yüksek dozlarda bile düşük yan etki profili elde edilebilmektedir.

Yapılan çalışmalarda İBH tedavisi için standart olarak kullanılan mesalazinin uzatılmış salımlı formunun, konvansiyonel mesalazin uygulamasına göre daha yüksek dozlarda bile daha iyi tolere edilerek yan etki potansiyelinin azaldığı ve terapötik etkinliğinin arttığı gözlenmiştir (Hanauer ve diğerleri, 1993; Singleton ve diğerleri, 1993).

Mulder ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada mesalazinin uzatılmış salımlı formunun (Pentasa®) İBH tedavisinde etkili olduğu ve yan etki profilinin düşük olduğu gösterilmiştir (Mulder ve diğerleri, 1998).

2.3. İpek Fibroin

İpek fibroin, Bombyx mori ve Antheraea pernyi gibi ipekböceklerinin kozalarından veya örümceklerden elde edilen doğal bir hayvan kaynaklı fibröz bir proteindir. Bu protein, bu türlerin epitel hücrelerinde sentezlenir (Vepari ve Kaplan 2007). Örümceklerden elde edilen ipek fibroin daha güçlü ve daha elastiktir, ancak örümceklerden ipek fibroin elde etmenin zorluğu nedeniyle, Bombyx mori ipekböceği kozalarından elde edilen ipek fibroin daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Thurber, Omenetto ve Kaplan, 2015). Farklı ipek türevleri, farklı gen yapılarına sahiptir. Bombyx mori ipek fibroinin diğer türlerden yapı ve özellikleri bakımından farklı olmasının nedeni bu gen yapısıdır (Craig ve Riekel, 2002).

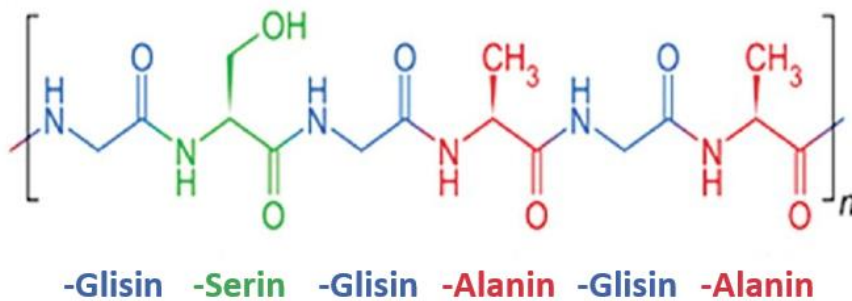
2.3.1. İpek fibroinin kimyasal yapısı

Bombyx mori ipekböceği kozaları genellikle ipek fibroin kaynağı olarak kullanılır. İpek fibroinin boyutları 10-25 µm arasındadır. İpek fibroin 1:1 oranında hafif zincir (26 kDa) ve ağır zincir (390 kDa) olmak üzere iki ana zincirden oluşur. Bu zincirler birbirlerine tekli disülfid bağları ile bağlıdır ve serisin adı verilen hidrofilik bir protein ile kaplanmıştır (Şekil 2.6).



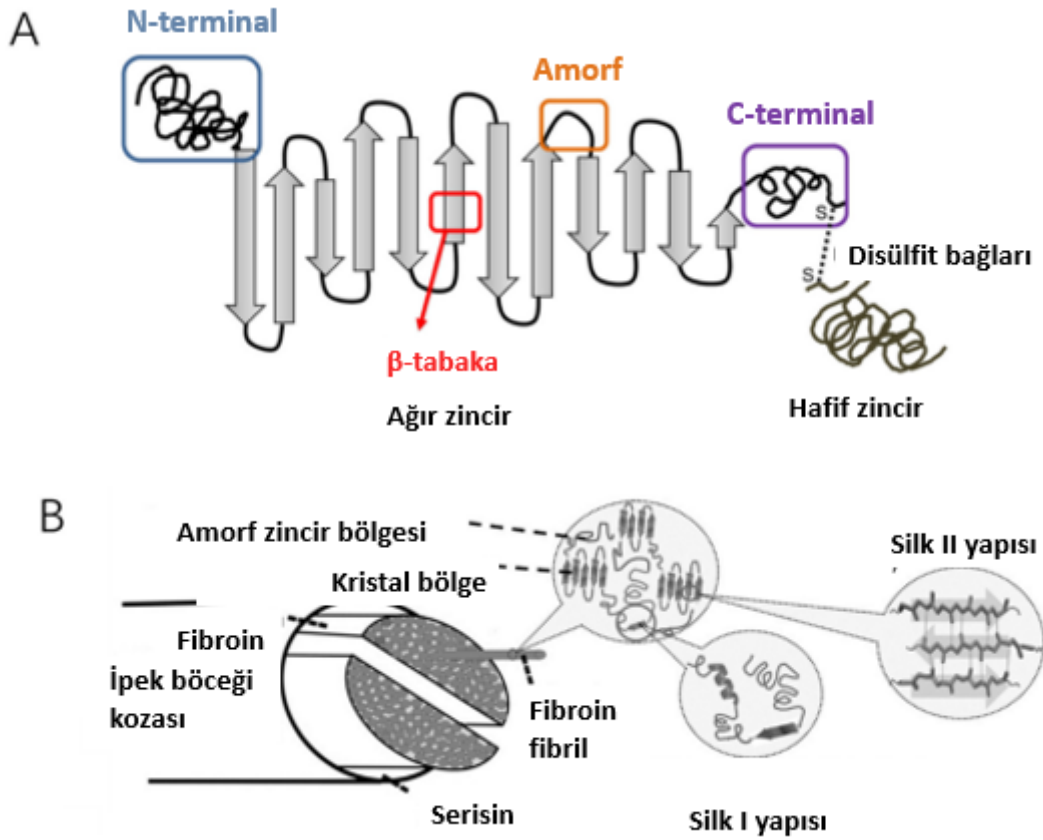
Şekil 2.6. İpek böceği kozasının temel bileşenleri (Sobajo ve diğerleri, 2008)

Serisin, ipekböceği koza kütlesinin yaklaşık %30'u kadardır. İpek fibroin elde etmek için serisin uzaklaştırılmalıdır. Bu işlem, ipekböceği kozalarının alkali bir çözelti içinde kaynatılmasıyla yapılır ve zıncı giderme olarak adlandırılır (Vepari ve Kaplan 2007). İpek fibroin, temel olarak glisin (Gly), alanin (Ala) serin (Ser) amino asitlerinden oluşur. Glisin, alanin ve serin oranı sırasıyla yaklaşık %43, %30, %12'dir. Bu amino asitlerin dizisi - (Gly-Ala-Gly-X)_n'dir (X, serin veya tirozin olabilir) (Şekil 2.7) (Mori ve Tsukada 2000).



Şekil 2.7. İpek fibroinin kimyasal yapısı (Moin ve diğerleri, 2021)

İpek fibroin, beta-tabaka adı verilen Silk I ve Silk II yapılarından oluşur (Şekil 2.8). Silk I yapısı suda çözünür, bağlı su moleküllerini içeren metastabil bir kristal yapıdır, Silk II, bitişik peptit blokları arasındaki güçlü hidrojen bağı nedeniyle en stabil durumdur. Silk I yapısının Silk II yapısına dönüşümü, ısıya, fiziksel eğirmeye ve metanol veya potasyum klorür gibi çözücülere maruz kaldığında gözlenir (Altman ve diğerleri 2003; Valluzzi ve diğerleri 2002). Silk III ise, ipek fibroin çözeltisinin hava-su arayüzünde bulunan ipek fibroinin stabil olmayan kristal yapısıdır.



Şekil 2.8. İpek fibroin yapısının şematik gösterimi. A: Disülfid bağları ile bağlanan ağır zincir (N-terminal, β-tabakaları, Amorf ve C-terminal) ve hafif zincir. B: İpek böceği kozası genel yapısı (Sun ve diğerleri, 2021)

2.3.2. İpek fibroinin özellikleri

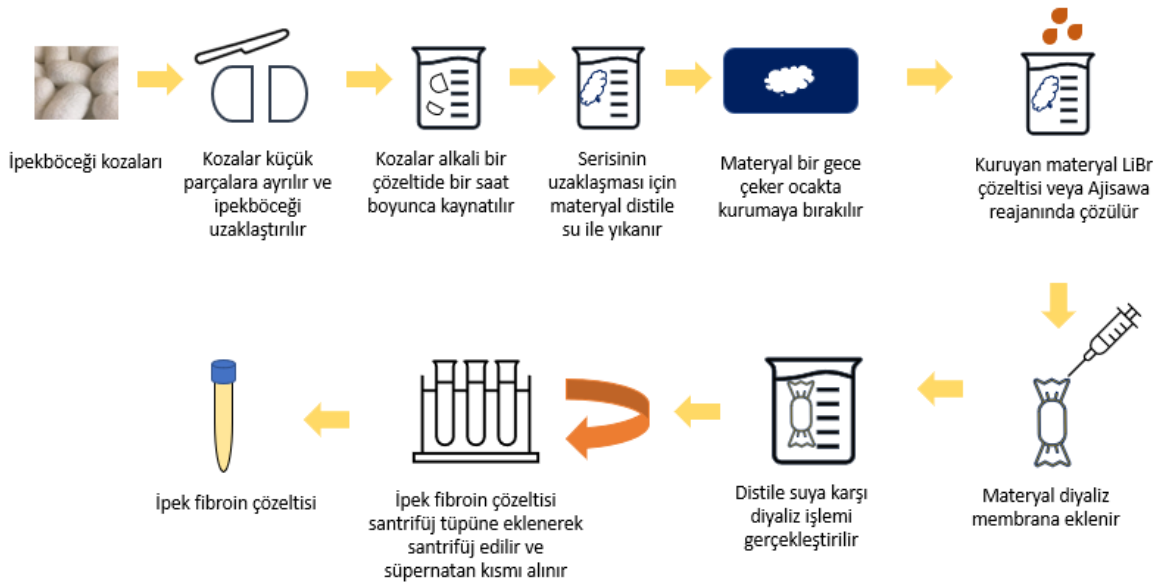
İpek fibroin, bu proteini çeşitli alanlarda kullanım için cazip kılan birçok özelliğe sahiptir. İpek fibroinin bu kadar yaygın kullanılmasının nedenlerinden biri de mekanik özellikleridir. Bu protein, yüksek gerilme direncine, uzayabilirliğe ve elastik özelliklere sahiptir. İpek fibroinin gerilme direnci 740 mPa'dır ve bu, polilaktik asit (PLA) ve kollajen gibi diğer polimerlere kıyasla çok yüksek bir gerilmedir (Rockwood ve diğerleri, 2011). İpek fibroin, kolayca bulunabilen ve kolayca elde edilebilen bir proteindir. Diğer bir özelliği ise 250 °C'ye kadar termal stabilite göstermesidir. Bu özelliği sayesinde bu proteini 3B baskı teknolojisi gibi sıcaklık uygulanan işlemlerde kullanmak mümkün hale gelmektedir ve ipek fibroin ile geniş bir sıcaklık aralığında çalışılabilir. Ayrıca bu termal stabilite sayesinde herhangi bir bozulma ve bütünlük kaybı olmadan özelliklerini koruyabilmektedir (Maghdouri-White ve diğerleri, 2016). Canlı vücuda yapılan uygulamalarda ipek fibroin tercih edilmektedir. Bunun nedeni

düşük immünojenite, antijenite, trombojenite ve sınırlı bakteri adezyonu göstermesidir (Kundu ve diğerleri, 2014). Ayrıca toksik, kanserojen, sitotoksik değildir ve biyolojik olarak uyumludur. Hemostatik özelliği de bu proteini canlı organizma için çekici kılmaktadır. İpek fibroin düşük inflamatuvar yanıt göstermektedir (Sheikh ve diğerleri, 2015). Biyobozunur bir proteindir ve bu özellik kontrol edilebilmektedir. İpek fibroinin biyolojik olarak bozunması uygulama yerine göre değişiklik göstermektedir, ayrıca bu bozunma proteolitik de olabilir. Enzimatik bozunmaya karşı direnci nedeniyle in vivo olarak yavaş bozunma hızına sahiptir. Bu kontrollü ve yavaş bozunma hızı nedeniyle doku mühendisliği gibi uygulamalarda yaygın olarak tercih edilmektedir. İpek fibroinin antiinflamatuvar özellik gösterdiği bilinmektedir. Bu özellik ilk kez Kim ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada farelerin kulaklarında ödem modeli oluşturulmuş ve ipek fibroin topikal olarak uygulanmıştır, uygulama sonrasında ipek fibroinin antiinflamatuvar bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Kim ve diğerleri, 2011). Bu proteinin hücre dizilerinin bağlanmasını, farklılaşmasını ve çoğalmasını sağlayarak hücreleri desteklediği, enzimler ve canlı viral aşılarda gibi biyomakromoleküllerin stabilitesini arttırdığı bilinmektedir (Yang ve diğerleri, 2019; Aykac ve diğerleri, 2018; Min ve diğerleri, 2004; Cubayachi ve diğerleri, 2019). Hücre farklılaşmasını ve çoğalmasını sağladığı için yara iyileşmesi gibi uygulamalarda kullanılır. İpek fibroin yüksek su buharı ve oksijen geçirgenliğine sahiptir, bu nedenle canlı dokulara kolayca uyum sağlar.

2.3.3. İpek fibroinin elde ediliş yöntemleri

İpek lifleri serisin proteini ile kaplanmış malzemelerdir. Serisinin immün yanıtlara neden olabileceği bilinmektedir. Bu nedenle canlı organizma ile uyumlu bir materyal elde etmek için serisin uzaklaştırılmalıdır. Serisinin uzaklaştırılmasıyla elde edilen materyal olan ipek fibroin, immün yanıtı neden olmadığı için biyoyuumludur. Serisinin ipek liflerinden uzaklaştırılması zambak giderme işlemi olarak bilinmektedir. İpek kozaları zambak giderme işlemi için alkali bir çözeltide kaynatılır. Zambak giderme işlemi için alkali çözelti olarak enzimler, üre, amonyum, boraks-hidroklorik asit tamponu, sodyum karbonat, bikarbonat çözeltisi kullanılabilir. Bu işlemden sonra elde edilen lif yapısı bir gece kurumaya bırakılır. Daha sonra lif yapısı LiBr çözeltisi veya Ajisawa reaktifi (CaCl_2 /etanol/su) gibi çözeltilerde çözülerek saf ipek fibroin

elde edilir. Daha sonra çözücülerin uzaklaştırılması için diyaliz işlemi gerçekleştirilir. Diyaliz işleminden sonra tamamen saf ipek fibroin elde etmek için santifüj işlemi yapılır (Şekil 2.9). Toz halinde ipek fibroin elde etmek için liyofilizasyon işlemi yapılabilir (Rockwood ve diğerleri, 2011). İpek fibroin elde etmek için farklı yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Bir çalışmada zamburak giderme için amonyak, sodyum karbonat ve sodyum bikarbonat olmak üzere üç farklı çözelti kullanılmış ve bu çözeltilerin etkileri karşılaştırılmıştır. Kurutma işleminden sonra LiBr çözeltisi ve Ajisawa reaktifi yerine formik asit:fosforik (7:3) asit karışımı kullanılmıştır. Bu çalışmada, kullanılan çözeltinin ipek liflerinin morfolojisi üzerinde önemli etkilere sahip olduğu, ayrıca sodyum bikarbonat ve sodyum karbonat yerine amonyak çözeltisi kullanımının ipek liflerindeki bozulmayı azalttığı görülmüştür (Nazeer, Yilgor ve Yilgor, 2019).



Şekil 2.9. İpek fibroin eldesinin şematik gösterimi

2.3.4. İpek fibroinin kullanım alanları

İpek fibroinin özellikleri ve avantajlarından dolayı geniş bir alanda kullanımı bulunmaktadır. Bu protein özellikle biyomedikal ve eczacılıkta birçok alanda tercih edilmektedir ve bu protein ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. İpek fibroinin kullanım alanları; vasküler doku rejenerasyonu (Enomoto ve diğerleri, 2010), sinir doku rejenerasyonu (Hu ve diğerleri, 2013), cilt dokusu rejenerasyonu (Khor ve diğerleri,

2003), kemik dokusu rejenerasyonu (Li ve diğerleri, 2006), kıkırdak doku rejenerasyonu (Wang ve diğerleri, 2006), ligament ve tendon doku rejenerasyonu (Fang ve diğerleri, 2009), kardiyak doku rejenerasyonu (Kanani ve Bahrami, 2010), oküler doku rejenerasyonu (Bray ve diğerleri, 2011), hepatik doku rejenerasyonu (Lv ve diğerleri, 2007), omurilik dokusu rejenerasyonu (Shen ve diğerleri, 2010), inter-vertebral doku rejenerasyonu (Chang ve diğerleri, 2007), mesane dokusu rejenerasyonu (Zou ve diğerleri, 2010), trakeal doku rejenerasyonu (Ni ve diğerleri, 2008), eardrum (kulak zarı) doku rejenerasyonu (Levin ve diğerleri, 2009), ilaç taşıyıcı sistem (Elakkiya ve diğerleri, 2014), yara iyileşmesi (Roh ve diğerleri, 2006), enzim immobilizasyonu (Lee ve diğerleri, 2005), yapay doku üretimi (Sheikh ve diğerleri, 2015), gen tedavisi (Li ve diğerleri, 2014), inflamatuvar bağırsak hastalığı (Lozano-Pérez ve diğerleri., 2014) olarak sıralanabilir.

2.3.5. İpek fibroinin inflamatuvar bağırsak hastalığında kullanımı

İpek fibroin, hücre farklılaşmasını, çoğalmasını ve birleşmesini destekleyerek yara bölgesinde iyileşmeyi hızlandırması ve antiinflamatuvar etki göstermesi sebebiyle inflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisi için dikkat çeken bir biyopolimerdir (Yang ve diğerleri, 2019; Kim ve diğerleri, 2011; Kimura ve diğerleri, 2007). Bu amaçla daha önce yapılan çalışmalarda ipek fibroinin tek başına veya tedavi edici bir ajanla birlikte inflamatuvar bağırsak hastalığında kullanılması değerlendirilmiş ve bu yönde olumlu sonuçlar gözlenmiştir. Bu amaçla bu zamana kadar ipek fibroinin partiküler formülasyonları hazırlanmış ve inflamatuvar bağırsak hastalığına olan etkisi in vitro/in vivo deneylerle araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada, ipek fibroinden nanopartikül ve mikropartikül formülasyonları hazırlanmış ve bu formülasyonlar ipek fibroin çözeltisi ile in vitro ve in vivo deneyler yapılarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, in vitro deneylerde ipek fibroinin immün yanıtı inflamasyona karşı artırdığı, in vivo deneylerde ise hem ipek fibroin çözeltisinin hem de partiküler sistemlerin sıçanlarda trinitrobenzen sulfonik asit (TNBS) ile oluşturulan deneysel kolit modelinde antiinflamatuvar yanıt gösterdiği ve yaralanan dokunun rejenerasyonunu desteklediği gözlenmiştir (Rodriguez-Nogales ve diğerleri, 2016a). Başka bir çalışmada inflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde kullanılan bir ajan olan resveratrolün kontrollü salımının sağlanması için ipek fibroin nanopartikülleri hazırlanmış ve in vitro hücre kültürü çalışmaları ile ve in vivo

deneysel kolit modeli oluşturularak sıçanlarda bu partiküler sistemin etkisi araştırılmıştır. In vitro hücre kültürü çalışmaları için sıçanlardaki immün yanıtla ilgili olan RAW 264.7 hücre dizisi seçilmiştir. In vivo çalışmada ise, resveratrol içeren ipek fibroin nanopartiküller, resveratrol içermeyen ipek fibroin nanopartiküller, resveratrol ve inflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde sıklıkla kullanılan bir tedavi edici ajan olan deksametazon sıçanlara uygulanmış ve bu formülasyonların trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) sıçan modelindeki etkileri karşılaştırılmıştır. Hem in vivo hem de in vitro deney sonuçlarına göre, resveratrol ve ipek fibroinin birlikte uygulanmasıyla antiinflamatuvar yanıtın arttığı gözlenmiştir (Lozano-Pérez ve diğerleri., 2014).

2.4. Gen Tedavisi

Gen tedavisi, belirli bir tedavi edici etkiye sahip nükleik asitlerin bazı vektörler aracılığıyla hücreye aktarılması işlemidir. Gen tedavisi eksik genlerin yerine konması, genlerin işlevlerinin değiştirilmesi ve yanlış ya da fazla çalışan genlerin susturulması gibi yöntemleri kapsamaktadır. Spesifik bir gene, dokuya veya hücreye aktarılan nükleik asitler ile genin işlevi engellenebilmekte, gene yeni bir fonksiyon kazandırılabilenekte veya genin eski hale dönerek iyileşmesi sağlanabilmektedir (O'Connor ve Boulis, 2016; Amor, 2001; Barnes ve diğerleri, 1997).

Gen tedavisi *ex vivo* ve *in vivo* olarak iki farklı şekilde yapılabilmektedir. *In vivo* gen tedavisinde genetik materyal doğrudan hastanın hücrelerine verilirken, *ex vivo* gen tedavisinde hastadan alınan hücrelere gen aktarımı kültür ortamında gerçekleştirilerek tedavi edilmiş hücreler hastalara aktarılmaktadır. Gen tedavisi için kullanılacak yöntem seçimi terapötik gene, hedef hücre yapısına ve taşıyıcı sistem özelliklerine bağlı olarak değişmektedir (Van Tendeloo, Van Broeckhoven ve Berneman, 2001).

2.4.1. Gen susturma teknolojisi

Gen susturma teknolojisi gen tedavisi stratejilerinden bir tanesidir. Gen susturma teknolojisinde amaç yanlış veya fazla çalışan genlerin ekspresyonunun engellenmesi ve sağlıklı bir gen ekspresyonunun sağlanmasıdır. Gen susturma

işlemi doğrudan genleri veya genlerin kodladığı mRNA'ları hedef alarak gerçekleştirilebilmektedir (Gewirtz, 2007).

Gen susturma teknolojisi transkripsiyonel gen susturma mekanizması ve post-transkripsiyonel gen susturma mekanizması olmak üzere iki farklı şekilde uygulanabilmektedir. Transkripsiyonel gen susturma mekanizmasında, susturulması hedeflenen genin ekspresyonu protein sentezinin transkripsiyonu aşamasında baskılanırken, post-transkripsiyonel gen susturma mekanizmasında gen susturma işlemi mRNA üzerinden hedef genin ekspresyonunun engellenmesi ile gerçekleşmektedir (Weinberg ve Morris, 2016; Hammond, Caudy ve Hannon, 2001).

2.4.2. RNA interferans

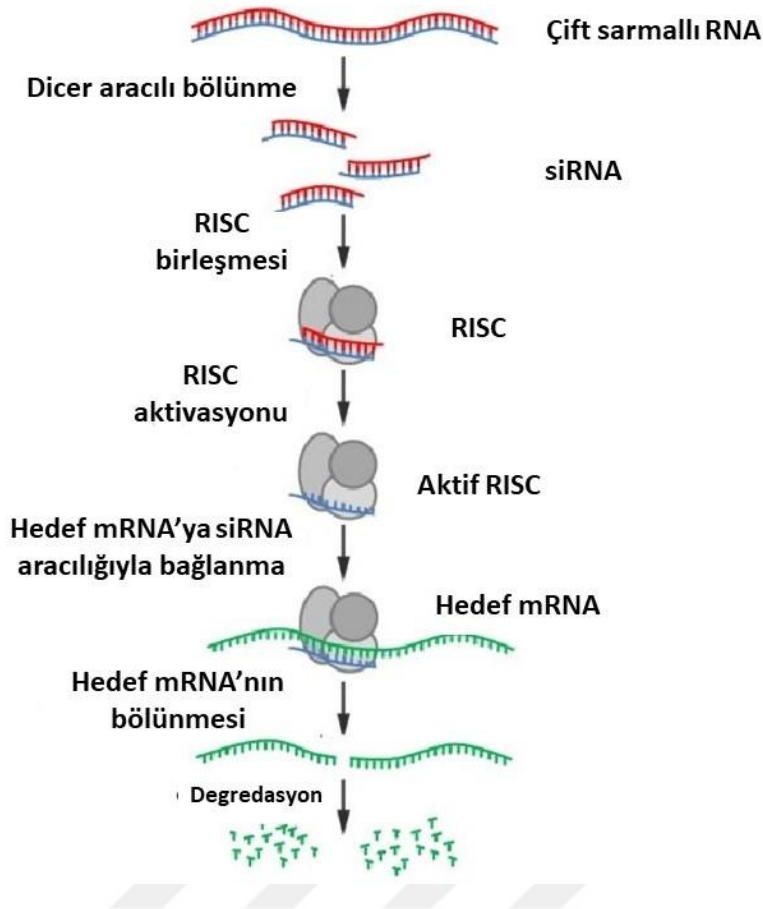
RNA İnterferans (RNAi) canlılarda hedef mRNA'nın parçalanmasıyla gerçekleşen post-transkripsiyonel bir gen susturma mekanizmasıdır. RNAi, küçük çift zincirli RNA'lar yardımıyla çoğunlukla hedef mRNAların ifadelerinin baskılanmasını ifade etmektedir. RNAi, hücre stoplazmasında gerçekleşen ve RISC (RNA-induced silencing complex) kompleksi tarafından düzenlenen bir gen susturma süreci olarak ifade edilir (Pratt ve MacRae 2009). RNAi mekanizması canlılarda doğal olarak var olan bir süreçtir. Transpozon, virüs gibi hareketli genetik materyallere karşı genomun korunmasını sağlayan hücresel bir savunma mekanizmasıdır. Bu nedenle diğer gen susturma stratejilerine göre daha üstündür (Zeng ve Cullen, 2002). Postkripsiyonel RNAi teknolojisinin; spesifiklik, potansiyel etkinlik gibi avantajları bulunmakta ve çeşitli hastalıkların tedavisinde gen susturma teknolojisi ile oldukça olumlu sonuçlar alınabilmektedir (Dana ve diğerleri, 2017). Bu sayede, belirli bir hastalığa spesifik genin ekspresyonu yok edilerek veya azaltılarak hastalık önlenmektedir, bu da önemli bir tedavi stratejisi oluşturmaktadır.

2.4.3. RNA interferans stratejileri ve mekanizması

RNAi mekanizmasında öncelikle RNaz-III ribonükleaz ailesine ait bir enzim olan Dicer enzimi RNA'yı siRNA adı verilen 20-25 nükleotid uzunluğundaki kısa parçalara ayırmaktadır. Daha sonra RNAi faktörleri bir araya gelerek RISC

komplekslerini oluşturmaktadır, bu oluşan kompleksler henüz aktif değildir. siRNA zincirlerinin ATP bağımlı bir şekilde açılması RNA-helikaz ile aktive olan Dicer enzimi ile gerçekleşmektedir. siRNA'lar açıldıktan sonra hedef mRNA'ya komplementer dizi içeren siRNA zinciri RISC'e bağlı kalmakta ve RISC kompleksi aktif hale gelmektedir. Aktive olan RISC kompleksi, taşıdığı siRNA zincirinin komplementer dizisini içeren hedef mRNA'ya bağlanarak bu mRNA'yı işlevsiz hale getirir ve böylece translasyon engellenmektedir (Leung ve Whittaker, 2005).

siRNA'lar 20-25 nükleotidden oluşan, protein kodlamayan RNA olarak da bilinen moleküllerdir. Bu moleküller çeşitli transfeksiyon yöntemleriyle hücreye alındıktan sonra, endonükleaz, ekzonükleaz ve helikaz enzimlerini içeren RISC ile kompleks oluşturmaktadır. RISC'te bulunan endonükleaz enzimi siRNA'nın sense adı verilen taşıyıcı ipliğini parçalayarak uzaklaştırmaktadır. siRNA'nın hedef mRNA'yı tanıyacak olan antisense adı verilen diğer iplikçigi ise RISC kompleksine bağlı kalmaktadır. RISC kompleksi yapısında bulunan bu iplikçik ile hedef mRNA'ya özgül olarak bağlanarak, yapısında bulunan endonükleaz enzimi ile mRNA'yı parçalayarak inaktive etmektedir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. RNA interferans mekanizması (Petrova, Zenkova ve Chernolovskaya, 2013)

2.4.4. RNAi mekanizmasının bileşenleri

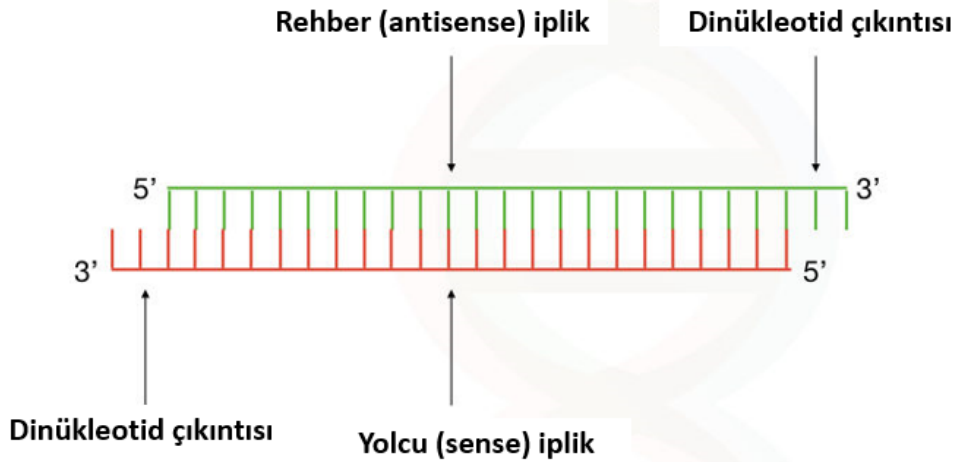
RNAi mekanizmasında sürecin devam etmesini sağlayan çeşitli görevlere sahip bileşenler rol oynamaktadır. Bu görevler başlatıcı (initiator), etki edici (effector), çoğaltıcı (amplifier) ve iletici (transmitter) olarak sıralanabilir (Agrawal ve diğerleri, 2003). Bu bileşenlerden ilki Dicer enzimidir, bu enzim RNAz III ribonükleaza aittir ve RNAi sürecinin başlamasında görev almaktadır. Dicer enzimi ilk basamak olarak siRNA'nın elde edilmesinde rol alır, ayrıca RNAi mekanizmasının bir sonraki basamağı olan RISC kompleksine yüklenmesinde de görev almaktadır (Szweykowska-Kulinska, Jarmolowski ve Figlerowicz, 2003).

RISC (RNA indükleyici baskılama kompleksi), yapısında endonükleaz ve helikaz enzimlerini içeren nükleaz aktiviteli bir RNA-multiprotein kompleksidir. RNAi mekanizmasında siRNA ile birleşerek, siRNA'nın çift sarmallı yapısının açılması ve

siRNA yapısında bulunan sense zincirinin uzaklaştırılmasından sorumludur. Daha sonra antisense diziye sahip siRNA rehberliğinde hedef mRNA ile hibritleşerek endonükleaz aktivitesiyle fosfodiester bağıını keser (Rand ve diğerleri, 2005). RNAi mekanizmasının bir diğer bileşeni siRNA'dır.

2.4.5. siRNA yapısı ve özellikleri

siRNA'lar (small interfering RNA) 20-25 nükleotidden oluşan, 5'- fosfat ve 3'- hidroksil uçları bulunan in vitro olarak sentezlenen çift sarmallı yapıya sahip RNA'lardır. siRNA'ların 3'- hidroksil uçlarında dinükleotid çıkıntıları bulunmaktadır (Şekil 2.11). RNAi mekanizmasında, çift sarmallı RNA yapısının Dicer enzimi tarafından 20-25 nükleotitlik küçük parçalara ayrılmasıyla oluşmaktadır. siRNA yapısında bulunan bir zincir RISC tarafından uzaklaştırılır, diğer zincir ise mRNA degradasyonunda rol oynamaktadır. siRNA molekülleri sentetik endojen kaynaklıdır ve hedef dizi ile son derece yüksek bir eşleşme göstermektedirler.



Şekil 2.11. siRNA yapısı

Gen susturma işleminin etkin bir şekilde gerçekleşmesi için RNA sürecinin etkili bir şekilde gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu nedenle siRNA'nın hedef doku, organ veya hücrelere yapısının korunarak taşınması büyük önem taşımaktadır. siRNA gibi fonksiyonel yapılar vücuda alındıktan sonra, vücutta bulunan nükleazlar tarafından veya dolaşım sisteminde yer alan retiküloendotelial sistem (RES) tarafından

parçalanabilir. Ayrıca hücreye alındığı zaman hücrede yer alan hücre içi RNAz veya helikaz enzimleriyle etkileşime girerek aktivitesini kaybedebilmektedir (Soutschek ve diğerleri, 2004). Bu nedenle siRNA gibi fonksiyonel yapılar, dolaşımda yer alan nükleazlarla parçalanarak hızlı bozulmaları, hedef dokularda yeterince birikmemeleri hücre sitoplazmasına erişebilmek için hücre membranlarını geçememeleri ve istenen doku veya hücre tarafından alınabilmeleri nedeniyle bir taşıyıcı sisteme ihtiyaç duyarlar (Mutlu-Ağardan, Sarısözen ve Torchilin, 2018).

2.4.6. siRNA temelli ilaç taşıyıcı sistemler

siRNA moleküllerinin hücrelere taşınması için ilaç taşıyıcı sistemler kullanılmaktadır. İlaç taşıyıcı sistemler, siRNA yapısını vücutta ve hücrelerde yer alan nükleazlar gibi engellerden koruyabilmekte, hem de siRNA'nın hücrelere geçişini sağlayabilmektedir. siRNA'nın taşınması için ideal bir ilaç taşıyıcı sistemin biyoyoumlu, genetik olarak uyumlu, non-immunojenik, non-toksik olması ve spesifik hücresel taşınmayı ve hücresel girişi sağlaması gerekmektedir. siRNA moleküllerinin etkin bir şekilde taşınması için vücuda alındıktan sonra bir takım engellerin aşılması gerekmektedir (Şekil 2.12).

siRNA'nın taşınması amacıyla çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Bunlar, katyonik transfeksiyon ajanları, polimerik nanopartiküller, lipozomlar, miseller, dendrimerler, niozomlar, metalik nanopartiküller ve oligonükleotit nanopartiküller olarak sıralanabilir. Bu sistemlerden bir tanesi de katyonik polimer bazlı sistemlerdir. Bu sistemler, genellikle katyonik olan polimerler ile, anyonik siRNA'nın elektrostatik etkileşimler yoluyla kompleks oluşturması yoluyla elde edilmektedir. Bu oluşan kompleks polipeks olarak adlandırılır ve bu sistemler genellikle nano boyutlardadır. Nano boyutlara sahip olmaları nedeniyle siRNA'nın hücre membranından geçerek hücre içine taşınmasını sağlamaktadırlar.



Şekil 2.12. Etkili bir siRNA taşıyıcı sistem formülasyon tasarımında karşılaşılabilecek kritik adımlar (Akhtar ve Benter, 2007)

siRNA temelli polipleks oluşumu amacıyla çeşitli polimerler kullanılmaktadır (Holzerny ve diğerleri, 2012). Bunlar polietilenimin (PEI), kitozan, poli-L-lizin (PLL), polilaktik asit poli (D,L-laktid-ko-glikolid) (PLGA), L-alfa-dioleoil fosfotidiletanolamin (DOPE) ve lipofektamindir (Oh ve Park, 2009). Bu polimerler arasında kitozan biyouyumlu, biyoparçalanabilir, non-toksik, doğal kaynaklı ve yüksek katyonik potansiyele sahip bir biyopolimer olduğu için siRNA taşınması amacıyla dikkat çekmektedir (Bozkır ve Saka, 2004). Bu biyopolimerin siRNA bozunmasını çeşitli uygulama yollarıyla hem in vitro hem de in vivo olarak azalttığı ve hücresel alımını

artırdığı bilinmektedir (Mao, Sun ve Kissel, 2010). Ayrıca kitozanın siRNA stabilitesini ve farmakokinetiğini değiştirebildiği de yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Gao ve diğerleri, 2009).

2.4.7. siRNA'nın inflamatuvar bağırsak hastalığında kullanımı

İnflamatuvar bağırsak hastalığının patogeneğinde proinflamatuvar bir sitokin olan tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) önemli bir rol oynamaktadır (Iqbal ve diğerleri, 2018) ve son yıllarda yapılan çalışmalarda siRNA kullanılarak bu proinflamatuvar sitokinlerin üretiminin baskılanması yaklaşımı dikkat çekmektedir (Guo, Jiang ve Gui, 2016; Kriegel ve Amiji 2011). Tedavide genel yaklaşım kullanılan taşıyıcı sistemle siRNA'nın inflamasyon bölgesine ulaşana kadar bozunmadan korunması ve bu bölgede inflamasyondan sorumlu mRNA genini susturarak TNF- α ekspresyonunun azaltılması şeklindedir. İnflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisinde siRNA kullanılarak yapılan çalışmalar Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.6. İnflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisinde siRNA'nın kullanıldığı çalışmalar

Formülasyon tipi	Formülasyon bileşenleri	Çalışma Türü	Kaynak
Nanopartikül	Kalsiyum Fosfat/PLGA	In vivo-Oral Uygulama	Frede ve diğerleri, 2016
Polimerzom	PEG-P(TMC-DTC)-PEI TKPR-PEG-P(TMCDTC)	In vivo-İntravenöz Uygulama	Xu ve diğerleri, 2019
Nanopartikül içeren hidrojel	PLA-PEG blok kopolimer Kitozan-Aljinat	In vivo-Oral Uygulama	Laroui ve diğerleri, 2014a
Nanopartikül	PLA-PVA	In vivo-Oral Uygulama	Laroui ve diğerleri, 2011
Nanolipozom	DOTAP	Ex vivo-Kolon dokusu	Bochicchio ve diğerleri, 2017
Nanopartikül içeren hidrojel	Kitozan-Aljinat	In vivo-Oral uygulama	Xiao ve diğerleri, 2014
Nanopartikül	Kitozan	In vivo-Oral uygulama	He ve diğerleri, 2015
Nanopartikül	Tiyoketal	In vivo-Oral Uygulama	Wilson ve diğerleri, 2010
Nanolipozom	DOTAP	Ex vivo-Kolon dokusu	Russo ve diğerleri, 2017
Nanopartikül	PLA-PVA Polietilen imin	In vivo-Oral Uygulama	Laroui ve diğerleri, 2014b
Nanopartikül yüklü mikroküre	Jelatin-PCL	In vivo-Oral Uygulama	Kriegel ve Amiji., 2011
Nanopartikül yüklü nanolif	Kitozan-PLGA	In vitro-Hücre Kültürü	Chen ve diğerleri, 2012

2.5. Üç Boyutlu Baskı ve Üç Boyutlu Biyobaskı Teknolojileri

2.5.1. Üç boyutlu baskı teknolojisi

Üç boyutlu (3B) baskı teknolojisi genel olarak bilgisayar kontrollü tasarımlardan, tamamlanmış üç boyutlu bir nesne elde edilene kadar malzemelerin ardışık katmanlarda biriktirilmesi, bağlanması veya polimerleştirilmesi yoluyla bir yapı üretme işlemidir (Yan ve diğerleri, 2018; Liu ve diğerleri, 2018; Bhatia ve diğerleri, 2017). Son yıllarda hızla gelişen bu teknoloji, otomotiv, havacılık, gıda sanayi ve biyomedikal uygulama gibi geniş bir yelpazede uygulama alanına sahiptir (Zhu ve diğerleri, 2016; Lepowsky ve Taşoğlu, 2018). Birçok firma 3 boyutlu yazıcılar kullanarak tasarım hatalarını ve düzeltilmesi gereken ticari riskleri en aza indirerek üretim sürecini hızlandırmaktadır. Bu nedenle 3D baskı teknolojisi, geleneksel olarak kullanılan üretim tekniklerine göre daha ekonomiktir. Üç boyutlu baskı teknolojisinin biyomedikal ve farmasötik alanda birçok uygulaması bulunmaktadır (Gültekin ve diğerleri, 2022). Bunlar; ilaç taşıyıcı sistemler, yapay doku-organ üretimi (Derby, 2012), doku rejenerasyonu, implant-stent üretimi olarak sıralanabilir. 3B baskı tekniklerinin farmasötik alanda kullanımı, ilk 3B baskı ile üretilmiş olan Aprelia Pharmaceuticals şirketine ait, Spritam isimli ilacın Ağustos 2015'te FDA tarafından onaylanması ile artmaya başlamıştır (Goole ve Amighi, 2016). Farklı başlangıç malzemeleri ve çalışma prensiplerine sahip 3D baskı teknolojileri bulunmaktadır.

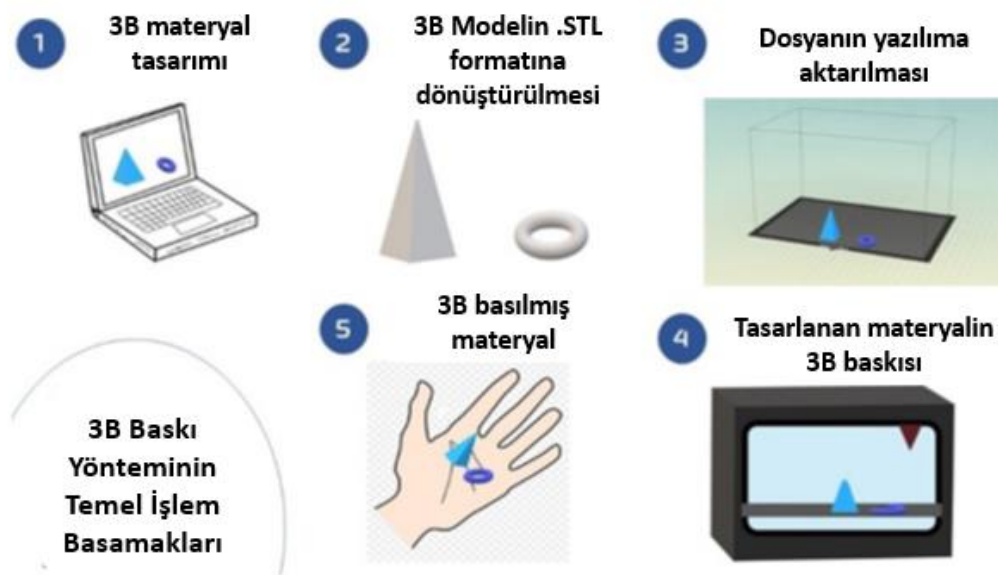
Üç boyutlu baskı teknolojisinin farmasötik alanda sağladığı avantajlar

Farmasötik alanda 3B baskı teknolojinin uygulanmasını cazip kılan sebepler, farmasötik ürünlerin kompleks yapısı, kişiselleştirilmiş tedavinin ve isteğe bağlı üretimin sağlanması olmuştur (Norman ve diğerleri, 2017). İlaç taşıyıcı sistemlerden beklenen özelliklerin sağlanabilmesi kompleks yapılar ile mümkün hale gelmektedir. Tek bir ilaç şeklinde birden fazla etki sağlamak, birden çok etken maddenin bir arada verilmesi, çoklu tabakaya sahip ilaç şekilleri üreterek her bir tabakanın farklı salım özellikleri göstermesi gibi nispeten kompleks yapılar için 3B baskı teknolojisini kullanmak mümkündür. Kişiye özgü tedavi bu teknolojinin sağladığı başlıca avantajlardandır. Bu teknolojisi ile kişinin anatomisine özgü ve ihtiyacı

doğrultusunda, dokular, implantlar, doku iskeleleri, stentler, protezler, organların üretilmektedir. Ayrıca bu teknoloji kullanılarak dar terapötik pencereye sahip ve ilaç şekli haline getirilmesi zor etken maddeler için kişiye özgü dozlama yapmak mümkündür (Vakili ve diğerleri, 2015; Wu ve diğerleri, 2009; Saydam ve Takka, 2020). Anında ve talep doğrultusunda üretim imkânı sağlayarak, gereksiz maliyetlerin önüne geçilmesini, hasta uyuncunun artmasını ve hastanın farmakoterapisinin doğru bir şekilde yapılmasını mümkün kılması yine 3B baskı teknolojisini ön plana çıkarmaktadır (Lim ve diğerleri, 2018). Farmasötik alanda, 3B baskı teknolojisiyle, basit bir işlemle, doğru, ucuz, ihtiyaca göre yapılandırılmış ve kişiye özel ilaç taşıyıcı sistemler tasarlamak mümkün hale gelmiştir (Goole ve diğerleri, 2016). Bu teknolojiyle, belirli bir geçirgenlik, gözeneklilik, hidrofobiklik/hidrofiliklik veya işlevsellik ile karakterize fonksiyonel yapılar elde edilebilir (Sandler ve diğerleri, 2011).

Üç boyutlu baskı teknolojisinin işlem basamakları

Üç boyutlu baskı teknolojisinin aşamaları genel olarak; tasarım, tasarımın makine tarafından okunabilir bir formata dönüştürülmesi, hammaddenin işlenmesi, baskı işlemi ve işlem sonrası düzenleme olarak sıralanabilir (Norman ve diğerleri, 2017; Gibson ve diğerleri, 2015; Zhu ve diğerleri, 2016) (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. 3B baskı yönteminin temel işlem basamakları

Temel üç boyutlu baskı teknolojileri

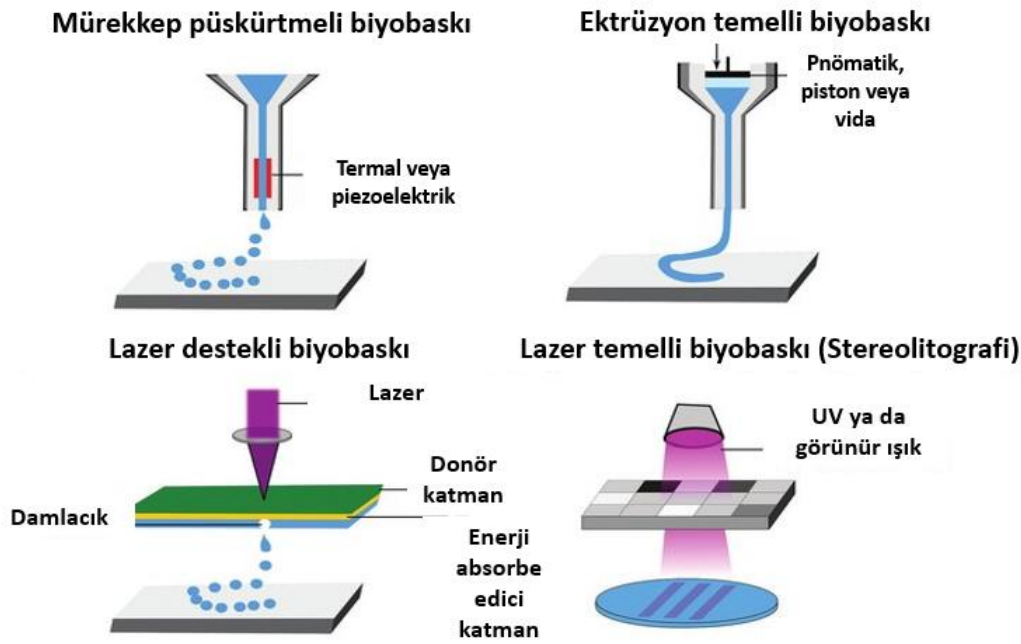
Baskı mekanizmalarına ve baskıda kullanılan materyallere göre çeşitli baskı teknolojileri bulunmaktadır. Bunlar bağlayıcı veya materyal püskürtme, toz yatağı kaynaşımı, fotopolimerizasyon, mürekkep püskürtmeli baskı ve ekstrüzyon temelli baskı olarak temel başlıklar altında sıralanabilmektedir. Bu teknolojilerden en çok kullanılanları eriyik birikim modelleme teknolojisi, lazer temelli baskı teknolojisi (stereolitografi), mürekkep püskürtmeli baskı teknolojisi.

2.5.2. Üç boyutlu biyobaskı teknolojisi

Üç boyutlu biyo baskı teknolojisi, tıpkı üç boyutlu baskı teknolojisi prensipleriyle çalışan hücreler, dokular, yapay organlar, biyomalzemeler, çipler, hidrojeller gibi biyolojik materyallerin üretilmesini sağlayan teknolojidir (Derakhshanfar ve diğerleri, 2018; Peng ve diğerleri, 2017). Materyal olarak 'biyo-mürekkep' adı verilen biyomateryalleri kullanır. Bilgisayar destekli tasarım programları kullanılarak, tasarlanan ürün elde edilinceye kadar biyomürekkepler kullanılarak katman katman basım yapılır (Melchels ve diğerleri, 2011).

2.5.3. Temel üç boyutlu biyobaskı teknolojileri

Üç boyutlu biyobaskı teknolojileri, lazer temelli biyobaskı (stereolitografi), lazer destekli biyobaskı, mürekkep püskürtmeli biyobaskı ve ekstrüzyon temelli biyobaskı olarak sıralanabilir (Şekil 2.14). Bu teknolojiler, mekanizmaları, çalışma prensipleri, avantajları ve zorlukları açısından farklılık göstermektedir (Çizelge 2.7).



Şekil 2.14. Üç boyutlu biyobaskı teknolojileri (Foyt ve diğerleri, 2018)

Ekstrüzyon temelli biyobaskı teknolojisinde, yüksek viskoziteli biyomürekkepler kullanılarak baskı yapılır. Yöntemde kullanılan biyomürekkep mekanik veya pnömatik kuvvetler yardımıyla şırıngadan akıtılır. Biyomürekkep mekanik kuvvet kullanılan biyoyazıcılarda şırıngada bulunan piston/vida yardımıyla, pnömatik kuvvet kullanılan biyoyazıcılarda ise şırıngaya uygulanan basınç yardımıyla akar (Zhang ve diğerleri, 2018; Skardal ve diğerleri, 2015). Bu yöntemde genellikle psödoplastik malzemelerle daha kolay çalışılır. Bu yazıcıların başlıca avantajı yüksek hücre yoğunluklarında çalışılabilme olanağı sunmasıdır ancak bunun yanında hücrelerin canlı kalma yüzdesi diğer yöntemlere göre daha düşüktür (Murphy ve Atala, 2014; Nakamura ve diğerleri, 2010). Lazer temelli biyobaskı teknolojisinde 3B baskı için lazer enerjisi kullanılır. Yöntemde ışık ile etkileşime giren bir biyomürekkep üzerine lazer ışını gönderilir ve istenilen yapı elde edilinceye kadar tabaka tabaka bu işleme devam edilir (Guillotin ve diğerleri, 2010; Barron ve diğerleri, 2004). Lazer destekli biyobaskı teknolojisinde, lazer ışını biyomürekkepe gönderilir ve bu işlem ile baskı tamamlanır. Biyomürekkepler ışığı absorbe edebilen titanyum veya altın bir katmanla desteklenir ve biyomürekkepler ve hücreler bu katman sayesinde askıya alınır. Bu yapıya lazer ışını gönderilmesiyle biyomürekkep buharlaşarak damlacık oluşturur ve bu damlacıklar ile boyutlu yapı elde edilene kadar işlem tekrarlanır (Catros ve diğerleri, 2011; Cudapati ve diğerleri,

2014). Mürekkep püskürtmeli (inkjet) biyobaskı teknolojisinde ise termal enerji ya da piezoelektrik enerji olmak üzere iki çeşit baskı yapılmaktadır. Bu yöntemde biyomürekkep damlalar halinde katman katman basılır. Bu yöntemlerden termal baskı teknolojisinde biyoyazıcı başlığı elektriksel olarak ısıtılmaktadır. Hücrelere zarar verebilmesi, kartuşun küçük çapı dolayısıyla fazla hücre yoğunluğunun kullanılamaması, yüksek viskoziteli sıvıların kullanılamaması ve damla boyutlarının her seferinde eşit olmaması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Piezoelektrik baskı teknolojisinde ise piezoelektrik kristaller kullanılır ve bu sayede basınç oluşturulur. Oluşan basınçla sıvı damlanın enjektörün ucuna gitmesiyle baskı sağlanır. Mürekkep püskürtmeli baskı teknolojisinde sıvı materyaller kullanılır, yüksek hücre yoğunlukları kullanılamaz ve baskı işlemi bittikten sonra materyalin iyileştirilmesi gerekmektedir (Zhang ve diğerleri, 2019; Fang ve diğerleri, 2012; Saunders, Gough ve Derby, 2008).

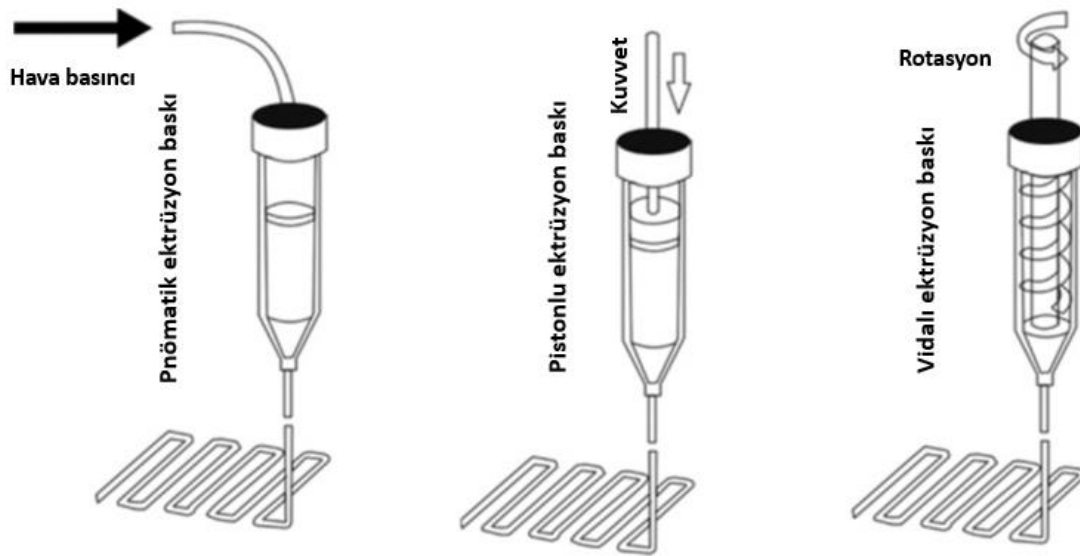
Çizelge 2.7. 3B Biyobaskı teknolojilerinin karşılaştırılması

Yöntem	Mekanizma	Maliyet	Hız	Zorluklar	Avantajlar
Mürekkep püskürtmeli 3B biyobaskı	Termal, mekanik, piezoelektrik kuvvetler	Düşük	Hızlı	Düşük viskoziteli materyal gerekliliği	Kolay ulaşılabilir olması
Ekstrüzyon temelli 3B biyobaskı	Termal, mekanik, pnömatik kuvvetler	Orta	Orta hız	Baskı esnasında hücreye zarar verme potansiyeli	Yüksek viskoziteli materyallerle çalışabilme imkanı
Lazer temelli 3B biyobaskı	Optik (dijital ışık)	Yüksek	Yavaş	Düşük materyal çeşitliliği	Yüksek hücre yoğunluğuyla çalışılabilme imkanı
Lazer destekli 3B biyobaskı	Optik (lazer ışını)	Yüksek	Yavaş	Düşük materyal çeşitliliği	Üretim kesinliğinin yüksek olması

2.5.4. Ekstrüzyon temelli 3B biyobaskı

Ekstrüzyon tabanlı biyobaskı teknolojisinde, baskı yüksek viskoziteli biyomürekkepler kullanılarak yapılır. Yöntemde kullanılan biyomürekkep, mekanik veya pnömatik kuvvetler yardımıyla şırıngadan akar. Biyomürekkep mekanik kuvvet kullanan yazıcılarda piston/vida yardımıyla, pnömatik kuvvet kullanan yazıcılarda ise şırıngaya uygulanan basınç ile akar (Şekil 2.15). Bu yöntemde psödoplastik malzemelerle çalışmak genellikle daha kolaydır (Zhang ve diğerleri, 2018; Skardal ve diğerleri, 2015). Ekstrüzyon tabanlı biyobaskı teknolojisi, basitliği, çeşitliliği ve öngörülebilirliği nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Mürekkep püskürtmeli biyobaskı ile karşılaştırıldığında, ekstrüzyon tabanlı biyobaskı daha yüksek hücre

yoğunluğu sağlar. Baskı malzemesi olarak çok çeşitli biyomalzemelerin kullanılabilmesi ve ucuz ekipman ekstrüzyon tabanlı biyobaskı teknolojisinin avantajları arasındadır (Derakhshanfar ve diğerleri, 2018). Ayrıca mürekkep püskürtmeli biyoyazıcıların damlacık sisteminden farklı olarak bu teknoloji ile sürekli akış sağlanabilir. Bu sürekli akış, biyoyazıcıya bağlı yazılım tarafından yürütülür. Ekstrüzyon tabanlı biyobaskılamamanın en büyük sınırlamalarından biri, hücresel yapının bozulmasıdır ve biyo-mürekkep akışı için kullanılan basınç, hücresel canlılığı etkiler (Bishop ve diğerleri, 2017). Ekstrüzyon bazlı baskı yöntemleri pnömatik, pistonlu ve vidalı sistemlerdir. Pnömatik yöntemde hava basıncı gerekli itici gücü sağlarken, piston ve vida yöntemlerinde dikey kuvvetler ve dönme kuvvetleri baskı işleminin başlamasını sağlar. Ekstrüzyon tabanlı biyobaskı teknolojisinde baskıdan önce biyomürekkeplerin viskozitesinin ve yüzey geriliminin ayarlanabilirliği ve biyomürekkeplerin yapısının değerlendirilmesi 3B baskı için oldukça önem taşımaktadır. Viskozite ve yüzey gerilimi değeri ekstrüzyon temelli baskı teknolojisinde kritik parametrelerdir ve biyomürekkebin basılabilirliğini doğrudan etkilemektedir. Viskozite ve yüzey gerilimi değerleri yani biyomürekkebin basılabilirliği, biyomürekkep hazırlanmasında kullanılan materyallerin değişimine bağlı olarak değişebilmektedir. Herhangi bir uygulama için gerekli mekanik özelliklerin elde edilebilmesi için kullanılacak malzemelerin özellikleri baskı öncesi ayarlanmalıdır.



Şekil 2.15. Farklı mekanizmaya sahip ekstrüzyon temelli 3B biyobaskı teknolojileri

2.5.5. Üç boyutlu biyobaskı teknolojisinin kullanım alanları

Üç boyutlu biyobaskı teknolojisinin özellikle biyomedikal alanda kullanımı yaygındır. Doku mühendisliği, organ rejenerasyonu gibi alanlarda kullanılmaktadır. Bu alanlara örnek olarak kemik ve kıkırdak doku mühendisliği, yapay kan damarı üretimi, cilt dokusu rejenerasyonu, karaciğer, kulak, mesane, göz ve beyin gibi organların rejenerasyonu veya yapay organ üretimi verilebilir.

2.5.6. Üç boyutlu biyobaskı teknolojisinin farmasötik alanda kullanımı

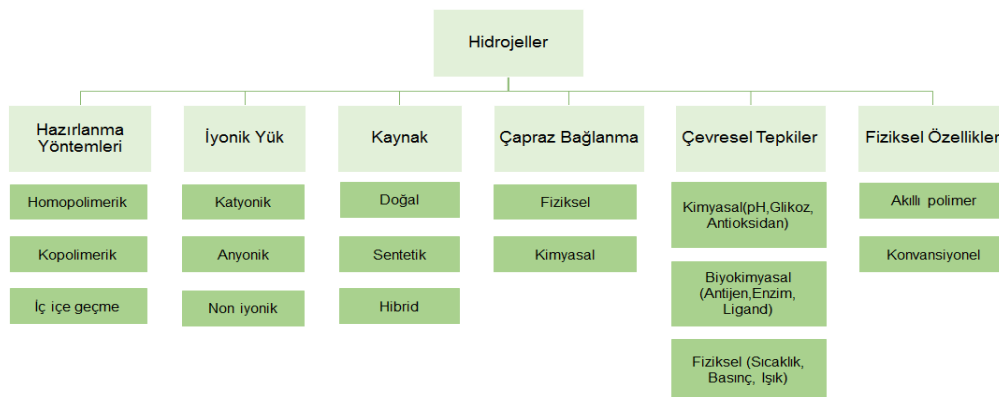
Üç boyutlu biyobaskı teknolojisinin eczacılık alanında birçok uygulaması vardır. Üç boyutlu biyobaskı, farmasötik alanda ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi, ilaç etkisinin, toksisitesinin ve metabolizmasının araştırılması için hücre ve doku modellerinin üretilmesi gibi amaçlarla kullanılmaktadır. İlaçların çeşitli mekanizmalarının, etkilerinin ve toksisitelerinin izlenmesi ve bilinmesi, ilaç araştırma ve geliştirme çalışmaları için büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla gereksiz hayvan kullanımı etik açıdan uygun olmadığı için genellikle hayvan modellerinden yararlanılmaktadır. Bu teknoloji ile üç boyutlu doku hücre modellemesi yapılarak ilacın özelliklerini izlemek mümkün olmaktadır. Üç boyutlu biyobaskı teknolojisi kullanılarak ilaç yüklü hidrojel ve iskele gibi ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi mümkündür (Lee ve diğerleri, 2019).

Üç boyutlu biyobaskı teknolojisi ile hasta anatomisine en uygun ilaç taşıyıcı sistem üretilerek tedavi etkinliğinin ve hasta uyuncunun artırılması amaçlanmaktadır. Üç boyutlu biyobaskı ile elde edilen ilaç taşıyıcı sistemlerin biyouyumluluk ve yapısal bütünlük gibi özelliklere sahip olması beklenmektedir. Bu teknoloji kullanılarak ilaç taşıyıcı sistem üretmenin birçok avantajı vardır. Birbirleri ile geçimsiz etkin maddeler, aynı ilaç taşıyıcı sistem içerisinde hastaya uygulanabilir. 3B biyobaskı teknolojisi kullanılarak üretilen ilaç taşıyıcı sistem, çoklu ilaç salımı gerçekleştirecek şekilde ayarlanabilmektedir. İlaçların hastaya verildikten sonra yaşadığı değişiklikler ADME (absorpsiyon, dağılım, metabolizasyon, atılım) olarak tanımlanır. Üç boyutlu biyobaskı teknolojisi ile canlı dokuların in vitro modellenmesi gerçekleştirilebilmektedir. Bu in vitro modelleme ile ilaçların tüm bu emilim, dağılım, metabolizasyon ve atılım süreçleri takip edilebilmekte ve bu sayede kişiye özel

tedavinin etkinliği artırılabilir. Üç boyutlu biyobaskı teknolojisi ile üretilmiş bu modeller ile ilaç hedefleme etkinliğini arttırmak mümkündür. Ayrıca ilaç araştırmalarında 3B biyobasılmış in vitro hücre modelleri kullanılarak ilacın etkinliği ve toksisitesi izlenebilmektedir. Böylece gereksiz hayvan kullanımı ve ilaç araştırma maliyetlerinin düşürülmesi mümkün olmaktadır.

2.6. Hidrojeller

Hidrojeller, hidrofilik polimer zincirlerinin kovalent bağlarla çapraz bağlanması ya da molekül içi fiziksel etkileşimlerle bir arada tutularak birleşmesi ile oluşmuş üç boyutlu ağ yapısıdır (Ju ve diğerleri, 2002). Çözünmeden ve orijinal şekillerini koruyarak ağırlıklarının %20'sinden fazla miktarda su veya biyolojik sıvıyı absorplayabilirler (Gupta, Vermani ve Garg, 2002; Hoffman, 2012). Şişmiş durumda bulunan hidrojellerin yapısı yumuşak ve porozitesi yüksektir ve canlı dokulara büyük oranda benzemektedir (Qu, Wirsén ve Albertsson, 2000). Polimerin yapısına göre degrade olma özelliklerinin ayarlanabilmesi sebebiyle peptit-protein yapıdaki maddelerin taşınması için kullanılabilir, ara yüzey gerilimleri düşüktür ve dolayısıyla madde adsorpsiyonu minimum düzeydedir, immunojenite göstermezler (Peppas ve diğerleri, 2000; Peppas ve diğerleri, 1991). Ayrıca yapılarında bulunan çapraz bağlar sayesinde yüksek su içeriklerine rağmen çözünmedikleri için; ilaç taşıyıcı sistem, yara örtüsü, biyosensör, lens, kateter olarak özellikle doku mühendisliğinde olmak üzere biyomedikal alanda geniş bir uygulama alanına sahiptirler (Hoffman, 2012; Peppas ve diğerleri, 2000). Hidrojeller çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Şekil 2.16'da hidrojellerin sınıflandırılma biçimleri özetlenmiştir.



Şekil 2.16. Hidrojellerin sınıflandırılması (Bahram, Mohseni ve Moghtader, 2016)

İdeal bir hidrojel; yüksek absorpsiyon kapasitesi, yüksek saflık, depolama ve kullanım sırasında yüksek stabilite, suda şişme sonrası nötr pH'ya sahip olma, renksizlik, kokusuzluk, toksik olmama, ışıktan etkilenmeme, yeniden ıslanabilirlik, yüksek biyobozunabilirlik ve düşük maliyet gibi özelliklere sahip olmalıdır (Ahmed, 2015).

2.6.1. Hidrojel üretim yöntemleri

Hidrojellerin temel olarak çapraz bağlanmış hidrofilik polimer ağlarıdır. Bu nedenle hidrojel üretimi için monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı gerekmektedir. Temel olarak hidrojel üretim yöntemlerinin mekanizması şu şekilde sıralanmaktadır:

1. Polimer zincirlerinin kimyasal reaksiyon yoluyla bağlanması
2. Çapraz bağ bağlantıları olarak yeniden birleşebilen ana zincir serbest radikallerini üretmek için iyonlaştırıcı radyasyon kullanmak
3. Dolaşma, elektrostatik ve kristal oluşumu gibi fiziksel etkileşimler

Hidrojel üretimi monomerlerin çapraz bağlayıcı yardımıyla polimerizasyonuna dayanmaktadır. Bu amaçla çeşitli polimerizasyon yöntemleri kullanılmaktadır.

Kütle polimerizasyonu

Kütle polimerizasyonu yöntemi hidrojel üretimi için kullanılan en basit yöntemdir. Bu yöntemde monomerler ve bu monomerlerde çözünebilen başlatıcılar kullanılmaktadır. Monomer derişiminin yüksek olması sebebiyle polimerizasyon hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir ve polimerizasyon derecesi yüksektir. Reaksiyon sırasında ısının artması ile viskozitede artış gözlenmesi bu yöntemin en büyük dezavantajlarından ancak reaksiyon sırasında ısının kontrol edilmesiyle bu problem önlenabilmektedir (Kiatkamjornwong, 2007; Ahmed, 2015).

Çözelti polimerizasyonu/çapraz bağlama

Bu yöntemde nötr veya iyonik yapıdaki monomerlerle çapraz bağlayıcı madde karıştırılır ve polimerizasyon UV ışını veya bir redoks başlatıcı sistem ile başlatılır. Reaksiyonda soğutucu görevi yapan bir çözücünün olması bu yöntemin kütle polimerizasyonu yöntemine göre en büyük avantajıdır. Bu yöntemde hazırlanan hidrojellerin ortamda bulunan fazla çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve çapraz bağlanmamış monomerlerin uzaklaştırılması amacıyla yıkanması gerekmektedir. Ayrıca heterojen bir yapıya sahip hidrojel üretilmesinin engellenmesi için ortamdaki su dengesinin ayarlanması gerekmektedir. Çözelti polimerizasyonu için en çok kullanılan çözücüler su, etanol, su-etanol karışımları ve benzil alkoldür (Ahmed, 2015).

Süspansiyon polimerizasyonu veya ters süspansiyon polimerizasyonu

Bu yöntemde elde edilen hidrojeller toz veya mikroküreler halinde elde edilmektedir ve öğütme işleminin gerekmemesi yöntemin en büyük avantajıdır. Yağ/su yerine su/yağ işlemi kullanıldığı için yöntem ters polimerizasyon denilmektedir. Yöntemde temel olarak monomerler ve başlatıcı hidrokarbon fazında dağıtılır. Reaksiyonda monomer çözeltisinin viskozitesi, karıştırma hızı, dağıtıcı tipi önemli parametrelerdendir. Yöntemin en büyük dezavantajları hazırlanan dispersiyonun termodinamik olarak kararsız olması ve bu nedenle sürekli çalkalama gerektirmesi ve düşük hidrofilik-lipofilik denge (HLB) değerine sahip bir süspansiyon ajanı kullanılmasının gerekliliğidir (Ogata ve diğerleri, 2006; Ahmed, 2015).

Bir desteğe aşılama

Kütle polimerizasyonu yöntemi ile hazırlanan hidrojeller mekanik olarak zayıf özelliktedir. Bu yöntemde zayıf olan mekanik özelliklerini iyileştirmek amacıyla hidrojeller mekanik olarak daha güçlü bir polimerik destek üzerine kaplanmış bir yüzeye aşılatabilmektedir. Bu aşılama sonucunda monomer zincirlerinin polimerik destekle oluşturduğu kovalent bağlar ile polimerizasyon işlemi bu destek üzerinde gerçekleşir (Talaat ve diğerleri, 2008; Qunyi ve Ganwei, 2005).

Işınlama ile polimerizasyon

Bu yöntemde gama ışınları ve elektron ışınları gibi yüksek enerjiye sahip ışınlar polimerizasyon için reaksiyon başlatıcı olarak kullanılmaktadır. Sulu polimer çözeltisine ışın gönderilmesiyle polimer zincirleri üzerinde serbest radikaller oluşur ve suyun radyolizi ile de makro radikallerin oluşumunu sağlayan hidroksil radikalleri oluşur. Makro radikallerin polimer zincirleriyle kovalent bağ oluşturması sonucu çapraz bağlı hidrojel yapısı oluşmaktadır. Işınlama ile polimerizasyonun diğer yöntemlere göre en büyük avantajı başlatıcı olarak kimyasal bir madde kullanılmaması ve dolayısıyla daha saf bir hidrojel elde edilebilmesidir. Bu yöntemle hidrojel elde edilmesi amacıyla en çok kullanılan polimerler polivinil alkol, polietilen glikol ve poliakrilik asittir (Karadağ, Saraydın ve Güven, 2001; Ajji ve diğerleri, 2008).

2.6.2. Hidrojellerin çapraz bağlama yöntemleri

Hidrojeller üretilirken bir çapraz bağlama yöntemi seçilerek polimerin özellikleri değiştirilir ve iyileştirilir. Çapraz bağlama sonucu hidrojin; elastik özelliği, viskozitesi, çözünürlüğü, sertlik ve dayanıklılığı, erime noktası, camsı geçiş sıcaklığı, polimerin termoset veya termoplastik özellikleri değişebilmektedir (Maitra ve Shukla, 2014). Hidrojeller çeşitli yöntemlerle çapraz bağlanabilmektedir. Çapraz bağlama yöntemleri fiziksel ve kimyasal yöntemler olmak üzere iki başlık altında değerlendirilebilir. Bu zamana kadar çeşitli çapraz bağlama yöntemleri denenmiştir (Çizelge 2.8). Hidrojel hazırlarken seçilecek çapraz bağlama yöntemi, hidrojelden beklenen özelliğe göre seçilebilmektedir. Çapraz bağlama yöntemlerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda; gama ışını ile çapraz bağlamanın daha büyük por çapına ve dolayısıyla porozitenin azalmasına neden olduğu ve mekanik özelliklerinin gelişmesini sağladığı (Kim ve diğerleri, 2016); enzimatik çapraz bağlama ile hidrojellerin daha fazla şişme oranı gösterdiği; ultrasonikasyonla çapraz bağlamada yavaş salım ve yavaş degradasyon gözlemlendiği ancak hidrojin stabilitesinin bir süre sonra bozulduğu (Das ve diğerleri, 2015); genipin kullanılarak çapraz bağlamanın, glutaraldehit ve N'-(3-dietilaminopropil) karbodiimid (EDC)/sülfo-N-hidroksisülfosüksinimit (NHS) 'ye göre toksisite açısından daha uygun olduğu belirlenmiştir (Whittaker ve diğerleri, 2014). Ayrıca genel olarak fiziksel çapraz bağlama yöntemlerinde kimyasal yöntemlerle karşılaştırıldığında

elde edilen hidrojin viskozitesinin daha fazla olduğu, proteinlerin modifikasyonu, yapısal bozunma ve inflamasyon gibi dezavantajlara sahip olmadığı gözlenirken, kimyasal çapraz bağlanan hidrojelde fiziksele göre artmış salım ve yükleme kapasitesi gözlenmiştir (Kim ve diğerleri, 2016).

Çizelge 2.8. Hidrojellerin çapraz bağlanma yöntemleri

Çapraz Bağlama Yöntemi/ Çapraz Bağlama Amacıyla Kullanılan Ajan	Kaynak
Sonikasyon	Diab ve diğerleri, 2012; Hu ve diğerleri, 2010; Das ve diğerleri, 2015; Guzewicz ve diğerleri, 2011; Wang ve diğerleri, 2008; Lovett ve diğerleri, 2015; Kim ve diğerleri, 2016; Xiao ve diğerleri, 2012; Zhang ve diğerleri, 2011
Vortex	Yucel, Cebe ve Kaplan, 2009
Gama ışını	Intavisade ve Oonkhanond, 2010; Kojthung ve diğerleri, 2008
Gluteraldehit	Rujiravanit ve diğerleri, 2003
EDC/NHS	Siridamrong, Phrotjanatharee ve Thamronganaskul, 2016
EDC	Lv ve diğerleri, 2007
Metanol/Etanol	Gil, Spontak ve Hudson, 2005
Kimotripsin	Samal ve diğerleri, 2013
Mantar tirozinaz	Kang ve diğerleri, 2004; Das ve diğerleri, 2015
PVA+Gama ışını	Hanpanich ve diğerleri, 2011
Formik asit	Ming ve diğerleri, 2016
PEG	Wang ve diğerleri, 2015
Gliserol	Lu ve diğerleri, 2009
Gliserol+Jelatin	Rodriguez ve diğerleri, 2017
Rutenyum	Whittaker ve diğerleri, 2014
Sodyum dodesil sülfat	Wu ve diğerleri, 2012
Soforolipid	Dubey ve diğerleri, 2018
Genipin	Silva ve diğerleri, 2008
Hidrojen peroksidad	Zhao ve diğerleri, 2016
Metil selüloz	Park ve diğerleri, 2013
Yabanturpu peroksidad+Hidrojen peroksit	McGill ve diğerleri, 2017; Raia ve diğerleri, 2017; Sundarakrishnan ve diğerleri, 2016
NHS	Suttenun ve Punyamoongwongsa, 2015

2.6.3. Hidrojeller ve 3B biyobaskı

Hidrojelleri, 3B Biyobaskı teknolojisi kullanılarak da hazırlamak mümkündür. Hidrojeller biyobaskı için oldukça uygun materyallerdir, çünkü yapıları canlı dokulara oldukça benzemektedir ve biyobaskı ile canlı vücuduna büyük oranda uyumlu materyaller elde edilebilmektedir. Hidrojeller ile biyobaskı için viskozitelerine göre biyobaskı yöntemlerinden biri tercih edilebilmektedir. İpek fibroin biyobaskı yönteminde biyomürekkep olarak kullanılan bir materyaldir. İpek fibroinin biyoyumluluğu, biyobozunabilirliği, üstün mekanik özellikleri biyobaskı

teknolojisinde seçilme nedenleridir. Ancak ipek fibroinin jelleşme süresinin tek başına çok uzun olması sebebiyle, biyobaskı için kullanılırken yardımcı bir polimere ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca biyobaskı ile hazırlandıktan sonra mutlaka çapraz bağlayıcı bir ajanla çapraz bağlanması gerekmektedir. İpek fibroinin 3B biyobaskı teknolojisinde biyomürekkep olarak kullanıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Wang ve diğerleri, 2008; Yucel, Cebe ve Kaplan, 2009) (Çizelge 2.9).

Çizelge 2.9. İpek fibroinin 3B biyobaskı teknolojisinde biyomürekkep olarak kullanıldığı çalışmalar

Yardımcı Materyal	Çapraz Bağlama Yöntemi	Biyobaskı Yöntemi	Kaynak
Gliserin-Jelatin	Genipin	Ekstrüzyon bazlı biyobaskı	Huang ve diğerleri, 2019
Jelatin	Ultrasonikasyon-Tirozinaz	Ekstrüzyon bazlı biyobaskı	Das ve diğerleri, 2015
Aljinat	Yabanturpu peroksidaz	Mürekkep-püskürtmeli biyobaskı	Compaan, Christensen ve Huang, 2016
Poliol	Gliserin	Ekstrüzyon bazlı biyobaskı	Jose ve diğerleri, 2015
Jelatin	Gliserin	Ekstrüzyon bazlı biyobaskı	Rodriguez ve diğerleri, 2017
Jelatin	Genipin-Etanol	Mürekkep-püskürtmeli biyobaskı	Shi ve diğerleri, 2017

2.6.4. Hidrojellerin inflamatuvar bağırsak hastalığında kullanımları

Hidrojeller biyolojik sıvıyı absorplayarak şişmeleri sayesinde inflamasyon bölgesinde tutunarak etki süresini artırmaları, inflamasyon bölgesine hedeflendirilebilmeleri, çapraz bağlı olmaları sebebiyle hastalık bölgesine kadar degrade olmadan ilacı taşıyabilmeleri ve peptit-protein gibi biyomakromoleküller için taşıyıcı sistem olarak kullanılabilmesi nedeniyle, inflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisi için uygun ilaç şekilleridir (Zhang ve diğerleri, 2015; Zhai, Mantaj ve Vllasaliu, 2018). İnflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisinde hidrojellerin kullanıldığı çalışmalarda, inflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisi amacıyla kullanılan 5-aminosalisilik asit gibi konvansiyonel etken maddeler ve bovin serum albumin gibi biyolojik maddelerin hidrojele yüklenerek inflamasyon bölgesine hedeflenmesi sağlanmıştır (Bai ve diğerleri, 2016; Jain ve diğerleri, 2008; Aprodu ve diğerleri, 2019).

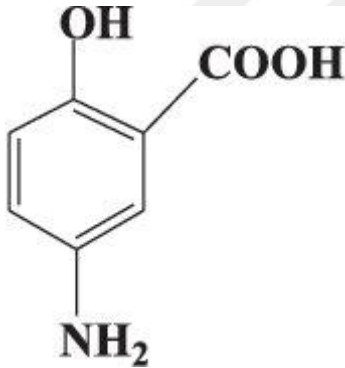
2.7. Mesalazin

Mesalazin (5-aminosalisilik asit), NF- κ B aktivasyonu ile uyarılan interlökinler ve TNF- α gibi çeşitli inflamasyon ajanlarını inhibe ederek etki gösteren hafif ve orta şiddette İBH tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir aminosalisilatıdır (Karagozian ve Burakoff, 2007).

2.7.1. Mesalazinin Fizikokimyasal Özellikleri

Kimyasal yapısı

Mesalazin, 5-amino 2-hidroksi benzoik asit yapısında aminosalisilat grubunda bir ilaçtır. Kapalı formülü $C_7H_7NO_3$ olarak gösterilmektedir (Şekil 2.17). Katı halde kokusuz veya zayıf bir kokuya sahiptir, sivri şekilli pembe kristal görünümündedir. Mesalazinin molekül ağırlığı 153,135 g/mol'dür ve erime derecesi 280 °C'dir (Arnold ve diğerleri, 2001).



Şekil 2.17. Mesalazinin kimyasal yapısı

Çözünürlük

Mesalazin amfoterik bir moleküldür. Çözünürlüğü ve iyonik karakterizasyonu molekülde yer alan amin ve karboksil gruplarının pKa'sına ve pH'ya bağlıdır. Mesalazinin sudaki çözünürlüğü 25 °C'de 0,844 mg/ml ve 37°C'de 1,41 mg/ml'dir. Mesalazinin çözünürlüğü pH 2'nin altında ve pH 5,5'in üzerinde artmaktadır, pH 2 ve pH 5,5 arasındaki pH değerlerinde ise çözünürlük en düşük değerdedir (French ve Mauger, 1993).

Mesalazin, dilüe hidroklorik asit ve dilüe alkali hidroksitte çözünmektedir, kloroform, eter, bütıl alkol, etil asetat, n-hekzan gibi organik çözücülerde çözünmemektedir (Arnold ve diğeri, 2001; French ve Mauger, 1993, Dash ve Brittain, 1998).

UV Spektrumu

Mesalazinin UV spektrumu 200-400 nm arasındadır. Maksimum absorbands verdiğı dalga boyu ise, asidik ortamda 300 nm, bazik ortamda 330 nm'dir (Dash ve Brittain, 1998).

2.7.2. Mesalazin etki mekanizması

İnflamatuvar bağırsak hastalığının patogenezi ve mesalazinin bu hastalıktaki etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. İBH patofizyolojisinde lökotrienler (LT), prostaglandinler (PG), sitokinler interlekin (IL)-1, IL-2 ve reaktif oksijenler gibi maddeler rol oynamaktadır. Hasta ve sağlıklı bireyler kullanılarak yapılan çalışmalarda, mesalazinin doza bağılı olarak LTB₄ inhibisyonu gerçekleştirdiğı ve PGE₂ seviyesinin hasta bireylerde sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğı görülmüştür. Mesalazinin İBH patofizyolojisinde etkili LTC₄, PGD₂, 5 hidroksieikosatetraenoik asit (HETE) ve trombosit aktive edici faktör seviyelerini düşürdüğü gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda mesalazinin interferon (IFN)- γ bağlanmasını inhibe ettiğı ve kolonik epitelyal hücrelerde IFN- γ ile indüklenen hücre geçirgenliğini azalttığı gözlenmiştir. Mesalazinin İBH'de önemli bir belirteç olan tümör nekroz faktörü (TNF)- α 'nın antiproliferatif etkilerini terse çevirerek, bağırsak hücrelerinde TNF- α aktivitesini inhibe ettiğı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca mesalazinin IL-1, IL-1 β ve IL-2 seviyelerini düşürmede ve reaktif oksijen türlerinin üretimini azaltarak oksidan kaynaklı doku hasarını engellemede etkili olduğı in vitro modeller kullanılarak kanıtlanmıştır (Clemett ve Markham, 2000).

2.7.3. Mesalazinin farmakokinetik özellikleri

Mesalazin oral olarak uygulandığında hızlı bir şekilde absorpsiyona uğrar ve ilacın çok az bir kısmı distal ince bağırsak ve kolona ulaşmaktadır. Yapılan bir çalışmada mesalazinin oral uygulamada kolona ulaşması için kolona hedefli ilaç taşıyıcı

sistemler geliştirilmiştir ve bu durumun doğrulanması amacıyla indiyumla işaretlenmiş preparatlar incelenmiş ve kolona hedefli ilaç taşıyıcı sistemle ile mesalazinin doğrudan distal bağırsağa ulaştığı gözlenmiştir (Brogden ve Sorkin, 1989). Mesalazinin kolona göre ince bağırsaktan emilimi daha fazladır. Rektal uygulanan dozaj formlarından ilaç absorpsiyonu oral uygulamaya göre farklılık göstermektedir. Bunun sebebi pH, dozaj formu ve formülasyonun farklı olmasıdır. Yapılan çalışmalarda rektal dozaj formlarından mesalazin absorpsiyonunun %10-30 arasında olduğu gösterilmiştir (Mooter ve Kinget, 1995).

Sağlıklı gönüllülerde mesalazinin ortalama maksimum plazma derişimi, 0,5 g intravenöz uygulamadan 5 dakika sonra 330 $\mu\text{mol/L}$ iken, 2,4 g mesalazin içeren kaplanmamış tabletten 2 saat sonra 234 $\mu\text{mol/L}$ bulunmuştur. Enterik kaplı tabletle aynı dozda mesalazin uygulandıktan 6 saat sonra 30 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuştur. Değişmemiş mesalazin plazma proteinlerine %43 oranında bağlanmaktadır. Ancak asetillenmiş metabolit %78 oranında plazma proteinlerine bağlanmaktadır. Mesalazinin dağılım hacmi kaplanmamış oral tablet uygulamasından sonra 18 L bulunmuşken, intravenöz uygulama sonrasında 25 L'dir.

Mesalazin büyük oranda idrardan asetillenmiş metaboliti asetilmesalazin şeklinde atılmaktadır. Bu asetilasyon asetilatör fenotipinden etkilenmemektedir ve geri dönüşsüzdür. İdrardan 4 saat içinde geri kazanımı ise kaplanmamış tabletlerden %50 iken, kaplı tabletlerden %13 olarak bulunmuştur. Toplam mesalazinin 7 gün boyunca feçesle atılımı remisyon dönemindeki hastalara göre aktif dönemdeki üseratif kolitli hastalarda daha fazladır. Bazı çalışmalarda mesalazinin bir dereceye kadar enterohepatik resirkülasyona uğradığı gösterilmiştir.

Asetil mesalazinin renal klirensi renal tübüler sekresyon baskın olduğu için glomerüler filtrasyon hızının 2-3 katı olarak bulunmuştur.

Mesalazinin plazma yarılanma ömrü 3,5 saattir. Ayrıca plazma yarılanma ömrü inflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastalarda enterik kaplı tablet ile tedaviden sonra 0,7-2,4 saat arasında değişirken, asetillenmiş metabolitin yarılanma ömrü mesalazinin 2 katıdır (Brogden ve Sorkin, 1989; Wiersma ve diğerleri, 2004).

2.7.4. Mesalazinin yan etki profili, stabilitesi ve toksisitesi

Yan etki profili

Mesalazin İBH tedavisinde oral ve rektal uygulamalarda genellikle iyi tolere edilmektedir. Ancak bazı çalışmalarda mesalazin kullanan hastalarda baş ağrısı, mide bulantısı, baş dönmesi, ateş, hazımsızlık, kas ağrısı, akut pankreatit, hepatotoksisite, interstisyel nefrit, perikardit, pnömoni ve saç dökülmesi değişik oranlarda görülmüştür. Bu belirtilerden en sık rastlanan baş ağrısı, baş dönmesi, mide bulantısı ve karın ağrısıdır (Shcroeder, Tremaine ve Ilstrup, 1987; Deltenre ve diğerleri, 1999; Corrigan ve Stevens, 2000; Pereria ve diğerleri 2021; Lim ve Fever 1994; Xie ve diğerleri, 2019). Mesalazin enemasının yan etkileri arasında lokal irritasyon da bulunmaktadır (Kutty ve diğerleri, 1982).

Bir çalışmada kontrollü salım yapan mesalazin tablet, plasebo tablet ile yan etkileri açısından karşılaştırılmış ve mesalazinin çoğu yan etkide plaseboyla benzer oranda yan etki gösterdiği gözlenmiştir (Arnold ve diğerleri, 2001).

Stabilitesi

Mesalazin sulu ortamda hızlı bir şekilde oksidasyona uğramaktadır, sulu ortamdaki oksidasyonu engellendiğinde stabil olduğu gözlenmiştir. Sulu ortamda ve pH 7'de dört farklı bozunma ürünü saptanmıştır (Dash ve Brittain, 1998).

Mesalazinin farklı farmasötik formlardaki stabilitesi yapılan farklı çalışmalarla incelenmiştir. Mesalazinin tablet ve supozituar formunda stabil olduğu ancak süspansiyon halinde 90 günün sonunda %10'luk bir bozunma olduğu gözlenmiştir (Dash ve Brittain, 1998).

Yapılan başka bir çalışmada mesalazinin stabilitesi farklı sulu ortamlarda ve farklı koşullarda incelenmiştir. Çalışma sonucunda mesalazinin bozunmasının iki farklı yolla olduğu gözlenmiştir. Bu yollardan ilki dekarboksilasyondur ve sonucunda 4-ASA oluşmaktadır, diğeri ise oksidasyondur ve oksidasyon sonucunda 5-ASA'nın aromatik halkasında sübstitüsyonla p-aminofenol oluşmaktadır (Palsmeier, Radzik ve Lunte, 1992).

Mesalazinin rektal süspansiyonu ile yapılan bir çalışmada, süspansiyon ışığa ve suya maruz bırakılmıştır. Işık ve suya maruziyette mesalazinin stabil olmadığı gözlenmiştir. Çünkü ışık ve su varlığında oksidasyona bağlı olarak parçalanma oluşmaktadır. Azot gazı altında kapatılıp hava geçirmez şartlarda saklandığında ise oksidasyonun minimuma indiği gözlenmiştir (Henderson, Johnson ve Berardi, 1994).

Mesalazinin biyolojik ortamdaki stabilitesi incelendiğinde ise, stabilitenin -80 °C'de plazmada sabit olduğu ancak -20 °C'de dört haftada dekompozisyona uğradığı görülmüştür (Dash ve Brittain, 1998).

Toksisitesi

Mesalazinin uzun süre kullanımında karsinojenik ve mutojenik bir etki bildirilmemiştir. Yapılan bir çalışmada 14,5 gram yüksek dozda mesalazin supozituar kullanan erkek bir hastada, hiperemi, rektal kanalda ödem ve 1,5 cm ülser görülmüştür. Ülserin daha sonra iyileştiği ve başka bir toksik etki bildirilmediği gözlenmiştir. Oral LD₅₀ hacmi erkek sıçanlarda 3,2 g/kg, dişi sıçanlarda ise 5,5 g/kg olarak bildirilmiştir (Dash ve Brittain, 1998; Köseoğlu ve diğerleri, 2011).

2.7.5. Mesalazinin inflamatuvar bağırsak alanında kullanımı

İnflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisinde bir ön ilaç olan sülfasalazin yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Mesalazin, sülfasalazinin aktif metabolitidir. Mesalazin 5-amino salisilik asit olarak da bilinmektedir ve salisilatların antiinflamatuvar etkisi bulunmaktadır. Sülfasalazin, mesalazin ve sülfapiridinin diazo bağlarıyla bağlanmasıyla oluşmaktadır. Mesalazinin büyük oranda mide ve bağırsaktan emilmektedir, uygulanan dozun %20'si termal ileum ve kolona ulaşmaktadır (Berends ve diğerleri, 2019; Moyer, 2008). Mesalazin N-asetil transferaz tarafından böbrekler veya dışkı yolu ile vücuttan uzaklaştırılan aktif olmayan bir bileşik olan N-asetil 5-salisilik asite metabolize edilir ya da etki edeceği bölgeye taşınır (Zhou ve diğerleri, 1999). Mesalazinin özellikle oral uygulamada gastrointestinal bölgenin üst kısımlarından emilimi gerçekleştiği için, düşük biyoyararlanım, hastalık bölgesine ulaşamama, beklenmeyen yan etkiler gibi problemleri bulunmaktadır (Iacucci, de

Silva ve Ghosh, 2010). Bu amaçla farklı tedavi stratejilerine ihtiyaç vardır ve bu kapsamda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada, mesalazin yüklü aljinat temelli enterik kaplı matris tabletler üretilmiş ve in vitro/in vivo çalışmalar sonucunda bu tabletlerin intestinal bölgeye kadar bozunmadan ulaşabildiği ve Crohn hastalığı tedavisi için uygun ilaç şekilleri olduğu gösterilmiştir (Tuğcu-Demiröz ve diğerleri, 2004). Bir diğer çalışmada farklı aljinat türleri kullanılarak mesalazin yüklü tabletler geliştirilmiş ve inflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde değerlendirilmiştir (Tuğcu-Demiröz ve diğerleri, 2007). Ayrıca İBH tedavisi için mesalazin yüklü kitozan temelli mikropartiküller, mesalazin ve balık yağı karışımı intrakolonik uygulanmıştır (Palma ve diğerleri, 2019; Yorulmaz ve diğerleri, 2019). Mesalazin ve budenosid ile hastalığın kombine tedavisi amacıyla da oral uygulama için tablet üretilmiştir (Gareb ve diğerleri, 2016). Akasya zamkı temelli mesalazin yüklü partiküller içeren tablet (Sharma ve diğerleri, 2019), mesalazin yüklü kalsiyum pektin-silika jel yapılı boncuklar (Günter ve diğerleri, 2018) ve mesalazin yüklü köpük (Haznar-Garbacz, Garbacz ve Weitschies, 2019) ilaç şekilleri de yine inflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde oral uygulama amacıyla üretilmiştir. Bir çalışmada ülseratif kolit tedavisinde rektal uygulama için mesalazin yüklü supozituar formülasyonu geliştirilmiş ve oral formülasyon ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada mesalazin yüklü supozituarların, oral uygulanan mesalazinden daha etkili bir tedavi sağladığı sonucuna varılmıştır (Gionchetti ve diğerleri, 1998). Vaja ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada ise İBH tedavisi için mesalazin yüklü mukoadesif pellet içeren supozituar formülasyonları geliştirilmiştir (Vaja ve Detroja, 2022).

2.8. Tezin Yenilikçi Yönü

İpek fibroin ipek böceği kozalarından elde edilen doğal kaynaklı bir biyopolimerdir ve antiinflamatuvar özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. 3B biyobaskı teknolojisi doku, organ, doku iskelesi üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak bu teknolojinin ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi amacıyla kullanımı yaygın değildir. Bu teknoloji ile istenilen tasarımda ve boyutlarda materyal üretilebilmesi ile kişiye özel tedavi sağlanması ve hücre, gen, doku gibi biyolojik materyallerin üretilebilmesi mümkündür. Bu avantajlar 3B biyobaskı teknolojisi kullanılarak ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesini cazip kılmaktadır. Mesalazin İBH tedavisinde yaygın bir şekilde

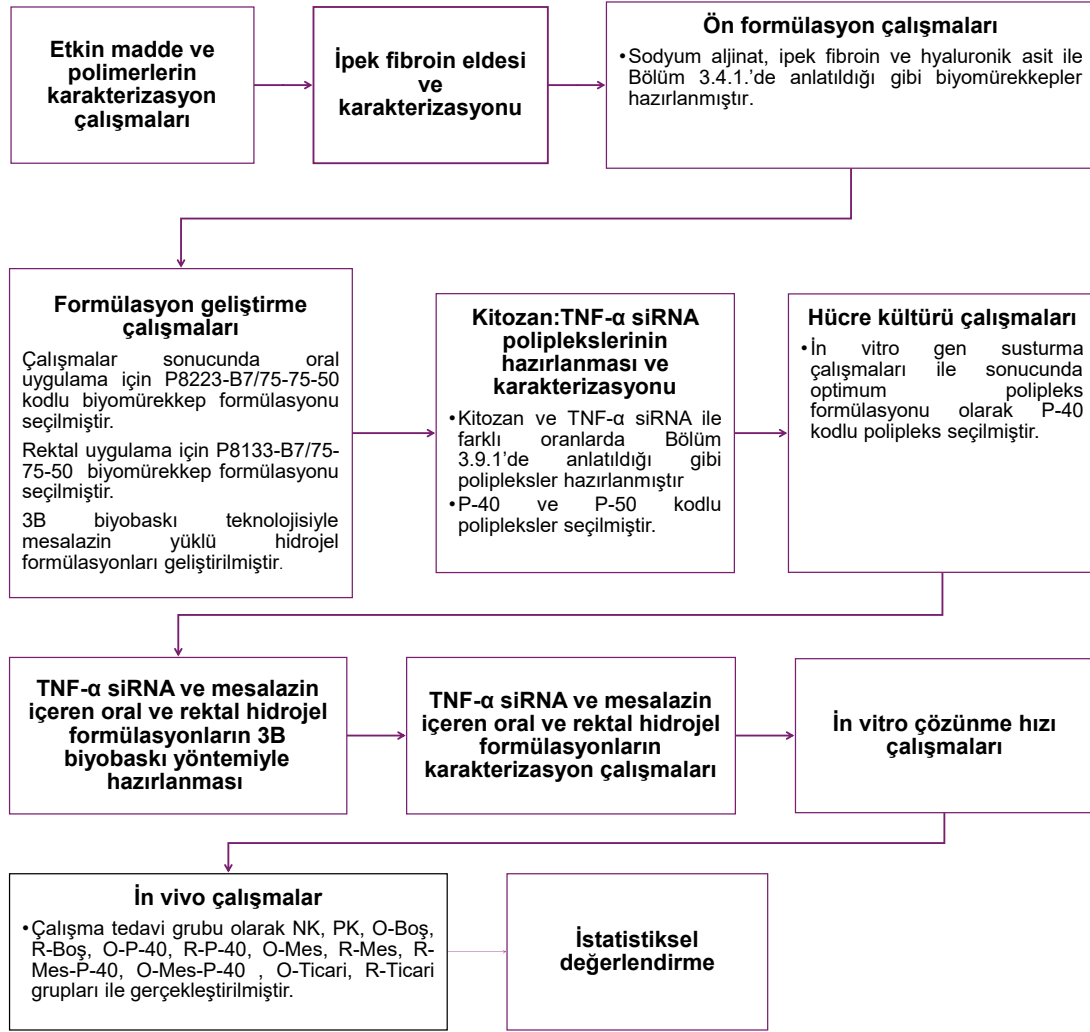
kullanılan bir aminosalisilatıdır ancak tedavi edici dozunun yüksek olması ve ilacın uygulama sıklığı hastanın yaşam kalitesini düşürmektedir. Ayrıca mesalazinin uzun süreli kullanımına bağlı olarak şiddetli yan etkiler görülebilmektedir. İBH patogeneğinde proinflatuvar bir sitokin olan TNF- α önemli bir rol oynamaktadır ve son yıllarda yapılan çalışmalarda siRNA kullanılarak bu proinflatuvar sitokinlerin üretiminin baskılanması yaklaşımı dikkat çekmektedir. Tez kapsamında antiinflatuvar özelliğe sahip olduğu bilinen ipek fibroin biyopolimeri kullanılarak 3B biyobaskı teknolojisiyle kişiye özel farklı tasarımlarda oral ve rektal hidrojel formülasyonları geliştirilmiştir. Literatürde ipek fibroin temelli oral ve rektal uygulanmak üzere 3B biyobaskı teknolojisiyle geliştirilen ilaç taşıyıcı sistem çalışması bulunmamaktadır. Ayrıca ekstrüzyon temelli biyobaskı teknolojisi ile TNF- α siRNA yüklü ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi çalışması da daha önce yapılmamıştır. Tez kapsamında;

- Antiinflatuvar bir biyopolimer olan ipek fibroin, İBH tedavisinde konvansiyonel olarak kullanılan mesalazin ve gen susturucu etkisi olan TNF- α siRNA'nın bir arada kullanılmasıyla sinerjik bir etki sağlanarak İBH tedavisinin etkinliğinin artırılması,
- Hidrojel yapısında formülasyonların geliştirilmesiyle uygulama kolaylığının sağlanması ve hidrojellerin biyoadeziv özellikleri sayesinde uygulama bölgesinde kalış süresinin artması,
- 3B biyobaskı teknolojisiyle oral ve rektal uygulanmak üzere uygun tasarım ve boyutlarda hidrojel formülasyonlarının geliştirilmesiyle kullanım kolaylığı ve kişiselleştirilmiş tedavinin sağlanması,
- Uzatılmış ilaç salımı sağlayan ilaç taşıyıcı sistem geliştirilerek ilaç uygulama sıklığının azaltılması ve böylece hastanın yaşam kalitesinin artırılması amaçlanmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez kapsamında ipek fibroin temelli mesalazin ve TNF- α siRNA yüklü 3B biyobaskı teknolojisiyle üretilmiş oral ve rektal hidrojel formülasyonları geliştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle ipek böceği kozalarından ipek fibroin üretilmiştir. 3B biyobaskının gerçekleştirilmesi için sodyum aljinat:ipek fibroin: hyaluronik asit temelli biyomürekkep formülasyonları geliştirilmiş ve optimize edilmiştir. Optimum biyomürekkep formülasyonu belirlendikten sonra, piyasa preparatlarıyla salım profillerinin karşılaştırılması amacıyla sadece mesalazin yüklü oral ve rektal hidrojeller geliştirilmiştir. Daha sonra biyomürekkep formülasyonlarına yüklenmek amacıyla kitozan:TNF- α siRNA polipleksleri üretilmiş, in vitro karakterizasyon ve in vitro gen susturma çalışmaları ile optimum polipleks formülasyonu belirlenmiştir. Optimum biyomürekkep formülasyonlarına kitozan:TNF- α siRNA polipleksi ve mesalazin yüklenerek 3B biyobaskı teknolojisiyle oral ve rektal hidrojel formülasyonları üretilmiştir. Bu formülasyonların karakterizasyon ve in vitro çözünme hızı çalışmaları yapılmıştır. Son olarak oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının in vivo etkinliğinin belirlenmesi amacıyla İBH modeli oluşturulmuş farelerde in vivo çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında yapılan bu çalışmalar Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Tez kapsamında yapılan çalışmaların şematik gösterimi

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

3.1.1. Kullanılan cihazlar

- UV spektrofotometre cihazı (Cary 60, Agilent, ABD)
- Çözünme hızı test cihazı (708-DS Dissolution Apparatus, Agilent Technologies, ABD)
- Canlı hücre analiz cihazı (Juli Br, Kore)
- Laminar flow kabin- Class II BSC (X2)
- Mikroplaka okuyucu (Spectramax i3, Molecular Devices, ABD)
- Karbondioksitli inkübatör ve normal inkubator (Nüve, Türkiye)
- Yüksek soğutmalı santrifüj 3–30 K, (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Almanya)
- 3B ekstrüzyon temelli biyoyazıcı (Axolotl Biosystems, Türkiye)
- Yatay elektroforez sistemi ve güç kaynağı (Thermo Scientific, ABD)
- UV görüntüleme sistemi (Spectronics GL-2000, MA, ABD)
- Diferansiyel taramalı kalorimetri cihazı (DSC 60, Shimadzu, Japonya)
- Fourier transform infrared spektrofotometre (Spectrum 400, Perkin Elmer, ABD)
- Rotasyonel viskometre (DV-III Rheometer, Brookfield, ABD)
- Yüzey gerilimi ölçüm cihazı (Theta Lite optical tensiometer, Biolin Scientific, Attension, Finlandiya)
- Taramalı elektron mikroskobu (Quanta 400, Fei, ABD)
- Tekstür analiz (Texture Analyzer) cihazı (TA-XT Plus, Texture Analyser, İngiltere)
- pH metre (OHAUS Corporation, ABD)
- Santrifüj cihazı (Beckman Coulter, ABD)
- Liyofilizatör (Christ-Alpha 1-2 LD plus, Almanya)
- Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçüm aleti (Malvern Zetasizer Nano, İngiltere)

3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler

- Mesalazin (Nobel İlaç Sanayii ve Ticaret A.Ş., Türkiye)
- İpek böceği kozaları (Kozabirlik, Bursa, Türkiye)

- Ticari ipek fibroin çözeltisi (Bugamed Biotechnology, Türkiye)
- Lityum bromür (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Sodyum bikarbonat (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Trisodyum fosfat dodekahidrat (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Sodyum aljinat, Protanal CR8133® (Viscosity, cps (1%): 15-45) (DuPont, ABD)
- Sodyum aljinat, Protanal CR8223® (Viscosity, cps (1%): 200-450) (DuPont, ABD)
- Sodyum aljinat, Protanal LFR 10/60® (Viscosity, cps (1%): 5-7) (DuPont, ABD)
- Sodyum aljinat, Aquateric® (Viscosity, cps (1%): 4-12) (DuPont, ABD)
- Sodyum aljinat, Manucol® (Viscosity, cps (1%): 60-170) (DuPont, ABD)
- Hyaluronik asit, Sigma-Aldrich, Almanya
- Potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄-Merck, Almanya)
- Sodyum klorür (NaCl-Sigma Aldrich, ABD)
- Sodyum hidroksit (NaOH- Sigma Aldrich, ABD)
- Sodyum asetat (C₂H₃NaO₂- Sigma Aldrich, ABD)
- Etanol (HPLC grade-Merck, Almanya)
- O-fosforik asit (Sigma Aldrich, ABD)
- Seyreltik hidroklorik asit (HCl) çözeltisi (Sigma Aldrich, ABD)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck, Almanya)
- Kalsiyum klorür (CaCl₂- Sigma Aldrich, ABD)
- Nükleaz içermeyen distile su (HIMEDIA, ABD)
- Sense-TNF-α siRNA (Dharmacon, ABD)
- Antisense-TNF-α siRNA (Dharmacon, ABD)
- Dharmafect Transfection Reagent (Dharmacon, ABD)
- Düşük molekül ağırlıklı kitozan (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Fetal Bovine Serum (Serana, Almanya)
- Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Penicillin-streptomycin (Serana, Almanya)
- Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Lipopolisakkarit (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Dekstran sodyum sülfat (Cayman Chemicals, ABD)

- Balb/c türü erkek fare (Nesa Deney Hayvanları Laboratuvarı, Türkiye)
- 500 mg mesalazin içeren Pentasa® ticari tablet (Seri no: T08251A)
- 500 mg mesalazin içeren Salofalk® ticari supozituar (Seri no: 210613A)

3.1.3. Kullanılan kitler

- TNF- α ELISA Kit (Sunred Biotechnology, Çin)
- TNF- α ELISA Kit (Boster, USA)
- IL-12 ELISA Kit (Boster, USA)
- IL-6 ELISA Kit (Boster, USA)

3.1.4. Kullanılan yazılımlar

- Üç boyutlu tasarım programı (TinkerCad, Autodesk, ABD)
- GraphPad Prism 10.1.2 (GraphPad Software Inc., ABD)
- DDSolver

3.1.5. Kullanılan hücre hattı

- RAW 264.7 (Fare Makrofaj) hücre hattı (ATCC, ABD)

3.1.6. İn vitro ve in vivo deneylerde kullanılan çözeltiler

pH 1,2 tampon çözelti (USP 40-Enzimsiz gastrik sıvı)

NaCl.....2 g
 Seyreltik HCl çözeltisi.....7 mL
 Distile su.....ym 1 L

0,1 N HCl çözeltisi

Seyreltik HCl çözeltisi.....7 mL
 Distile su.....ym 1 L

pH 6,8 tampon çözeltileri

Tez kapsamında oral hidrojel formülasyonları için gerçekleştirilen in vitro çözünme hızı çalışmalarında 0-2. saatler arası pH 1,2 tamponu, 2-24. saatler arası pH 6,8 tampon çözelti-1 kullanılmıştır. Ancak 2. saatten sonra çözünme hızı cihazında ortam değiştirirken formülasyonda kayıp oluşması nedeniyle salım yüzdesinin %100'e ulaşmadığı görülmüştür. Daha sonra oral formülasyonlar için yapılan in vitro çözünme hızı çalışmaları için USP'ye kayıtlı pH 6,8 tampon çözelti-2 kullanılmıştır.

pH 6,8 tampon çözelti-1 (USP 40-Fosfat tamponu) (pH 6,8-1)

KH₂PO₄.....6,8 g
 NaOH.....0,9 g
 Distile su.....ym 1 L

pH 6,8 tampon çözelti-2 (USP-40) (pH 6,8-2)

0,1 N HCl çözeltisi.....750 mL
 0,20 M tribazik sodyum fosfat çözeltisi.....250 mL

Fosfat tamponları (USP XXXI)

a. Monobazik potasyum fosfat çözeltisi (0,2 M)

KH₂PO₄.....27,22 g
 Distile su.....ym 1 L

b. Sodyum hidroksit çözeltisi (0,2 M)

NaOH.....8 g
 Distile su..... ym 1 L

pH 7,4 fosfat tamponu hazırlanışı: a çözeltisinden 50 mL ve b çözeltisinden 39,1 mL karıştırılır, distile suyla 200 mL'ye tamamlanır.

pH 4,5 asetat tamponu

Asetik asit.....	700 µL
C ₂ H ₃ NaO ₂	0,771 g
NaCl.....	9 g
Distile su	ym 1 L

3.2. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmaları

Tez kapsamında 3B biyobaskı teknolojisiyle mesalazin ve TNF- α siRNA yüklü ipek fibroin temelli hidrojeller geliştirilmiştir. Öncelikle etkin madde olan mesalazinin miktar tayini yöntemi geliştirilmiş ve analitik metot validasyonu çalışmaları yapılmıştır. Hidrojellerin geliştirilmesinde kullanılan ipek fibroin, sodyum aljinat ve hyaluronik asit polimerleri ile etkin madde olan mesalazinin karakterizasyon çalışmaları diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC), fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR-ATR) ve X-ışını kırınım (XRD) yöntemleri ile yapılmıştır.

3.2.1. Mesalazinin miktar tayini yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu

Mesalazinin miktar tayini yönteminin geliştirilmesi amacıyla UV-Vis spektrofotometre kullanılmıştır. Bu yöntem proje kapsamında geliştirilen 3B basılmış hidrojellerden mesalazin salımının tayini amacıyla kullanılmıştır. Bu çalışma distile su, 0,1 N HCl, pH 1,2, pH 6,8-1, pH 6,8-2 ve pH 7,4 tamponlarında yapılmıştır.

Analiz çalışmalarına başlamadan önce mesalazinin tüm ortamlarda 20 µg/mL derişimde çözeltisi hazırlanmıştır. UV-Vis spektrofotometre kullanılarak bu çözeltilerin 200-800 nm arasında dalga boyu taraması yapılmış ve her bir ortam için mesalazinin maksimum absorbans verdiği dalga boyu (λ_{max}) saptanmıştır.

Yöntem validasyonu; kullanılan yöntemin doğru ve kesin bir şekilde her seferinde bekleneni gerçekleştirdiğinin ve amaçlanan kullanımına uygunluğunun kanıtlanması için yapılması gereken işlemler bütünüdür. Elde edilen sonuçlar valide edilmiş bir yöntemle yapıldığı zaman bu sonuçların doğruluğu, özgünlüğü, tutarlılığı, kesinliği ve güvenilirliği kanıtlanmış olur.

Analitik yöntem validasyonu çalışmada kullanılan bütün ortamlar için ICH Q2(R1) kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Validasyon çalışmaları kapsamında, doğrusallık, kesinlik, doğruluk ve geri elde, özgünlük ve seçicilik, duyarlılık ve saptama sınırı ve stabilite parametreleri değerlendirilmiştir.

Doğrusallık

Her bir numunede bulunan etkin madde miktarı için, derişim ile ölçüm aralığında elde edilen yanıt arasında doğru orantı olması durumu doğrusallık olarak ifade edilmektedir. Doğrusallık parametresi derişime karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilen kalibrasyon doğruları ve bu doğrulara ait doğru denklemi ile kanıtlanmaktadır.

Doğrusallığın kanıtlanması amacıyla mesalazinin distile su, 0,1 N HCl, pH 1,2, pH 6,8-1, pH 6,8-2 ve pH 7,4 tamponlarında 50 µg/mL derişimde stok çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiden seyreltme yapılarak (5-40 µg/mL derişim aralığında) standart çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerin UV-Vis spektrofotometrede, 0,1 N HCl ve pH 1,2 tampon çözeltileri için 300 nm dalga boyunda; distile su, pH 6,8-1, pH 6,8-2 ve pH 7,4 tampon çözeltileri için 330 nm'de köre karşı ölçümü yapılmıştır.

Her bir ortam için, standart çözeltilerin içerdiği mesalazin derişimlerine karşı ölçülen absorbans değerleri ile en küçük kareler yöntemi kullanılarak kalibrasyon doğru denklemi elde edilmiştir ve elde edilen bu kalibrasyon doğrusunun korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

Kesinlik

Aynı analiz yöntemi kullanılarak aynı koşullar altında çalışıldığında birbirini takip eden ölçümler ile elde edilen sonuçların birbirine yakınlığını, yani ölçümlerin tekrarlanabilirliğini gösteren parametre kesinlik olarak ifade edilmektedir. Deney içi kesinlik ve deneyler arası kesinlik olmak üzere iki şekilde değerlendirilmektedir.

Deney içi kesinlik

Belirli bir derişimde etkin madde içeren bir numunenin aynı gün içinde art arda yapılan miktar tayini analizleri sonucunda elde edilen sonuçların tekrarlanabilir olduğunu gösteren parametre deney içi kesinlik olarak ifade edilmektedir. Çalışma kapsamında etkin maddenin 30 µg/mL derişimdeki çözeltileri distile su, 0,1 N HCl, pH 1,2, pH 6,8-1, pH 6,8-2 ve pH 7,4 tamponlarında hazırlanmış ve bu çözeltilerin UV-Vis spektrofotometrede art arda 10 kez absorbans ölçümleri yapılmıştır. Daha önceden her bir tampon ortamı için elde edilen kalibrasyon denklemleri kullanılarak absorbans değerlerine karşılık gelen derişimler hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucu elde edilen derişim değerlerinin ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapmaları hesaplanarak kullanılan miktar tayini analiz yönteminin deney içi kesinliği değerlendirilmiştir.

Deneyler arası kesinlik

Belirli bir derişimde etkin madde içeren bir numunenin farklı günler içinde art arda yapılan miktar tayini analizleri sonucunda elde edilen sonuçların tekrarlanabilir olduğunu gösteren parametre deneyler arası kesinlik olarak ifade edilmektedir. Çalışma kapsamında etkin maddenin 8, 10 ve 12 µg/mL derişimdeki çözeltileri, distile su, 0,1 N HCl, pH 1,2, pH 6,8-1, pH 6,8-2 ve pH 7,4 tamponlarında, üç farklı günde üçer kez farklı stoklardan hazırlanmış ve bu çözeltilerin UV-Vis spektrofotometrede art arda absorbans ölçümleri yapılmıştır. Daha önceden her bir tampon ortamı için elde edilen kalibrasyon denklemleri kullanılarak absorbans değerlerine karşılık gelen derişimler hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucu elde edilen derişim değerlerinin ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapmaları hesaplanarak kullanılan miktar tayini analiz yönteminin deneyler arası kesinliği değerlendirilmiştir.

Özgünlük- Seçicilik

Bir yöntemin özgünlüğü yani seçiciliği bu yöntemin amaçlanan maddeyi tayin edebilme yeteneği olarak ifade edilmektedir. Analizde kullanılan yöntemin, etkin maddeyi formülasyonda kullanılan diğer yardımcı maddelerden ayırması

gerekmektedir. Yöntemin özgünlüğünün değerlendirilmesi amacıyla çalışmamızda geliştirilen formülasyonlarda kullanılan polimerlerin (İpek fibroin, sodyum aljinat-Protanal CR8133, sodyum aljinat-Protanal CR8223 ve hyaluronik asit) distile su, 0,1 N HCl, pH 1,2, pH 6,8-1, pH 6,8-2 ve pH 7,4 tamponlarında çözeltileri hazırlanmış ve mesalazinin pik verdiği dalga boylarında (pH 1,2, 0,N HCl tampon çözeltileri için 300 nm dalga boyunda, distile su, pH 6,8-1, pH 6,8-2 ve pH 7,4 tampon çözeltileri için 330 nm'de) spektrumları alınmıştır.

Doğruluk ve geri elde

Ölçüm sonuçlarının bilinen bir değere yakınlığını gösteren parametre doğruluk olarak ifade edilmektedir. Kullanılan yöntemin doğruluğu % geri elde ile gösterilmektedir. Yöntemin doğruluğunun kanıtlanması için etkin maddenin bilinen derişimlerini içeren numuneler hazırlanır ve ölçümleri yapılır. Ölçümler sonucu elde edilen değerler %95 olasılıkla kabul edilen aralıkta ise yöntemin doğruluğu kanıtlanmış olmaktadır.

Çalışma kapsamında distile su, 0,1 N HCl, pH 1,2, pH 6,8-1, pH 6,8-2 ve pH 7,4 tamponlarında, formülasyonlardaki etkin madde miktarının %80'ini, %100'ünü ve %120'sini içerecek şekilde, 20 mL çözeltiler hazırlanmış, bu çözeltiler süzildükten sonra gerekli seyreltmeler yapılarak UV-Vis spektrofotometrede absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Daha önceden her bir tampon ortamı için elde edilen kalibrasyon denklemleri kullanılarak absorbans değerlerine karşılık gelen derişimler hesaplanmıştır. Hesaplanan bu derişimlerin bilinen derişim değerlerine oranlanmasıyla % geri elde değerleri, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri hesaplanarak kullanılan miktar tayini yönteminin doğruluğu değerlendirilmiştir.

Duyarlılık ve saptama sınırı

Duyarlılık sınırı (LOD-limit of detection); bir numunedeki saptanabilen ancak ölçülemeyen en düşük madde miktarı olarak ifade edilmektedir. Aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmaktadır (Eş. 3.1):

$$\text{Duyarlılık sınırı} = (3,3\sigma)/S \quad (3.1)$$

Saptama sınırı (LOQ-limit of quantification); bir numunedeki doğru ve kesin olarak ölçülebilen en düşük madde miktarı olarak ifade edilmektedir. Aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmaktadır (Eş. 3.2):

$$\text{Saptama sınırı} = (10\sigma)/S \quad (3.2)$$

σ : Kalibrasyon aralığında yer alan en düşük derişimin standart sapması

S: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Çalışmamızda kullanılan bütün ortamlar için duyarlılık sınırı ve saptama sınırı değerleri kalibrasyon denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır.

Stabilite

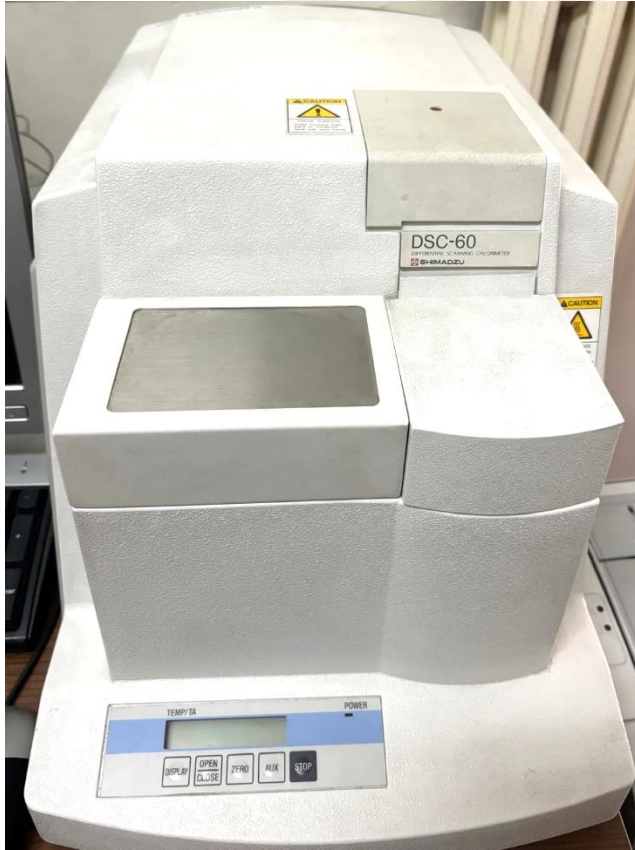
Stok çözeltilerin veya numunelerin saklanacakları ya da analiz edilecekleri süre boyunca kararlılıklarını koruması durumu stabilite olarak ifade edilmektedir. Etkin maddenin çözelti stabilitesinin tayini amacıyla her bir ortamda etkin maddenin 20 µg/mL derişimde çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler 37 °C'de 24 saat boyunca bekletilmiş ve 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ve 24. saatlerde örnekler alınarak bu örneklerin UV-Vis spektrofotometrede absorbansları ölçülmüştür. Kalibrasyon denklemleri kullanılarak derişimleri hesaplanmış ve etkin madde miktarındaki değişim değerlendirilmiştir.

3.2.2. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizleri

Termal bir analiz yöntemi olan Diferansiyel taramalı kalorimetrenin (Differential scanning calorimetry-DSC) temel prensibi, referans ile test numunesini aynı sıcaklıkta tutmak için gereken ısı enerjisinin ölçülmesidir. Bu yöntem ile çalışmada kullanılan etkin maddenin erime sıcaklığı, formülasyonda kullanılan polimerlerin camsı geçiş sıcaklığının olup olmadığı ve etkin madde ve yardımcı maddeler arasındaki geçimlilik değerlendirilebilmektedir. Çalışmada kullanılan etkin madde olan mesalazinin erime sıcaklığı, polimerlerin ise camsı geçiş sıcaklığının olup

olmadığı DSC yöntemi ile saptanmıştır. Etkin madde ve yardımcı maddeler arasındaki geçimliliğin değerlendirilmesi amacıyla da etkin madde ve yardımcı maddelerin 1:1 oranda fiziksel karışımları hazırlanarak DSC termogramları alınmıştır.

DSC analizinde önce mesalazin ve yardımcı maddelerin ayrı ayrı azot gazı altında 10 °C/dakika ısıtma hızında, 25-350 °C arasında DSC termogramları alınmıştır. Analiz için 2 mg madde hassas terazide tartılmış, alüminyum örnek tablası içinde basınç altında sıkıştırılmış ve DSC cihazının numune bölmesine yerleştirilerek DSC analizi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra aynı işlem mesalazin ve yardımcı maddelerin 1:1 oranındaki fiziksel karışımları için de yapılarak, etkin madde ve yardımcı maddeler arasındaki geçimlilik değerlendirilmiştir. DSC analizlerinde referans madde olarak indiyum kullanılmıştır. Çalışmalarımızda kullanılan DSC analiz cihazının fotoğrafı Resim 3.1’de gösterilmiştir.



Resim 3.1. DSC analizlerinin gerçekleştirildiği cihaz

3.2.3. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR-ATR) analizi

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR), etkin madde ve polimerlerin kimyasal yapılarında bulunan fonksiyonel grupların analizinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem ile moleküller kızılötesi dalgalarla uyarılarak moleküllerin titreşim seviyeleri ölçülmekte ve moleküllerde yer alan kimyasal grupların titreştiği dalga boyları kaydedilmektedir. Mesalazin ve formülasyonda yer alan yardımcı maddeler arasındaki olası etkileşimlerin incelenmesi amacıyla FTIR analizleri yapılmıştır. Bu amaçla ATR (attenuated total reflectance, toplam azaltılmış yansıma) prob içeren FTIR yöntemi kullanılarak, mesalazin ve formülasyonların hazırlanmasında kullanılan polimerlerin 1:1 orandaki fiziksel karışımlarının, 4000 – 400 cm^{-1} dalga boyları arasında taraması yapılarak analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. X-ışını kırınımı (XRD) analizi¹

X-ışını kırınım (X-Ray Diffractometer-XRD) analizi, materyalin kristal örgüsünün belirlenmesi amacıyla her bir kristalik yapının kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak X-ışınlarını belirli bir düzen içerisinde kırması prensibine sahip bir analiz yöntemidir. XRD analizi ile incelenen örnek ile monokromatik X-ışınları arasındaki yapısal girişim incelenmektedir. Çalışmamızda mesalazin, formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin ve 1:1 oranda fiziksel karışımlarının XRD difraktogramları değerlendirilmiştir. Analizlerin gerçekleştirilmesi için yapılan taramalar 0 ila 60° arasında, 2 θ grazing açısı ile 3°/dakika hızda gerçekleştirilmiştir.

3.3. İpek fibroin eldesi ve karakterizasyonu

3.3.1. Protein miktar tayini yönteminin geliştirilmesi

İpek fibroinde bulunan protein miktarının tayini için Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bradford,1976). İlk olarak Bradford yönteminde kullanılmak üzere Bradford ajanı hazırlanmıştır. Bunun için 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 tartılmış, 50 mL %95 etanolde çözülmüş, daha sonra 100 mL %85 fosforik asit eklenmiş, karışım süzöldükten sonra distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Standart kalibrasyon

¹ XRD analizleri Nobel İlaç'ta gerçekleştirilmiştir. Yardımları için kendilerine teşekkür ederiz.

eğrisinin oluşturulması amacıyla standart protein olarak sığır serum albümini (BSA) kullanılmıştır. Distile suda 1 mg/mL derişimde stok çözelti hazırlandıktan sonra gerekli seyreltmeler yapılarak 10-100 µg/mL arasında değişen 10 farklı derişimde BSA standart çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan standart çözeltilerin görüntüsü Resim 3.2’de gösterilmiştir. Daha sonra bu standart çözeltilere önceden hazırlanmış olan Bradford ajanı eklenerek UV-Vis spektrofotometrede 595 nm’de absorbansları ölçülmüştür. Standart çözeltilerin derişimine karşı elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusu elde edilmiş ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

Liyofilizasyon işlemi sonucunda elde edilen liyofilize ipek fibroin suda çözünmeyip formik asitte çözüldüğü için, BSA içeren stok çözelti formik asit kullanılarak hazırlanmış ve aynı işlemler tekrarlanarak ikinci bir kalibrasyon doğrusu elde edilmiş ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.



Resim 3.2. Protein miktar tayini yöntemi için hazırlanan standart çözeltilerin görüntüsü

3.3.2. İpek fibroin eldesi için optimizasyon çalışmaları

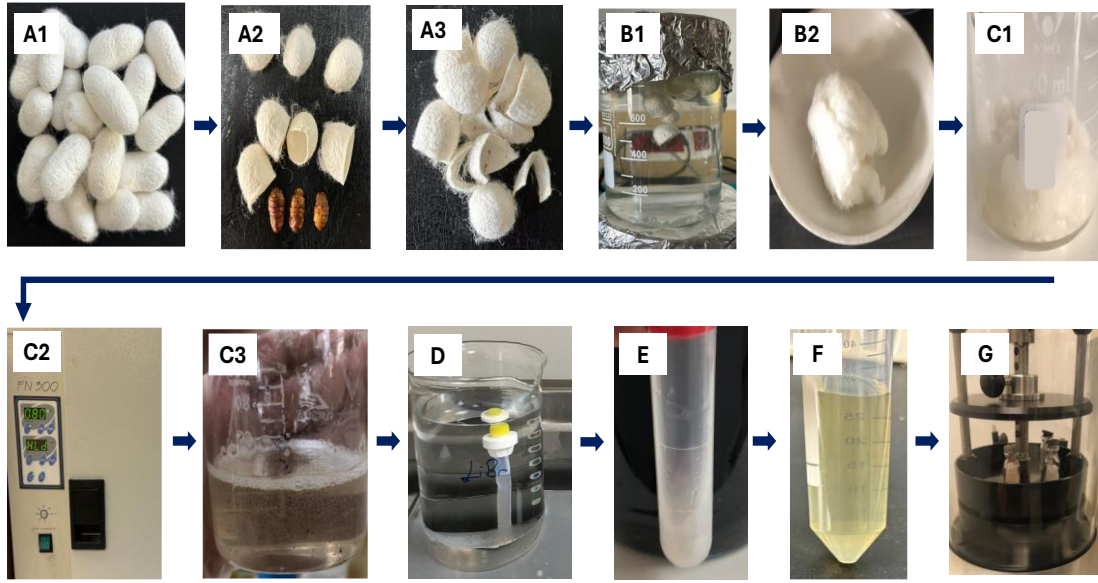
Çalışmamızda ipek böceği (*Bombyx mori*) kozaları kullanılarak ipek fibroin eldesi gerçekleştirilmiştir (Rockwood ve diğerleri, 2011; Ajisawa, 1998). İpek fibroin eldesi için kullanılan ipek böceği kozaları Resim 3.3’te gösterilmiştir. İpek fibroin eldesi zambak giderme, ekstraksiyon, diyaliz, santrifüj ve liyofilizasyon (gerekirse) olmak üzere temel olarak beş basamakta değerlendirilmektedir. Çalışmamızda ekstraksiyon, diyaliz ve santrifüj basamaklarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.



Resim 3.3. İpek fibroin eldesi için kullanılan ipek böceği kozaları

Zamk giderme işlemi, ipek böceği kozasında bulunan bir diğer protein olan serisinin uzaklaştırılması amacıyla yapılmaktadır. İlk olarak zamk giderme işlemi için ipek böceği kozaları temizlenip küçük parçalara ayrılmıştır. Küçük parçalara ayrılan kozalar 0.02 M Na_2CO_3 çözeltisinde 1 saat boyunca kaynatılmıştır. Bu işlemden sonra açığa çıkan serisin proteininin uzaklaştırılması için elde edilen materyal birkaç defa distile su ile yıkandıktan sonra bir gece boyunca çeker ocakta kurumaya bırakılmıştır. Serisin, ipek böceği kozalarının yaklaşık %25-30'unu oluşturmaktadır. Zamk giderme işlemiyle serisinin uzaklaştırıldığının kanıtlanması ve her seferinde uzaklaşan serisin miktarının birbirine yakın olduğunun gösterilmesi amacıyla zamk giderme işleminde uzaklaşan serisin miktarı gravimetrik olarak analiz edilmiştir. Bu amaçla üç farklı zamanda eşit miktarda ipek böceği kozası tartılmış zamk giderme işlemi gerçekleştirilmiştir. Zamk giderme işleminden sonra elde edilen materyal tartılarak % uzaklaşan serisin miktarı hesaplanmıştır.

Daha sonra serisinden arındırılmış materyalden ipek fibroin çözeltisi eldesi için çeker ocakta kurutulmuş materyal ekstraksiyon ajanında 80 °C'de 5 saat bekletilerek materyalin tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Ardından distile suya karşı diyaliz işlemi ile ekstraksiyon ajanının uzaklaştırılması ve en son çözeltide kalan safsızlıkların tamamen uzaklaştırılması için santrifüj işlemi yapılmıştır. İpek fibroin eldesi işlem basamakları Resim 3.4'te gösterilmiştir.



Resim 3.4. İpek fibroin eldesi işlem basamakları (A: İpek böceği kozalarının temizlenmesi, B: Zamk giderme işlemi, C: Ekstraksiyon işlemi, D: Diyaliz işlemi, E: Santrifüj işlemi, F: Elde edilen ipek fibroin çözeltisi, G: Liyofilizasyon işlemi)

Zamk giderme işleminden sonra en yüksek protein içeriğine sahip ipek fibroin çözeltisinin elde edilmesi için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yöntemde kullanılan ekstraksiyon ajanı tipinin (Ajisawa/LiBr), diyaliz süresinin (1, 2 ve 3 gün), diyaliz işleminde kullanılan diyaliz membranının molecular weight cut-off (MWCO) değerinin (3.500 Da/12.000 Da) ve santrifüj işleminin elde edilen ipek fibroinin içerdiği protein miktarına etkisi değerlendirilmiştir. İpek fibroin karakterizasyon çalışmalarında liyofilize ipek fibroin kullanılacağı için aynı işlem liyofilize ipek fibroin eldesi için de gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi amacıyla ipek fibroin çözeltisi için 24 adet (Çizelge 3.1), liyofilize ipek fibroin için ise 12 adet (Çizelge 3.2) deney yapılmıştır. Elde edilen ipek fibroinlerin içerdiği protein miktarı Bradford yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Daha sonra ipek fibroin eldesini etkileyen parametrelerin, ipek fibroin protein içeriğine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla Graphpad Prism 10.1.2 yazılımı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) yöntemi ile istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler sonucunda en yüksek protein içeriğine sahip ipek fibroin elde edilen yöntem optimum yöntem olarak belirlenmiş ve daha sonraki çalışmalarda ipek fibroin eldesi için bu yöntem kullanılmıştır (Yıldız ve diğerleri, 2023).

Çizelge 3.1. İpek fibroin eldesinin optimizasyonu için yapılan deney tasarımı

	Diyaliz süresi	1 gün				2 gün				3 gün			
	Diyaliz membranının MWCO değeri (Da)	3.500		12.000		3.500		12.000		3.500		12.000	
Ekstraksiyon ajanı tipi		SÖ*	SS*	SÖ	SS	SÖ	SS	SÖ	SS	SÖ	SS	SÖ	SS
	Ajisawa ajanı	İF-1	İF-2	İF-3	İF-4	İF-5	İF-6	İF-7	İF-8	İF-9	İF-10	İF-11	İF-12
	LiBr çözeltisi	İF-13	İF-14	İF-15	İF-16	İF-17	İF-18	İF-19	İF-20	İF-21	İF-22	İF-23	İF-24
	SÖ: Santrifüj öncesi SS: Santrifüj sonrası												

Çizelge 3.2. Liyofilize ipek fibroin eldesinin optimizasyonu için yapılan deney tasarımı

Liyofilize ipek fibroin	Diyaliz süresi	Gün 1		Gün 2		Gün 3	
	Diyaliz membranının MWCO değeri (Da)	3.500	12.000	3.500	12.000	3.500	12.000
Ekstraksiyon ajanı tipi	Ajisawa ajanı	L-İF-1	L-İF-2	L-İF-3	L-İF-4	L-İF-5	L-İF-6
	LiBr çözeltisi	L-İF-7	L-İF-8	L-İF-9	L-İF-10	L-İF-11	L-İF-12

3.3.3. İpek fibroinin karakterizasyonu çalışmaları

Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen ipek fibroinin karakterizasyon çalışmaları kapsamında DSC analizi, FTIR analizi, gravimetrik analiz ve sirküler dikroizm ölçümleri yapılmıştır. İpek fibroinin karakterizasyon çalışmaları ticari ipek fibroin (Bugamed Biotechnology, Türkiye) ile karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir.

DSC analizleri

DSC analizinin gerçekleştirilmesi amacıyla elde edilen ipek fibroin ve ticari ipek fibroin örnekleri -80 °C'de dondurulmuş ve -55 °C'de 40 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Daha sonra her iki ipek fibroin örneğinin ayrı ayrı azot gazı altında 10°C/dakika ısıtma hızında, 25-350°C arasında DSC termogramları alınmıştır. Analiz için 2 mg madde hassas terazide tartılmış ve alüminyum örnek tablası içinde basınç altında sıkıştırılmıştır. Daha sonra DSC cihazının numune bölmesine yerleştirilerek DSC analizi gerçekleştirilmiştir.

FTIR analizleri

FTIR analizinin gerçekleştirilmesi amacıyla elde edilen ipek fibroin ve ticari ipek fibroin örnekleri -80 °C'de dondurulmuş ve -55 °C'de 40 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Elde edilen optimum ipek fibroin ve ticari ipek fibroinin FTIR analizi, ATR (attenuated total reflectance, toplam azaltılmış yansıma) prob içeren FTIR yöntemi kullanılarak, 4000 – 400 cm⁻¹ dalga boyları arasında tarama yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Gravimetrik analiz

Elde edilen ipek fibroinin sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere gravimetrik analizi yapılmıştır. Bu analizin yapılması için belirli bir miktarda ipek fibroin çözeltisi suyun uzaklaşması için -55 °C'de 40 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Liyofilize ipek fibroin tartılmış ve gravimetrik olarak derişim belirlenmiştir.

İpek fibroin yapı analizi testi

Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilmiş ipek fibroin ve ticari ipek fibroinin ikincil yapılarının belirlenmesi ve bu yapıların karşılaştırılması amacıyla sirküler dikroizm spektroskopisi analizleri gerçekleştirilmiştir. Sirküler dikroizm spektroskopisi, protein yapısındaki maddelerin katlanmalarının ve ikincil yapılarının analiz edilmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Sirküler dikroizm ölçümleri için ipek fibroin numuneleri derişimleri 1 mg/mL olacak şekilde distile su ile seyreltilmiştir. Sirküler dikroizm analizleri 190-260 nm dalga boyu aralığında 10-100 nm/dk hızda gerçekleştirilmiştir ve analizlerde kör olarak distile su kullanılmıştır.¹

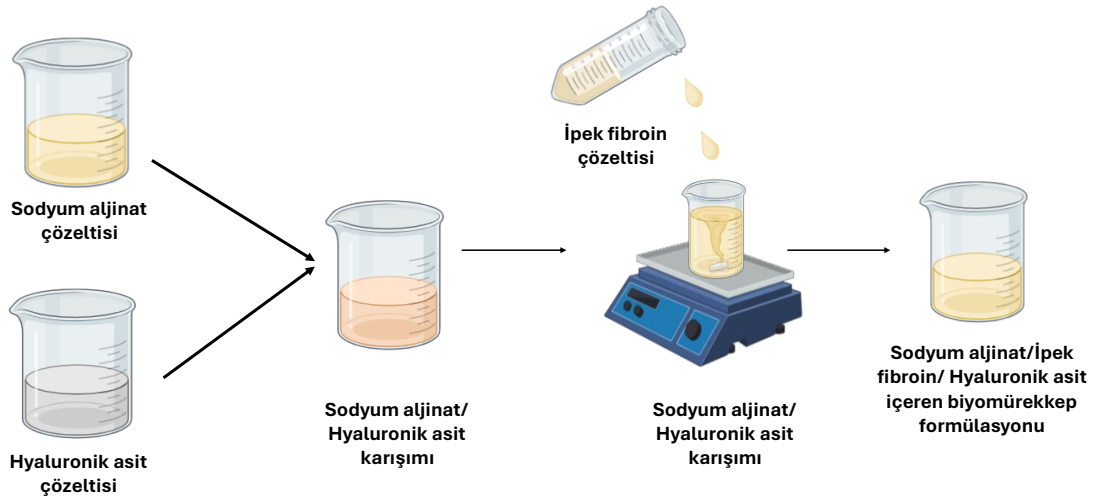
¹ Sirküler dikroizm analiz çalışmaları Bilkent UNAM'da yapılmıştır.

3.4. Ön Formülasyon Çalışmaları

3.4.1. Üç boyutlu biyobaskı için gerekli biyomürekkep formülasyonlarının hazırlanması amacıyla yapılan ön çalışmalar

Çalışmamızda 3B biyobaskı için ekstrüzyon temelli biyoyazıcı kullanılmıştır. 3B biyoyazıcılarda biyobaskının gerçekleştirilmesi için basılabilir biyomürekkep formülasyonlarının geliştirilmesi gerekmektedir. Biyomürekkep formülasyonlarının üç boyutlu biyoyazıcıda basılabilirliği; yüzey gerilimi, viskozite ve basılabilirlik parametreleri ile belirlenmektedir. Çalışmamızda biyomürekkep formülasyonlarının hazırlanması için ilk olarak biyoparçalanabilir ve biyouyumlu oldukları bilinen sodyum aljinat (SA) (Protanal LFR 10/60), hyaluronik asit (HA) ve ipek fibroin (İF) çözeltisi kullanılmıştır.

Biyomürekkep formülasyonlarında kullanılan polimer çözeltileri, distile su ile SA-LFR 10/60 %7,5 ve HA %2 derişimde olacak şekilde hazırlanmıştır. Yapılan gravimetrik analiz sonucunda ipek fibroin çözeltisinin derişimi %5 olarak bulunduğu için ipek fibroin %5 derişimde hazırlanmıştır. Daha sonra bu üç polimer çözeltisi Çizelge 3.3'te verilen oranlarda karıştırılarak biyomürekkep formülasyonları oluşturulmuştur. Bu amaçla ilk olarak SA-LFR 10/60 ve HA çözeltileri karıştırılmış, daha sonra yapısının bozulmaması için ipek fibroin damla damla polimer karışımına eklenmiştir (Şekil 3.2). SA, HA ve ipek fibroin belli oranlarda karıştırılmıştır. Hazırlanan biyomürekkep formülasyonlarının, 3B biyobaskı işlemi için kritik parametreler olan viskozite ve yüzey gerilimi ölçümleri gerçekleştirilmiş ve 3B biyoyazıcı (Axolotl Biosystems, Türkiye) kullanılarak biyomürekkep formülasyonlarının basılabilirlik parametreleri değerlendirilmiştir.



Şekil 3.2. Biyomürekkeplerin hazırlanma işlemi

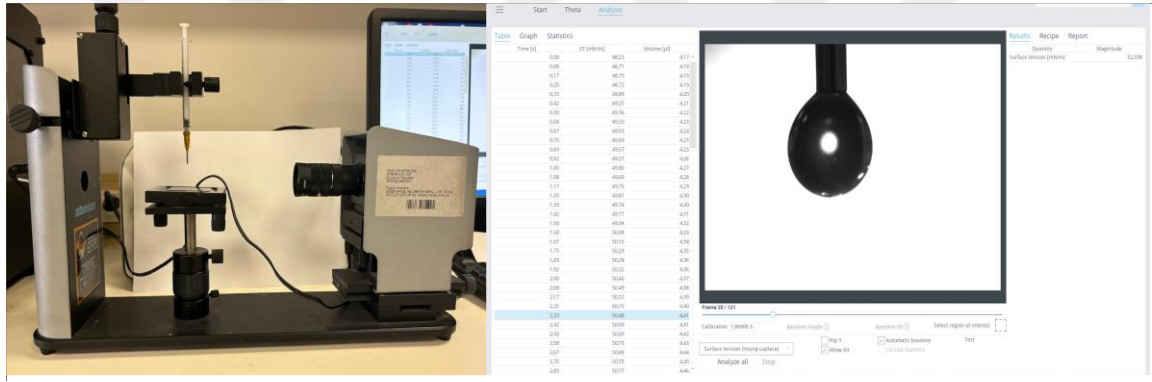
Çizelge 3.3. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında geliştirilen biyomürekkep formülasyonlarının içeriği ve basılabilirlik parametresinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan baskı parametreleri

Biyomürekkep formülasyon kodu	Formülasyon içeriği SA:İF:HA (mg)	Baskı Parametreleri	Tasarımın doluluk oranı
B1/100-75-20	100:75:20	1-5 Psi Basınç 19G Baskı Ucu	%10
B2/100-75-25	100:75:25	1-5 Psi Basınç 19G Baskı Ucu	
B3/100-50-25	100:50:25	1-5 Psi Basınç 19G Baskı Ucu	
B4/100-50-50	100:50:50	1-5 Psi Basınç 19G Baskı Ucu	
B5/100-25-50	100:25:50	1-5 Psi Basınç 19G Baskı Ucu	
B6/100-25-75	100:25:75	1-5 Psi Basınç 19G Baskı Ucu	
B7/75-75-50	75:75:50	1-5 Psi Basınç 19G Baskı Ucu	
B8/75-50-75	75:50:75	1-5 Psi Basınç 19G Baskı Ucu	
B9/50-75-75	50:75:75	1-5 Psi Basınç 19G Baskı Ucu	

Yüzey Gerilimi Ölçümleri

Ekstrüzyon temelli 3B biyobaskı için biyomürekkeplerin yüzey gerilimi önemli bir parametredir. Yüzey gerilimi, bir çözeltinin yüzey alanının 1 cm² artırılması için çözeltideki birim mesafeye uygulanan kuvvet olarak ifade edilmektedir. Yüzey gerilimi değerinin birimi mN/m ya da dyn/cm olabilmektedir. Yüzey gerilimi ölçümleri

Wilhelmy, damla hacmi, damla ağırlığı, halka koparma ve asılı damla yöntemi gibi çeşitli yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Çalışmamızda analiz için asılı damla yöntemi kullanılmıştır. Ölçümlerin yapılması için hazırlanan biyomürekkep formülasyonları bir insülin enjektörüne çekilmiş ve bu formülasyonun bir damlası enjektörün ucunda asılı halde bırakılmıştır. Yüzey gerilimi ölçüm cihazında bulunan kamera ile damlacık görüntülenmiştir. Cihazın yazılımı ile asılı olan damlanın şekli ve hacmi yardımıyla Young–Laplace eşitliği kullanılarak biyomürekkeplerin yüzey gerilimi değerleri hesaplanmıştır (Stalder ve diğerleri, 2010). Yüzey gerilimi ölçümleri için kullanılan cihaz, hesaplama ekranı, kullanılan çözeltinin yazılımdaki kamera görüntüsü ve hesaplama yapılan ekranın görüntüsü Resim 3.5'te verilmiştir.



Resim 3.5. Yüzey gerilimi ölçümleri için kullanılan cihaz, ölçümü yapılan biyomürekkep çözeltisinden elde edilen asılı damlanın yazılımdaki kamera görüntüsü ve yazılımda yüzey gerilimi değerinin hesaplandığı ekranın görüntüsü

Viskozite ölçümleri

Viskozite, ekstrüzyon temelli 3B biyobaskı işlemi için önemli parametrelerden biridir. Viskozite; akışkanlara uygulanan kayma kuvvetinin karşılaştığı direnç olarak ifade edilmektedir. Biyomürekkep formülasyonlarının 3B biyobaskısı için viskozite değerinin belirli sınırlar içinde olması gerekmektedir. Viskozite değeri çok yüksek olursa 3B baskı sırasında biyomürekkeplere uygulanan basınç yetersiz kalacak ve baskı ucundan biyomürekkep formülasyonu akmayacaktır. Viskozite değeri çok düşük olursa basılan materyal çapraz bağlama işlemi gerçekleşinceye kadar baskıdaki şeklini koruyamayacaktır. Ayrıca ekstrüzyon temelli 3B biyobaskı için kullanılacak biyomürekkep formülasyonunun psödoplastik akış tipi göstermesi

gerekmektedir. Bu akış tipinde artan kayma hızı değerlerinde viskozite düşmektedir. Baskı işlemi sırasında viskozitenin azalması biyomürekkebin baskı ucundan kolay bir şekilde akmasını sağlamaktadır. Akışkanların viskozite değerlerinin ölçülmesi için kullanılan çeşitli viskometreler bulunmaktadır. Bu viskometreler tek noktalı (kılcal viskometreler, düşen ve dönen bilya viskometreleri) ve çok noktalı (çift eksenli viskometreler, dönen mil viskometresi, koni ve tabla (plaka) viskometresi) olarak sınıflandırılabilir. Çalışmamızdaki viskozite ölçümleri dönen mil viskometresi (Brookfield viskometresi) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerde kullanılan viskometre Resim 3.6'da gösterilmiştir. Bu yöntemde yarı katı ilaç şekillerinin viskozitesi ve akış özellikleri de tayin edilebilmektedir. Brookfield viskometresinde bir yay ile aletin motoruna bağlanan ve farklı hızda dönüş yapabilen miller bulunmaktadır. Bu millerin geometrik şekilleri birbirinden farklıdır. Ölçülecek örneğin tipine göre mil seçilmektedir. Ölçümlerin gerçekleştirilmesi için 0,5 mL biyomürekkep formülasyonu cihazda bulunan plakaya yerleştirilmiş ve biyomürekkepler için CP52 tipi mil seçilmiştir. Artan kayma hızı değerlerinde viskozite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Kayma hızı-viskozite ve kayma gerilimi-viskozite grafikleri çizilerek biyomürekkep formülasyonlarının akış tipleri belirlenmiştir.

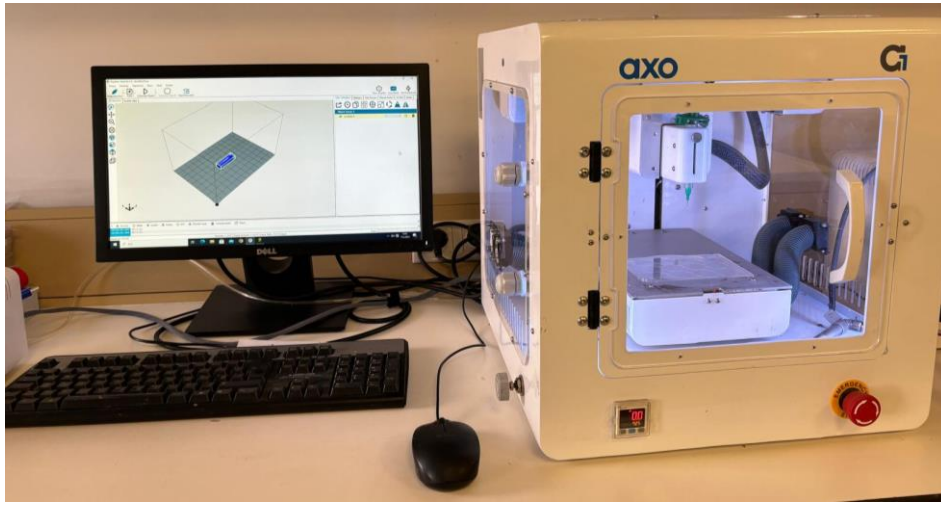


Resim 3.6. Viskozite ölçümlerinde kullanılan viskometre

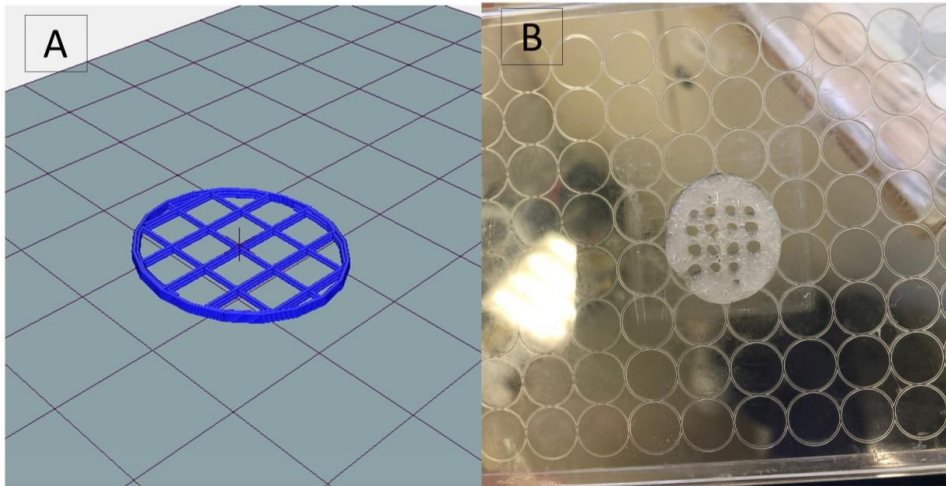
3B Biyobaskı işleminin gerçekleştirilmesi

Çalışmamızda biyomürekkeplerin 3B biyobaskısı için ekstrüzyon temelli 3B biyobaskı yöntemi kullanılmıştır. 3B biyoyazıcı ve cihazın yazılımının görüntüsü Resim 3.7’de verilmiştir. Ekstrüzyon temelli biyobaskı teknolojisinde baskı, yüksek viskoziteli biyomürekkepler kullanılarak yapılır. Yöntemin temel prensibi enjektöre doldurulan biyomürekkeplerin mekanik veya pnömatik kuvvetler yardımıyla enjektöre uygulanan basınçla akması ve bu şekilde baskı işleminin gerçekleşmesidir. Bu yöntemde genellikle psödoplastik malzemelerle çalışmak daha kolaydır. Ön çalışmalar kapsamında biyomürekkeplerin basılabilirlik parametrelerinin değerlendirilmesi için 3B biyoyazıcı kullanılarak baskı işlemleri

gerçekleştirilmiştir. Baskı işleminde kullanılan parametreler ve baskı ucu Çizelge 3.3'te verilmiştir. Basılacak materyalin tasarımı TinkerCad programı kullanılarak yapılmıştır, kullanılan tasarım ve baskı sonrası materyalin görüntüsü Resim 3.8'de gösterilmiştir. 3B biyobaskı işleminden sonra basılan materyalin çapraz bağlanması için %5 derişimde kalsiyum klorür çözeltisi kullanılmıştır. Kalsiyum klorür derişimi literatür bilgisine göre seçilmiştir (Girón-Hernández ve diğerleri, 2021). Çapraz bağlama amacıyla kalsiyum klorür kullanılmasının sebebi sodyum aljinatın kalsiyum iyonları varlığında, kalsiyum aljinata dönüşerek çapraz bağlı bir forma geçmesidir.



Resim 3.7. Hidrojel formülasyonlarının hazırlanması için kullanılan 3B biyoyazıcı ve yazılım

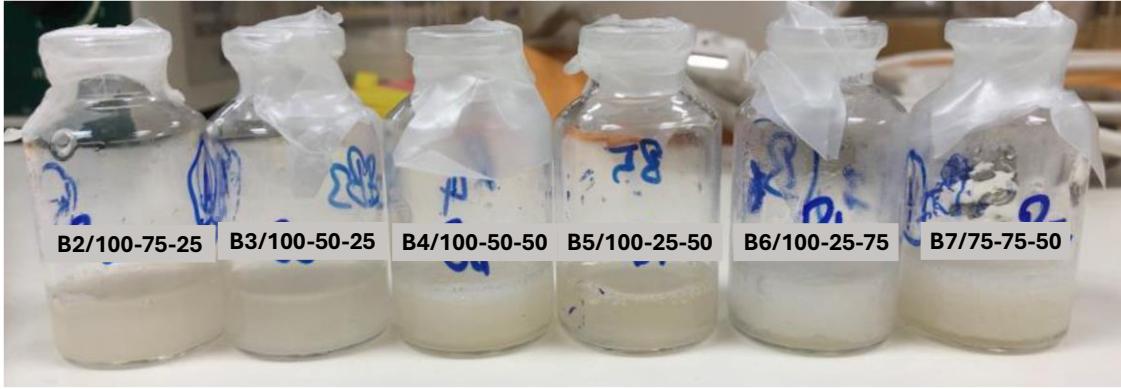


Resim 3.8. A: 3B biyoyazıcı kullanılarak basılan hidrojellerin şekilsel tasarımı B: Hidrojellerin 3B baskı sonrası görüntüsü

Yapılan değerlendirmelerde B1/100-75-20 formülasyonu, viskozite ve yüzey geriliminin 3B baskı için uygun olmaması, B8/75-50-75 formülasyonu, formülasyonda bulunan ipek fibroin miktarının düşük olması, B9/50-75-75 formülasyonu ise formülasyonda bulunan sodyum aljinat miktarının çapraz bağlama işlemi için yeterli olmaması nedeniyle daha sonraki çalışmalarda kullanılmamıştır. Diğer biyomürekkep formülasyonları her seferinde eşit miktarda formülasyon hazırlanması ve biyomürekkeplere yüklenecek olan mesalazin ve TNF- α siRNA miktarlarında sapma olmaması amacıyla sabit hacimde (5 mL) olacak şekilde tekrar hazırlanmıştır. Biyomürekkepler HA çözeltisi en fazla %2 derişimde hazırlanabildiği ve elde edilen ipek fibroin çözeltisi ise gravimetrik olarak %5 derişime sahip olduğu için formülasyonlarda yer alan SA:İF:HA polimer oranlarının mg olarak sabit kalması amacıyla SA çözeltisi derişimleri değiştirilerek hazırlanmıştır (Çizelge 3.4). Hazırlanan biyomürekkep formülasyonlarının görüntüleri Resim 3.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Sabit hacimde hazırlanan biyomürekkep formülasyon içerikleri

Biyomürekkep formülasyon kodu	Polimer Oranı (SA:İF:HA mg)	Sodyum Aljinat Miktarı (Protanal LFR 10/60)	İpek Fibroin Miktarı (%5)	Hyaluronik Asit Miktarı (%2)	Toplam Hacim
B2/100-75-25	100:75:25	2,25 mL (%4,45)	1,5 mL	1,25 mL	5 mL
B3/100-50-25	100:50:25	2,75 mL (%3,63)	1 mL	1,25 mL	
B4/100-50-50	100:50:50	1,5 mL (%6,67)	1 mL	2,5 mL	
B5/100-25-50	100:25:50	2 mL (%5)	0,5 mL	2,5 mL	
B6/100-25-75	100:25:75	0,75 mL (%13,34)	0,5 mL	3,75 mL	
B7/75-75-50	75:75:50	1 mL (%7,5)	1,5 mL	2,5 mL	



Resim 3.9. Hazırlanan biyomürekkep formülasyonlarının görünüşü

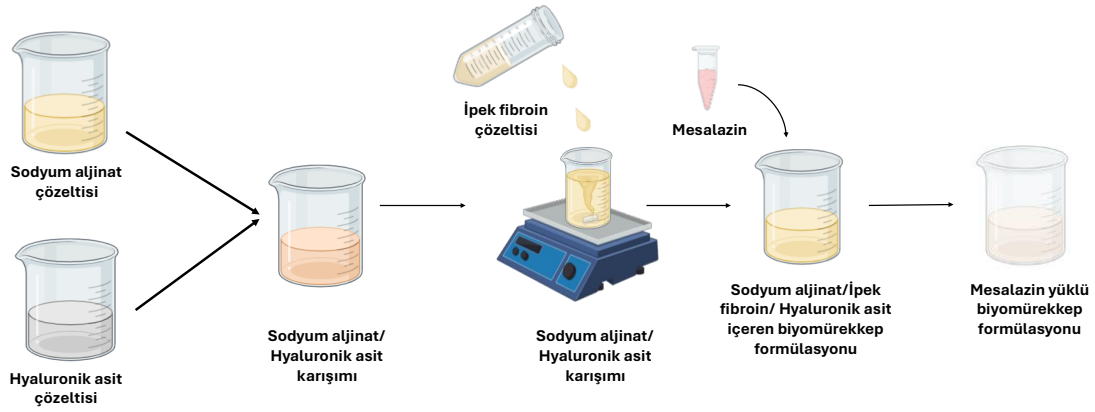
Sabit hacimde hazırlanan B2/100-75-25, B3/100-50-25, B4/100-50-50, B5/100-25-50, B6/100-25-75 ve B7/75-75-50 kodlu biyomürekkeplerin viskozite ve yüzey gerilimi ölçümleri gerçekleştirilmiş ve basılabilirlikleri değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirme sonucunda; B3/100-50-25, B4/100-50-50, B6/100-25-75 ve B7/75-75-50 formülasyonları daha sonraki çalışmalar için seçilmiştir. Bu biyomürekkepler ile 3B biyobaskı işlemi ile Resim 3.8'de gösterilen tasarıma göre ve Çizelge 3.3'te yer alan baskı parametreleri kullanılarak hidrojel basımı gerçekleştirilmiştir. 3B basılan hidrojeller, H3/100-50-25, H4/100-50-50, H6/100-25-75 ve H7/75-75-50 olarak kodlanmıştır. Baskı işleminden sonra kalsiyum klorür ile çapraz bağlama süresinin optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Çapraz bağlama süresinin optimizasyonu çalışmaları

Optimizasyon çalışmaları baskı sonrası çapraz bağlama süresinin yeterliliğinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla H3/100-50-25, H4/100-50-50, H6/100-25-75 ve H7/75-75-50 formülasyonlarının her biri için 15, 30 ve 45 dk çapraz bağlama süreleri belirlenmiştir. Basılan hidrojeller %5 kalsiyum klorür çözeltisinde belirlenen sürelerde bekletildikten sonra 37°C sıcaklıktaki etüve yerleştirilmiştir. Başlangıç, 1.saat, 2.saat, 4.saat ve 24. saatin sonunda tartılarak ağırlıkları belirlenmiştir. Her bir çapraz bağlama süresi için 24. saatin sonunda % ağırlık kaybı değerleri hesaplanmıştır. Çapraz bağlama süreleri arasında fark olup olmadığı ve ağırlık kaybını ne kadar etkilediği istatistiksel değerlendirmelerle hesaplanmıştır.

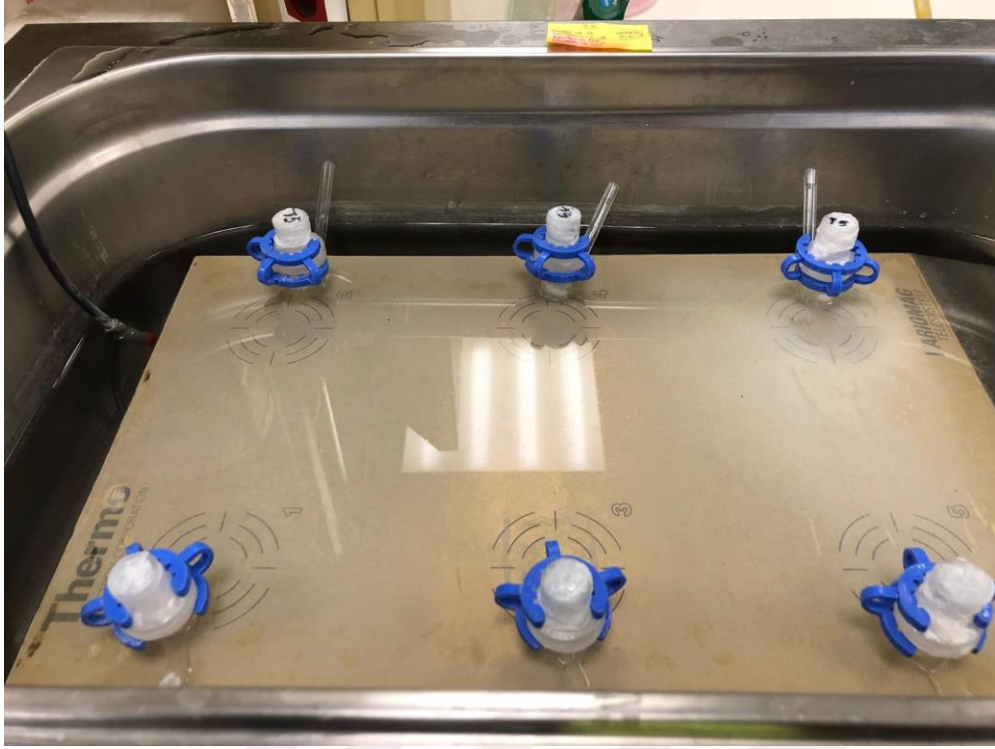
Hidrojellerden mesalazin salımı çalışması

Ön çalışmalar sonucunda seçilen biyomürekkep formülasyonları arasından seçim yapabilmek amacıyla öncelikle etkin madde salım profili değerlendirilmiştir. Mesalazin yüklü H3/100-50-25, H4/100-50-50, H6/100-25-75 ve H7/75-75-50 formülasyonlarının hazırlanması amacıyla ön çalışmalar sonucunda seçilen B3/100-50-25, B4/100-50-50, B6/100-25-75 ve B7/75-75-50 kodlu biyomürekkep formülasyonlarına Şekil 3.3'te gösterildiği gibi %2 derişimde mesalazin (5 mL için 100 mg) yüklenmiştir. Daha sonra Resim 3.8'de verilen tasarıma göre Çizelge 3.3'te verilen baskı parametreleri kullanılarak 3B biyobaskı işlemi ile mesalazin yüklü H3/100-50-25, H4/100-50-50, H6/100-25-75 ve H7/75-75-50 kodlu hidrojel formülasyonları hazırlanmıştır. Franz difüzyon hücresi yöntemi kullanılarak hem biyomürekkep formülasyonlarından hem de 3B basılmış hidrojel formülasyonlardan in vitro mesalazin salımı çalışması yapılmıştır. Franz difüzyon hücresi yöntemi; salım ortamının 2,5 mL olması nedeniyle formülasyonların küçük boyutlu hazırlanmasına imkan vererek etkin madde ve polimerlerden düşük miktarlarda harcanmasını sağlamak ve biyomürekkep formülasyonlarından mesalazin salımının değerlendirilmesi amacıyla in vitro salım çalışmalarında kullanılmıştır. Salım çalışmasının düzeneği Resim 3.10'da gösterilmiştir. Salım çalışması kapsamında gastrointestinal sistem pH değerlerinin taklit edilmesi amacıyla 0-2. saatler arası pH 1,2 ve 2-48. saatler arası pH 6,8-1 tamponları kullanılarak, 37°C'de 48 saat boyunca in vitro salım çalışması yapılmıştır. Salım çalışması sırasında 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24 ve 48. saatlerde ortamdaki örneğin tamamı çekilmiş ve yerine taze tampon eklenmiştir. Çalışma üç paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Alınan örneklerin absorbansları UV-Vis spektrofotometrede ölçülmüş ve kalibrasyon denklemleri kullanılarak % salınan mesalazin değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. Mesalazin yüklü biyomürekkep formülasyonlarının hazırlanma basamakları

İn vitro çözünme hızı ve salım çalışmaları sırasında ortamda bulunan etkin madde miktarının doyumluk derişimine ulaşması, etkin maddenin çözünürlüğünü doğrudan etkileyen bir parametredir. Vücutta çözünen etkin madde kana geçerek ortamdan uzaklaşmaktadır, böylece etkin maddenin çözünürlüğü ortamdaki etkin madde derişiminden etkilenmez. Dolayısıyla in vitro çözünme hızı çalışmalarının in vivo ortamı taklit etmek amacıyla ortamda bulunan etkin madde miktarının çözünürlüğü etkilemesini engelleyecek şekilde tasarlanması gerekmektedir. Bu durum sink koşul olarak isimlendirilmektedir. Avrupa Farmakopesi'ne göre sink koşul, deney ortamında çözünen etkin maddenin ulaşabileceği maksimum derişimin, etkin maddenin o ortamdaki doyumluk derişiminin $1/3'$ ü ile $1/10'u$ arasında olması durumunda sağlanmaktadır (Liu ve diğerleri, 2013). Amerikan Farmakopesi (USP)'ne göre ise sink koşul bir ortamda çözünen etkin madde miktarının o ortamdaki doyumluk çözünürlüğünün en az $1/3'ü$ olması durumunda sağlanmaktadır (Adrover ve diğerleri, 2015). İn vitro çözünme hızı çalışmalarında kullanılan tampon ortamlarında mesalazinin çözünürlüğü yaklaşık 1 mg/mL 'dir (Harini Chowdary ve diğerleri, 2014). Çalışma kapsamında yapılan bütün in vitro çözünme hızı ve in vitro salım çalışmalarında sink koşul sağlanarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir.



Resim 3.10. Franz difüzyon hücresi kullanılarak yapılan salım çalışmasının düzeneği

3.5. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

3.5.1. Oral uygulama için optimum formülasyonun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar

Oral uygulama için hazırlanan formülasyonun mide ortamında daha yavaş salım yapması ve salımın 24 saat sürmesi beklenmektedir. Yapılan in vitro salım çalışması sonuçlarına göre mesalazin yüklü B7/75-75-50 kodlu biyomürekkep formülasyonu ve bu biyomürekkep kullanılarak üretilen mesalazin yüklü H7/75-75-50 hidrojel formülasyonu ile en yavaş mesalazin salımı elde edilmiştir. Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere B7/75-75-50 kodlu biyomürekkep formülasyonu seçilmiştir. Salım çalışması sonucunda, salım hızının mide ortamında daha yavaşlatılması amacıyla hidrojel formülasyonunun hazırlanmasında kullanılan biyomürekkep formülasyonunda farklı aljinat tiplerinin etkisi değerlendirilmiştir. Bu amaçla Protanal LFR 10/60 yerine daha yüksek molekül ağırlığına sahip sodyum aljinat türevleri olan Manucol, Protanal CR8133, Protanal CR8223 ve Aquateric, kullanılarak biyomürekkep formülasyonları hazırlanmıştır. Bu formülasyonlarda,

B7/75-75-50 baz alınmış, sadece aljinat tipi değiştirilmiştir. Bu formülasyonlar sırasıyla M-B7, P8133-B7, P8223-B7, A-B7 olarak kodlanmıştır. Hazırlanan biyomürekkep formülasyonlarının yüzey gerilimi, viskozite ölçümleri gerçekleştirilmiş ve basılabilirlik parametresi değerlendirilmiştir. Ölçülen parametreler değerlendirildikten sonra bu biyomürekkep formülasyonlarına mesalazin yüklenerek 3B biyobaskı teknolojisiyle Bölüm 3.4.1’de yer alan “3B Biyobaskı İşleminin Gerçekleştirilmesi” başlığında anlatıldığı gibi mesalazin yüklü hidrojel formülasyonları üretilmiştir. Üretilen mesalazin yüklü hidrojel formülasyonları ise M-H7, P8133-H7, P8223-H7, A-H7 olarak kodlanmıştır. Bu formülasyonların baskısında kullanılan parametreler Çizelge 3.5’te verilmiştir. Formülasyonlar Resim 3.8’de verilen tasarıma göre basılmıştır.

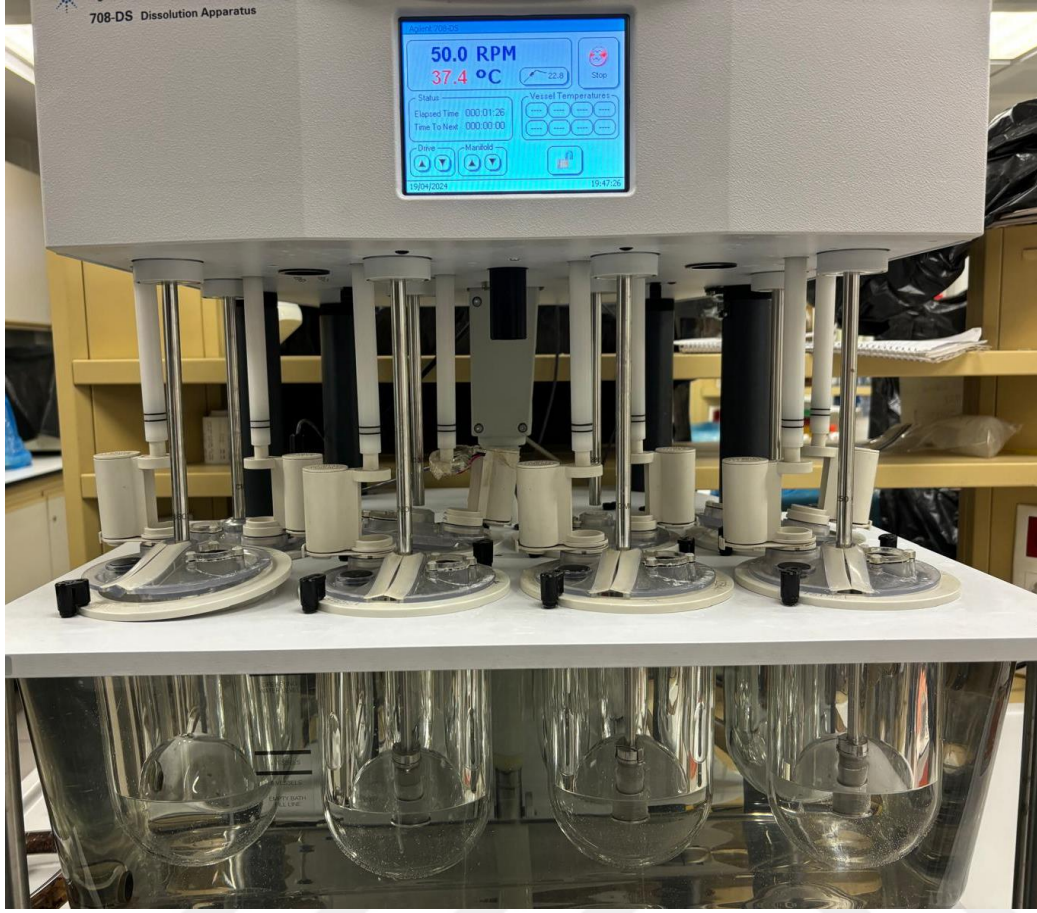
Çizelge 3.5. Farklı aljinat tipleri ile hazırlanan oral biyomürekkep formülasyonları kullanılarak üretilen hidrojel formülasyonlarının 3B baskı parametreleri

Formülasyon Kodu	Basınç	Baskı Ucu	Tasarım Boyutları	Tasarım Doluluk Oranı
M-H7/oral (Manucol)	2,5-5 Psi	19 G	X eksen:20 mm Y eksen:20 mm Z eksen:1,5 mm	%10
P8133- H7/oral (Protanal CR8133)	2-2,5 Psi			
P8223-H7/oral (Protanal CR8223)	5-7,5 Psi			
A-H7/oral (Aquateric)	1-1,5 Psi			

Optimum oral formülasyonunun belirlenmesi için in vitro çözünme hızı çalışması

İn vivo ortamdaki etkin madde salım hızını daha iyi tayin edebilmek için mesalazin yüklü hidrojellerden salım çalışmaları, USP çözünme hızı cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla önce H7/75-75-50 hidrojel formülasyonu ile çalışılmıştır. Çözünme hızı çalışmalarının gerçekleştirildiği cihaz Resim 3.11’de gösterilmiştir. İn vitro çözünme hızı çalışmalarında koşulların belirlenmesi için öncelikle çalışmalar çözünme hızı cihazında (Agilent Technologies), 37 °C sıcaklıkta USP Aparatus I kullanılarak 50 rpm dönüş hızında gerçekleştirilmiştir. İn vitro çözünme ortamı olarak gastrointestinal sistem pH’sını taklit etmek amacıyla 0-2. saatler arası 250 mL pH 1.2 tamponu, 2-24.saatler arasında ise 250 mL pH 6.8-1 tamponu kullanılmıştır. 1., 2., 4., 6., 8., 12. ve 24. saatlerde ortamdan örnek alınmış ve alınan örneklerin absorbans ölçümleri UV-Vis spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiş ve kalibrasyon denklemleri kullanılarak % salım

değerleri hesaplanmıştır. Ancak 2. saatten sonra çözünme hızı cihazında ortam değiştirirken formülasyondaki kayıptan kaynaklı olarak salım yüzdesinin %100'e ulaşmadığı görülmüştür. Daha sonra oral formülasyonlar için yapılan in vitro çözünme hızı çalışmaları için USP'ye kayıtlı bir metot olan pH'nın çözünme ortamı değiştirilmeden ayarlandığı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde ortama başlangıçta 0,1 N HCl tamponu eklenmekte, daha sonra 0,20 M tribazik sodyum fosfat çözeltisi ilave edilerek pH değeri 6,8'e ayarlanarak pH 6,8-2 tamponu elde edilmektedir. Farklı aljinat tipleri kullanılarak hazırlanmış 3B basılmış mesalazin yüklü oral formülasyonların (M-H7, P8133-H7, P8223-H7, A-H7) salım çalışması da çözünme hızı cihazında aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir (Resim 3.11). Gastrointestinal sistem pH'sını taklit etmek amacıyla 0-2. saatler arası 187,5 mL 0,1 N HCl tamponu çözünme ortamı olarak kullanılmış, 2-24. saatler arasında 250 mL pH 6,8-2 tamponu çözünme ortamı olarak kullanılmıştır. Hidrojel formülasyonlarının yüzmesinin engellenmesi amacıyla formülasyonlar sinker kullanılarak sabitlenmiştir. 1., 2., 4., 6., 8., 12. ve 24. saatlerde ortamdaki örnek alınmış, alınan örneklerin absorbansları UV-Vis spektrofotometrede ölçülmüş ve kalibrasyon denklemleri kullanılarak % salım değerleri hesaplanmıştır. Çalışma üç paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. İn vitro çözünme hızı sonuçları değerlendirilerek oral uygulama için optimum hidrojel formülasyonu ve bu hidrojel formülasyonunun baskısında kullanılan optimum biyomürekkep formülasyonu seçilmiştir.

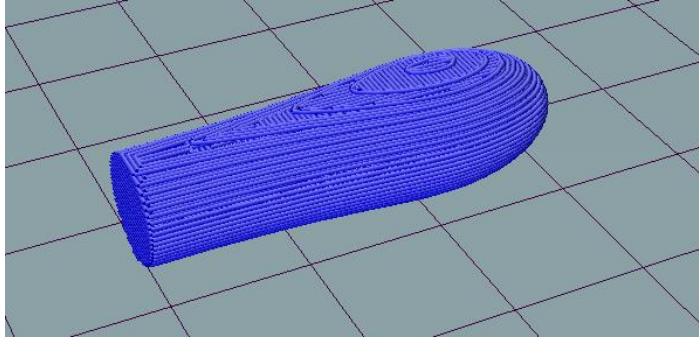


Resim 3.11. İn vitro çözünme hızı çalışmalarının gerçekleştirildiği cihaz

3.5.2. Rektal uygulama için optimum formülasyonun belirlenmesi için yapılan çalışmalar

Rektal uygulama için kullanılacak optimum biyomürekkep formülasyonunun belirlenmesi amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Oral biyomürekkep formülasyonlarında kullanılan sodyum aljinat tipleri kullanılarak (Protanal LFR 10/60 yerine daha yüksek molekül ağırlığına sahip Manucol, Protanal CR8133, Protanal CR8223 ve Aquateric) oral formülasyon için belirlenen optimum polimer oranlarında biyomürekkep formülasyonları hazırlanmıştır. Bu formülasyonlar Çizelge 3.6'da gösterildiği gibi kodlanmıştır. Hazırlanan biyomürekkep formülasyonlarının yüzey gerilimi, viskozite ölçümleri gerçekleştirilmiş ve basılabilirlik parametresi değerlendirilmiştir. Bu parametreler değerlendirildikten sonra bu biyomürekkep formülasyonlarına mesalazin yüklenerek 3B biyobaskı teknolojisiyle Bölüm 3.4.1'de yer alan “3B Biyobaskı İşleminin Gerçekleştirilmesi” başlığında anlatıldığı gibi hidrojel formülasyonları üretilmiştir. Hidrojel formülasyonlarının kodlanması Bölüm

3.5.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Bu formülasyonların baskısında kullanılan parametreler Çizelge 3.6’da verilmiştir ve formülasyonlar Resim 3.12’de verilen tasarıma göre basılmıştır.



Resim 3.12. Rektal uygulanmak üzere hazırlanan biyomürekkep formülasyonlarının baskısı için kullanılan tasarım

Çizelge 3.6. Farklı aljinat tipleri ile hazırlanan rektal biyomürekkep formülasyonları kullanılarak üretilen hidrojel formülasyonları için 3B baskı parametreleri

Hidrojel formülasyonu kodu	Basınç	Baskı Ucu	Tasarım Boyutları	Tasarım Doluluk Oranı
M-H7/rektal	2,5-5 Psi	19 G	X eksen:30 mm Y eksen:10 mm Z eksen:7,5 mm	%60
P8133- H7/rektal	2-2,5 Psi			
P8223-H7/rektal	5-7,5 Psi			
A-H7/rektal	1-1,5 Psi			

Optimum rektal formülasyonunun belirlenmesi için in vitro çözünme hızı çalışması

Farklı aljinat tipleri kullanılarak hazırlanmış 3B basılmış rektal hidrojel formülasyonlarının salım çalışması Bölüm 3.5.1’de yer alan “*Optimum oral formülasyonunun belirlenmesi için in vitro çözünme hızı çalışması*” başlığı altında anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Rektal formülasyonlar için in vitro çözünme ortamı olarak kolon pH’sını taklit etmek amacıyla 0-24. saatler arası 250 mL pH 7.4 fosfat tamponu kullanılmıştır. İn vitro çözünme hızı sonuçları değerlendirilerek rektal uygulama için optimum hidrojel formülasyonu ve bu hidrojel formülasyonunun baskısında kullanılan optimum biyomürekkep formülasyonu seçilmiştir.

3.5.3. Oral ve rektal uygulamada kullanılmak üzere 3B biyobaskı için optimum biyomürekkep formülasyonlarının hazırlanması

Formülasyon çalışmaları sonucunda oral ve rektal uygulama için iki ayrı optimum biyomürekkep formülasyonu seçilmiştir. Oral uygulama için optimum biyomürekkep P8223-B7 kodlu formülasyon, rektal uygulama için ise optimum biyomürekkep P8133-B7 kodlu formülasyon olarak seçilmiştir. Bu aşamadan sonra hazırlanan bütün hidrojel formülasyonları bu biyomürekkep formülasyonları kullanılarak hazırlanmıştır. Formülasyonların içeriği Çizelge 3.7’de verilmiştir. Biyomürekkep formülasyonları Şekil 3.2’de gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.7. Optimum oral ve rektal biyomürekkep formülasyonlarının içerikleri

Biyomürekkep formülasyon tipi	Biyomürekkep formülasyon kodu	Polimer Oranı (SA:İF:HA mg)	SA Miktarı	İF Miktarı (%5)	HA Miktarı (%2)	Toplam Hacim
Oral formülasyon	P8223- B7/oral	75:75:50	2,25 mL (%4,45)	1,5 mL	1,25 mL	5 mL
Rektal formülasyon	P8133-B7/rektal	75:75:50	2,75 mL (%3,63)	1 mL	1,25 mL	

3.6. Optimum Oral ve Rektal Biyomürekkep Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları

Yapılan önformülasyon ve formülasyon çalışmaları sonucunda belirlenen optimum oral ve rektal biyomürekkep formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları kapsamında yüzey gerilimi, viskozite ölçümleri ile viskoelastisite ve reolojik özelliklerin belirlenmesi amacıyla da osilasyonel reometre kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Yüzey gerilimi ve viskozite ölçümleri Bölüm 3.4.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

Osilasyonel reometre analizleri¹:

3B ekstrüzyon temelli biyobaskı için kullanılacak biyomürekkeplerin akış özelliklerinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Bu yöntem ile baskıda kullanılacak biyomürekkeplerin psödoplastik akış özelliği göstermesi gerekmektedir. Bu nedenle

¹ Osilasyonel reometre analiz çalışmaları Bilkent UNAM’da yapılmıştır.

biyomürekkep formülasyonlarının viskoelastisite ve reolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla dinamik osilatör reometresi ile analizler gerçekleştirilmiştir. Reolojik özelliklerin belirlenmesinde osilasyonel=salınımlı=titreşimli reometre (oscillatory) veya akış reometresinin tercih edilmesinin sebebi bu cihaz ile ölçüm yapıldığında biyomürekkeplerin hem viskoelastisite hem de reolojik özelliklerinin belirlenebilmesidir.

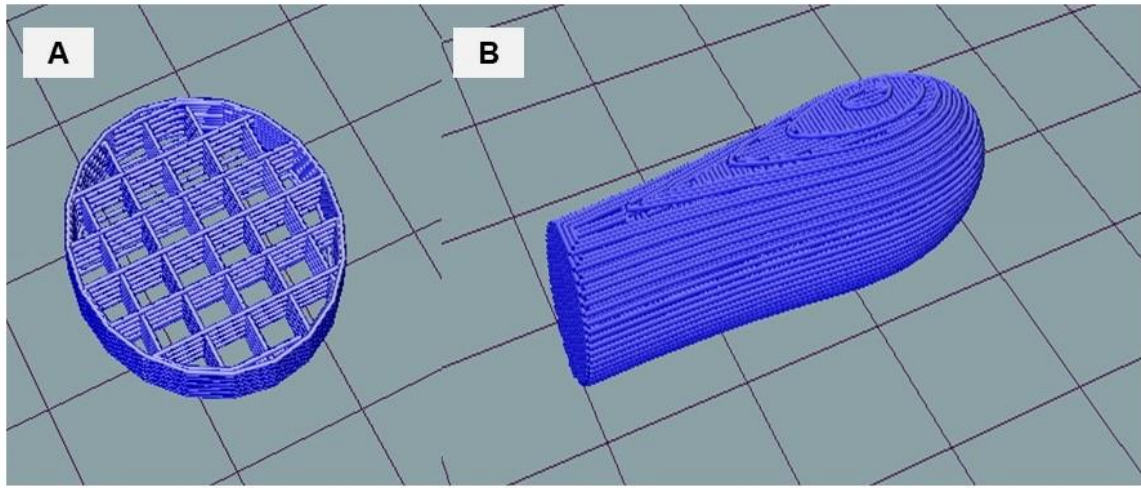
Osilasyonel reometresi kullanılarak hem oral hem de rektal optimum biyomürekkep formülasyonunun kayıp modülü (G'') ve depolama modülü (G') ölçümleri hem artan frekans değerlerine hem de artan kayma gerilimi değerlerine karşı ölçülmüştür.

3.7. Oral ve Rektal Uygulama İçin Sadece Mesalazin Yüklü Optimum Hidrojel Formülasyonlarının 3B Biyobaskı İşlemi

Mesalazin içeren piyasa preparatlarıyla tez çalışmamızda geliştirilen mesalazin yüklü oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının salım profillerinin karşılaştırılması amacıyla sadece mesalazin yüklü oral ve rektal hidrojel formülasyonları geliştirilmiştir. Sadece mesalazin yüklü optimum oral ve rektal hidrojel formülasyonları, Çizelge 3.7'de içerikleri verilen optimum oral ve rektal biyomürekkep formülasyonlarına Şekil 3.3'te gösterildiği gibi %2 derişimde mesalazin yüklenerek hazırlanan biyomürekkep formülasyonları kullanılarak ekstrüzyon temelli 3B biyoyazıcı ile Bölüm 3.4.1'de yer alan “*3B Biyobaskı İşleminin Gerçekleştirilmesi*” başlığında anlatıldığı gibi üretilmiştir. Formülasyonların baskı parametreleri Çizelge 3.8'de verilmiştir. Oral hidrojel formülasyonlarda mide ortamında daha yavaş bir mesalazin salımının elde edilmesi ve salımın geciktirilmesi amacıyla oral formülasyonların 3B biyobaskısı için kullanılan tasarım değiştirilmiş ve tasarımın Z eksenı yönünde boyutu artırılmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda Resim 3.13'te verilen tasarım kullanılmıştır. Oral mesalazin yüklü hidrojel formülasyonu O-Mes, rektal mesalazin yüklü hidrojel formülasyonu ise R-Mes olarak kodlanmıştır.

Çizelge 3.8. Optimum oral ve rektal sadece mesalazin yüklü hidrojel formülasyonları için baskı parametreleri

Formülasyon tipi	Hidrojel formülasyon kodu	Formülasyon üretimi için kullanılan biyomürekkep formülasyon kodu	Basınç	Baskı Ucu	Tasarım parametreleri	Tasarım Doluluk Oranı
Oral hidrojel	O-Mes	P8223- B7/oral	5-7,5 Psi	19 G	X eksen:20 mm Y eksen:20 mm Z eksen:4,5 mm	%10
Rektal hidrojel	R-Mes	P8133-B7/rektal	2-2,5 Psi	19 G	X eksen:30 mm Y eksen:5 mm Z eksen:7,5 mm	%60



Resim 3.13. Hidrojel formülasyonlarına ait tasarımlar. A: Oral formülasyon B: Rektal formülasyon

3.8. Sadece Mesalazin Yüklü Optimum Oral ve Rektal Hidrojel Formülasyonları ile Yapılan in Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları

Sadece mesalazin yüklü optimum 3B basılmış oral formülasyondan (O-Mes) in vitro mesalazin salım çalışması Bölüm 3.5.1’de yer alan “*Optimum oral formülasyonunun belirlenmesi için in vitro çözünme hızı çalışması*” başlığı altında anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Oral formülasyonun salım profili, mesalazin içeren piyasa preparatı Pentasa® tablet (O-Ticari) ile karşılaştırılmıştır. Salım profillerinin karşılaştırılması amacıyla DDSolver yazılımı kullanılarak f1 (fark faktörü) ve f2 (benzerlik faktörü) hesaplanmıştır.

Sadece mesalazin yüklü optimum 3B basılmış rektal formülasyondan (R-Mes) mesalazinin salım çalışması Bölüm 3.5.2’de yer alan “*Optimum rektal formülasyonunun belirlenmesi için in vitro çözünme hızı çalışması*” başlığı altında anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Rektal formülasyonun in vitro mesalazin salım profili, mesalazin içeren piyasa preparatı Salofalk® supozituar (R-Ticari) ile karşılaştırılmıştır. Salım profillerinin karşılaştırılması amacıyla DDSolver yazılımı kullanılarak f1 (fark faktörü) ve f2 (benzerlik faktörü) hesaplanmıştır.

3.9. TNF- α Geninin Susturulması Amacıyla Hazırlanan Formülasyonlar

3.9.1. Kitozan:TNF- α siRNA polipekslerinin hazırlanması

Çalışmamızda TNF- α geninin susturulması amacıyla formülasyonlara kitozan:TNF- α siRNA polipekslerinin eklenmesi planlanmıştır. Katyonik bir polisakkarit olan kitozan, siRNA ile elektrostatik olarak etkileşime girerek polipeks oluşturmaktadır (Serrano-Sevilla ve diğerleri, 2019). Kitozan:TNF- α siRNA polipekslerinin hazırlanması amacıyla TNF- α genine özgü TNF- α siRNA kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan sense ve antisense siRNA’ların baz dizilimleri Çizelge 3.9’da verilmiştir. Polipekslerin hazırlanması için düşük molekül ağırlıklı kitozan kullanılmıştır. Bu amaçla Çizelge 3.10’da gösterildiği gibi 13 farklı oranda kitozan TNF- α siRNA hazırlanarak polipeksler oluşturulmuştur.

Çizelge 3.10’da verilen oranlarda TNF- α siRNA ve kitozan 20 μ L hacimde bir tüpte karıştırılmış ve 10 saniye hafif şiddetle vorteksle karıştırıldıktan sonra polipekslerin oluşması amacıyla 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Çalışmada TNF- α siRNA derişimi 30 μ g/mL olarak sabit tutulmuştur. Çizelge 3.10’da verilen oranları elde edebilmek amacıyla farklı derişimlerde kitozan çözeltileri hazırlanmıştır. Kitozan çözeltilerinin hazırlanması için pH 4,5 asetat tamponu kullanılmıştır. Tampon nükleaz içermeyen distile su kullanılarak hazırlanmıştır.

Çizelge 3.9. Çalışmada kullanılan TNF- α siRNA’ların baz dizilimleri

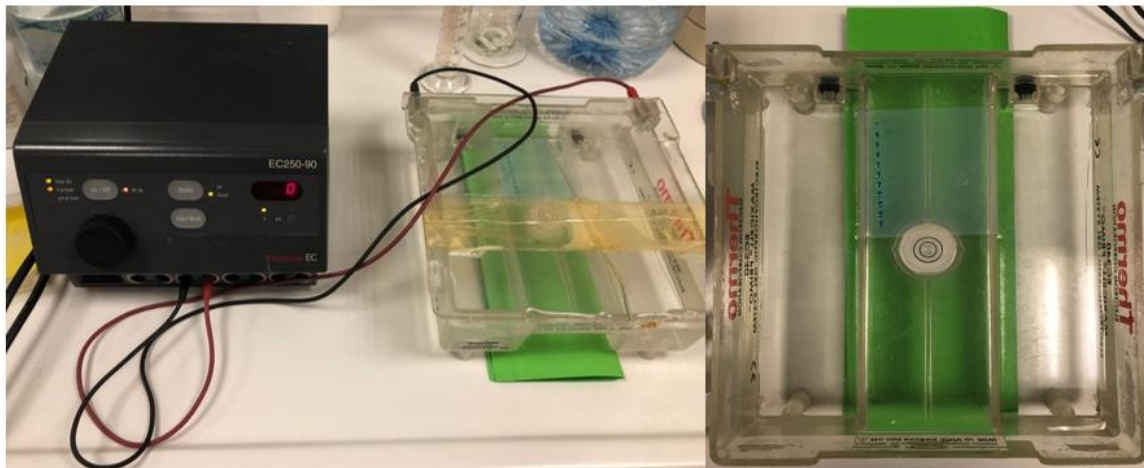
siRNA türü	Baz dizilimi
Sense TNF- α siRNA	5'-GACAACCAACUAGUGGUGCdTdT-3'
Antisense TNF- α siRNA	5'-GCACCACUAGUUGGUUGUCdTdT-3'

Çizelge 3.10. Kitozan-TNF- α siRNA polipekslerini hazırlamak için kullanılan oranlar

Polipeks kodu	Kitozan-TNF- α siRNA oranı
P-0,1	0,1
P-0,25	0,25
P-0,5	0,5
P-1	1
P-2	2
P-4	4
P-6	6
P-8	8
P-10	10
P-20	20
P-30	30
P-40	40
P-50	50

3.9.2. Kitozan:TNF- α siRNA polipekslerinin karakterizasyonu

Polipeksler hazırlandıktan sonra, Kitozan:TNF- α siRNA polipeks oluşum oranını belirlemek amacıyla jel retardasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla %2'lik agaroz jel kullanılarak hazırlanan polipeksler 100 V'da 30 dakika yatay jel elektroforez cihazı kullanılarak sürüklenmiştir. Elektroforez işlemi için kullanılan cihaz Resim 3.14'te gösterilmiştir. Sürüklenme işlemi bittikten sonra agaroz jeller 10 dakika etidyum bromür çözeltisinde bekletilmiş ve UV lamba altında GeneSnap® programı ile görüntülenmiştir.



Resim 3.14. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan yatay jel elektroforez cihazı

Jel görüntülerine göre polipeks oluşumunun gözlenmeye başladığı orandan itibaren polipekslerin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri Malvern Zetasizer ile gerçekleştirilmiştir. Böylece kompleks oluşumu doğrulanmıştır.

3.10. Hücre Kültürü Çalışmaları¹

Hücre kültürü çalışmalarında İBH hastalığı araştırmalarında sıklıkla kullanılan fare makrofaj hücre hattı RAW 264.7 (ATCC ® TIB71™) kullanılmıştır. Hücre kültürü üretici protokolüne göre, 75 cm²'lik flasklarda (PBI International), %10 FBS (Fötal Bovine Serum-ATCC) ve antibiyotik (penisilin-streptomisin, ATCC) içeren ortam (DMEM) içerisinde %5 CO₂ etüvde 37 °C'de yapılmıştır. Hücrelerin konfluentliği Juli Br cihazın yazılımı kullanılarak kontrol edilmiş ve %70'e ulaştıklarında subkültürleri; haftada bir her bir flask başına 3 mL 1:3 Tripsin–EDTA çözeltisi (ATCC) ile yapılmıştır. Konfluent RAW 264.7 hücrelerine ait mikroskop görüntüsü Resim 3.15'te sunulmuştur.



Resim 3.15. RAW 264.7 hücrelerinin mikroskop görüntüsü

Hücre kültürü çalışmaları kapsamında sitotoksosite ve in vitro gen susturma çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar için formülasyonda yer alan etkin madde olan mesalazinin ve TNF- α siRNA polipleksinin tek tek ve birlikte sitotoksitelerinin ve gen susturma etkinliklerinin değerlendirilmesi amacıyla 3B biyobaskı teknolojisiyle hidrojel formülasyonları geliştirilmiştir. Bu hidrojel formülasyonlarının kodları ve içerikleri Çizelge 3.11'de yer almaktadır.

¹ Hücre kültürü çalışmaları Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Yardımları için kendilerine teşekkür ederiz.

Çizelge 3.11. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hidrojel formülasyonlarının kodları ve içerikleri

Formülasyon kodu	Formülasyon içeriği	Formülasyon geliştirilmesinde kullanılan biyomürekkep kodu
O-Boş	Oral-boş hidrojel	P8223- B7
R-Boş	Rektal-boş hidrojel	P8133-B7
O-P-40	Oral- polileks P-40 yüklü hidrojel	P8223- B7
R-P-40	Rektal-polileks P-40 yüklü hidrojel	P8133-B7
O-P-50	Oral- polileks P-50 yüklü hidrojel	P8223- B7
R-P-50	Rektal- polileks P-50 yüklü hidrojel	P8133-B7
O-Mes	Oral-mesalazin yüklü hidrojel	P8223- B7
R-Mes	Rektal-mesalazin yüklü hidrojel	P8133-B7
O-Mes-P-40	Oral-mesalazin ve polileks P-40 yüklü hidrojel	P8223- B7
R-Mes-P-40	Rektal-mesalazin ve polileks P-40 yüklü hidrojel	P8133-B7
O-Mes-P-50	Oral-mesalazin ve polileks P-50 yüklü hidrojel	P8223- B7
R-Mes-P-50	Rektal- mesalazin ve polileks P-50 yüklü hidrojel	P8133-B7

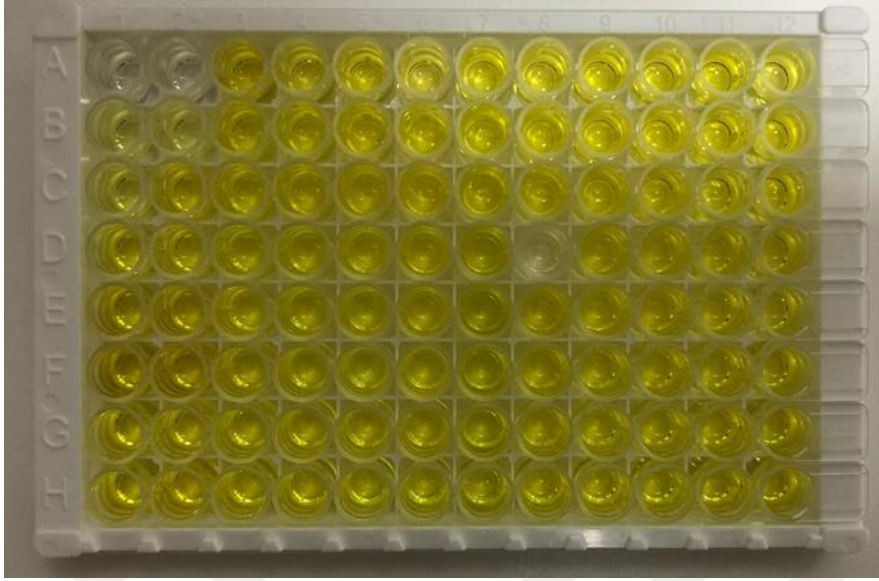
3.10.1. İn vitro TNF- α gen susturma çalışmaları

Mesalazinin TNF- α geninin susturulması üzerinde tek başına etkisinin değerlendirilmesi amacıyla mesalazin içeren ve içermeyen oral ve rektal hidrojel formülasyonları önceki bölümlerde anlatıldığı gibi 3B biyobaskı yöntemiyle hazırlanmıştır. Ayrıca Bölüm 3.9.2’de anlatılan karakterizasyon çalışmalarına göre seçilen P-40 ve P-50 polilekslerinin tek başına ve mesalazin içeren ve içermeyen hidrojel formülasyonlarına ayrı ayrı yüklenerek gen susturma etkinliği değerlendirilmiştir. İn vitro gen susturma etkinliği değerlendirilecek hidrojel formülasyonlarının kodlaması Çizelge 3.11’de verilmiştir. Literatürde gen susturma etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan TNF- α siRNA dozları göz önünde bulundurularak polileks ve hidrojel formülasyonları içerecek şekilde hazırlanmıştır (Frede ve diğerleri, 2016; McCarthy ve diğerleri, 2013). İn vitro gen susturma çalışması için hazırlanan 3B basılmış hidrojel formülasyonlarının görüntüsü Resim 3.22’de gösterilmiştir. İn vitro gen susturma etkinliği değerlendirilen formülasyonlar Çizelge 3.12’de gösterilmiştir. Hazırlanan formülasyonların in vitro TNF- α genini susturma etkinliklerinin değerlendirilmesi amacıyla, RAW 264.7 hücre hattında transfeksiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kültürü yapılan hücreler, uygulama gününden bir gün önce polileksler için 12 kuyucuklu plakalara (1×10^6

hücre/mL) ve formülasyonlar için ise 24 kuyucuklu insertli plakalara (1×10^5 hücre/mL) aktarılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak DharmaFECT™ transfeksiyon ajanı kullanılarak TNF- α siRNA polipleksleri hazırlanmış ve üretici protokolüne göre transfeksiyon gerçekleştirilmiştir (DharmaFECT™ Transfection Reagents siRNA Transfection Protocol). TNF- α siRNA içeren formülasyonlar ve kitozan:TNF- α siRNA polipleksleri kuyucuklara uygulanarak transfeksiyonun gerçekleşmesi için 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda her kuyucuğa 100 ng/mL derişimde lipopolisakkarit (LPS) ilave edilerek 5 saat daha inkübasyona bırakılmış ve makrofajların aktivasyonu sağlanmıştır (Xu ve diğerleri, 2019). Süre sonunda tüm kuyucuklardaki hücreler kaldırılarak 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı atılarak, çöken hücre süspansiyonlarına 100 μ L PBS eklenerek dilüe edilmiştir. PBS ile dilüe edilen hücre süspansiyonlarından 100 μ L alınarak TNF- α içerikleri Mouse TNF- α ELISA kiti kullanarak kit protokolüne göre ELISA yöntemiyle (Spectramax ix3) tayin edilmiştir (Wilson ve diğerleri, 2010; Xu ve diğerleri, 2019). İn vitro gen susturma çalışmalarında kullanılan ELISA kitine ait plaka görüntüsü Resim 3.16'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlar Graphpad Prism 10.1.2 yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.12. İn vitro gen susturma etkinliği değerlendirilen formülasyonlar

Formülasyon türü	Formülasyon kodu
Polipleks	P-40
	P-50
Oral ve Rektal Hidrojel Formülasyonları	O-Boş
	R-Boş
	O-P-40
	R-P-40
	O-P-50
	R-P-50
	O-Mes
	R-Mes
	O-Mes-P-40
	R-Mes-P-40
	O-Mes-P-50
	R-Mes-P-50



Resim 3.16. İn vitro gen susturma çalışmalarında kullanılan ELISA kitine ait plaka görüntüsü

3.10.2. Sitotoksosite çalışmaları

Sitotoksosite çalışmaları, formülasyon geliştirilmesinde kullanılan polimerler (Sodyum aljinat-Protanal CR8223, Sodyum aljinat-Protanal CR8133, hyaluronik asit, ipek fibroin, kitozan), etkin madde olan mesalazin, naked (çıplak) sense ve antisense TNF- α siRNA ve Bölüm 3.6.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan farklı oranlardaki polipeksler ile gerçekleştirilmiştir. Sitotoksosite çalışması yapılacak hidrojel formülasyonlarının kodlaması Çizelge 3.11’de verilmiştir ve bu hazırlanan 3B basılmış hidrojel formülasyonlarının görüntüsü Resim 3.22’de gösterilmiştir. Sitotoksosite çalışmaları için hazırlanan polipeks yüklü hidrojel formülasyonuna yüklenecek polipekse in vitro gen susturma çalışmaları sonucunda karar verilmiştir.

Formülasyonların hücrelere uygulanması için hücreler uygulama gününden bir gün önce, 96 kuyucuklu plakalara ve 24 kuyucuklu insertli plakalara 1×10^5 hücre/mL olacak şekilde aktarılmıştır. Formülasyon hazırlanmasında kullanılan polimerlerin, etkin madde mesalazinin naked (çıplak) sense ve antisense TNF- α siRNA’nın sitotoksosite tayinlerinin yapılması amacıyla Çizelge 3.13’te gösterilen derişimlerde steril hücre kültürü vasatında (serum ve antibiyotik içermeyen) stok çözeltileri hazırlanmıştır. Test çözeltileri, stok çözeltilerden seyreltilerek Çizelge 3.13’te verilen derişimlerde hazırlanmıştır. Hücrelere uygulamadan önce bütün test çözeltileri 0,22

μm membran filtreden süzölmüştür. Çözeltiler 100 μL hacimde 96 kuyucuklu plakalara uygulanmıştır. 3B biyobaskı yöntemiyle hazırlanan ve Bölüm 3.15'te anlatılan ve Çizelge 3.17'de yer alan in vivo çalışmalarda kullanılacak oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının ve farklı oranlardaki polipeks formülasyonlarının sitotoksosite tayinleri ise 24 kuyucuklu insertli plakalarda yapılmıştır. Formülasyonlar hazırlandıktan sonra UV lamba ile sterilize edilerek insert içerisine yerleştirilmiştir. Sitotoksosite tayini yapılan formülasyonlar Çizelge 3.14'te gösterilmiştir. Uygulama sonrası 24 saat inkübasyonu takiben MTT test protokolü uygulanmıştır. 24 saat sonunda, 96 ve 24 kuyucuklu plakalara 25 μL MTT çözeltisi (5 mg/mL PBS (Fosfatla tamponlanmış izotonik çözelti) içerisinde) eklenmiştir. Formazan oluşumunun makroskobik olarak görüldüğü dört saatlik inkübasyondan sonra, 100 μL DMSO ilave edilmiştir. Işığa duyarlı bir yöntem olmasından dolayı çalışmanın tamamı karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Plakalar, horizontal karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra (100 rpm, 20 dakika), optik dansiteleri mikropilaka okuyucuda 540 nm dalga boyunda okunmuştur (SpectraMax i3 Multi-Mode Platform, Molecular Devices, ABD). Sitotoksosite çalışmalarına ait plaka görüntüsü Resim 3.17'de gösterilmiştir. Numune uygulanan hücrelerdeki sitotoksosite yüzde (%) olarak ifade edilmiş ve uygulanmayan, %100 canlı kabul edilen pozitif kontrol grubuna göre sitotoksosite hesaplaması aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır. Formülde ODtest, numune kuyucuklarının ODkontrol ise, uygulama yapılmayan kontrol kuyucuklarının absorbans değerini ifade etmektedir (Mutlu-Ağardan ve diğerleri, 2020).

$$\% \text{Canlılık} = \frac{OD_{test}}{OD_{kontrol}} \times 100 \quad (3.1)$$

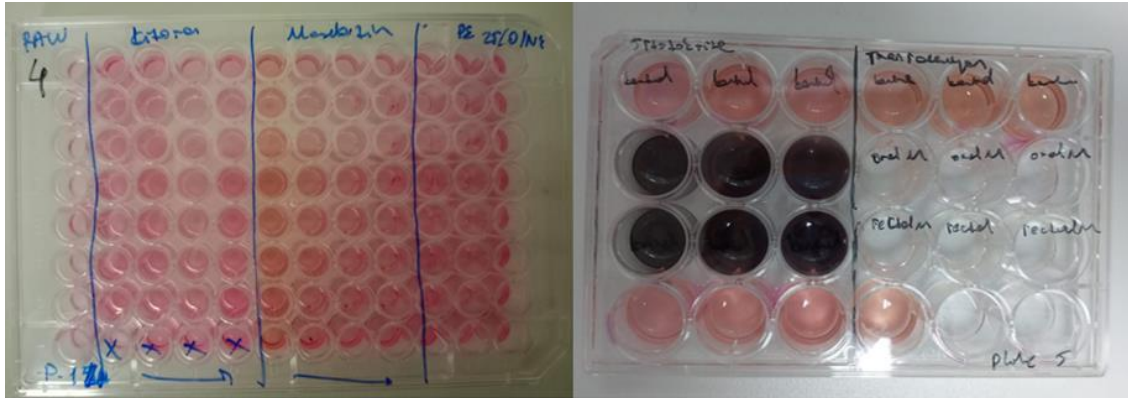
Daha sonra sonuçlar Graphpad Prism 10.1.2 yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.13. Sitotoksosite tayini yapılan materyaller ile sitotoksosite tayini için kullanılan stok ve test çözeltilerinin derişimleri

Sitotoksosite materyal	analizi yapılan	Stok çözelti derişimleri	Test çözelti derişimleri
İpek fibroin		4 mg/mL	4 mg/mL 2 mg/mL 1 mg/mL 0,5 mg/mL
Hyaluronik Asit		3 mg/mL	3 mg/mL 1,5 mg/mL 0,75 mg/mL 0,375 mg/mL
Sodyum aljinat-Protanal CR8133		0,75 mg/mL	0,75 mg/mL 0,375 mg/mL 0,1875 mg/mL 0,09375 mg/mL
Sodyum aljinat-Protanal CR8223		3 mg/mL	3 mg/mL 1,5 mg/mL 0,75 mg/mL 0,375 mg/mL
Kitozan		0,75 mg/mL	0,75 mg/mL 0,375 mg/mL 0,1875 mg/mL 0,09375 mg/mL
Mesalazin		2 mg/mL	2 mg/mL 1 mg/mL 0,5 mg/mL 0,25 mg/mL
Sense TNF- α siRNA		90 μ g/mL	90 μ g/mL 60 μ g/mL 30 μ g/mL 15 μ g/mL
Antisense TNF- α siRNA		90 μ g/mL	90 μ g/mL 60 μ g/mL 30 μ g/mL 15 μ g/mL

Çizelge 3.14. Sitotoksosite tayini yapılan formülasyonlar

Formülasyon türü	Formülasyon kodu
Polipleks formülasyonları	P-20 P-30 P-40 P-50
Oral ve Rektal Hidrojel Formülasyonları	O-Boş R-Boş O-P-40 R-P-40 O-Mes R-Mes O-Mes-P-40 R-Mes-P-40



Resim 3.17. Sitotoksosite çalışmalarına ait plaka görüntüleri

3.11. Kitozan:TNF- α siRNA Polileksi ile Fizyolojik Sıvılarda Stabilitte Çalışmaları

Karakterizasyon ve in vitro gen susturma çalışmaları sonucu seçilen kitozan:TNF- α siRNA polileksinin (P-40) fizyolojik ortamlarda stabilite çalışması yapılmıştır. Bu çalışma pH 1,2 (mide) ve pH 6,8 (ince bağırsak) ortamlarında 37 °C'de gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın amacı pH 1,2 ve pH 6,8-1 ortamlarında TNF- α siRNA'nın parçalanıp parçalanmadığı hakkında fikir sahibi olmaktır. Polileks oluşturmanın stabiliteye etkisinin değerlendirmesi amacıyla naked (çıplak) siRNA'lar da çalışma grubuna eklenmiştir. pH 1,2'de 1. ve 2. saatlerde, pH 6,8-1'de ise 2. ve 6. saatlerde örnek alınarak 100 V ile 30 dk jel retardasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Parçalanmış TNF- α siRNA'nın jeldeki görüntüsünü değerlendirmek amacıyla naked (çıplak) ve polileks halindeki TNF- α siRNA'lara RNAaz enzimi eklenmiştir. Jel retardasyon çalışmasından sonra jeller 10 dakika etidyum bromürde bekletilerek GeneSnap programı ile UV lamba altında görüntülenmiştir (Chukwudi ve diğerleri, 2016).

3.12. TNF- α siRNA ve Mesalazin İçeren Optimum Oral ve Rektal Hidrojel Formülasyonlarının 3B Biyobaskı Yöntemiyle Hazırlanması

Daha önceki çalışmalar ile belirlenmiş Çizelge 3.8'de içerikleri verilen optimum oral ve optimum rektal biyomürekkep formülasyonlarına, mesalazin ve kitozan:TNF- α siRNA polileksi eklenerek biyomürekkep formülasyonları hazırlanmıştır. Biyomürekkep formülasyonuna eklenen optimum kitozan:TNF- α siRNA polileksi Bölüm 3.9.2'de anlatılan karakterizasyon çalışmaları olan partikül büyüklüğü, zeta

potansiyel, polidispersite indeksi ve Bölüm 3.10.1’de anlatılan in vitro gen susturma çalışmaları sonucunda belirlenmiştir. Biyomürekkep formülasyonları Şekil 3.3’te gösterildiği gibi hazırlanmış, formülasyona en son TNF- α siRNA polileksi eklenmiştir. TNF- α siRNA eklenecek biyomürekkep formülasyonlarının hazırlanmasında nükleaz içermeyen distile su kullanılmıştır.

Biyomürekkep formülasyonları hazırlandıktan sonra bu biyomürekkep formülasyonları kullanılarak ekstrüzyon temelli 3B biyoyazıcı ile Bölüm 3.4.1’de yer alan “3B Biyobaskı İşleminin Gerçekleştirilmesi” başlığında anlatıldığı gibi TNF- α siRNA ve mesalazin yüklü formülasyonlar geliştirilmiştir. Biyomürekkep formülasyonlarının 3B biyobaskı işlemi için kullanılan parametreler Çizelge 3.8’de verilmiştir. Oral ve rektal hidrojel formülasyonları Resim 3.13’te gösterilen tasarıma göre basılmıştır. Optimum oral TNF- α siRNA ve mesalazin yüklü hidrojel formülasyonu O-Mes-P-40 olarak ve optimum rektal TNF- α siRNA ve mesalazin yüklü hidrojel formülasyonu ise R-Mes-P-40 olarak kodlanmıştır (Çizelge 3.11). Hidrojel formülasyonlarının içerikleri Çizelge 3.15’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.15. O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 kodlu hidrojel formülasyonlarının içerikleri

	Hidrojel formülasyon kodu	
	O-Mes-P-40	R-Mes-P-40
Kullanılan boş biyomürekkep formülasyon kodu	P8223-B7	P8133-B7
TNF- α siRNA miktarı	110,8 μ g	110,8 μ g
Mesalazin miktarı	30 mg	20 mg

3.13. TNF- α siRNA ve mesalazin içeren oral ve rektal formülasyonların karakterizasyon çalışmaları

TNF- α siRNA ve mesalazin içeren oral ve rektal 3B basılmış hidrojel formülasyonları üretildikten sonra karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar kapsamında DSC, FT-IR, XRD, TGA analizleri, şişme kapasitesi ölçümleri, in vitro parçalanma deneyi, mekanik testler, mukoadesyon deneyi ve morfolojik analizler gerçekleştirilmiştir.

3.13.1. DSC analizleri

Formülasyonların üretimi için ekstrüzyon temelli 3B biyobaskı yöntemi kullanıldığı için formülasyonların hazırlanması sırasında formülasyon bileşenlerinin yapılarında oluşabilecek olası değişikliklerin analiz edilmesi amacıyla hem oral hem de rektal formülasyonların DSC analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.13.2. FTIR analizleri

Formülasyonların hazırlanması sırasında bileşenlerde meydana gelebilecek olası değişikliklerin tespit edilmesi amacıyla oral ve rektal formülasyonlar için FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. FTIR analizleri hem hidrojeller hem de liyofilize hidrojeller için yapılmıştır. FTIR analizleri Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.13.3. XRD analizleri

Formülasyonda yer alan bileşenlerin kristal yapılarında formülasyonların hazırlanması aşamasında bir değişiklik olup olmadığının belirlenmesi amacıyla oral ve rektal formülasyonlar için XRD analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.13.4. Termogravimetrik analizler

Termogravimetrik analiz, zamanın veya sıcaklığın bir fonksiyonu olarak numunenin ağırlığındaki değişimin ölçülmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Bu yöntemde, analiz edilen numune ısıtıldıkça ağırlık değişimini ölçen hassas bir terazi bulunmaktadır. Çalışmamızda hazırlanan formülasyonların termal stabilitesinin ve formülasyonlardaki su içeriğinin belirlenmesi amacıyla termogravimetrik analizler gerçekleştirilmiştir. Analizlerin gerçekleştirildiği cihaz Resim 3.18'de gösterilmiştir. Oral ve rektal formülasyon azot gazı altında 10°C/dk hızda 500 °C'ye kadar ısıtılmış ve artan sıcaklık değerine karşı formülasyondaki ağırlık kaybı izlenmiştir.



Resim 3.18. Termogravimetrik analizlerin gerçekleştirildiği cihaz

3.13.5. Şişme kapasitesi ölçümleri

Şişme kapasitesi, bir formülasyonun su tutma kapasitesini ifade etmektedir. Şişme kapasitesinin belirlenmesi için şişme indeksi değeri hesaplanmaktadır. Şişme kapasitesi formülasyonların uygulandığı bölgede kalış süresini etkilemektedir. Çalışmamız kapsamında hazırlanan formülasyonlar hidrojel yapısında olduğu için oral ve rektal formülasyonların şişme indeksi hesaplanmıştır. Bu amaçla formülasyonlar tartılarak başlangıç ağırlıkları belirlenmiş ve daha sonra distile su içerisinde bekletilmiştir. Ağırlık sabitleninceye kadar belirli zaman aralıklarında formülasyonlar tartılarak son ağırlık belirlenmiştir. Daha sonra aşağıdaki eşitlik kullanılarak her iki formülasyon için de şişme indeksi hesaplanmıştır (Eş. 3.3). Çalışmalar üç paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme indeksi} = (\text{Son ağırlık} - \text{Başlangıçtaki ağırlık}) / (\text{Başlangıçtaki ağırlık}) \times 100$$

(3.3)

Oral ve rektal formülasyonlarının şişme kapasiteleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığının belirlenmesi amacıyla istatistiksel analiz gerçekleştirilmiştir.

3.13.6. İn vitro parçalanma deneyi

Çalışma kapsamında hazırlanan oral ve rektal formülasyonların vücut ortamında parçalanma sürelerinin belirlenmesi amacıyla in vitro parçalanma çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla oral formülasyonlar 0-2. Saatler arası pH 1,2'de, 2-24. Saatler arası da pH 6,8-2 tamponunda, rektal formülasyonlar 0-24.saatler arası pH 7,4 tamponunda 37°C'de bekletilmiştir. Başlangıç ağırlıkları tartılmış, daha sonra 1., 2., ve 24. Saatte formülasyonlar tartılmış ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak (Eş. 3.4) %parçalanma değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra bu değerler kullanılarak % parçalanma-zaman grafiği çizilmiştir. Çalışmalar üç paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{parçalanma} = (t \text{ anındaki ağırlık} - \text{Başlangıçtaki Ağırlık}) / (\text{Başlangıçtaki Ağırlık}) \times 100$$

(3.4)

3.13.7. Mekanik testler

Çalışmada hazırlanan formülasyonların dayanıklılığının belirlenmesi amacıyla mekanik özellikleri Texture-Analyzer TA-TX cihazı kullanılarak test edilmiştir. Bu amaçla hem oral hem rektal formülasyonlardan 1x3 cm boyutunda örnekler kesilmiş ve daha sonra bu örneklerin kalınlıkları mikrometre yardımıyla ölçülmüştür. Daha sonra bu bilgiler cihazın yazılımına girilmiş ve kesilen örnekler cihazın probuna yerleştirilerek ölçümler gerçekleştirilmiştir. Ölçümler sonrasında gerilim (mPa)'e karşı gerinim (%) grafikleri elde edilmiş ve bu grafikler kullanılarak gerilme direnci ve kopma uzaması değerleri hesaplanmıştır. Çalışmalar üç paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.13.8. Mukoadezyon deneyleri

Mukoadezyon hazırlanan bir formülasyonun dokuya yapışarak etki süresinin uzaması açısından önemli bir parametredir. Çalışma kapsamında oral ve rektal formülasyonların mukoadazyon özelliklerinin belirlenmesi için Texture-Analyzer TA-TX cihazı kullanılmıştır. Oral ve rektal formülasyonların etki bölgesinin kolon olması amaçlandığı ve in vivo deneylerde deney hayvanı olarak fare kullanıldığı için çalışmalar fare kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşumunun formülasyonların mukoadazyonuna etkisinin incelenmesi amacıyla doku olarak hem sağlıklı kolon hem de inflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulmuş kolon kullanılmıştır. Deneylerin yapılması amacıyla, cihazın üst probuna doku, prob çapına uygun boyutta kesilen formülasyonlar ise cihazın alt kısmına yapıştırılmıştır. Daha önceki çalışmalarda valide edilmiş yöntem kullanılarak çalışma gerçekleştirilmiştir. Mukoadazyon deneyi için kullanılan test parametreleri Çizelge 3.16'da verilmiştir.

Çizelge 3.16. Mukoadazyon deneyi için kullanılan test parametreleri

Test Parametreleri	Kullanılan Değerler
Prob hızı	1 mm/sn
Probun uyguladığı kuvvet	0,2 N
Mukoza ile formülasyonun temas süresi	60 sn

Deneyde kullanılan Texture-Analyzer TA-TX cihazının penetrometresi ile fare kolon mukozası ve formülasyonların belirli süre temas halinde kaldıktan sonra materyallerin birbirinden ayrılması için uygulanan kuvvet ve bu amaçla yapılan iş değerleri cihazın yazılım programı ile belirlenmiştir. Deney sonucunda uygulanan kuvvet (N)- mesafe (mm) grafiği elde edilmektedir ve bu grafikteki eğri altında kalan alan (AUC) mukoadazyon işini vermektedir. Aşağıdaki eşitlik (Eş. 3.5) kullanılarak mukoadazyon işi hesaplanmış ve formülasyonların mukoadezif özellikleri değerlendirilmiştir. Çalışmalar üç paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

$$\text{Mukoadezyon işi} = \text{Mukoadezyon alanı(AUC)} / \pi r^2 \quad (3.5)$$

$$\pi r^2 = 0,6 \times 0,6 \times 3,14 = 1,1304$$

3.13.9. Morfolojik analizler¹

Çalışma kapsamında 3B biyobaskı yöntemiyle hazırlanmış formülasyonların morfolojik analizleri taramalı elektron mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Formülasyonların morfolojisinin daha iyi analiz edilmesi amacıyla, oral ve rektal formülasyonlar -55 °C'de 40 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Formülasyonların hem liyofilize hem de liyofilize olmamış halleri taramalı elektron mikroskobu kullanılarak görüntülenmiş ve formülasyonların morfolojisi değerlendirilmiştir. Morfolojik analizlerde kullanılan taramalı elektron mikroskobu (SEM) Resim 3.19 'da gösterilmiştir.



Resim 3.19. Morfolojik analizlerde kullanılan taramalı elektron mikroskobu

3.14. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları

TNF- α siRNA'nın hidrojel formülasyonuna serbest veya polileks halinde eklenmesinin salıma olan etkisinin değerlendirilmesi amacıyla in vitro çözünme hızı

¹ SEM görüntülemeleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda yapılmıştır

çalışmaları mesalazin-serbest TNF- α siRNA ve mesalazin-kitozan: TNF- α siRNA polileksi yüklü oral ve rektal hidrojel formülasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Formülasyonlara serbest TNF- α siRNA, polilekste bulunan TNF- α siRNA miktarı kadar eklenmiştir. Serbest TNF- α siRNA içeren oral formülasyonlar O-Mes-Serbest ve rektal formülasyonlar R-Mes-Serbest olarak kodlanmıştır.

O-Mes-P-40 ve O-Mes-Serbest hidrojel formülasyonları için salım çalışmaları Bölüm 3.5.1’de yer alan “*Optimum oral formülasyonunun belirlenmesi için in vitro çözünme hızı çalışması*” başlığı altında anlatıldığı gibi, R-Mes-P-40 ve R-Mes-Serbest formülasyonları için Bölüm 3.5.2’de yer alan “*Optimum rektal formülasyonunun belirlenmesi için in vitro çözünme hızı çalışması*” başlığı altında anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

Hidrojel formülasyonlarının yüzmesinin engellenmesi amacıyla formülasyonlar sinker kullanılarak sabitlenmiştir. 1., 2., 4., 6., 8., 12. Ve 24. Saatlerde ortamdan örnek alınmış ve ortama salınan mesalazin ve siRNA miktarı, serbest TNF- α siRNA ve kitozan:TNF- α siRNA polileksi içeren formülasyonlar için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Çalışma üç paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Formülasyona siRNA eklenmesinin formülasyonlardan mesalazin salımına etkisinin değerlendirilmesi amacıyla DD Solver programı kullanılarak f2 (benzerlik faktörü) ve f1(fark faktörü) hesaplanmıştır. Mesalazin miktarları UV-Vis spektrofotometre ile, TNF- α siRNA miktarı ise Quant-it RiboGreen Assay kit kullanılarak, üretici protokolüne göre florometrik yöntemle tayin edilmiştir. Ayrıca ortamdan alınan örnekler ile jel retardasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Salım çalışmaları sonucunda hem oral hem de rektal formülasyon için DDSolver yazılımı ile % salım değerleri kullanılarak formülasyonlardan mesalazin ve TNF- α siRNA salım kinetikleri belirlenmiştir (Yao ve diğerleri, 2010).

3.15. İn Vivo Çalışmalar

İn vivo deneyler Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı tarafından onaylanan 26/06/2020 tarihli 66332047-604.01.02-sayılı ve

27/10/2023 tarihli E-66332047-604.01.02-785782 sayılı izinler doğrultusunda, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Deneysel Araştırmalar Ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda deney hayvanı olarak fare (Balb/c fare erkek, 20-40 gram ağırlığında) kullanılmıştır. 12 tane deney grubu oluşturulmuştur ve her deney grubu için 6'şar adet fare kullanılmıştır. Deney grupları Çizelge 3.17'de verilmiştir. Deney gruplarının isimlendirilmesi Çizelge 3.11'de yer alan hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hidrojel formülasyonlarına göre yapılmıştır.

Çizelge 3.17. İn vivo çalışmalar için oluşturulan deney grupları

Gruplar	Gruptaki fare sayısı	Grup isimlendirilmesi
Boş kontrol grubu	n=6	NK (Negatif kontrol)
İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulmuş kontrol grubu	n=6	PK (Pozitif kontrol)
İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra ipek fibroin-temelli boş hidrojel formülasyonu uygulanan grup	Oral uygulama (n=6)	O-Boş
	Rektal uygulama (n=6)	R-Boş
İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra kitozan/TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grup	Oral uygulama (n=6)	O-P-40
	Rektal uygulama (n=6)	R-P-40
İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra mesalazin yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grup	Oral uygulama (n=6)	O-Mes
	Rektal uygulama (n=6)	R-Mes
İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra mesalazin ve kitozan/TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grup	Oral uygulama (n=6)	O-Mes-P-40
	Rektal uygulama (n=6)	R-Mes-P-40
İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra ticari Pentasa® (500 mg) preparatı uygulanan grup	Oral uygulama (n=6)	O-Ticari
İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra ticari Salofalk® (500 mg) supozituar uygulanan grup	Rektal uygulama (n=6)	R-Ticari

Hayvanlar deney öncesi ve deney sırasında standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve sıcaklık koşullarında (24°-25°C) tutulmuş ve deney boyunca standart pellet fare yemi ile beslenmiştir.

Çalışma boyunca her gün farelerin tükettiği pellet yem ve su miktarının, ağırlık değişimlerinin, gaita varlığının, gaita kıvamları ve gaitalarının kan içerip içermediğinin belirlenebilmesi amacıyla fareler ayrı ayrı kafeslerde izlenmiştir (Resim 3.20).



Resim 3.20. Farelerin yerleştirildiği tekli kafeslerin görüntüsü

3.15.1. Deney hayvanlarında dekstran sodyum sülfat ile inflamatuvar bağırsak hastalığı modeli oluşturulması

Farelerde İBH modeli oluşturmak için dekstran sodyum sülfat (DSS) kullanılmıştır. Bu amaçla farelerin içme suyuna %3,5 a/a DSS eklenmiştir ve 5 gün boyunca fareler DSS içeren içme suyunu içmişlerdir. Hastalığın oluşumunu izlemek için DSS içeren su verilen gün boyunca farelerin dışkı ve rektum takibi Çizelge 3.18’de verilen skorlamaya göre (Chassaing ve diğerleri, 2014) yapılmıştır. İnflamatuvar bağırsak hastalığı modeli oluşmuş rektal kanaması olan bir farenin görüntüsü Resim 3.21’de verilmiştir.



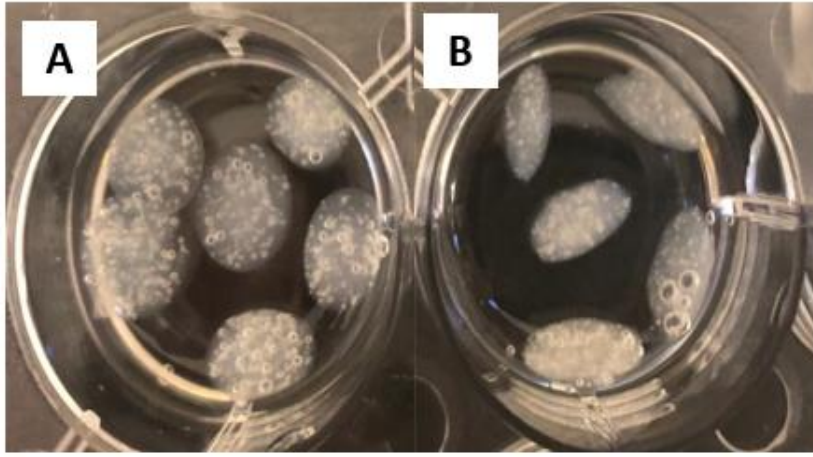
Resim 3.21. İnflamatuvar bağırsak hastalığı modeli oluşmuş rektal kanaması olan bir farenin görüntüsü

Çizelge 3.18. DSS ile inflamatuvar bağırsak hastalığı oluşumunu takip etmek için kullanılan skorlama

Parametre	Skor
Normal dışkı	0
Yumuşak dışkı	1
Kan izleri olan çok yumuşak dışkı	2
Görünür rektal kanamayla birlikte sulu dışkı	3

3.15.2. Deney gruplarına uygulanan tedavi protokolü

İn vivo deneylerde fareler 5 gün boyunca DSS içeren içme suyu tüketmişlerdir. 6.gün DSS içeren içme suyu normal içme suyu ile değiştirilmiş ve tedaviye başlanmıştır. Tedavi 5 gün sürdürülmüştür. Tedavi uygulanan günlerde fareler tedavi uygulanmadan önce 12 saat aç bırakılmıştır. Oral ve rektal hidrojel formülasyonları, tedaviden hemen önce 3B biyobaskı yöntemiyle basılmış ve farelere uygulanmıştır. Basılan hidrojel formülasyonlarının görüntüsü Resim 3.22’de gösterilmiştir.



Resim 3.22. Farelerde tedavide kullanılmak üzere 3B biyobaskı yöntemiyle hazırlanmış hidrojellerin görüntüsü. A: Oral hidrojeller B: Rektal hidrojeller

Farelere oral hidrojel formülasyon uygulanması için hazırlanan hidrojeller farelerin yutabileceği şekilde parçalanmış ve oral yoldan farelere verilmiştir. Farelerin formülasyonu yutması için formülasyon verilmesi esnasında su içirilmiştir (Resim 3.23). Oral piyasa preparatı Pentasa® tablet ise 0,2 mL su içerisinde dağıtılarak oral yoldan uygulanmıştır. Rektal formülasyonlar farelerin rektumundan insülin enjektörü yardımıyla uygulanmıştır. Bu amaçla rektal hidrojel formülasyonları ve rektal piyasa preparatı Salofalk® supozituar 0,2 mL su içerisinde dağıtılmış ve enjektöre çekilmiştir. Rektuma uygulama yapıldıktan sonra sızıntıları önlemek amacıyla, fareler 60 saniye boyunca baş aşağı (Trendelenburg pozisyonu) tutulmuştur (Resim 3.24). İn vivo çalışmalar için kullanılacak formülasyonlar 1 mg/25 g (40 mg/kg) dozunda mesalazin ve 110,8 µg/25 g (4,432 mg/kg) dozunda TNF-α siRNA içerecek şekilde uygulama gününde hazırlanmıştır. Bu miktarlar deneylerde kullanılan farelerin ortalama ağırlığına göre belirlenmiştir. Oral ve rektal piyasa preparatları 1,2 mg/25 g (48 mg/kg) dozda farelere uygulanmıştır.



Resim 3.23. Farelere oral hidrojellerin uygulanması



Resim 3.24. Farelere rektal hidrojelilerin uygulanması

3.15.3. Kolon dokusu örneklerinin alınması ve değerlendirilmesi

Farelerde sakrifikasyon işlemi öncesinde anestezinin sağlanması amacıyla ketamin hidroklorür 50 mg/kg dozunda ve ksilazin hidroklorür 5 mg/kg dozunda intramusküler olarak uygulanmıştır. Fareler anestezieye alınmadan önce tartılarak ağırlıkları kaydedilmiştir. Anestezi işleminden sonra sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirilmiştir.

- Farelerin mid-line insizyonla batinları açılarak çekumdan itibaren tüm kolon, karaciğer ve dalakları çıkarılmıştır (Resim 3.25)

- Kolon çıkarıldıktan sonra dalakla birlikte fotoğrafları çekilmiş daha sonra, tüm kolon ve dalak ağırlığı-ayrıca karaciğer ağırlığı kaydedilmiştir.
- Kolondaki lezyonların makroskopik değerlendirmesi yapılmıştır.
- Kolonun bir kısmı histolojik analizler için formole alınmış, diğer kısmı da %0,9 NaCl ile yıkanıp kurularak immünolojik analizlerde kullanılmak üzere -196 °C sıvı azota alınarak hemen dondurulmuş ve ardından çalışmalara kadar -80°C'de saklanmıştır.



Resim 3.25. Midline insizyonla farelerin batinlarının açılması ve kolonlarının çıkarılması

Makroskopik analizler

Tedavi bittikten sonra, çalışmanın 11. Gününde sakrifiye edilen farelerin kolon mukozasındaki makroskopik hasar değerlendirilmesi için Çizelge 3.19'da bulunan makroskopik skorum kriterleri kullanılmıştır (Wallace ve diğerleri, 1989).

Çizelge 3.19. Makroskopik skorum kriterleri

Puan	Kriter
0	Hasar yok
1	Hiperemi
2	Hiperemi ile beraber duvar kalınlaşması
3	Duvar kalınlaşması gerçekleşmeden soliter ülser varlığı
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.

3.15.4. Kolon dokularının homojenizasyonu ve biyokimyasal çalışmalar için hazırlanması

Fareler sakrifiye edildikten sonra farelerden alınan kolon dokuları saklama poşetlerine konulmuş ve analiz gerçekleştirilinceye kadar -80°C'de saklanmıştır. Kolon dokularının homojenizasyon işlemlerinde pH 7,4 PBS kullanılmıştır. Homojenizasyon işlemi öncesinde kolon dokuları çözünmelerine izin vermeden tartılmış ve tüplere konulmuştur. Daha sonra dokuların üzerine 1 mL PBS ilave edilmiştir. Homojenizasyon işlemi sırasında dokuların ısınmasını engellemek amacıyla buz kullanılmıştır. Homojenizasyon işlemi sonrasında elde edilen homojenatlar, 4 °C'de santrifüj edilerek süpernatantlar mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır.

3.15.5. Kolon mukozasında yapılan biyokimyasal çalışmalar

Farelerden alınan kolon dokularında biyokimyasal analizler yapılmıştır. Biyokimyasal analizler kapsamında IL-12, IL-6, TNF- α , malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) seviyeleri ölçülmüştür.

IL-12, IL-6 ve TNF- α seviyelerinin ölçülmesi

İn vivo çalışmada kullanılan farelerin kolon mukozasının IL-12, IL-6 ve TNF- α seviyeleri Elisa (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay) yöntemi ile Boster® (Amerika) markalı kitler kullanılarak ayrı ayrı ölçülmüştür.

Bu amaçla 0,2 g kolon dokusu alınarak, PBS (pH 7.4) ile (1:5) homojenizasyon işlemi sonikasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve daha sonra hazırlanan örnekler 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatantlar alınmıştır. IL-6, IL-12 ve TNF- α seviyelerinin ölçülmesi kit protokollerine göre gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan kitlere ait standart IL-12, IL-6 ve TNF- α kalibrasyon doğruları kullanılarak IL-12, IL-6 ve TNF- α derişimleri pg/mL olarak hesaplanmıştır.

Nitrik oksit seviyesinin ölçülmesi

Yaklaşık 0.2 g kolon dokusu, pH 7,4 PBS ile (1:5) homojenize edildikten sonra, 3500 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. 200 µL süzüntüye, ortamdaki nitratı nitrite indirgemek amacıyla eşit miktarda vanadyum (III) klorür (VCl_3) eklenmiş ve 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra sodyum fosfat tamponu ve eşit miktarlarda karıştırılmış olan Griess I (%0.2'lik naftiletilediamin dihidroklorür (NEDD) ve Griess II (% 10'luk fosforik asit (H_3PO_4) içinde % 2'lik sülfanilamid) reaktifleri eklenmiştir. 37 °C'de 10 dk inkübasyondan sonra numunelerin absorbansları UV-Vis spektrofotometrede köre karşı 540 nm dalga boyunda okunmuştur. Kalibrasyon doğrusu oluşturmak için 6,4 mM'lık stok sodyum nitrit ($NaNO_2$) standartı dilüe dilerek, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 ve 1 µM derişimlerde standartlar elde edilmiştir ve bu standartların UV-Vis spektrofotometrede absorbansları okunarak bir kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir. Hazırlanan bu doğrudan dokulardaki NO derişimi µmol/g doku olarak hesaplanmıştır (Yener, 2013).

Malondialdehit (MDA) seviyesinin ölçülmesi

Kolon dokusundaki MDA derişim tayini için, 0.2 g doku, %10'luk trikloroasetik asit (TCA) ile (1:9) homojenize edildikten sonra, 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. 750 µL süzüntüye, bütilhidroksi toluenin etanoldeki %1'lik çözeltisi ve %0.67'lik tiyobarbitürik asit eklenerek 15 dk benmaride kaynamaya bırakılmıştır. Daha sonra numunelerin absorbansları UV-Vis spektrofotometrede köre karşı 450 nm dalga boyunda okunmuştur. Kalibrasyon doğrusu oluşturmak için standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksi propanın asit hidrolizi ile elde edilen malondialdehit kullanılmıştır. 1 mM derişimde stok çözeltiden hareketle, farklı derişimlerde standart çözelti (örneğin, 2.5, 5, 10 nmol) hazırlanarak standartlar elde edilmiştir ve bu standartların UV-Vis spektrofotometrede absorbansları okunarak bir kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir. Hazırlanan bu doğrudan dokulardaki NO derişimi µmol/g doku olarak hesaplanmıştır (Yener, 2013).

3.15.6. Histolojik analizler

Histolojik çalışmalar in vivo deneylerden sonra hayvanlardan alınan kolon mukozal doku örnekleri kullanılarak yapılmıştır.¹

Histomorfolojik analizler

Her bir örnek ilk önce serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra % 4 nötral-tamponlanmış formol solüsyonu içerisinde tespit edilerek parafine gömülmüştür. Parafin bloklardan, 5 µm'lik kesitler alınmıştır. Kesitlerin histomorfolojik analizleri için standart Mallory'nin modifiye üçlü boyaması yapılmıştır. Tüm bulgular ışık mikroskopunda (Leica DM 2500) değerlendirilmiş ve görüntülenmiştir (Leica DFC 450). Histopatolojik değişikliklerin skorlanması doku hasarı ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu değerlerinin toplamına göre Çizelge 3.20'de verilen kriterlere göre hesaplanmıştır (Wirtz ve diğerleri, 2017).

Çizelge 3.20. Histopatolojik değişikliklerin skorlanması için kriterler

Skor	Doku Hasarı	İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu
0	Hiç	Seyrek
1	Fokal epitel hasarı	Artmış, birkaç nötrofil
2	Derin mukozal doku hasarı	İnflamatuvar hücre kümelerinin submukozal varlığı
3	Bağırsak duvarının derinliklerinde geniş hasar	Transmural hücre infiltrasyonu

İmmunohistokimyasal analizler

Her bir doku örneği serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra % 4 nötral-tamponlanmış formol solüsyonu içerisinde tespit edilerek parafine gömülmüştür. Parafin bloklardan hazırlanan 4 µm kalınlığındaki kesitler poly-L lizin kaplı lamlara alınmıştır. Kesitler 37 °C'de bir gece etüvde bekletildikten sonra deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemleri uygulanıp distile suya alınmıştır. Bu aşamayı takiben endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için %3'lük H₂O₂ (metanolle hazırlanmış) de 20 dk bekletilen kesitler bunun ardından 5 dk süreyle distile suda yıkanmıştır. Antijen retrieval (geri kazanım) protokolü için kesitler, içerisinde 0.01M sitrat tamponu (pH

¹ Histolojik çalışmalar Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesin Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Yardımları için kendilerine teşekkür ederiz.

6.0) bulunan plastik mikro dalga şalesine aktarılmıştır. Şale mikrodalga fırının dönen platformunun orta noktasına yerleştirilerek 600 W'da beşer dakika süreyle ardı ardına dört kez ısıtılmıştır. Her beş dakikada bir şaledaki tampon miktarı kontrol edilerek azalan kısım distile suyla tamamlanmıştır. Daha sonra mikrodalga fırından çıkarılan kesitler oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan doku kesitleri 5 dakika süreyle PBS ile yıkanıp PAP-PEN ile etrafları çizilmiştir. Antijen retrieval protokolü sonrası PBS'de yıkanan kesitler, spesifik olmayan antikor bağlanmalarını önlemek amacıyla %10'luk normal fare serumu ile 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Protein bloklama aşamasından sonra kesitler yıkanmadan primer antikorda +4 °C'de 12 saat tutulmuştur. Primer antikor olarak, anti TNF- α kullanılmıştır. Negatif kontrol amacıyla, primer antikor basamağı atlanılarak, izleyen basamaklar kesitlere uygulanmıştır. Biotinlenmiş sekonder antikor ile 30 dk boyunca muamele edildikten sonra streptavidin horseradish peroksidaz ile 30 dk boyunca 37 °C'de nemli ortamda inkübe edilmiştir. Kesitler her inkübasyon öncesi 10 dk süre ile PBS solüsyonu ile yıkanmıştır. Ardından kesitler diaminobenzidin (DAB) kromojen substratıyla muamele edilip çeşme suyu ile yıkanmıştır. Son olarak kesitler Gill's hematoksilin ile zıt boyamaları yapıp dehidre edilerek entellan ile kapatılmıştır. Tüm bulgular ışık mikroskobunda (Leica DM 2500) değerlendirilmiş ve görüntülenmiştir (Leica DFC 450). TNF- α için immünohistokimyasal skor, pozitif boyalı hücrelerin yüzdesi (0, yok; 1, <%1; 2, %1–10; 3, %11–33; 4, %34–66; 5, %67–100) ve yoğunluk puanlarının (0, yok; 1, zayıf; 2, orta; 3, güçlü) toplamına göre hesaplanmıştır. Bu amaçla, körleme olarak histometrik ve histolojik analiz için bölümler seçilmiştir. Daha sonra objektif bir değerlendirme yapılması amacıyla başka iki araştırmacı tarafından yine körleme olarak histometrik analizi gerçekleştirilmiştir. Her bölüm için değerler, verilerdeki varyasyonları azaltmak için aynı araştırmacı tarafından farklı günlerde üç kez ölçülmüştür (Chamanara ve diğerleri, 2019).

3.16. İstatistiksel Değerlendirme

Projede elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için Graphpad Prism 10.1.2 yazılımı kullanılmıştır. Bulguların ortalama standart sapma (SS) ve standart hata (SH) değerleri hesaplanmıştır. Tüm analizlerde parametrik testler kullanılmıştır. İstatistiksel değerlendirme ikiden fazla grup olduğu için tek yönlü

varyans analizi (ANOVA) kullanılarak yapılmıştır. ANOVA sonrasında örnekler bir kontrol grubuna karşı kıyaslanacak ise Dunnett T3 testi, örnekler birbirleri arasında kıyaslanacak ise Tukey HSD testi kullanılarak posthoc analizler gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler %95 güven aralığında yapılmıştır. Analizlerde 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı fark olarak değerlendirilmiştir. 0,05'ten büyük çıkması durumunda ise anlamlı bir farklılık olmadığı şeklinde değerlendirilmiştir.

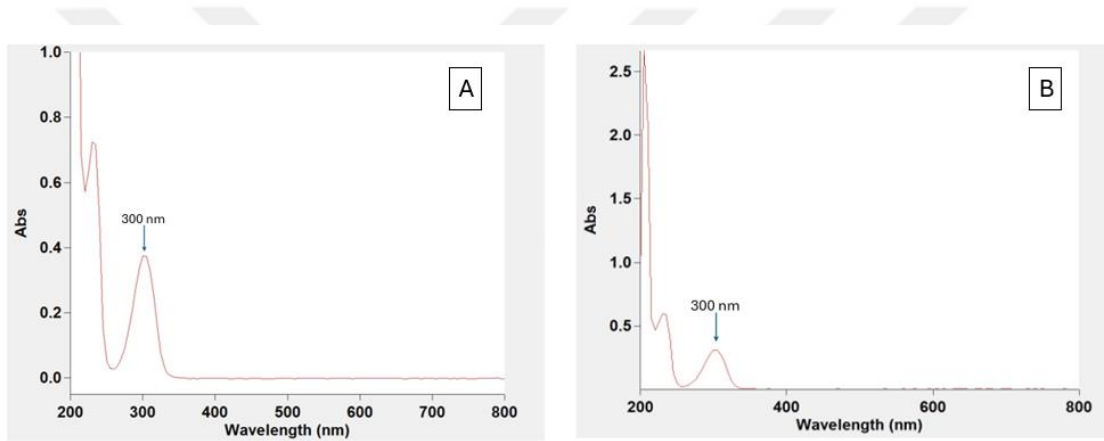


4. BULGULAR

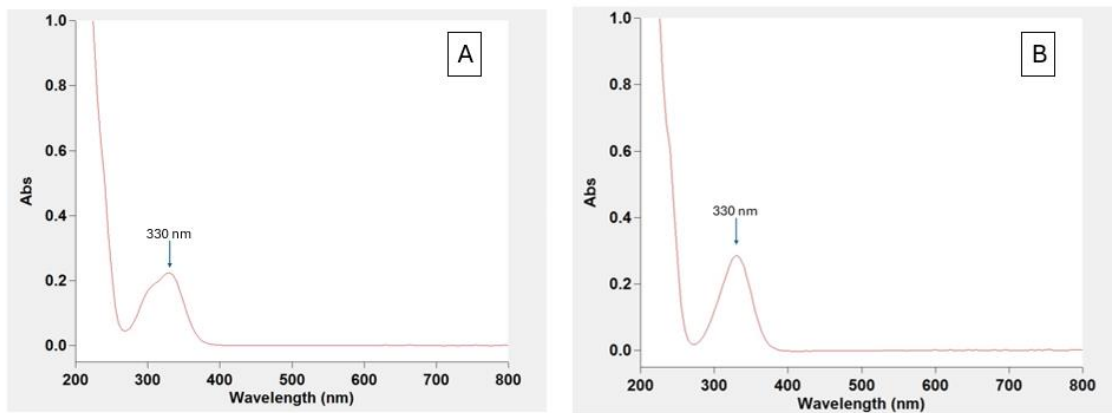
4.1. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmaları

4.1.1. Mesalazinin miktar tayini yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu

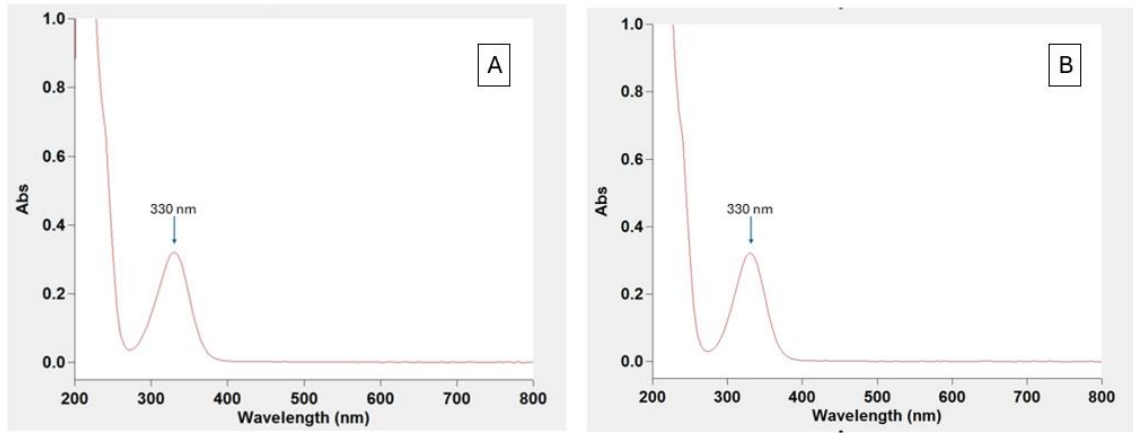
Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi mesalazin için yapılan tarama sonucunda λ_{max} , 0,1 N HCl, pH 1,2, için 300 nm, distile su, pH 6,8-1, pH 6,8-2 ve pH 7,4 için 330 nm olarak belirlenmiştir. Yapılan taramalar sonucu elde edilen spektrumlar Şekil 4.1-4.3’te gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Mesalazinin 0,1 N HCl çözeltisi içindeki çözeltisinin 200-800 nm aralığında UV-VIS spektrumu (A), mesalazinin pH 1,2 tamponu içindeki çözeltisinin 200-800 nm aralığında UV-VIS spektrumu (B)



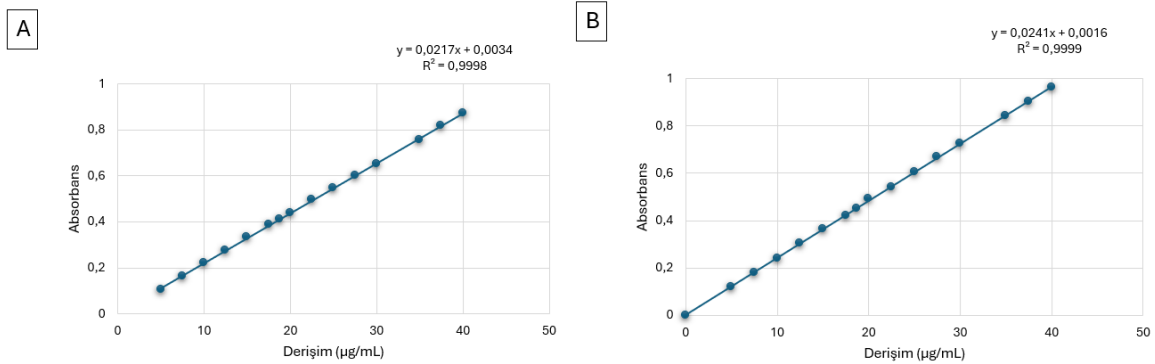
Şekil 4.2. Mesalazinin distile su içindeki çözeltisinin 200-800 nm aralığında UV-VIS spektrumu (A), mesalazinin pH 6,8-1 tamponu içindeki çözeltisinin 200-800 nm aralığında UV-VIS spektrumu (B)



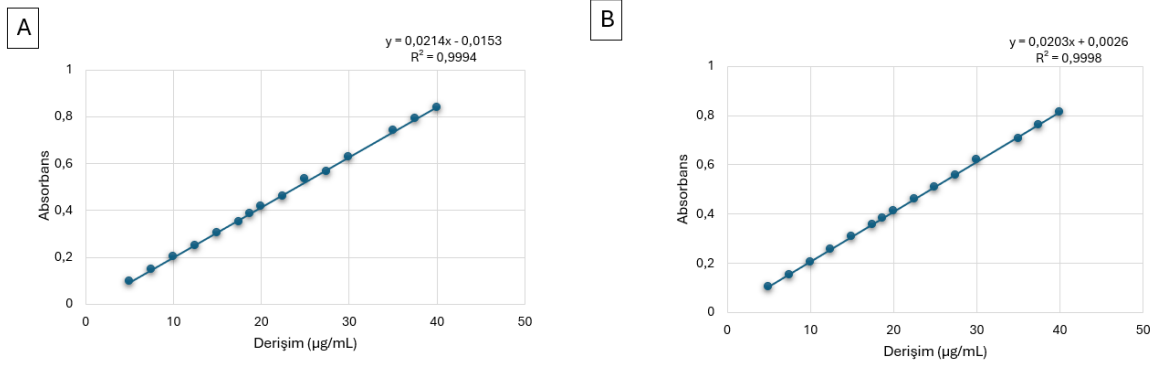
Şekil 4.3. Mesalazinin pH 6,8-2 tamponu içindeki çözeltisinin 200-800 nm aralığında UV-VIS spektrumu (A), mesalazinin pH 7,4 tamponu içindeki çözeltisinin 200-800 nm aralığında UV-VIS spektrumu (B)

Doğrusallık

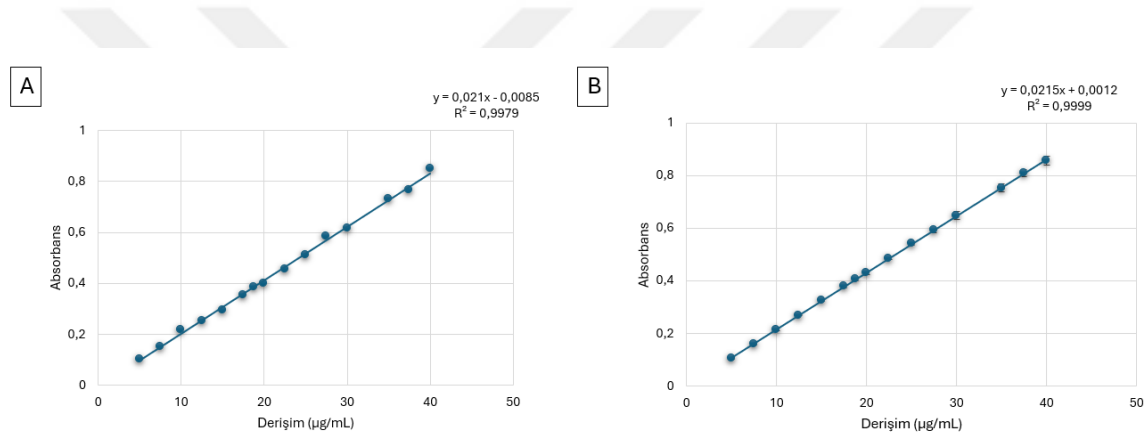
Doğrusallık analizleri ICH Q2 (R1) kılavuzuna uygun olarak Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 5-40 µg/ml derişim aralığında çözeltiler kullanılmış ve on beş noktali kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Çizilen eğrinin korelasyon katsayısı kullanılarak absorbans ve derişim arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu kanıtlanmıştır. Kalibrasyon doğruları Şekil 4.4-4.6’da gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Mesalazinin pH 1,2 tamponu içindeki çözeltisinin 300 nm dalga boyundaki kalibrasyon doğrusu (A) Mesalazinin 0,1 N HCl tamponu içindeki çözeltisinin 300 nm dalga boyundaki kalibrasyon doğrusu (B)



Şekil 4.5. Mesalazinin distile su içindeki çözeltisinin 330 nm dalga boyundaki kalibrasyon doğrusu (A), mesalazinin pH 6,8-1 tamponu içindeki çözeltisinin 330 nm dalga boyundaki kalibrasyon doğrusu (B)



Şekil 4.6. Mesalazinin pH 6,8-2 tamponu içindeki çözeltisinin 330 nm dalga boyundaki kalibrasyon doğrusu (A), mesalazinin pH 7,4 tamponu içindeki çözeltisinin 330 nm dalga boyundaki kalibrasyon doğrusu (B)

Kesinlik

Kesinlik analizi ICH Q2 (R1) kılavuzuna uygun olarak Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Kesinlik analizi deney içi kesinlik ve deneyler arası kesinlik analizleri olmak üzere iki ayrı çalışma altında değerlendirilmiştir.

Deney içi kesinlik

Mesalazinin distile su, 0,1 N HCl, pH 1,2, pH 6,8, 2. pH 6,8 ve pH 7,4 içinde deney içi kesinlik analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 4.1-4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.1. Mesalazinin distile su içindeki deney içi kesinlik analizi sonuçları

Örnek No	Mesalazin Derişimi (µg/mL)	Ölçülen Derişim (µg/mL)
1	30	30,29
2	30	30,23
3	30	30,26
4	30	30,27
5	30	30,27
6	30	30,26
7	30	30,30
8	30	30,28
9	30	30,29
10	30	30,42
Ortalama		30,29
Standart Sapma		0,20
Bağıl sapma (%)		0,679

Çizelge 4.2. Mesalazinin 0,1 N HCl tamponu içindeki deney içi kesinlik analizi sonuçları

Örnek No	Mesalazin Derişimi (µg/mL)	Ölçülen Derişim (µg/mL)
1	30	30,29
2	30	30,32
3	30	30,32
4	30	30,35
5	30	30,34
6	30	30,34
7	30	30,34
8	30	30,32
9	30	30,33
10	30	30,34
Ortalama		30,33
Standart Sapma		0,23
Bağıl sapma (%)		0,778

Çizelge 4.3. Mesalazinin pH 1,2 tamponu içindeki deney içi kesinlik analizi sonuçları

Örnek No	Mesalazin Derişimi (µg/mL)	Ölçülen Derişim (µg/mL)
1	30	30,23
2	30	30,43
3	30	30,42
4	30	30,36
5	30	30,36
6	30	30,33
7	30	30,43
8	30	30,48
9	30	30,42
10	30	30,45
Ortalama		30,39
Standart Sapma		0,28
Bağıl sapma (%)		0,921

Çizelge 4.4. Mesalazinin pH 6,8-1 tamponu içindeki deney içi kesinlik analizi sonuçları

Örnek No	Mesalazin Derişimi (µg/mL)	Ölçülen Derişim (µg/mL)
1	30	30,29
2	30	30,23
3	30	30,31
4	30	30,27
5	30	30,37
6	30	30,4
7	30	30,44
8	30	30,38
9	30	30,38
10	30	30,42
Ortalama		30,35
Standart Sapma		0,25
Bağıl sapma (%)		0,827

Çizelge 4.5. Mesalazinin pH 6,8-2 tamponu içindeki deney içi kesinlik analizi sonuçları

Örnek No	Mesalazin Derişimi (µg/mL)	Ölçülen Derişim (µg/mL)
1	30	30,03
2	30	30,03
3	30	30,03
4	30	30,03
5	30	30,04
6	30	30,03
7	30	30,02
8	30	30,02
9	30	30,02
10	30	30,01
Ortalama		30,03
Standart Sapma		0,02
Bağıl sapma (%)		0,063

Çizelge 4.6. Mesalazinin pH 7,4 içindeki deney içi kesinlik analizi sonuçları

Örnek No	Mesalazin Derişimi (µg/mL)	Ölçülen Derişim (µg/mL)
1	30	30,60
2	30	30,52
3	30	30,56
4	30	30,57
5	30	30,57
6	30	30,56
7	30	30,62
8	30	30,58
9	30	30,60
10	30	30,78
Ortalama		30,60
Standart Sapma		0,42
Bağıl sapma (%)		1,40

Deneyler arası kesinlik

Mesalazinin distile su, 0,1 N HCl, pH 1,2, pH 6,8, 2. pH 6,8 ve pH 7,4 içinde deneyler arası kesinlik analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 4.7-4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Mesalazinin distile su içindeki deneyler arası kesinlik bulguları

Derişim (µg/mL)	1.gün	2.gün	3.gün	Ortalama	Standart Sapma	%Bağıl sapma
8	7,99	7,91	7,84	7,91	0,06	0,771
10	10,18	10,18	10,19	10,19	0,13	1,31
12	12,31	12,34	12,35	12,33	0,24	1,96

Çizelge 4.8. Mesalazinin 0,1 N HCl çözeltisi içindeki deneyler arası kesinlik bulguları

Derişim (µg/mL)	1.gün	2.gün	3.gün	Ortalama	Standart Sapma	%Bağıl sapma
8	8,04	8,01	7,99	8,01	0,01	0,116
10	10,19	10,16	10,15	10,17	0,12	1,17
12	12,21	12,21	12,22	12,21	0,15	1,25

Çizelge 4.9. Mesalazinin pH 1,2 tamponu içindeki deneyler arası kesinlik bulguları

Derişim (µg/mL)	1.gün	2.gün	3.gün	Ortalama	Standart Sapma	%Bağıl sapma
8	7,83	7,80	7,82	7,81	0,13	1,64
10	10,12	10,12	10,12	10,12	0,09	0,86
12	11,99	12	12	11,998	0,001	0,009

Çizelge 4.10. Mesalazinin pH 6,8-1 tamponu içindeki deneyler arası kesinlik bulguları

Derişim (µg/mL)	1.gün	2.gün	3.gün	Ortalama	Standart Sapma	%Bağıl sapma
8	7,77	7,79	7,85	7,803	0,139	1,74
10	10,01	10,01	10,02	10,01	0,01	0,105
12	12,08	12,06	12,09	12,08	0,06	0,464

Çizelge 4.11. Mesalazinin pH 6,8-2 tamponu içindeki deneyler arası kesinlik bulguları

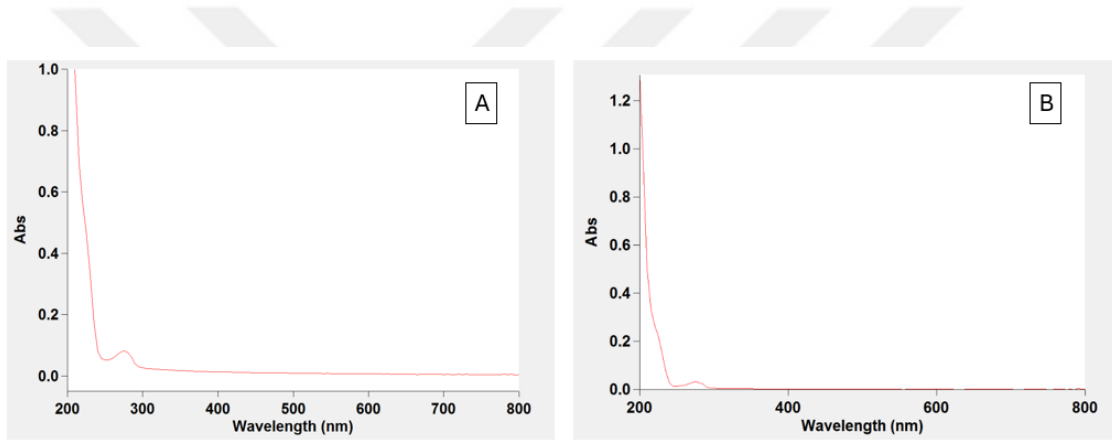
Derişim (µg/mL)	1.gün	2.gün	3.gün	Ortalama	Standart Sapma	%Bağıl sapma
8	7,97	7,98	7,97	7,97	0,02	0,222
10	10,01	9,99	9,99	10	0	0,005
12	11,92	11,91	11,92	11,92	0,06	0,496

Çizelge 4.12. Mesalazinin pH 7,4 tamponu içindeki deneyler arası kesinlik bulguları

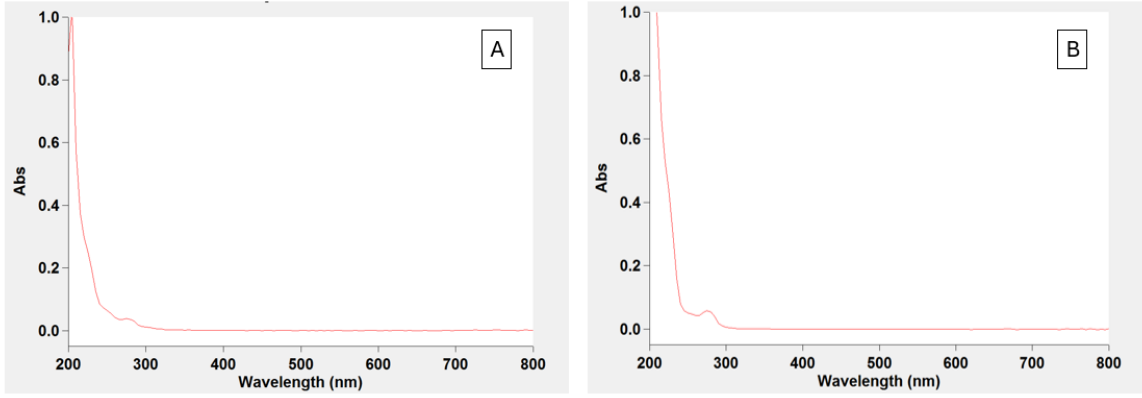
Derişim (µg/mL)	1.gün	2.gün	3.gün	Ortalama	Standart Sapma	%Bağıl sapma
8	7,75	8,24	8,252	8,08	0,06	0,729
10	9,81	9,81	9,81	9,81	0,14	1,35
12	11,8	11,8	11,78	11,79	0,15	1,27

Özgünlük ve seçicilik

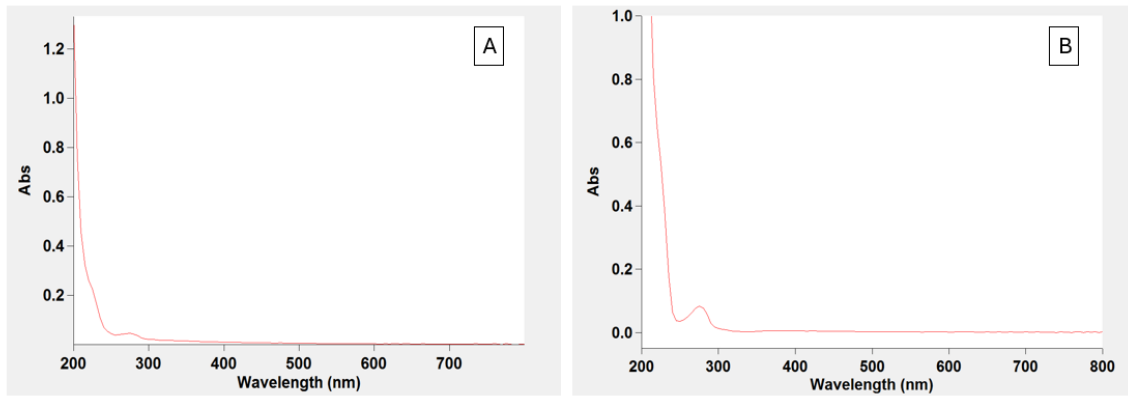
Özgünlük ve seçicilik analizi Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Farklı ortamlarda hazırlanmış polimerler çözeltilerinin UV-Vis spektrumları Şekil 4.7-4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.7. Mesalazin dışındaki formülasyon bileşenlerinin distile su içindeki 200-800 nm arasındaki UV spektrumları (A), mesalazin dışındaki formülasyon bileşenlerinin 0,1 N HCl çözeltisi içindeki 200-800 nm arasındaki UV spektrumları (B)



Şekil 4.8. Mesalazin dışındaki formülasyon bileşenlerinin pH 1,2 tamponu içindeki 200-800 nm arasındaki UV spektrumları (A), mesalazin dışındaki formülasyon bileşenlerinin pH 6,8-1 tamponu içindeki 200-800 nm arasındaki UV spektrumları (B)



Şekil 4.9. Mesalazin dışındaki formülasyon bileşenlerinin pH 6,8-2 tamponu içindeki 200-800 nm arasındaki UV spektrumları (A), Mesalazin dışındaki formülasyon bileşenlerinin pH 7,4 tamponu içindeki 200-800 nm arasındaki UV spektrumları (B)

Geri elde ve doğruluk çalışmaları

Geri elde ve doğruluk analizi ICH Q2 (R1) kılavuzuna uygun olarak Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Geri elde analizinin sonuçları Çizelge 4.13-4.18’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. Mesalazinin distile su içindeki doğruluk ve yüzde geri elde analizinin sonuçları

Hazırlanan mesalazin miktarı (mg)	Hesapla bulunan ortalama mesalazin miktarı (mg)	Geri elde (%)	Standart sapma	Bağıl sapma (%)
24	24,25	101	0	0,743
30	30,84	103	0	0,477
36	35,85	99,6	0,1	0,303

Çizelge 4.14. Mesalazinin 0,1 N HCl çözeltisi içindeki doğruluk ve yüzde geri elde analizinin sonuçları

Hazırlanan mesalazin miktarı (mg)	Hesapla bulunan ortalama mesalazin miktarı (mg)	Geri elde (%)	Standart sapma	Bağıl sapma (%)
24	24,35	101	0	1,02
30	30,48	102	0	1,14
36	35,33	98,1	0,5	1,33

Çizelge 4.15. Mesalazinin pH 1,2 tamponu içindeki doğruluk ve yüzde geri elde analizinin sonuçları

Hazırlanan mesalazin miktarı (mg)	Hesapla bulunan ortalama mesalazin miktarı (mg)	Geri elde (%)	Standart sapma	Bağıl sapma (%)
24	24,19	101	0	0,568
30	30,72	102	1	1,71
36	35,68	99,1	0,2	0,631

Çizelge 4.16. Mesalazinin pH 6,8-1 tamponu içindeki doğruluk ve yüzde geri elde analizinin sonuçları

Hazırlanan mesalazin miktarı (mg)	Hesapla bulunan ortalama mesalazin miktarı (mg)	Geri elde (%)	Standart sapma	Bağıl sapma (%)
24	23,39	97,5	0,4	1,80
30	29,85	99,5	0,1	0,356
36	35,58	98,84	0,23	0,819

Çizelge 4.17. Mesalazinin pH 6,8-2 tamponu içindeki doğruluk ve yüzde geri elde analizinin sonuçları

Hazırlanan mesalazin miktarı (mg)	Hesapla bulunan ortalama mesalazin miktarı (mg)	Geri elde (%)	Standart sapma	Bağıl sapma (%)
24	24,50	102	0	1,48
30	29,55	98,5	0,3	1,07
36	36,28	101	0	0,558

Çizelge 4.18. Mesalazinin pH 7,4 tamponu içindeki doğruluk ve yüzde geri elde analizinin sonuçları

Hazırlanan mesalazin miktarı (mg)	Hesapla bulunan ortalama mesalazin miktarı (mg)	Geri elde (%)	Standart sapma	Bağıl sapma (%)
24	23,99	99,9	0,0	0,041
30	30,83	103	0	1,95
36	36,01	100	0	0,024

Duyarlılık ve saptama sınırı

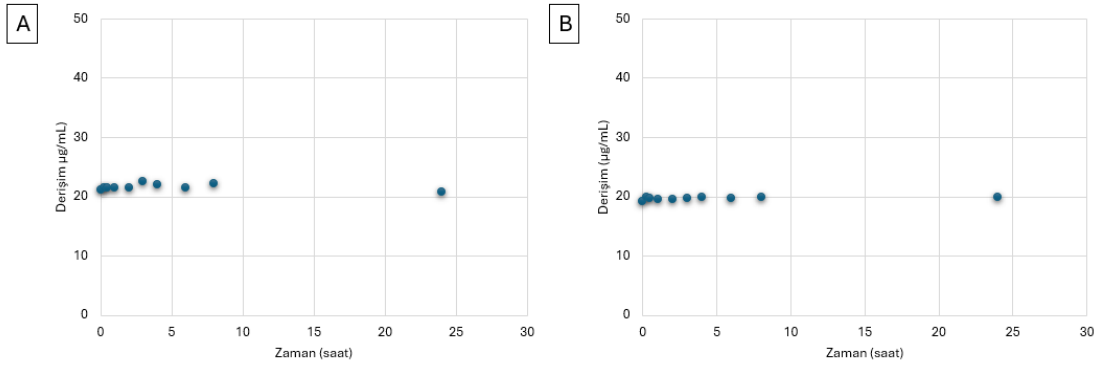
LOD ve LOQ hesaplamaları ICH Q2 (R1) kılavuzuna uygun olarak Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Bütün ortamlar için LOD ve LOQ değerleri Çizelge 4.19’da verilmiştir.

Çizelge 4.19. Mesalazinin farklı ortamlardaki LOD ve LOQ değerleri

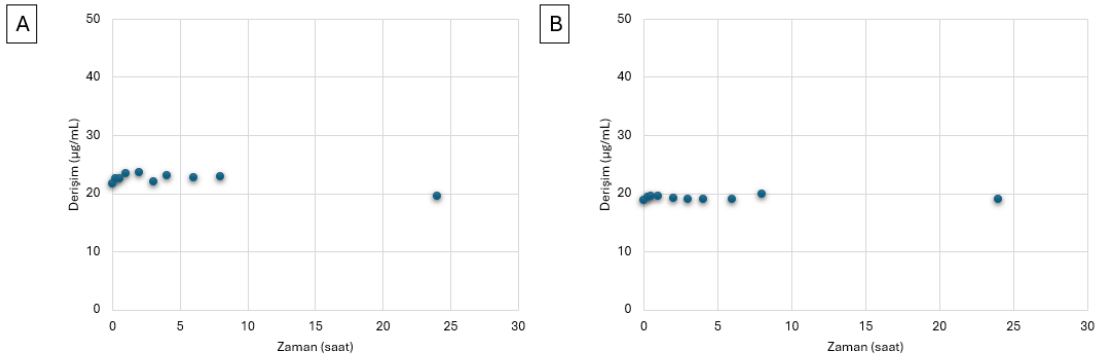
Ortamlar	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Distile su	0,891	2,698
0,1 N HCl	0,413	1,251
pH 1,2	0,565	1,710
pH 6,8-1	0,479	1,452
pH 6,8-2	1,700	5,152
pH 7,4	0,410	1,243

Stabilite

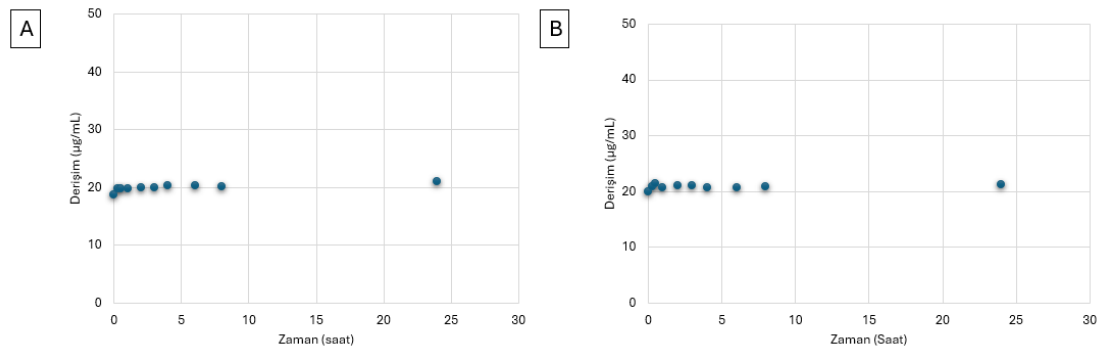
Çözelti stabilitesi analizleri ICH Q2 (R1) kılavuzuna uygun olarak Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Çözeltiler 20 µg/mL derişimde hazırlanmış, 37 °C’de belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak mesalazin çözeltilerinin derişiminde değışiklik meydana gelip gelmediğı değerlendirilmiştir. Stabilite çalışması sonuçları Şekil 4.10-4.12’de gösterilmiştir. Çalışma sonuçları istatistiksel analiz yapılarak değerlendirilmiştir. Bütün ortamlar için başlangıç derişimi ve 24. Saat sonucundaki derişim arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$).



Şekil 4.10. Mesalazinin distile sudaki çözeltisinin 37 °C'deki 24 saatlik stabilite deneyi sonuçları (A), mesalazinin 0,1 N HCl tamponundaki çözeltisinin 37 °C'deki 24 saatlik stabilite deneyi sonuçları (B)



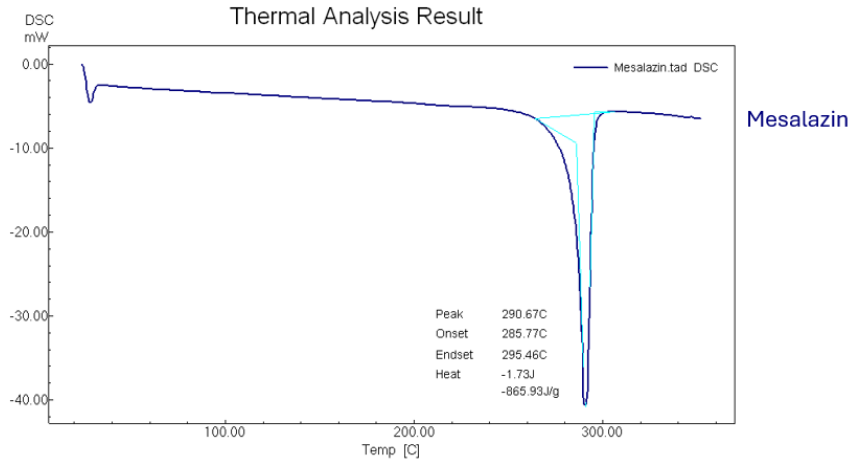
Şekil 4.11. Mesalazinin pH 1,2 tamponundaki çözeltisinin 37 °C'deki 24 saatlik stabilite deneyi sonuçları (A), mesalazinin pH 6,8-1 tamponundaki çözeltisinin 37 °C'deki 24 saatlik stabilite deneyi sonuçları (B)



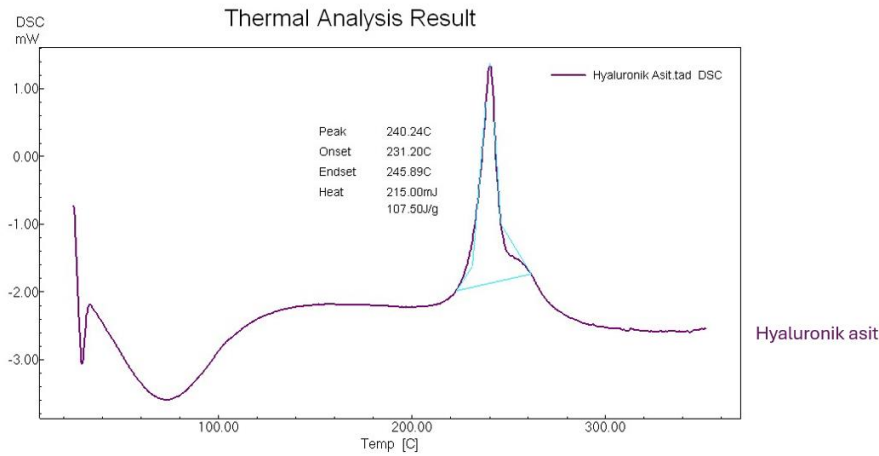
Şekil 4.12. Mesalazinin pH 6,8-2 tamponundaki çözeltisinin 37 °C'deki 24 saatlik stabilite deneyi sonuçları (A), mesalazinin pH 7,4 tamponundaki çözeltisinin 37 °C'deki 24 saatlik stabilite deneyi sonuçları (B)

4.1.2. DSC Analizleri

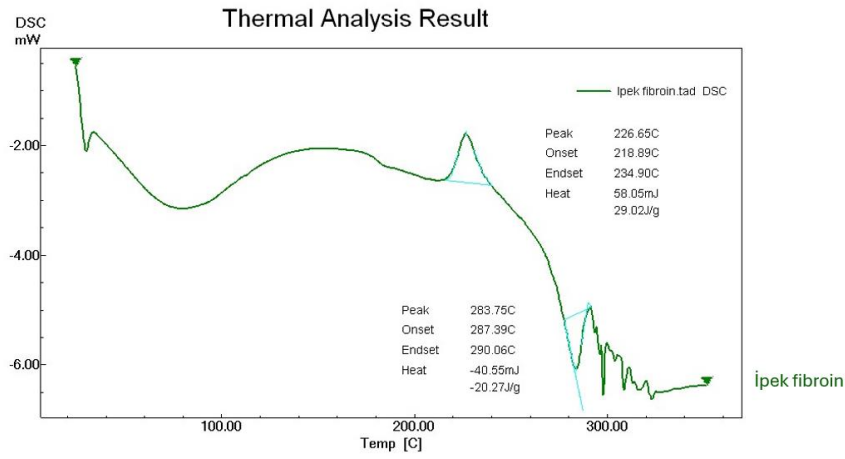
DSC analizleri Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Mesalazinin ve formülasyonda kullanılan polimerlerin tekli ve karışım halindeki termogramları Şekil 4.13-4.34 arasında verilmiştir.



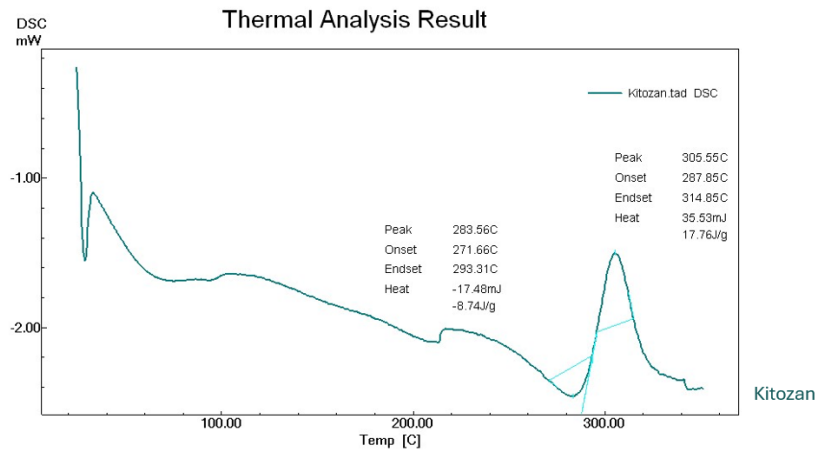
Şekil 4.13. Mesalazinin DSC termogramı



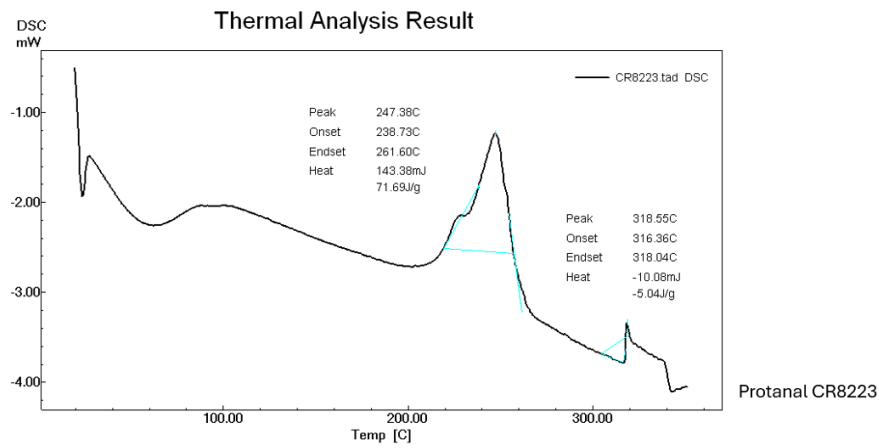
Şekil 4.14. Hyaluronik asitin DSC termogramı



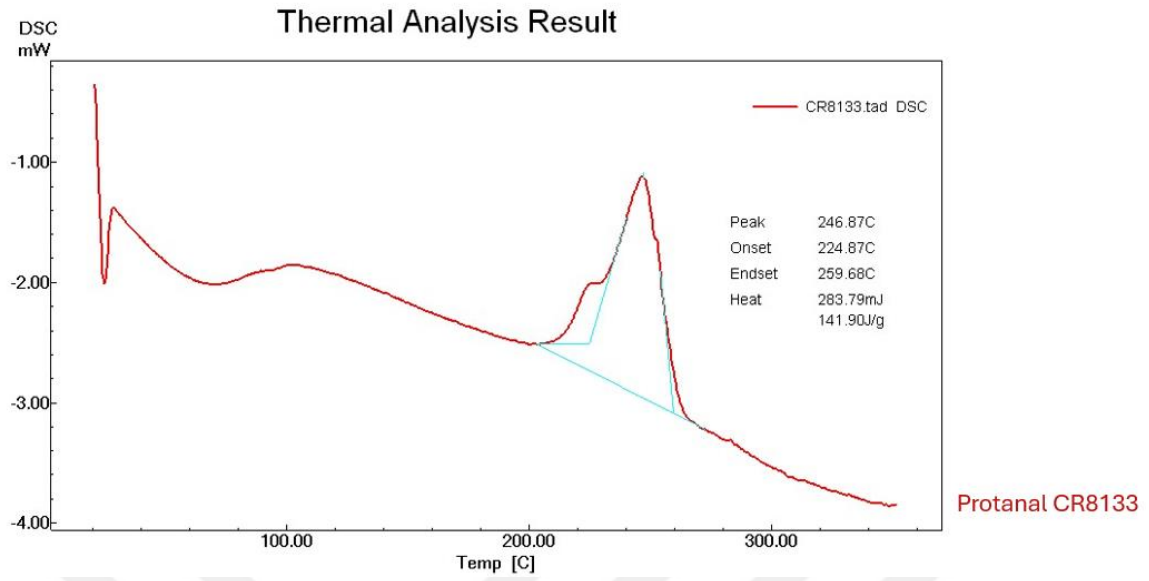
Şekil 4.15. İpek fibroinin DSC termogramı



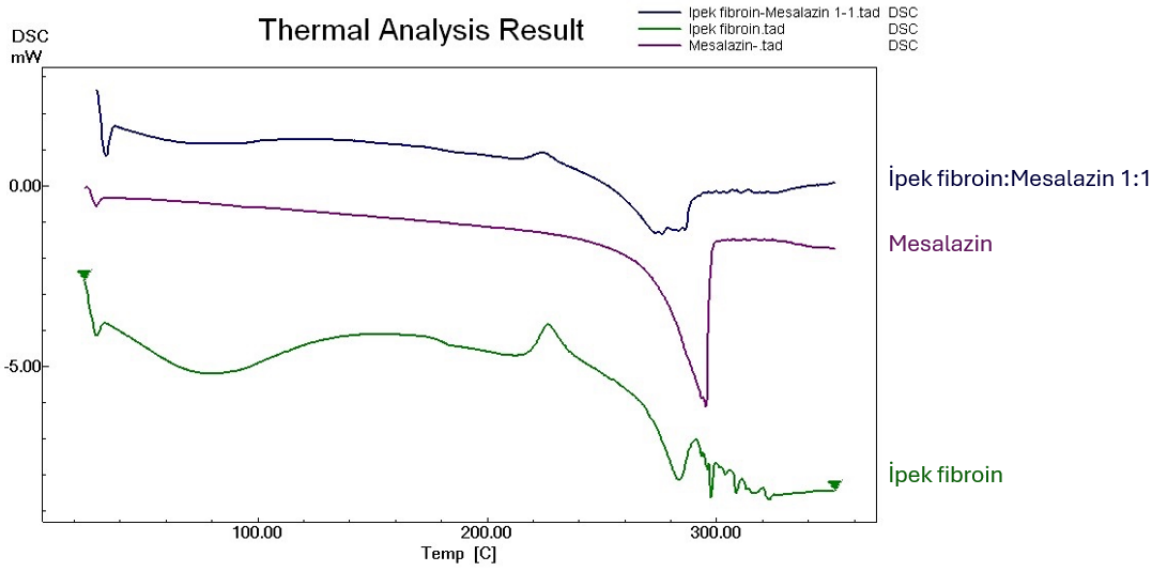
Şekil 4.16. Kitozanın DSC termogramı



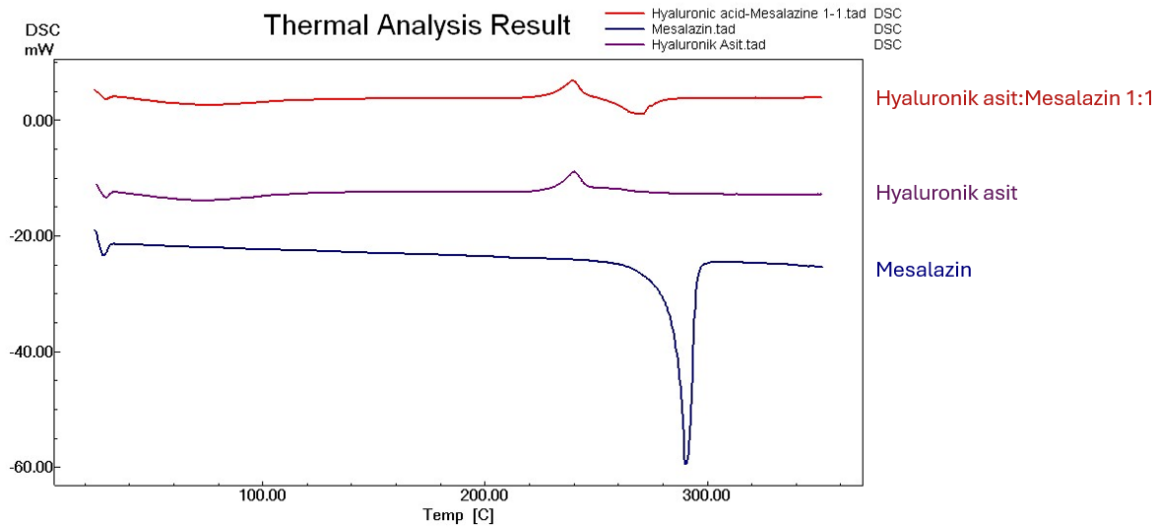
Şekil 4.17. Sodyum aljinat-Protanal CR8223'ün DSC termogramı



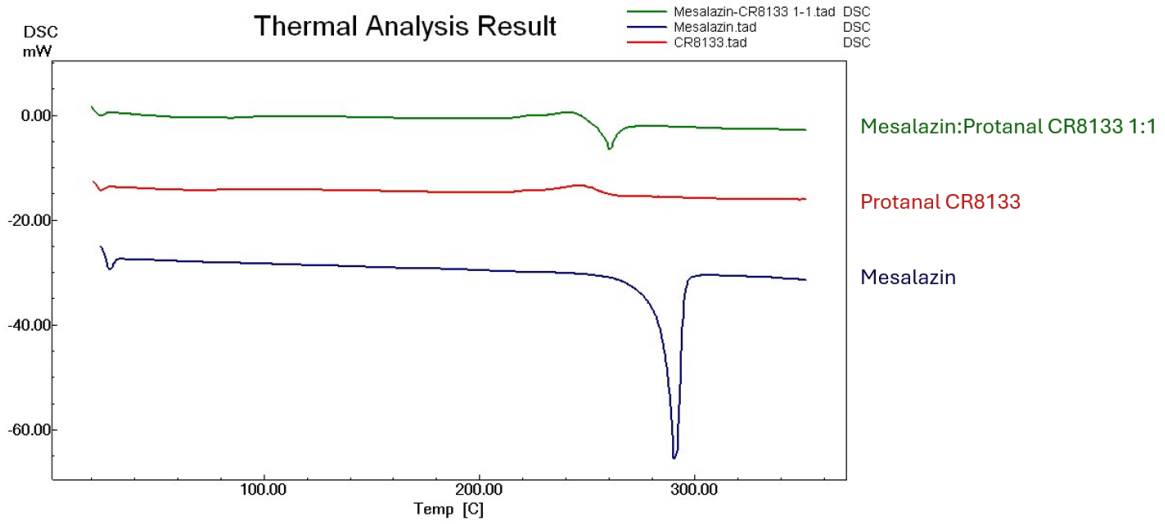
Şekil 4.18. Sodyum aljinat-Protanal CR8133'ün DSC termogramı



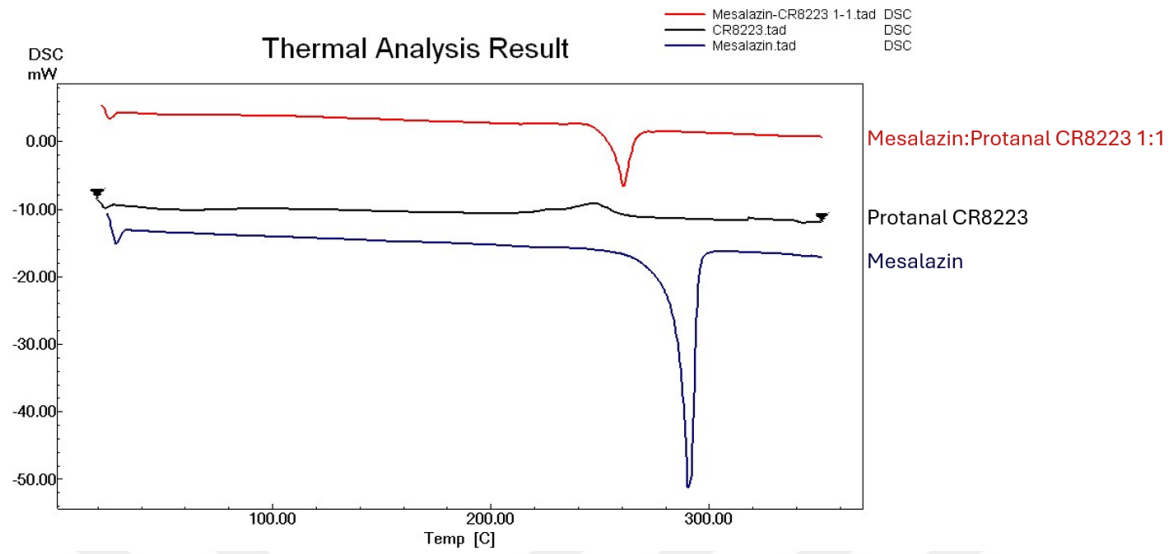
Şekil 4.19. Mesalazin, ipek fibroin ve mesalazin:ipek fibroin 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları



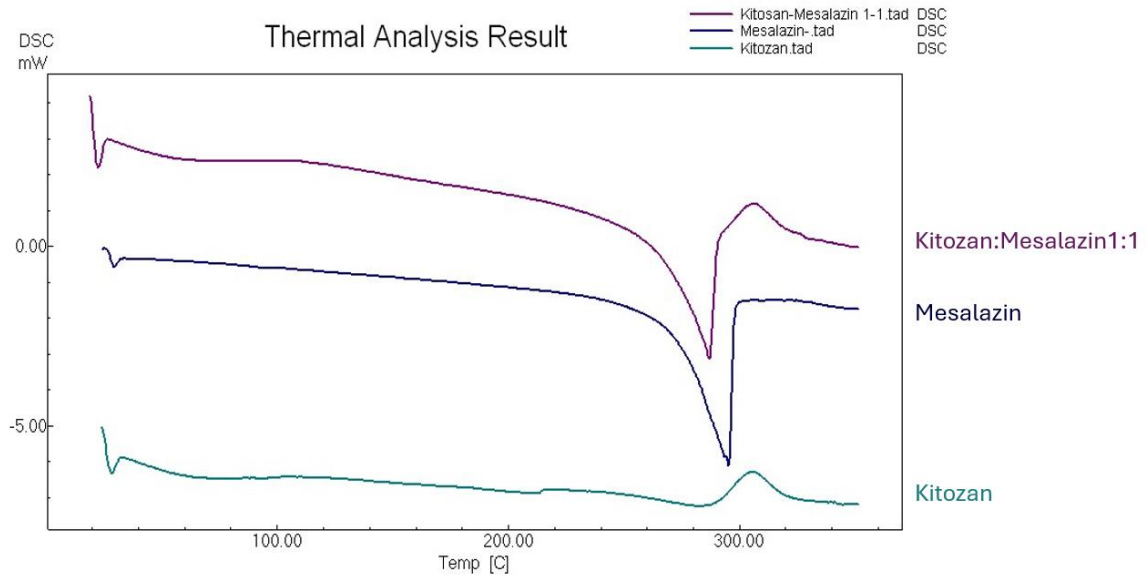
Şekil 4.20. Mesalazin, hyaluronik asit ve mesalazin:hyaluronik asit 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları



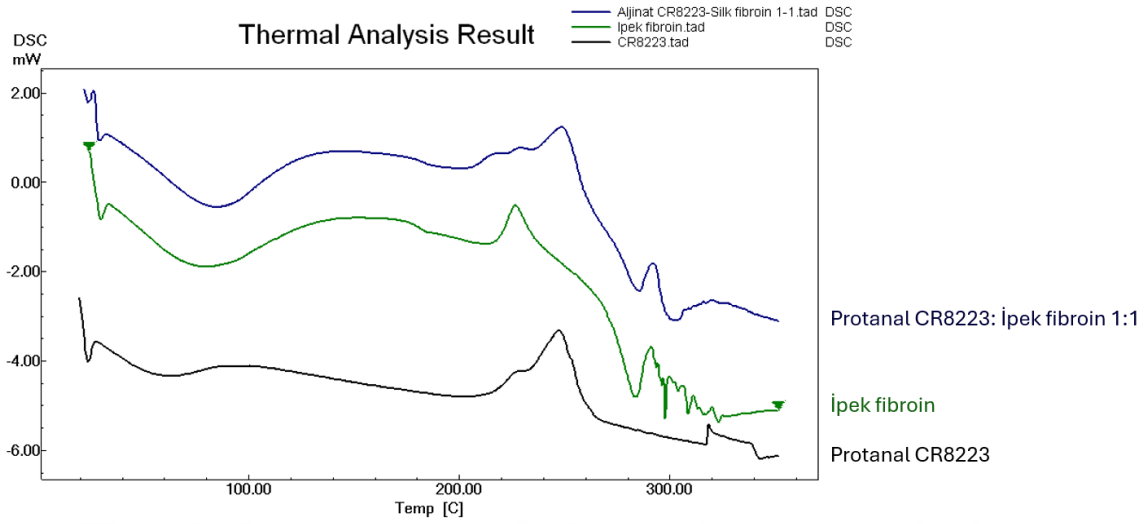
Şekil 4.21. Mesalazin, sodyum aljinat-Protanal CR8133 ve mesalazin:aljinat Protanal CR8133 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları



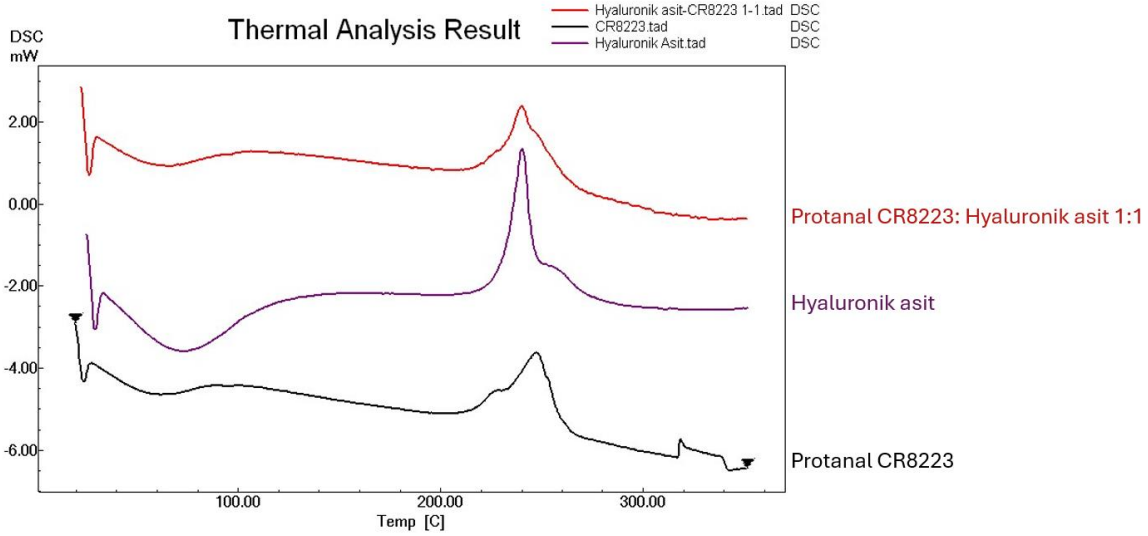
Şekil 4.22. Mesalazin, sodyum aljinat-Protanal CR8223 ve mesalazin:sodyum aljinat-Protanal CR8223 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları



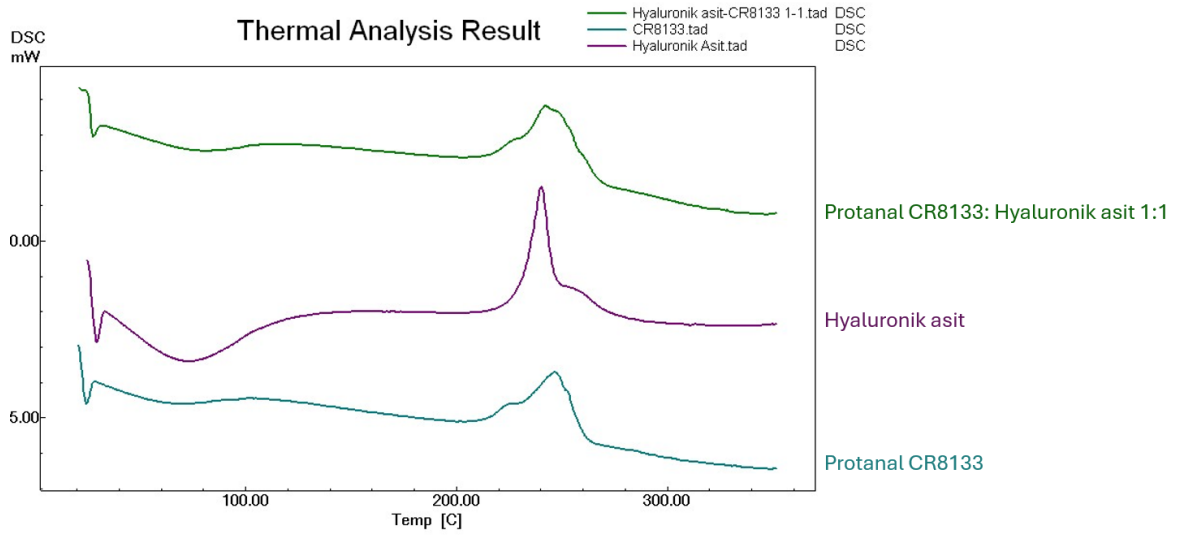
Şekil 4.23. Mesalazin, kitozan ve mesalazin:kitozan 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları



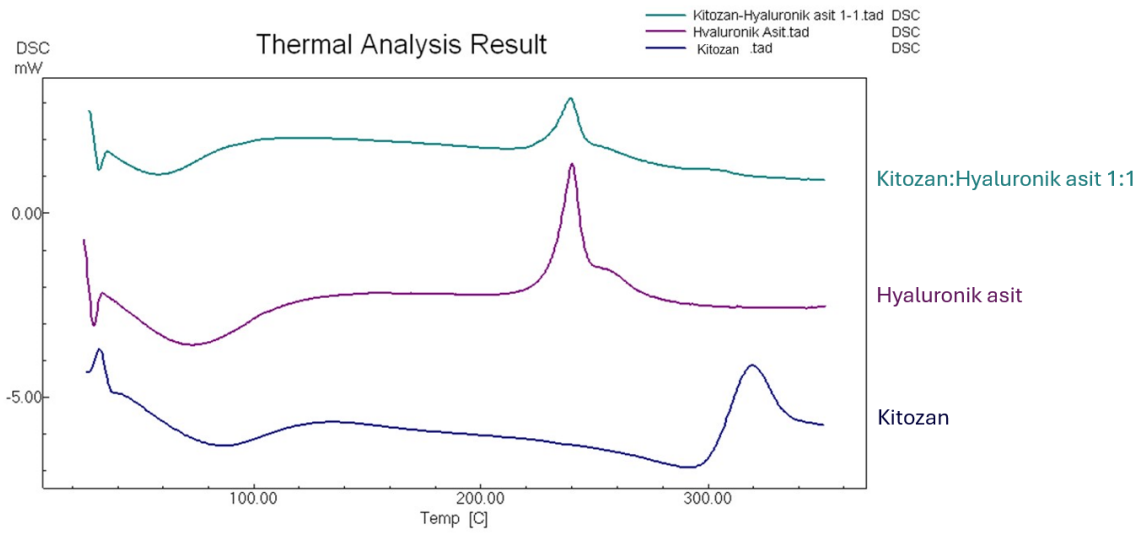
Şekil 4.24. İpek fibroin, sodyum aljinat-Protanal CR8223 ve ipek fibroin:sodyum aljinat-Protanal CR8223 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları



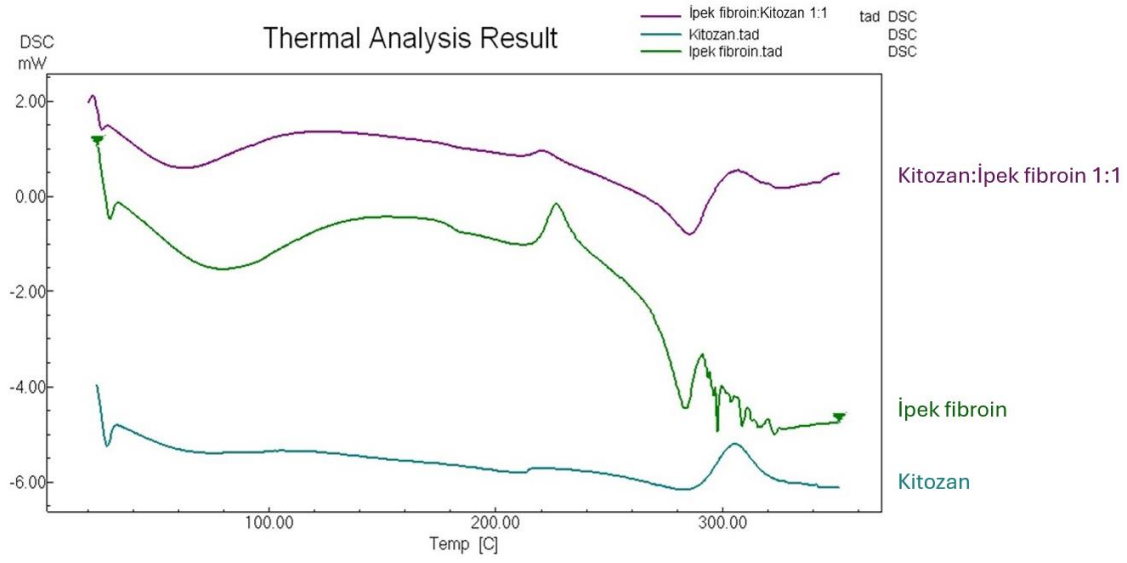
Şekil 4.25. Hyaluronik asit, sodyum aljinat-Protanal CR8223 ve hyaluronik asit:sodyum aljinat-Protanal CR8223 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları



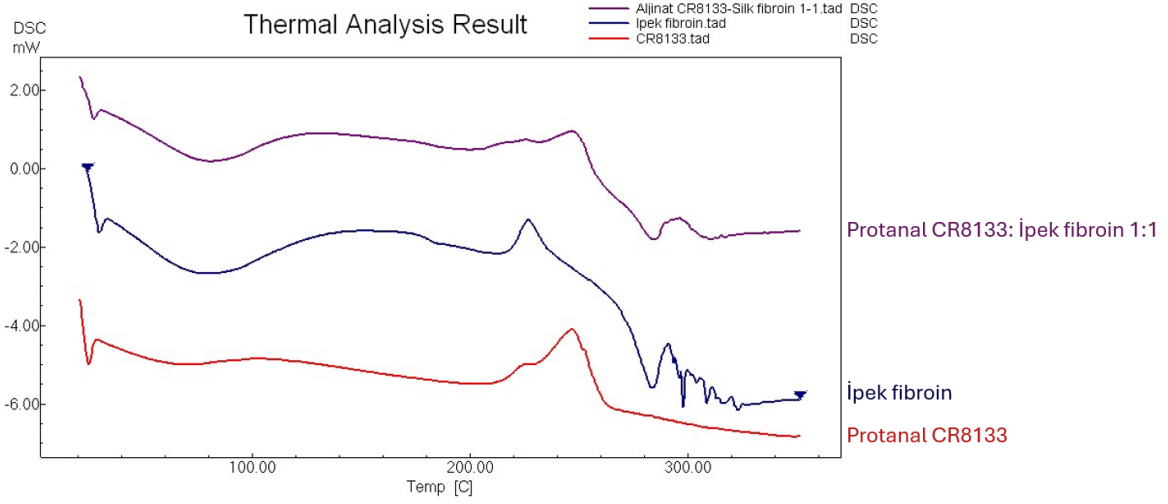
Şekil 4.26. Hyaluronik asit, sodyum aljinat-Protanal CR8133 ve hyaluronik asit: sodyum aljinat Protanal-CR8133 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları



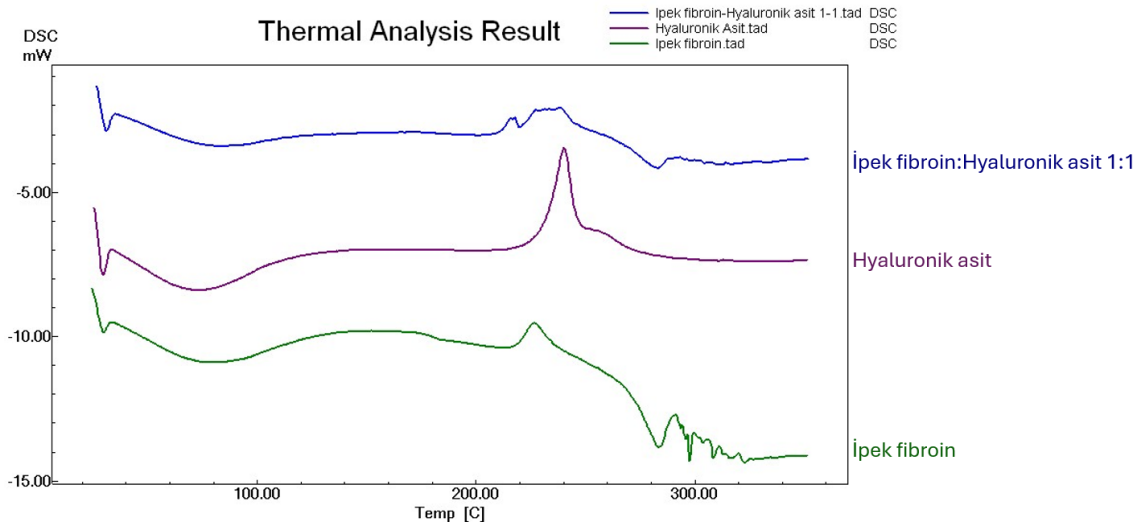
Şekil 4.27. Hyaluronik asit, kitozan ve hyaluronik asit: kitozan 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları



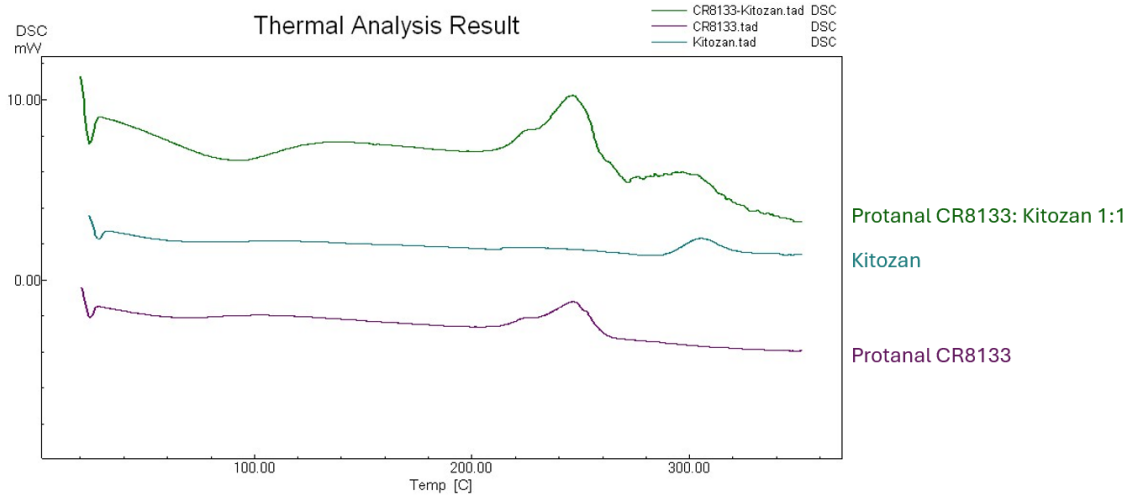
Şekil 4.28. İpek fibroin, kitozan ve ipek fibroin:kitozan 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları



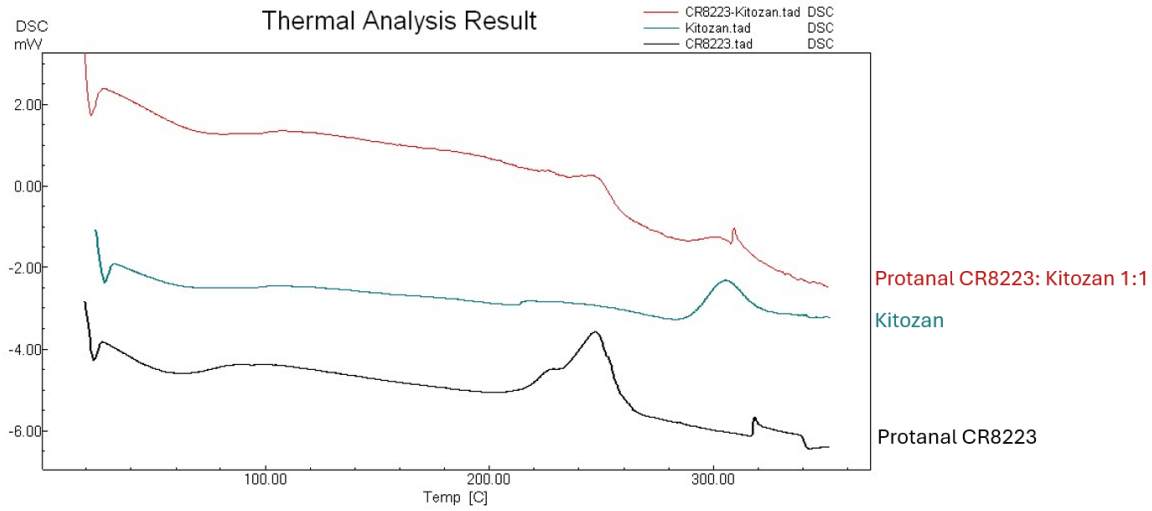
Şekil 4.29 İpek fibroin, sodyum aljinat-Protanal CR8133 ve ipek fibroin:sodyum aljinat-Protanal CR8133 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları



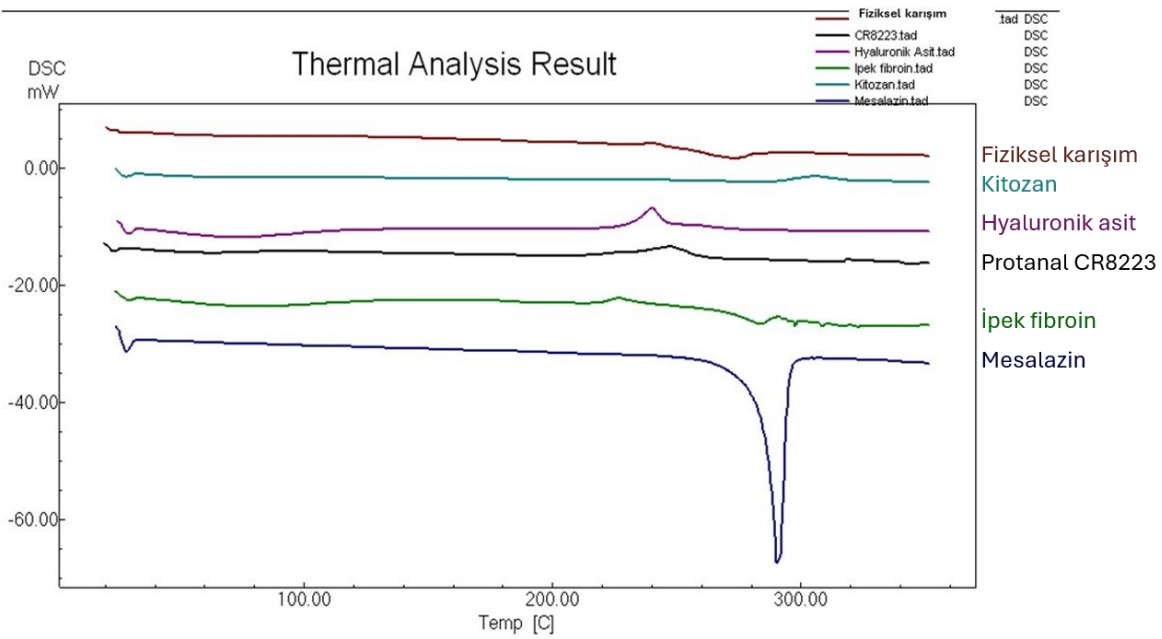
Şekil 4.30. İpek fibroin, hyaluronik asit ve ipek fibroin:hyaluronik asit 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları



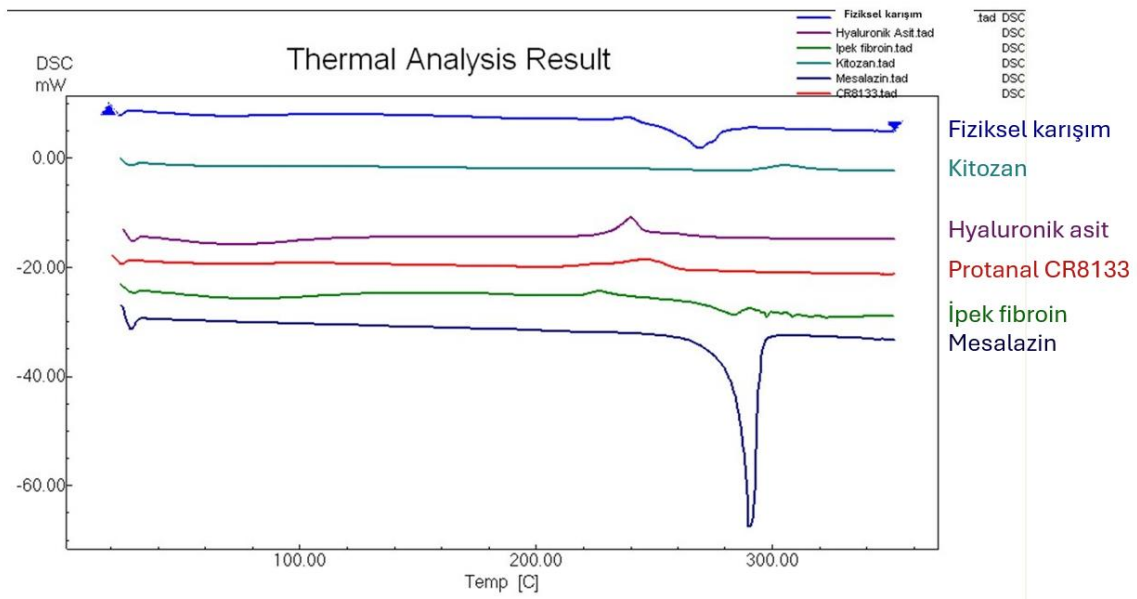
Şekil 4.31. Kitozan, sodyum aljinat-Protanal CR8133 ve Kitozan:sodyum aljinat-Protanal CR8133 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları



Şekil 4.32. Kitozan, sodyum aljinat-Protanal CR8223 ve Kitozan:sodyum aljinat-Protanal CR8223 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarının DSC termogramları



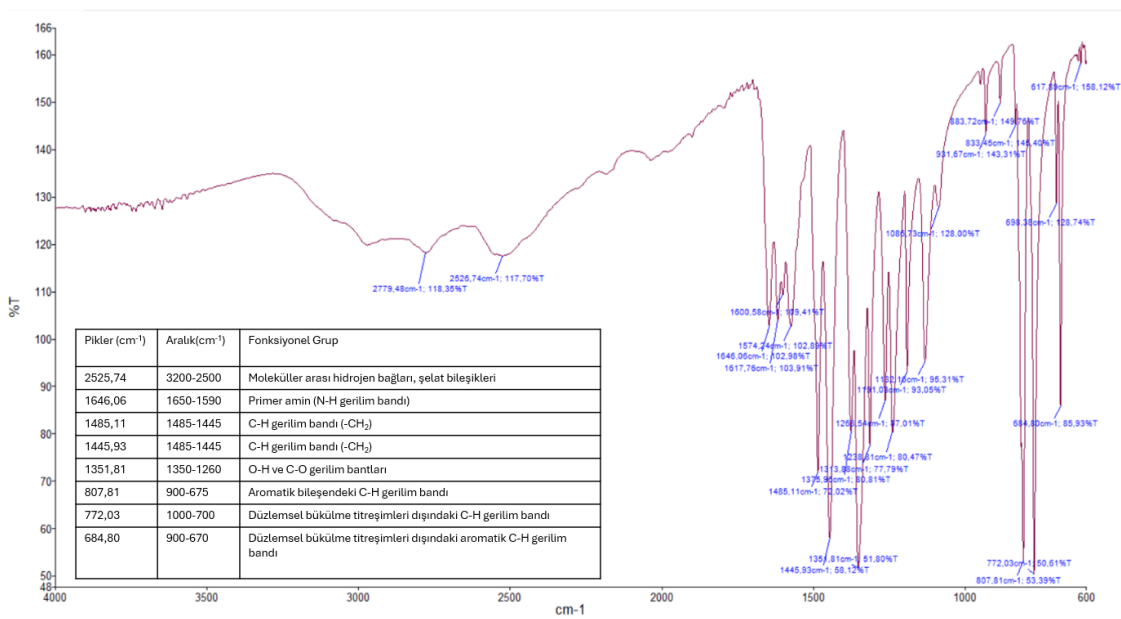
Şekil 4.33. Mesalazin, kitozan, ipek fibroin, sodyum aljinat-Protanal CR8223, hyaluronik asit ve mesalazin ile formülasyonda kullanılan polimerlerin 1:1 fiziksel karışımlarının DSC termogramları



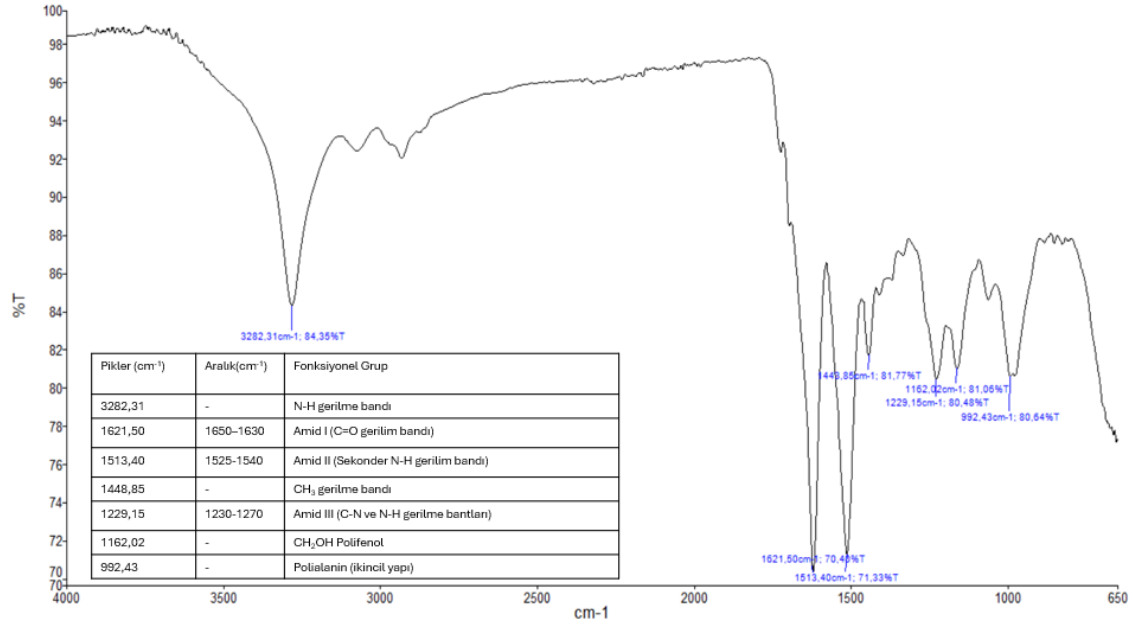
Şekil 4.34. Mesalazin, kitozan, ipek fibroin, sodyum aljinat-Protanal CR8133, hyaluronik asit ve mesalazin ile formülasyonda kullanılan polimerlerin 1:1 fiziksel karışımlarının DSC termogramları

4.1.3. FTIR Analizleri

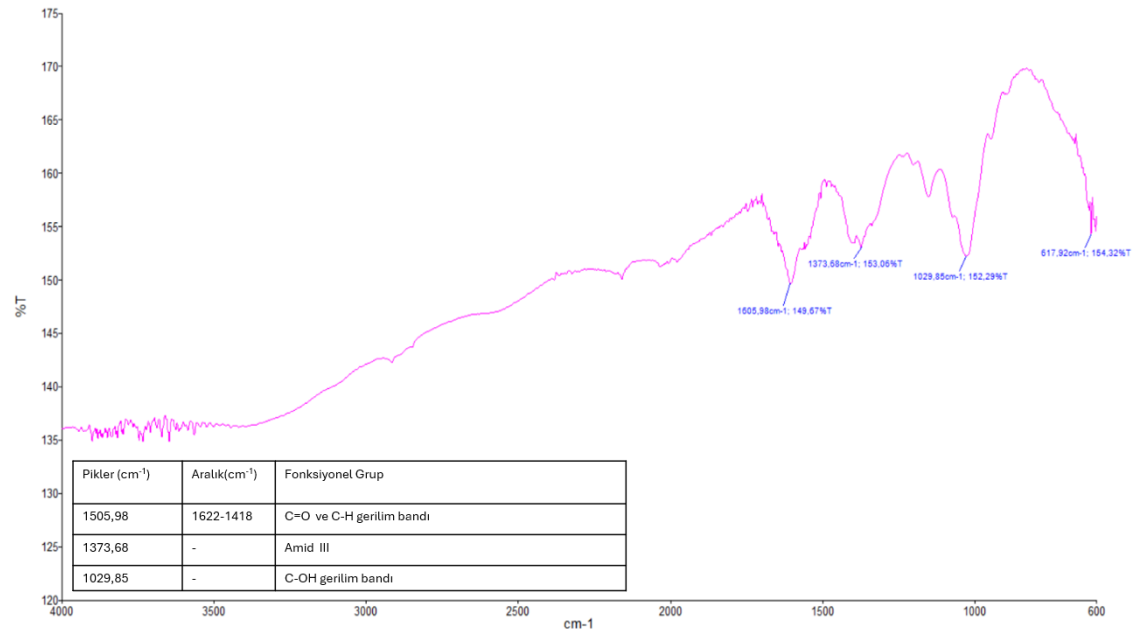
FTIR analizleri Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Mesalazin ve formülasyon geliştirmede kullanılan polimerlerin tek tek ve fiziksel karışım halindeki spektrumları Şekil 4.35-4.42 arasında verilmiştir.



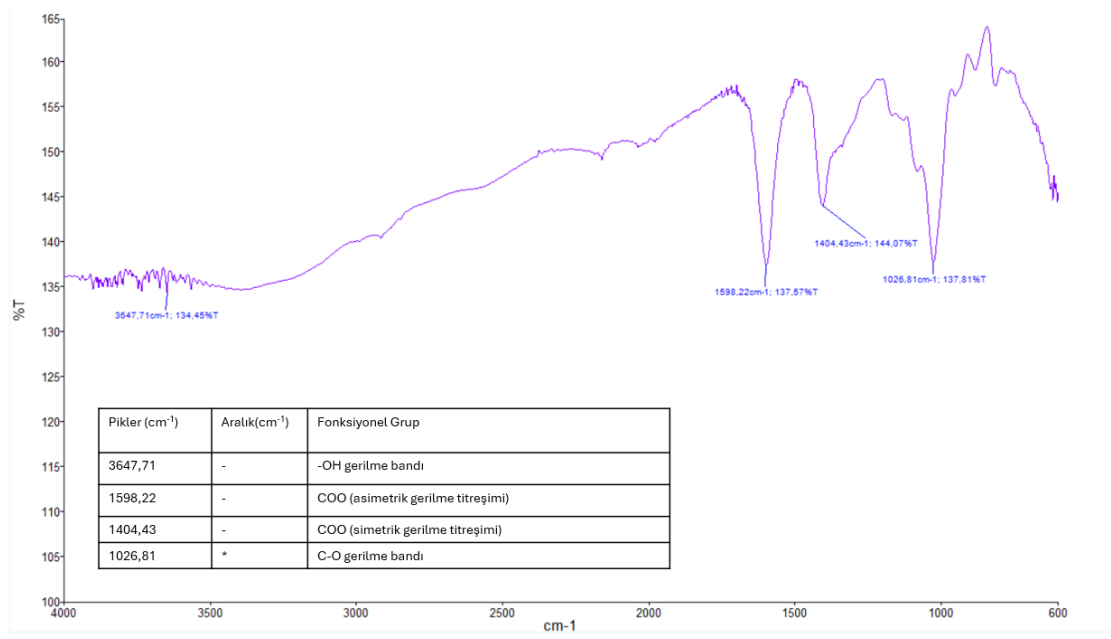
Şekil 4.35. Mesalazinin FTIR spektrumu



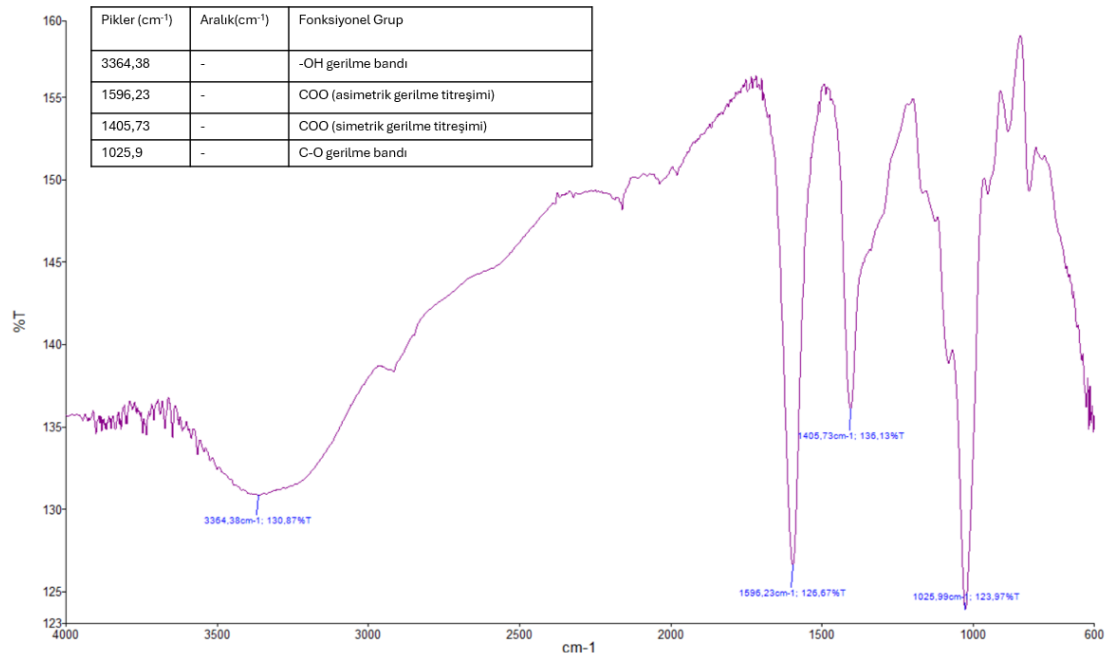
Şekil 4.36. İpek fibroinin FTIR spektrumu



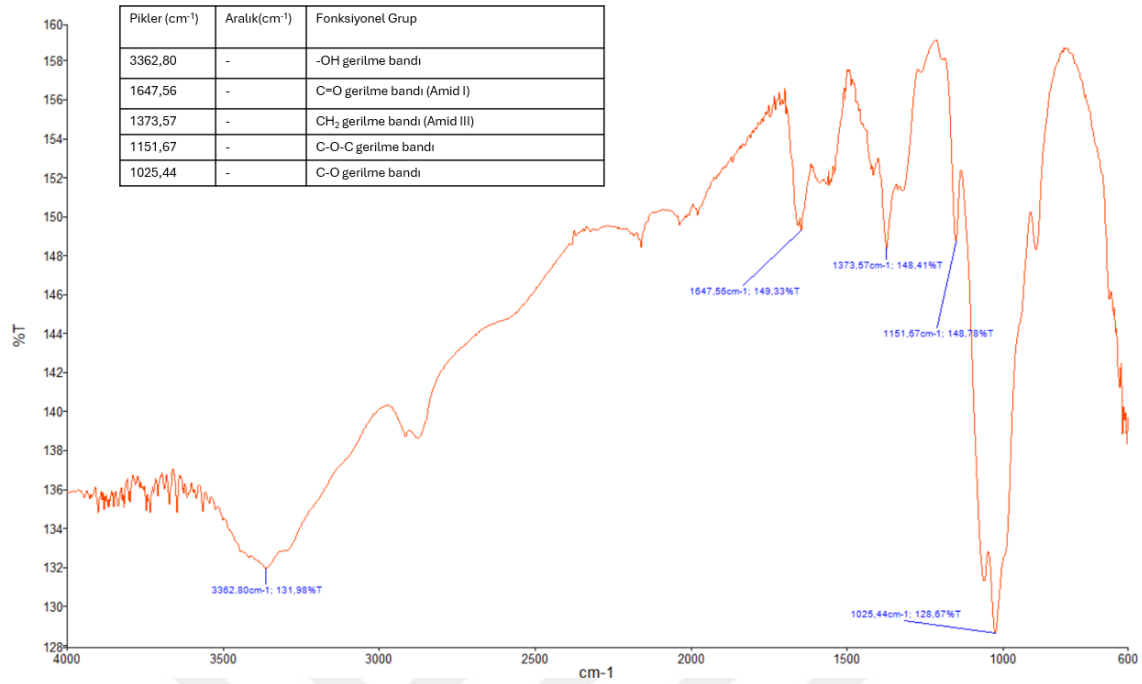
Şekil 4.37. Hyaluronik asitin FTIR spektrumu



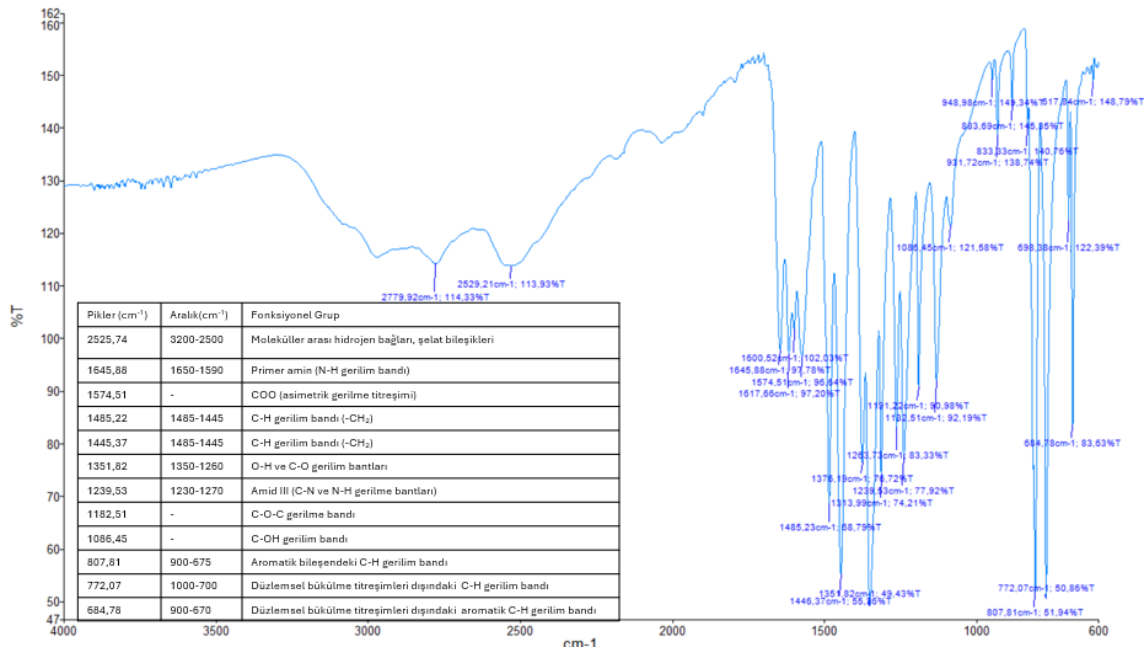
Şekil 4.38. Sodyum aljinat-Protanal CR8223'ün FTIR spektrumu



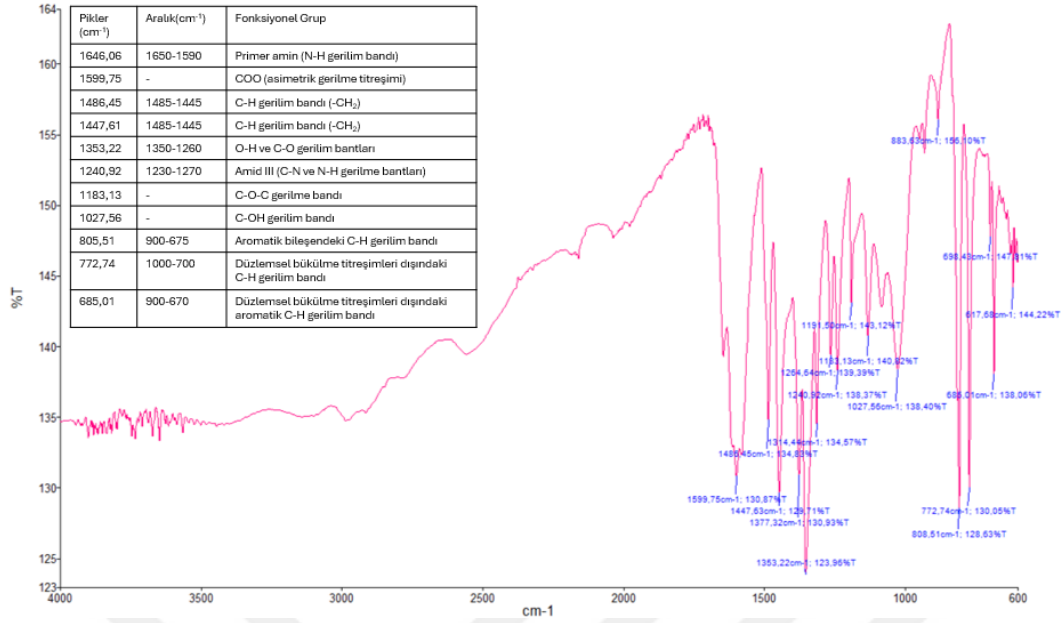
Şekil 4.39. Sodyum aljinat-Protanal CR8133'ün FTIR spektrumu



Şekil 4.40. Kitozanın FTIR spektrumu



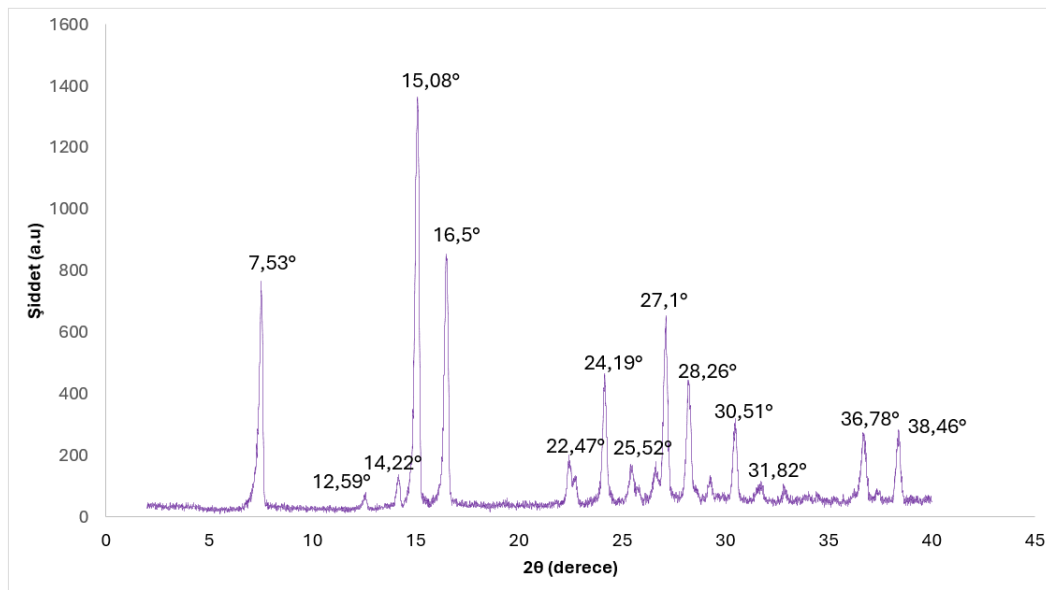
Şekil 4.41. Mesalazin, kitozan, ipek fibroin, sodyum aljinat-Protanal CR8223 ve hyaluronik asitin fiziksel karışımının FTIR spektrumu



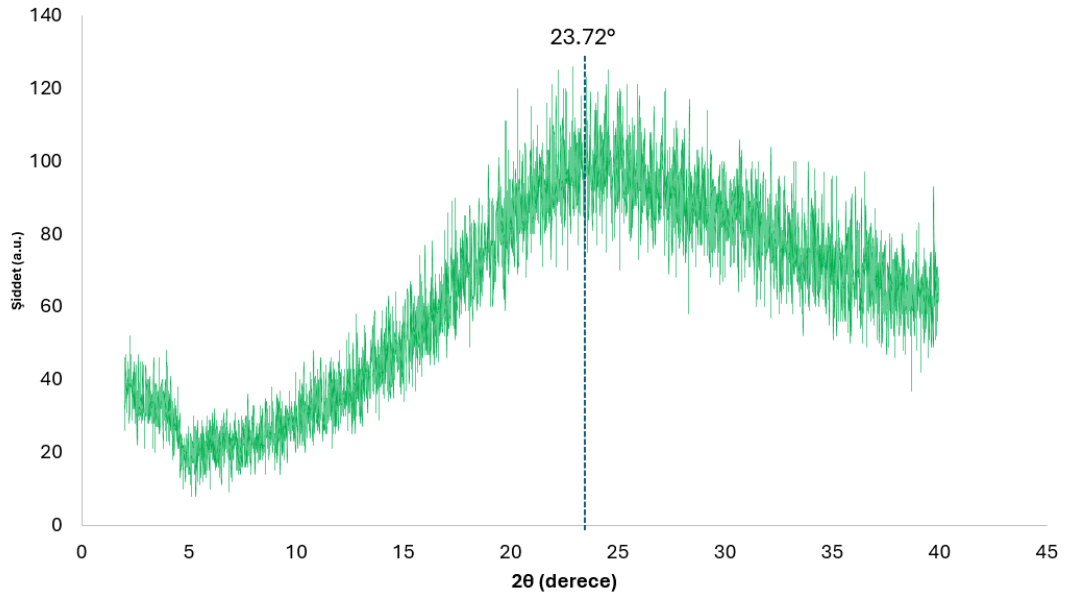
Şekil 4.42. Mesalazin, kitozan, ipek fibroin, sodyum aljinat-Protanal CR8133 ve hyaluronik asitin fiziksel karışımının FTIR spektrumu

4.1.4. XRD Analizleri

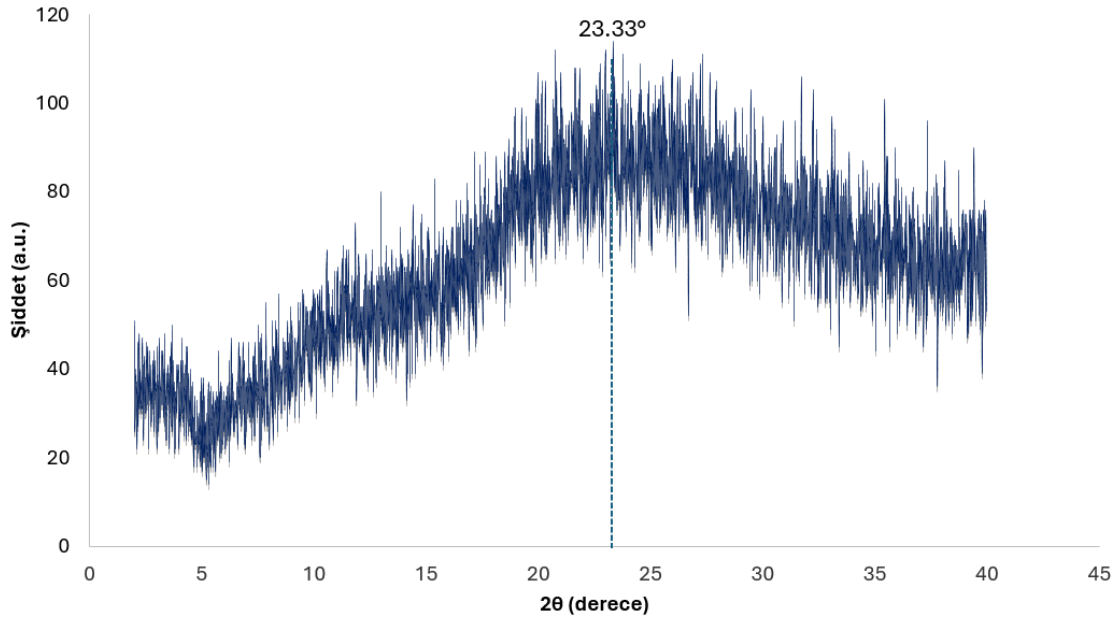
XRD analizleri Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Mesalazinin ve formülasyonda kullanılan polimerlerin tekli ve karışım halindeki difraktogramları Şekil 4.43-4.50 arasında verilmiştir.



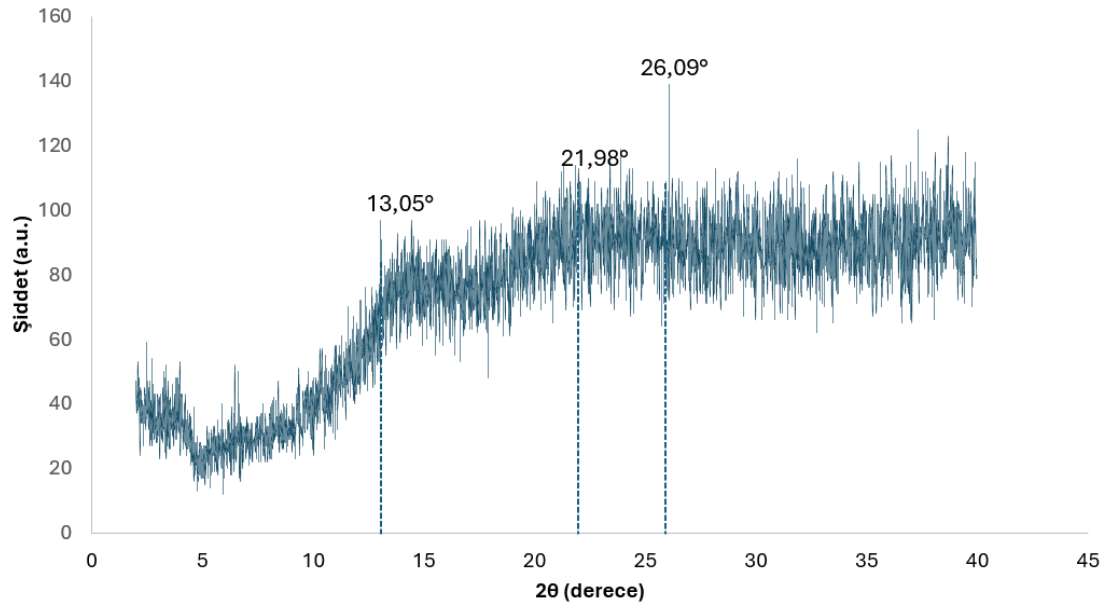
Şekil 4.43. Mesalazinin XRD difraktogramı



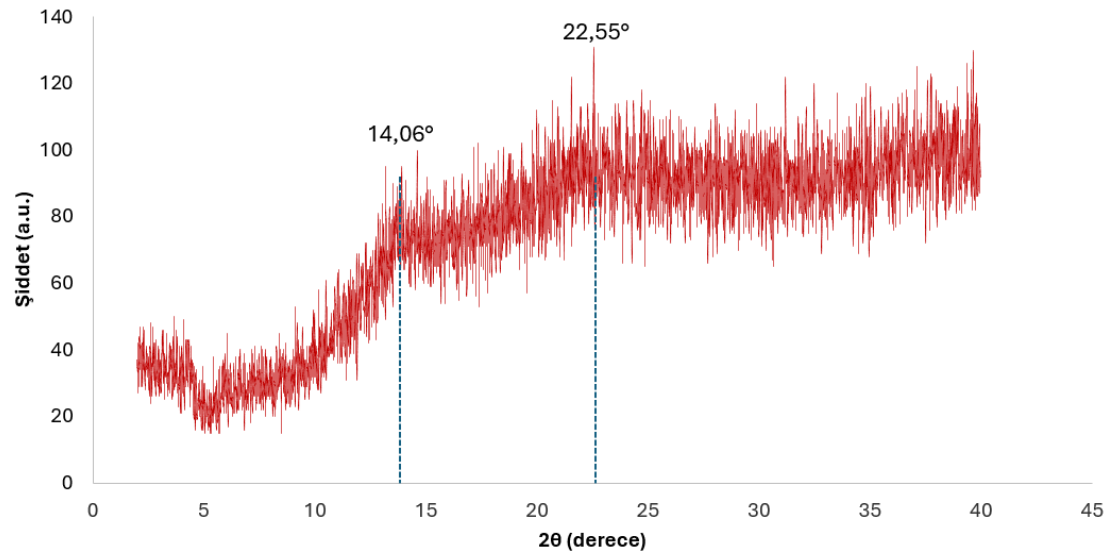
Şekil 4.44. İpek fibroinin XRD difraktogramı



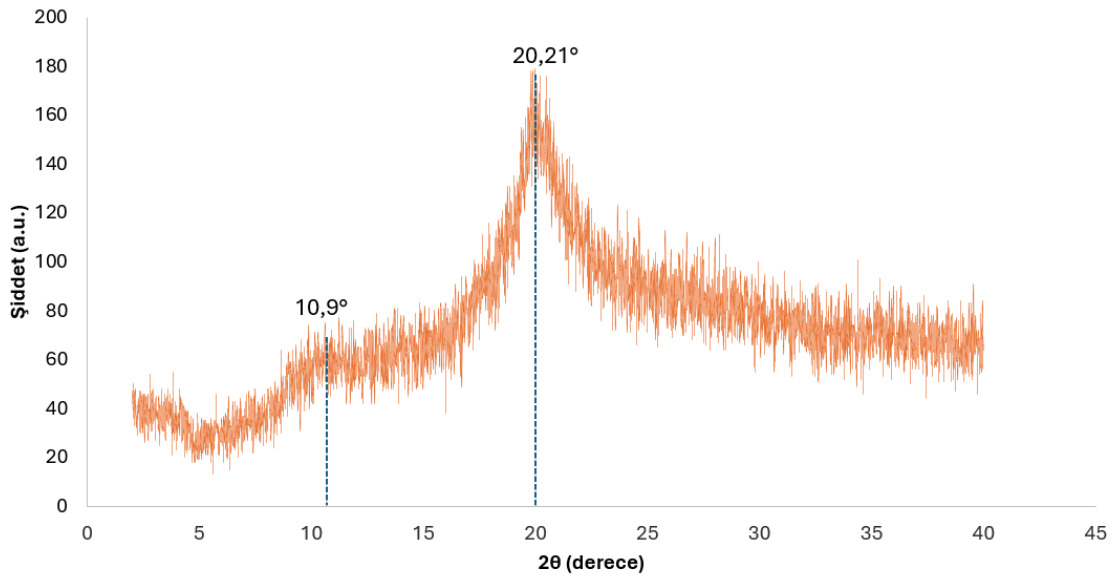
Şekil 4.45. Hyaluronik asitin XRD difraktogramı



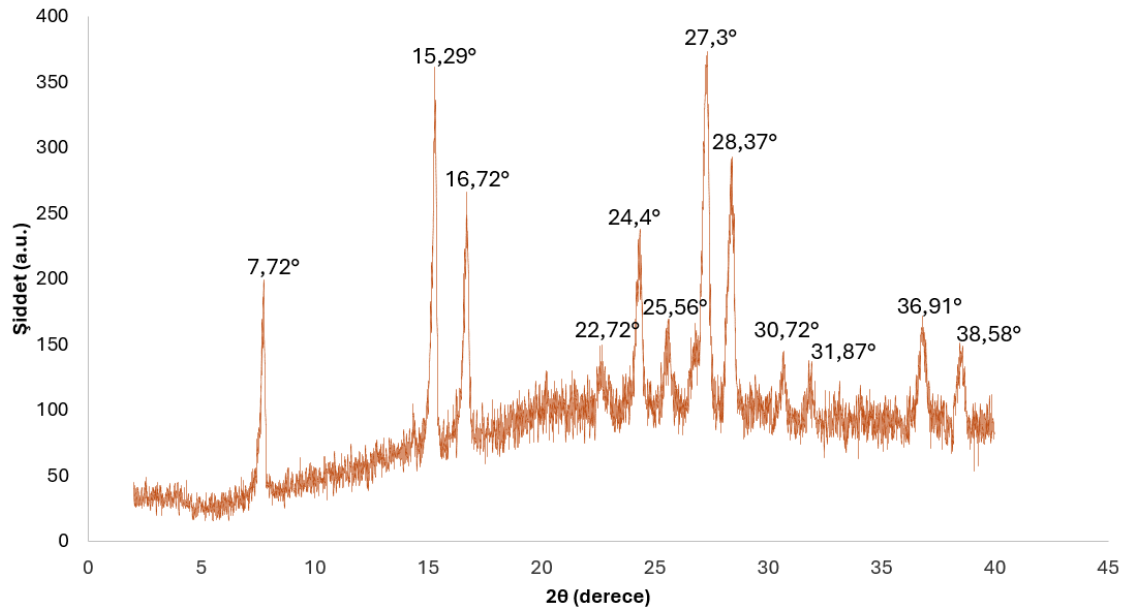
Şekil 4.46. Sodyum aljinat-Protanal CR8223 ün XRD difraktogramı



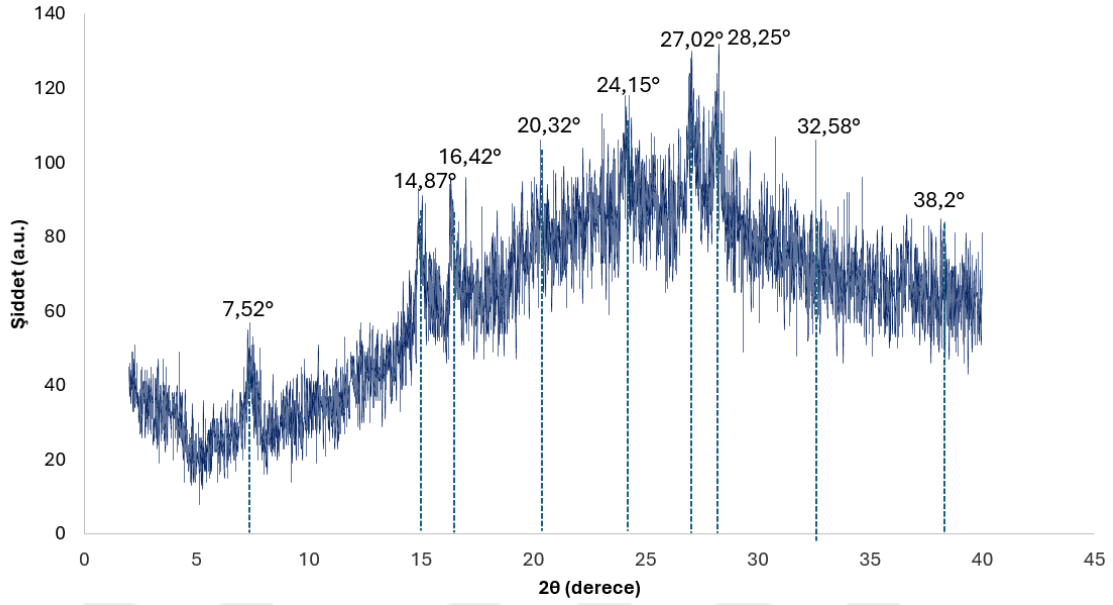
Şekil 4.47. Sodyum aljinat-Protanal CR8133 ün XRD difraktogramı



Şekil 4.48. Kitozanın XRD difraktogramı



Şekil 4.49. Mesalazin, kitozan, ipek fibroin, sodyum aljinat-Protanal CR8223 ve hyaluronik asitin fiziksel karışımının XRD difraktogramı

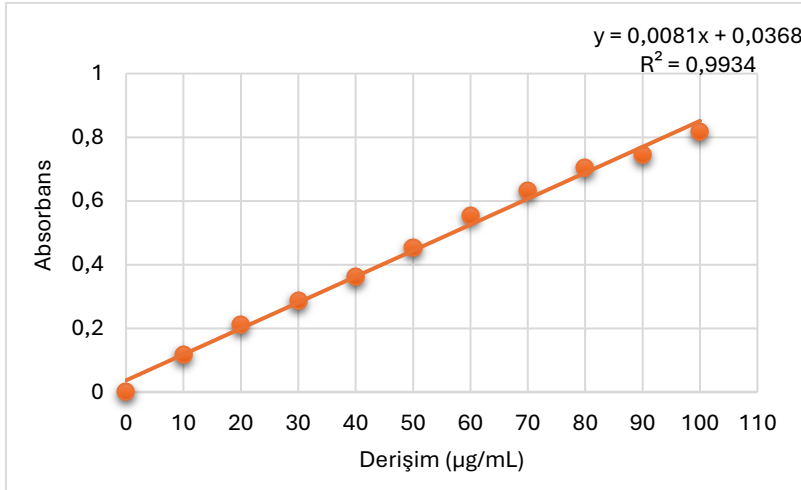


Şekil 4.50. Mesalazin, kitozan, ipek fibroin, sodyum aljinat-Protanal CR8133 ve hyaluronik asitin fiziksel karışımının XRD difraktogramı

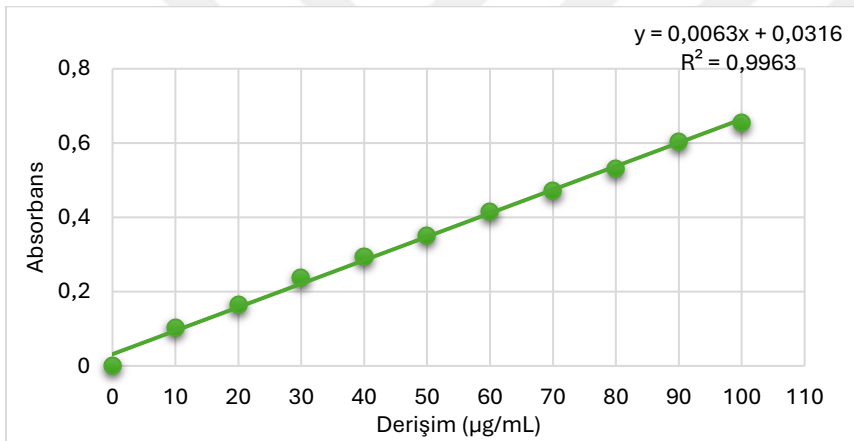
4.2. İpek fibroin eldesi ve karakterizasyonu

4.2.1 Protein miktar tayini yönteminin geliştirilmesi

Protein miktar tayini için Bradford yönteminin geliştirilmesi Bölüm 3.3.1' de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Miktar tayini yöntemi geliştirilmesi çalışmaları sonucunda ipek fibroin çözeltisinden ve liyofilize ipek fibroinden protein miktar tayini için olmak üzere iki ayrı kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir. İpek fibroin çözeltisinden protein miktar tayini için Bradford yöntemiyle elde edilen kalibrasyon doğrusu Şekil 4.51'de, liyofilize ipek fibroinden miktar tayini için Bradford yöntemiyle elde edilen kalibrasyon doğrusu Şekil 4.52'de gösterilmiştir.



Şekil 4.51. İpek fibroin çözeltisinden protein miktar tayini için Bradford yöntemiyle elde edilen kalibrasyon doğrusu



Şekil 4.52. Liyofilize ipek fibroinden protein miktar tayini için Bradford yöntemiyle elde edilen kalibrasyon doğrusu

4.2.3 İpek fibroin eldesi için optimizasyon çalışmaları

İpek fibroin eldesi optimizasyon çalışmaları Bölüm 3.3.2’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Zambak giderme işleminden sonra uzaklaşan serisin miktarı gravimetrik olarak analiz edilmiştir ve sonuçlar Çizelge 4.20’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.20. Zamk giderme işlemi sonucunda uzaklaşan serisin miktarının gravimetrik olarak analiz sonuçları

Tartılan İpek Böceği Kozası Ağırlığı (g)	Zamk Giderme İşleminde Sonra Elde Edilen Materyal Ağırlığı (g)	%Kayıp
2,564	1,894	26,12
2,558	1,845	27,86
2,579	1,904	26,19
Ortalama %Kayıp		26,72
Standart Sapma		0,985

Optimizasyon çalışmaları kapsamında ipek fibroin çözeltisi eldesinin optimizasyonu için Çizelge 3.1’de yer alan deneyler yapılmıştır ve ipek fibroin çözeltilerinin protein miktarları Bradford yöntemiyle analiz edilmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 4.21’de verilmiştir. Liyofilize ipek fibroin eldesinin optimizasyonu için ise Çizelge 3.2’de yer alan deneyler yapılmıştır ve deney sonuçları Çizelge 4.22’de gösterilmiştir. Daha sonra ipek fibroin eldesini etkileyen parametrelerin, ipek fibroin protein içeriğine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla Graphpad Prism 10.1.2 programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi yöntemi ile istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir. Bu istatistiksel analiz sonuçları ekstraksiyon ajanı tipinin elde edilen ipek fibroinin protein içeriğine etkisi ipek fibroin çözeltisi için Şekil 4.53’te, liyofilize ipek fibroin için Şekil 4.54’te; diyaliz işlemi için kullanılan diyaliz membranının MWCO değerinin etkisi ipek fibroin çözeltisi için Şekil 4.55’te, liyofilize ipek fibroin için Şekil 4.56’da; diyaliz süresinin etkisi ipek fibroin çözeltisi için Şekil 4.57’de, liyofilize ipek fibroin için Şekil 4.58’de; santrifüj işleminin etkisi ipek fibroin çözeltisi için Şekil 4.59’da gösterilmiştir.

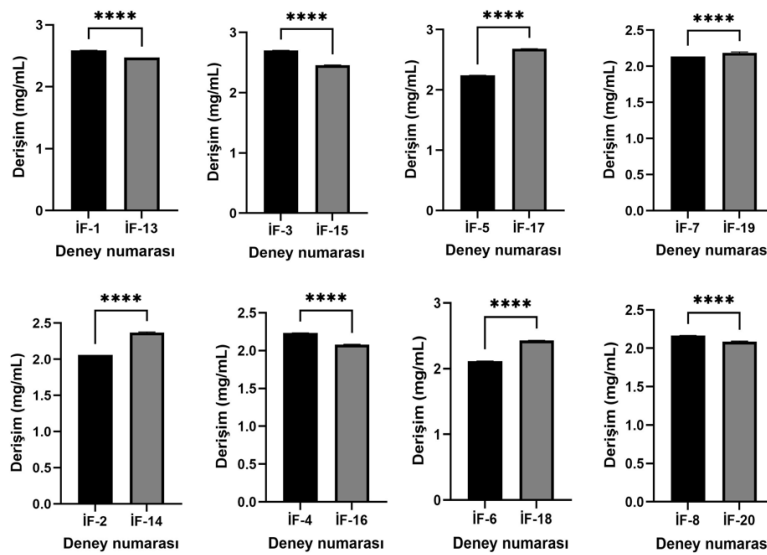
İpek fibroin çözeltisi ve liyofilize ipek fibroin için yapılan deneylerde, 3.günde ipek fibroin çözeltisi agregasyona uğramış ve ipek fibroin çözeltisi elde edilememiştir. Bu nedenle optimizasyon çalışmaları için yapılan analiz sonuçlarında 3.günde yer alan deneyler yer almamaktadır.

Çizelge 4.21. İpek fibroin çözeltisi için miktar tayini sonuçları (n=3, Ortalama $\pm$ SS)

Diyaliz süresi		1 gün				2 gün			
Diyaliz membranının MWCO değeri (Da)		3.500		12.000		3.500		12.000	
Ekstraksiyon ajanı tipi	Ajisawa ajanı	SÖ*	SS*	SÖ	SS	SÖ	SS	SÖ	SS
		2,58 $\pm 0,02$	2,061 $\pm 0,003$	2,70 $\pm 0,003$	2,233 $\pm 0,002$	2,2427 $\pm 0,0002$	2,113 $\pm 0,003$	2,1364 $\pm 0,0007$	2,166 $\pm 0,001$
	LiBr çözeltisi	2,4736 $\pm 0,0005$	2,37 $\pm 0,01$	2,4583 $\pm 0,0027$	2,079 $\pm 0,005$	2,6815 $\pm 0,0016$	2,4307 $\pm 0,0012$	2,1865 $\pm 0,0125$	2,085 $\pm 0,009$
SÖ: Santrifüj öncesi SS: Santrifüj sonrası									

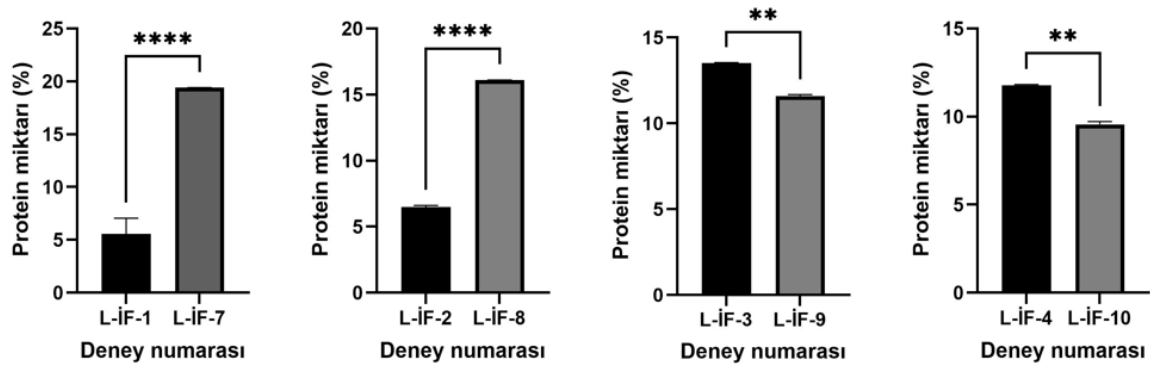
Çizelge 4.22. Liyofilize ipek fibroin için miktar tayini sonuçları (n=3, Ortalama $\pm$ SS)

Diyaliz süresi		1 gün		2 gün	
Diyaliz membranının MWCO değeri (Da)		3.500	12.000	3.500	12.000
Ekstraksiyon ajanı tipi	Ajisawa ajanı	5,58 $\pm$ 1,47	6,47 $\pm$ 0,13	13,51 $\pm$ 0,04	11,78 $\pm$ 0,04
	LiBr çözeltisi	19,40 $\pm$ 0,01	16,10 $\pm$ 0,01	11,59 $\pm$ 0,09	9,56 $\pm$ 0,16



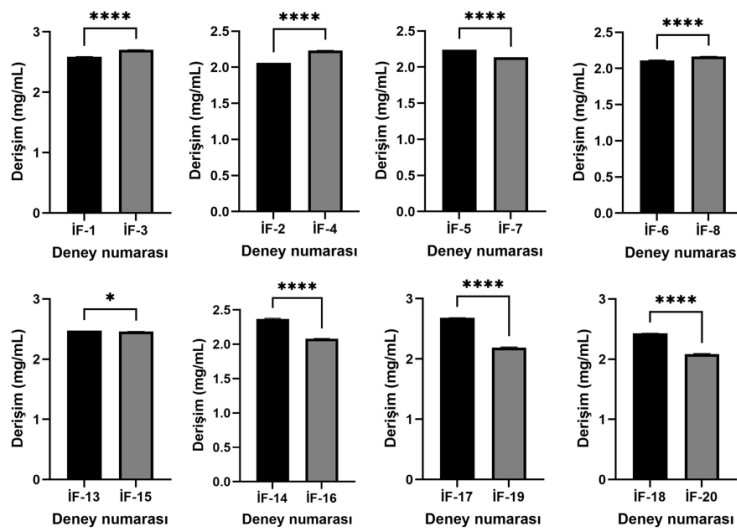
Analiz edilen deney numarası	Ortalama fark	p değeri
İF-1-İF-13	0,1150	<0,0001
İF-3-İF-15	0,2420	<0,0001
İF-5-İF-17	-0,4388	<0,0001
İF-7-İF-19	-0,05004	<0,0001
İF-2-İF-14	-0,3059	<0,0001
İF-4-İF-16	0,1539	<0,0001
İF-6-İF-18	-0,3174	<0,0001
İF-8-İF-20	0,08115	<0,0001

Şekil 4.53. İpek fibroin çözeltisi için ekstraksiyon ajanı tipinin elde edilen ipek fibroinin protein içeriğine etkisinin istatistiksel analiz sonuçları (ns: p>0,05, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p<0,0001)



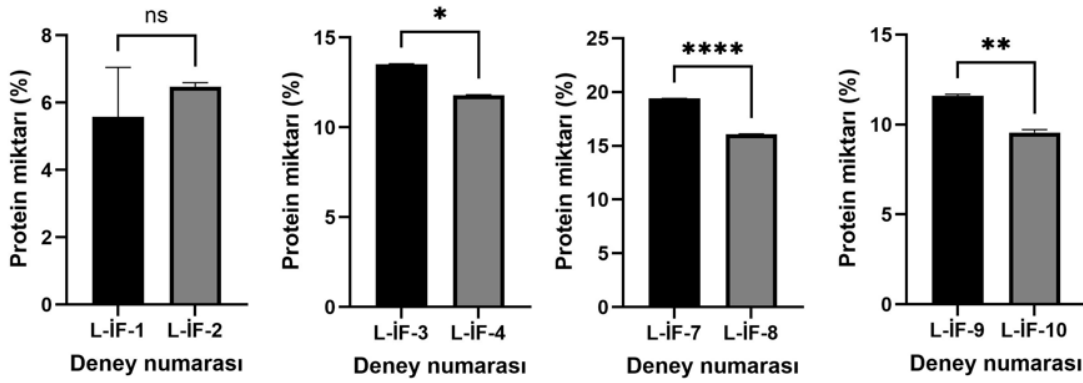
Analiz edilen deney numarası	Ortalama fark	p değeri
L-İF-1-L-İF-7	-13,82	<0,0001
L-İF-2-L-İF-8	-9,630	<0,0001
L-İF-3-L-İF-9	1,920	0,0072
L-İF-4-L-İF-10	2,220	0,0019

Şekil 4.54. Liyofilize ipek fibroin için ekstraksiyon ajanı tipinin elde edilen ipek fibroinin protein içeriğine etkisinin istatistiksel analiz sonuçları (ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$)



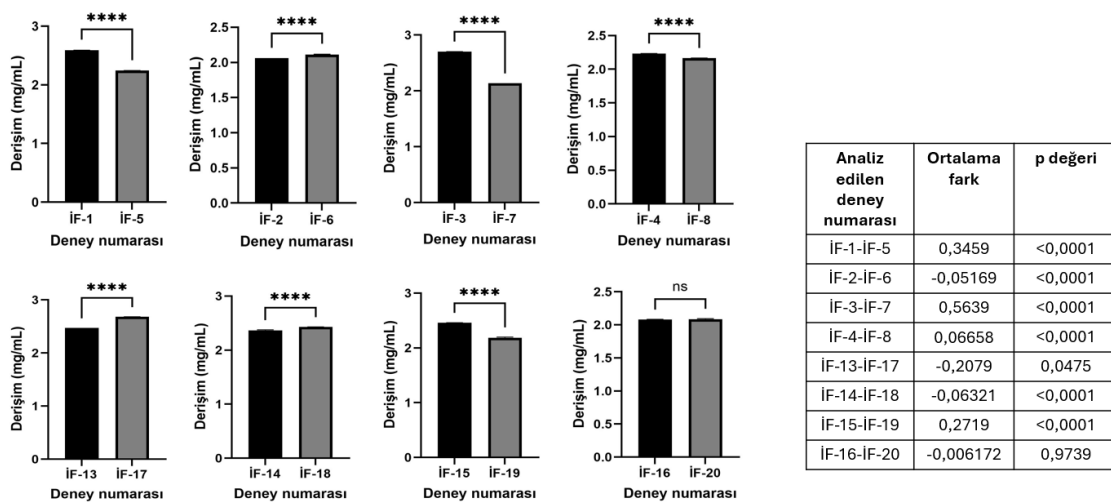
Analiz edilen deney numarası	Ortalama fark	p değeri
İF-1-İF-3	-0,1117	<0,0001
İF-2-İF-4	-0,1717	<0,0001
İF-5-İF-7	0,1063	<0,0001
İF-6-İF-8	-0,05342	<0,0001
İF-13-İF-15	0,01531	0,0475
İF-14-İF-16	0,2881	<0,0001
İF-17-İF-19	0,4951	<0,0001
İF-18-İF-20	0,5432	<0,0001

Şekil 4.55. İpek fibroin çözeltisi için diyaliz membranının MWCO değerinin elde edilen ipek fibroinin protein içeriğine etkisinin istatistiksel analiz sonuçları (ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$)



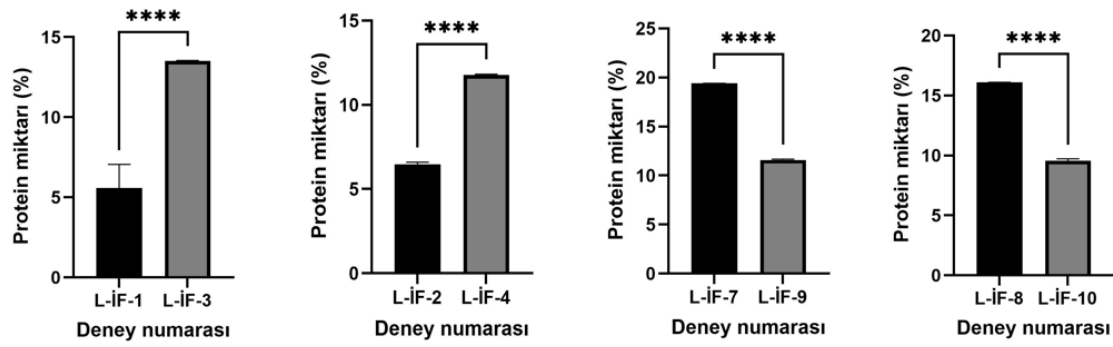
Analiz edilen deney numarası	Ortalama fark	p değeri
L-İF-1-L-İF-2	-0,8900	0,4699
L-İF-3-L-İF-4	1,730	0,0170
L-İF-7-L-İF-8	3,300	<0,0001
L-İF-9-L-İF-10	2,030	0,0044

Şekil 4.56. Liyofilize ipek fibroin için diyaliz membranının MWCO değerinin elde edilen ipek fibroinin protein içeriğine etkisinin istatistiksel analiz sonuçları (ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$)



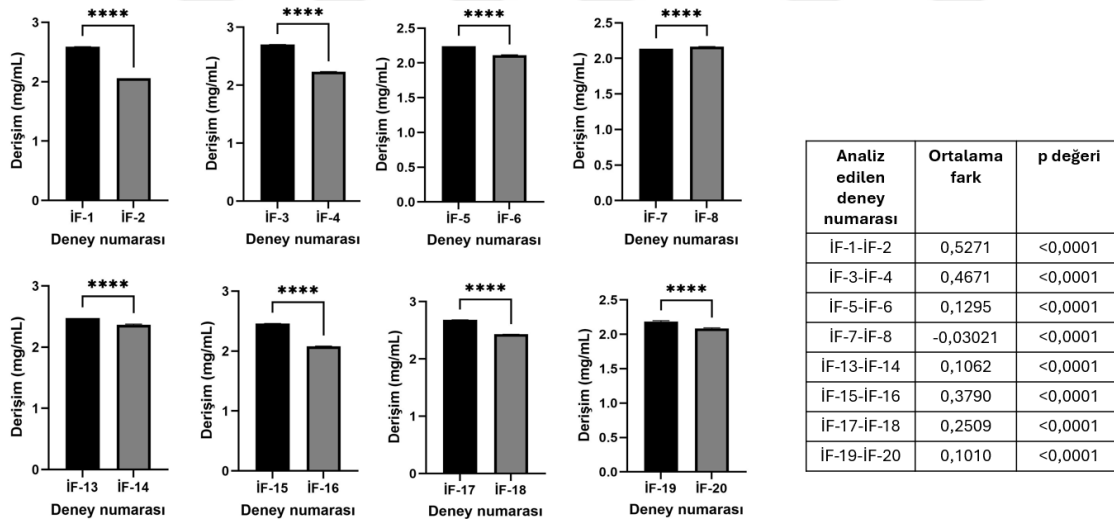
Analiz edilen deney numarası	Ortalama fark	p değeri
İF-1-İF-5	0,3459	<0,0001
İF-2-İF-6	-0,05169	<0,0001
İF-3-İF-7	0,5639	<0,0001
İF-4-İF-8	0,06658	<0,0001
İF-13-İF-17	-0,2079	0,0475
İF-14-İF-18	-0,06321	<0,0001
İF-15-İF-19	0,2719	<0,0001
İF-16-İF-20	-0,006172	0,9739

Şekil 4.57. İpek fibroin çözeltisi için diyaliz süresinin elde edilen ipek fibroinin protein içeriğine etkisinin istatistiksel analiz sonuçları (ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$)



Analiz edilen deney numarası	Ortalama fark	p değeri
L-İF-1-L-İF-3	-7,930	<0,0001
L-İF-2-L-İF-4	-5,310	<0,0001
L-İF-7-L-İF-9	7,810	<0,0001
L-İF-8-L-İF-10	6,540	<0,0001

Şekil 4.58. Liyofilize ipek fibroin için diyaliz süresinin elde edilen ipek fibroinin protein içeriğine etkisinin istatistiksel analiz sonuçları (ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$)



Analiz edilen deney numarası	Ortalama fark	p değeri
İF-1-İF-2	0,5271	<0,0001
İF-3-İF-4	0,4671	<0,0001
İF-5-İF-6	0,1295	<0,0001
İF-7-İF-8	-0,03021	<0,0001
İF-13-İF-14	0,1062	<0,0001
İF-15-İF-16	0,3790	<0,0001
İF-17-İF-18	0,2509	<0,0001
İF-19-İF-20	0,1010	<0,0001

Şekil 4.59. İpek fibroin çözeltisi için santrifüj işleminin elde edilen ipek fibroinin protein içeriğine etkisinin istatistiksel analiz sonuçları (ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$)

Santrifüj işleminden sonra bir miktar protein kaybı görülse de santrifüj işleminin safsızlıkları uzaklaştırmak için etkili olduğu gözlenmiştir. Bu amaçla santrifüj işleminin optimizasyonu için 10000 rpm (8512 RCF) dönme hızında 10 dk, 5000 rpm (2128 RCF) dönme hızında 5 dakika ve 2500 rpm (532 RCF) dönme hızında 5 dk

santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir ve daha sonra % kayıp hesaplanmıştır. Bu optimizasyon işleminin sonuçları Çizelge 4.23'te gösterilmiştir ve bu sonuçlara göre optimum santrifüj işlem koşulu 2500 rpm dönme hızında 5 dakika olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.24'te en yüksek protein içeriğine sahip ipek fibroin eldesi için optimum işlem koşulları verilmiştir. Buna göre en yüksek protein içeriğine sahip ipek fibroin çözeltisinin eldesinde, ekstraksiyon ajanı olarak LiBr çözeltisi, diyaliz membranının MWCO değeri olarak 3.500 Da, diyaliz süresi olarak da 2 gün diyalizin kullanıldığı ve santrifüj işleminin gerçekleştirildiği yöntemin uygun olduğuna karar verilmiştir. Daha sonraki deneyler için bu işlem koşulları kullanılarak ipek fibroin üretimi gerçekleştirilmiştir (Yıldız ve diğerleri, 2023).

Çizelge 4.23. İpek fibroin eldesinde santrifüj işleminin optimizasyonu sonuçları

Santrifüj süresi (dakika)	RPM/RCF	% Kayıp
10	10000/8512	9.33
10	5000/2128	4.37
5	2500/532	3.13

Çizelge 4.24. İpek fibroin eldesi için optimum işlem koşulları

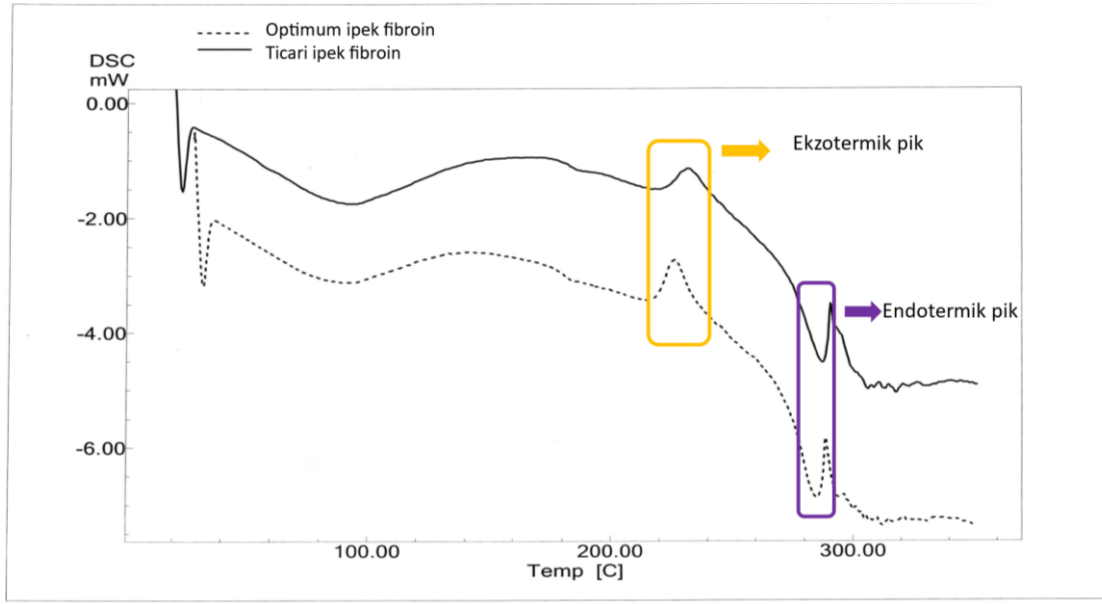
Ekstraksiyon ajanı tipi	LiBr çözeltisi
Diyaliz süresi	2 gün
Diyaliz membranının MWCO değeri	3500 Da
Santrifüj işlemi koşulları (İpek fibroin çözeltisi için)	2500 RPM (532 RCF), 5 dakika

4.2.4. İpek fibroinin karakterizasyon çalışmaları

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen ipek fibroinin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. İpek fibroinin karakterizasyon çalışmaları ticari ipek fibroin (Bugamed Biotechnology, Türkiye) ile karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları kapsamında DSC analizi, FTIR analizi, gravimetrik analiz ve sirküler dikroizm ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

DSC analizleri

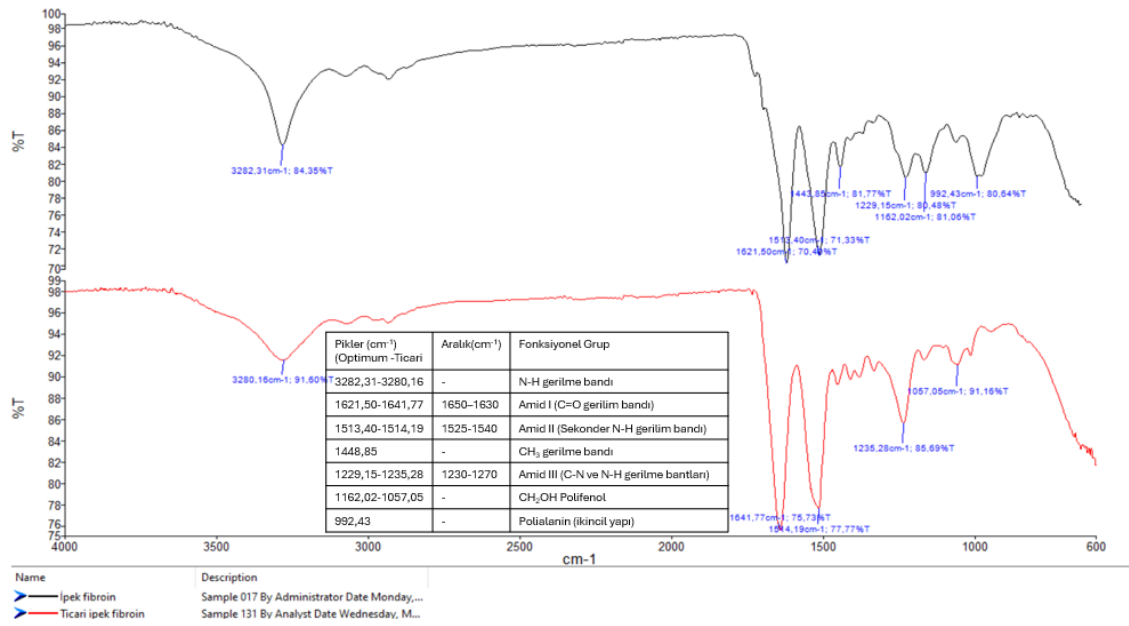
Optimum ipek fibroin ve ticari ipek fibroinin DSC analizleri Bölüm 3.3.3' te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. İpek fibroin ve ticari ipek fibroinin DSC termogramları Şekil 4.60'ta gösterilmiştir.



Şekil 4.60. Optimum ipek fibroin ve ticari ipek fibroinin DSC termogramları

FTIR analizi

Optimum ipek fibroin ve ticari ipek fibroinin FTIR analizleri Bölüm 3.3.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. İpek fibroin ve ticari ipek fibroinin FTIR spektrumları Şekil 4.61'de gösterilmiştir.



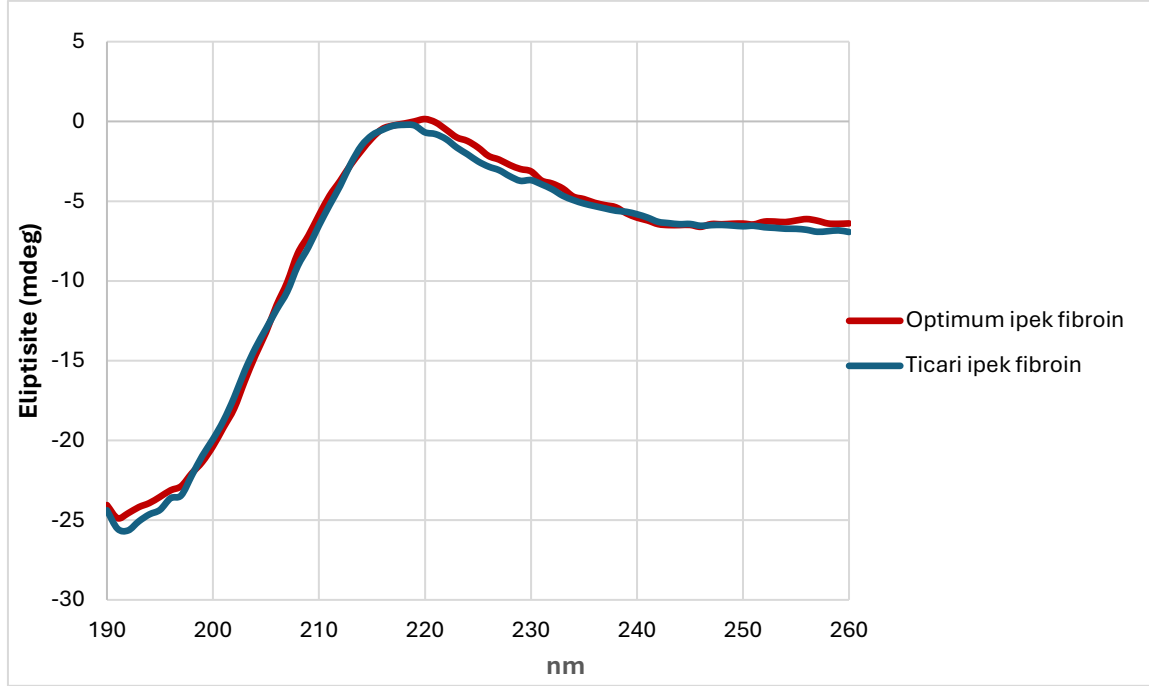
Şekil 4.61. Optimum ipek fibroin ve ticari ipek fibroinin FTIR spektrumları

Gravimetrik analiz

Optimum ipek fibroin için gravimetrik analiz Bölüm 3.3.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Gravimetrik analiz sonucunda optimum ipek fibroinin derişimi gravimetrik olarak %5 olarak bulunmuştur ve daha sonraki çalışmalarda bu değer kullanılmıştır.

İpek fibroin yapı analizi testi

Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilmiş ipek fibroin ve ticari ipek fibroinin ikincil yapılarının belirlenmesi ve bu yapıların karşılaştırılması amacıyla sirküler dikroizm analizleri Bölüm 3.3.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Optimum ipek fibroin ve ticari ipek fibroinin sirküler dikroizm sonuçları Şekil 4.62'de gösterilmiştir.



Şekil 4.62. Optimum ipek fibroin ve ticari ipek fibroinin sirküler dikroizm spektogramları

4.3. Önformülasyon Çalışmaları

4.3.1. Üç boyutlu biyobaskı için gerekli biyomürekkep formülasyonlarının hazırlanması amacıyla yapılan ön çalışmalar

Biyomürekkep formülasyonunun hazırlanması için yapılan ön çalışmalar kapsamında sodyum aljinat (Protanal LFR 10/60), ipek fibroin ve hyaluronik asit kullanılarak farklı biyomürekkep formülasyonları hazırlanmış ve bu formülasyonların yüzey gerilimi ve viskozite ölçümleri Bölüm 3.4.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir ve ölçüm sonuçları Çizelge 4.25’te verilmiştir.

Çizelge 4.25. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında geliştirilen biyomürekkep formülasyonlarının yüzey gerilimi, viskozite ölçüm sonuçları ve basılabilirlikleri (n=3)

Biyomürekkep formülasyon kodu	İçeriği (SA:İF:HA mg)	Viskozite (Shear Rate:50) (mPa.s) Ortalama $\pm$ SS	Yüzey Gerilimi (mN/m) Ortalama $\pm$ SS	Basılabilirlik
B1/100-75-20	100:75:20	629,53 $\pm$ 2,29	45,22 $\pm$ 1,33	-
B2/100-75-25	100:75:25	960,20 $\pm$ 2,80	42,88 $\pm$ 0,43	+
B3/100-50-25	100:50:25	1123,88 $\pm$ 2,29	34,45 $\pm$ 1,18	+
B4/100-50-50	100:50:50	1354,49 $\pm$ 2,29	44,02 $\pm$ 0,17	+
B5/100-25-50	100:25:50	1147,73 $\pm$ 2,29	42,32 $\pm$ 0,30	+
B6/100-25-75	100:25:75	1402,20 $\pm$ 4,58	42,46 $\pm$ 0,53	+
B7/75-75-50	75:75:50	506,27 $\pm$ 6,06	53,77 $\pm$ 1,69	+
B8/75-50-75	75:50:75	1567,86 $\pm$ 29,84	42,08 $\pm$ 3,12	+
B9/50-75-75	50:75:75	1019,18 $\pm$ 4,58	31,17 $\pm$ 0,06	+

Yapılan değerlendirmelerde B1/100-75-20 formülasyonu, viskozite ve yüzey geriliminin 3B baskı için uygun olmaması, B8/75-50-75 formülasyonu, formülasyonda bulunan ipek fibroin miktarının düşük olması, B9/50-75-75 formülasyonu ise formülasyonda bulunan sodyum aljinat miktarının çapraz bağlama işlemi için yeterli olmaması nedeniyle daha sonraki çalışmalarda kullanılmamıştır. Diğer biyomürekkep formülasyonları her seferinde eşit miktarda formülasyon hazırlanması ve biyomürekkeplere yüklenecek olan mesalazin ve TNF- α siRNA miktarlarında sapma olmaması amacıyla sabit hacimde (5 mL) olacak şekilde tekrar hazırlanmıştır. Biyomürekkepler HA çözeltisi en fazla %2 derişimde hazırlanabildiği ve elde edilen ipek fibroin çözeltisi ise gravimetrik olarak %5 derişime sahip olduğu için formülasyonlarda yer alan SA:İF:HA polimer oranlarının mg olarak sabit kalması amacıyla SA çözeltisi derişimleri değiştirilerek hazırlanmıştır (Çizelge 3.4). Daha sonra bu biyomürekkep formülasyonları için, viskozite, yüzey gerilimi ve basılabilirlik ölçümleri gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar Çizelge 4.26'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.26. Sabit hacimde hazırlanan biyomürekkep formülasyonlarının viskozite, yüzey gerilimi ve basılabilirlik analizi sonuçları (n=3)

Biyomürekkep formülasyon kodu	İçeriği (SA:SF:HA mg)	Viskozite (Shear Rate:50) (mPa.s) Ortalama $\pm$ SS	Yüzey Gerilimi (mN/m) Ortalama $\pm$ SS	Basılabilirlik
B2/100-75-25	100:75:25	1123,88 $\pm$ 33,81	36,38 $\pm$ 0,36	+
B3/100-50-25	100:50:25	915,80 $\pm$ 12,77	44,25 $\pm$ 1,25	+
B4/100-50-50	100:50:50	1642,09 $\pm$ 0,00	39,41 $\pm$ 0,40	+
B5/100-25-50	100:25:50	2832,24 $\pm$ 16,06	46,32 $\pm$ 1,03	+
B6/100-25-75	100:25:75	3514,78 $\pm$ 24,18	36,89 $\pm$ 0,10	+
B7/75-75-50	75:75:50	2634,09 $\pm$ 0,00	47,00 $\pm$ 2,30	+

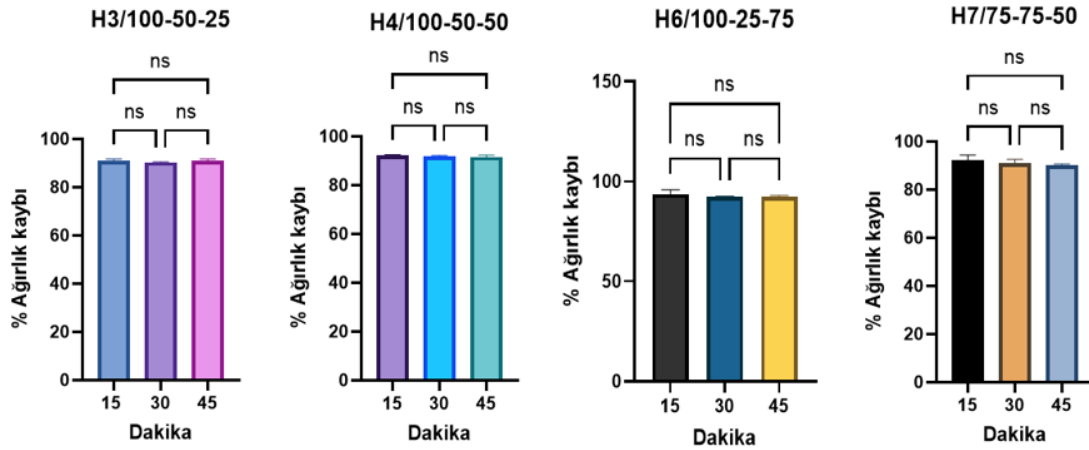
Bu biyomürekkep formülasyonlarının yüzey gerilimi ve viskoziteleri 3B biyobaskı için uygun bulunmuş ve formülasyonların tümü basılabilir olarak değerlendirilmiştir. Ekstrüzyon temelli biyobaskı için viskozite değerlerinin 1-60.000.000 mPa.s aralığı gibi geniş bir aralıkta olması basım için yeterli olmakla birlikte, basılan materyalin şeklinin korunması için viskozitenin yüksek olması tercih edilmektedir (O'Connel ve diğerleri, 2020). Yapılan değerlendirme sonucunda B3/100-50-25, B4/100-50-50, B6/100-25-75 ve B7/75-75-50 formülasyonları daha sonraki çalışmalar için seçilmiştir. Baskı işleminden sonra 3B basılan hidrojel çapraz H3/100-50-25, H4/100-50-50, H6/100-25-75 ve H7/75-75-50 olarak kodlandırılmıştır.

Çapraz bağlama süresinin optimizasyonu çalışmaları

Çapraz bağlama süresi optimizasyon çalışmaları H3/100-50-25, H4/100-50-50, H6/100-25-75 ve H7/75-75-50 formülasyonları için Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Her bir formülasyon için 24 saat sonunda % ağırlık kaybı değeri belirlenmiştir ve ağırlık kayıplarının istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığının belirlenmesi için istatistiksel analiz gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlama süresi optimizasyonu için % ağırlık kaybı değerleri Çizelge 4.27'de, istatistiksel analiz sonuçları ise Şekil 4.63'te gösterilmiştir. Şekil 4.63'e bakıldığı zaman bütün formülasyonlar için 15, 30 ve 45 dakika çapraz bağlama süresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$). Çapraz bağlama süresi olarak 15 dakika seçilmiştir ve bundan sonraki çalışmalarda 15 dakika kullanılmıştır.

Çizelge 4.27. Çapraz bağlama süresi optimizasyonu için % ağırlık kaybı değerleri (n=3)

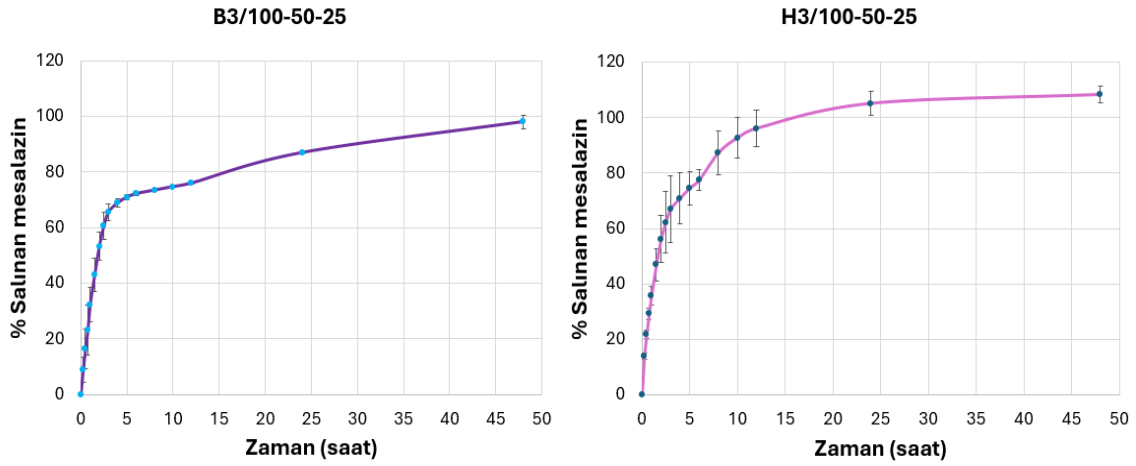
Hidrojel Formülasyon Kodu	Çapraz Bağlanma Süresi (dk)	Başlangıç Ağırlığı (mg) Ortalama $\pm$ SS	24. saat Sonundaki Ağırlık (mg) Ortalama $\pm$ SS	% Ağırlık kaybı Ortalama $\pm$ SS
H3/100-50-25	45	479,1 $\pm$ 52,9	43,8 $\pm$ 5,5	90,8 $\pm$ 0,2
	30	445,1 $\pm$ 116,5	42,9 $\pm$ 11,9	90,4 $\pm$ 0,2
	15	387,3 $\pm$ 104,6	34,7 $\pm$ 8,3	91,0 $\pm$ 0,6
H4/100-50-50	45	378,2 $\pm$ 24,4	31,9 $\pm$ 3,4	91,6 $\pm$ 0,7
	30	478,8 $\pm$ 101,9	39,2 $\pm$ 8,6	91,8 $\pm$ 0,4
	15	487,9 $\pm$ 57,8	37,7 $\pm$ 5,5	92,3 $\pm$ 0,3
H6/100-25-75	45	382,3 $\pm$ 64,5	30,3 $\pm$ 7,2	92,1 $\pm$ 0,8
	30	401,1 $\pm$ 63,9	31,8 $\pm$ 4,7	92,1 $\pm$ 0,5
	15	516,2 $\pm$ 122,6	33,3 $\pm$ 5,5	93,5 $\pm$ 2,2
H7/75-75-50	45	572,1 $\pm$ 120,5	57,0 $\pm$ 9,5	90,0 $\pm$ 0,7
	30	518,3 $\pm$ 113,7	46,5 $\pm$ 8,8	91,0 $\pm$ 1,6
	15	529,3 $\pm$ 113,2	41,4 $\pm$ 19,3	92,2 $\pm$ 2,3



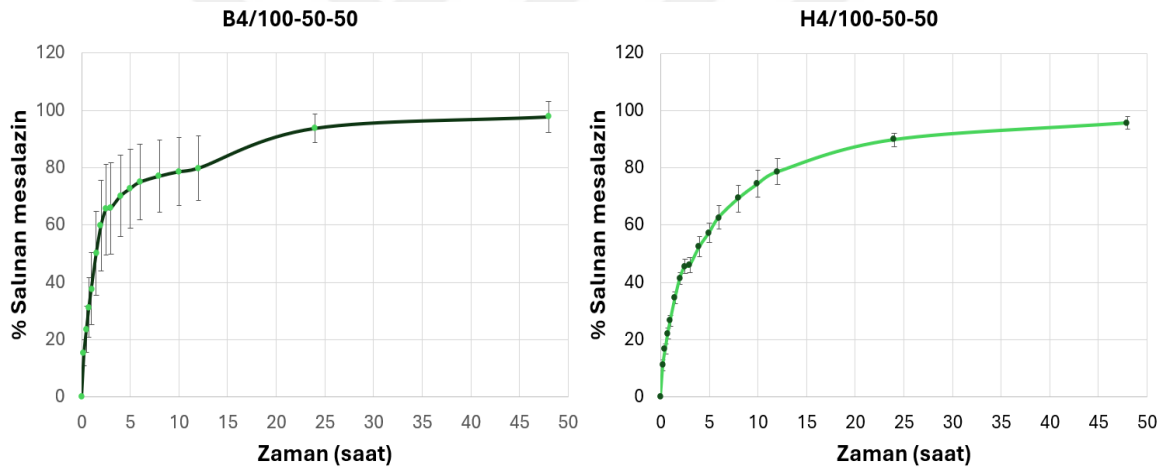
Şekil 4.63. Çapraz bağlama süresi optimizasyonu için istatistiksel analiz sonuçları

Hidrojellerden mesalazin salımı çalışması

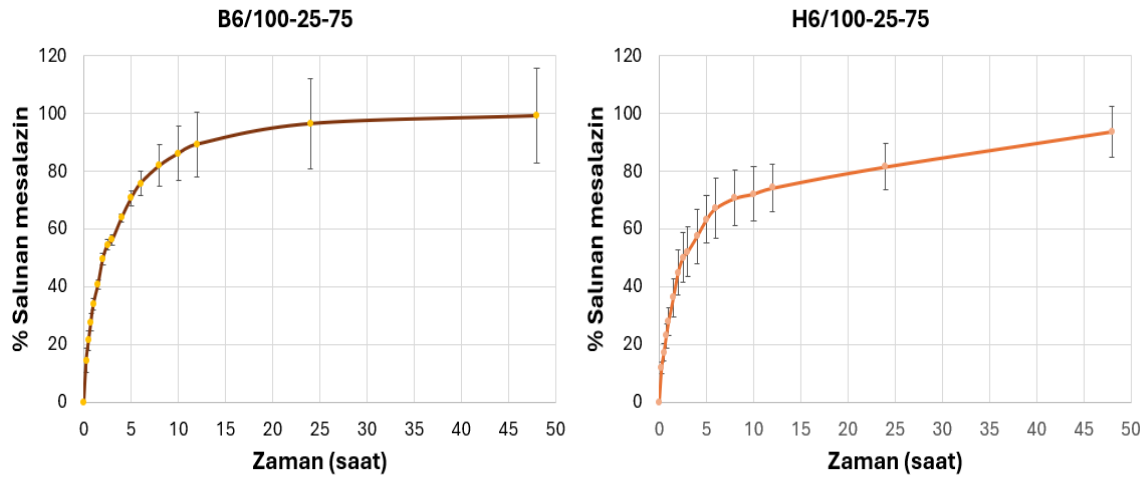
Mesalazinin salım profilini gözlemlemek amacıyla B3/100-50-25, B4/100-50-50, B6/100-25-75 ve B7/75-75-50 biyomürekkep formülasyonlarına mesalazin yüklenmiş ve 3B biyobaskı teknolojisi ile mesalazin yüklü H3/100-50-25, H4/100-50-50, H6/100-25-75 ve H7/75-75-50 kodlu hidrojeller hazırlanmıştır. Bu hidrojeller kullanılarak Franz difüzyon hücresi yöntemi ile in vitro salım deneyi yapılmıştır. Franz difüzyon hücresi deneyleri Bölüm 3.4.1’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir ve hem biyomürekkep formülasyonlarından hem de 3B basılmış hidrojel formülasyonlardan in vitro mesalazin salımı çalışması yapılmıştır. Salım sonucunda % salınan mesalazin- zaman grafikleri çizilmiş ve bu grafikler, B3/100-50-25 ve H3/100-50-25 için Şekil 4.64’te, B4/100-50-50 ve H4/100-50-50 için Şekil 4.65’te, B6/100-25-75 ve H6/100-25-75 için Şekil 4.66’da ve B7/75-75-50 ve H7/75-75-50 için Şekil 4.67’de sunulmuştur.



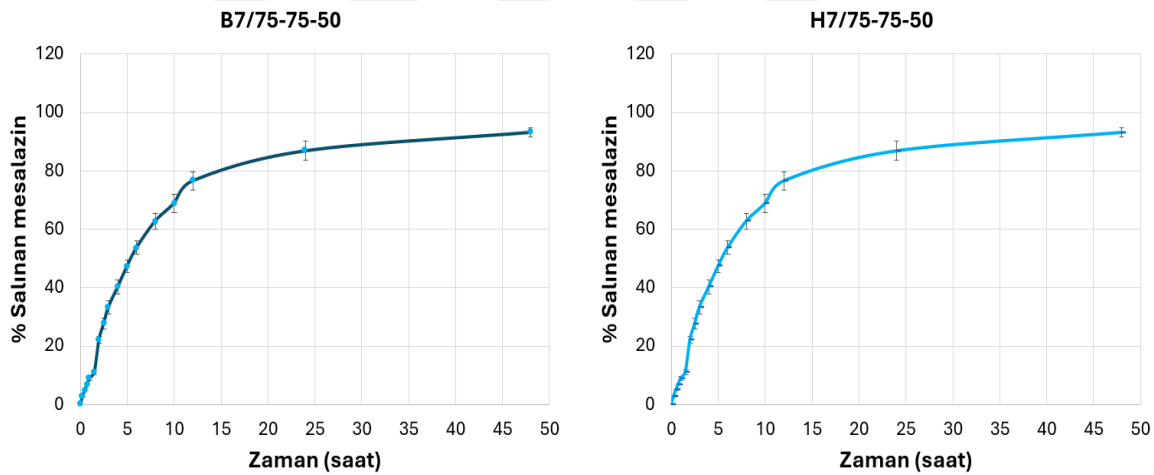
Şekil 4.64. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında geliştirilen B3/100-50-25 biyomürekkep ve H3/100-50-25 hidrojel formülasyonundan mesalazinin in vitro salım profili (n=3, Ortalama $\pm$ SS).



Şekil 4.65. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında geliştirilen B4/100-50-50 biyomürekkep ve H4/100-50-50 hidrojel formülasyonundan mesalazinin in vitro salım profili (n=3, Ortalama $\pm$ SS).



Şekil 4.66. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında geliştirilen B6/100-25-75 biyomürekkep ve H6/100-25-75 hidrojel formülasyonundan mesalazinin in vitro salım profili (n=3, Ortalama±SS).



Şekil 4.67. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında geliştirilen B7/75-75-50 biyomürekkep ve H7/75-75-50 hidrojel formülasyonundan mesalazinin in vitro salım profili (n=3, Ortalama±SS).

Franz difüzyon yöntemi ile in vitro salım deneyi sonuçlarına göre tüm formülasyonlar için 3B basılmış hidrojellerden mesalazin salımının, biyomürekkep formülasyonlarına göre daha yavaş olduğu gözlenmiştir. Ayrıca en yavaş mesalazin salımın B7/75-75-50 biyomürekkep ve bu biyomürekkep formülasyonu kullanılarak üretilen H7/75-75-50 hidrojel formülasyonu ile elde edildiği görülmüştür. Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere B7/75-75-50 kodlu biyomürekkep formülasyonu seçilmiştir.

4.4. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

4.4.1.Oral uygulama için optimum formülasyonun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar

Oral uygulama için mide ortamında salım hızının yavaşlatılması amacıyla farklı aljinat tipleri kullanılarak biyomürekkep formülasyonları ve bu formülasyonlar kullanılarak Bölüm 3.4.1’de yer alan “*3B Biyobaskı İşleminin Gerçekleştirilmesi*” başlığı altında anlatıldığı gibi 3B biyobaskı ile hidrojel formülasyonları üretilmiştir. Bu formülasyonlarda, B7/75-75-50 baz alınmış, sadece aljinat tipi değiştirilmiştir. Hazırlanan formülasyonların kodlaması Bölüm 3.5.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan biyomürekkep formülasyonlarının yüzey gerilimi, viskozite ölçümleri ve basılabilirlik parametresinin değerlendirilmesi Bölüm 3.4.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir ve bu sonuçlar Çizelge 4.28’de verilmiştir. Formülasyonların tümünün yüzey gerilimi ve viskozite değerleri ekstrüzyon temelli 3B biyobaskı için uygun bulunmuş ve formülasyonlar basılabilir bulunmuştur.

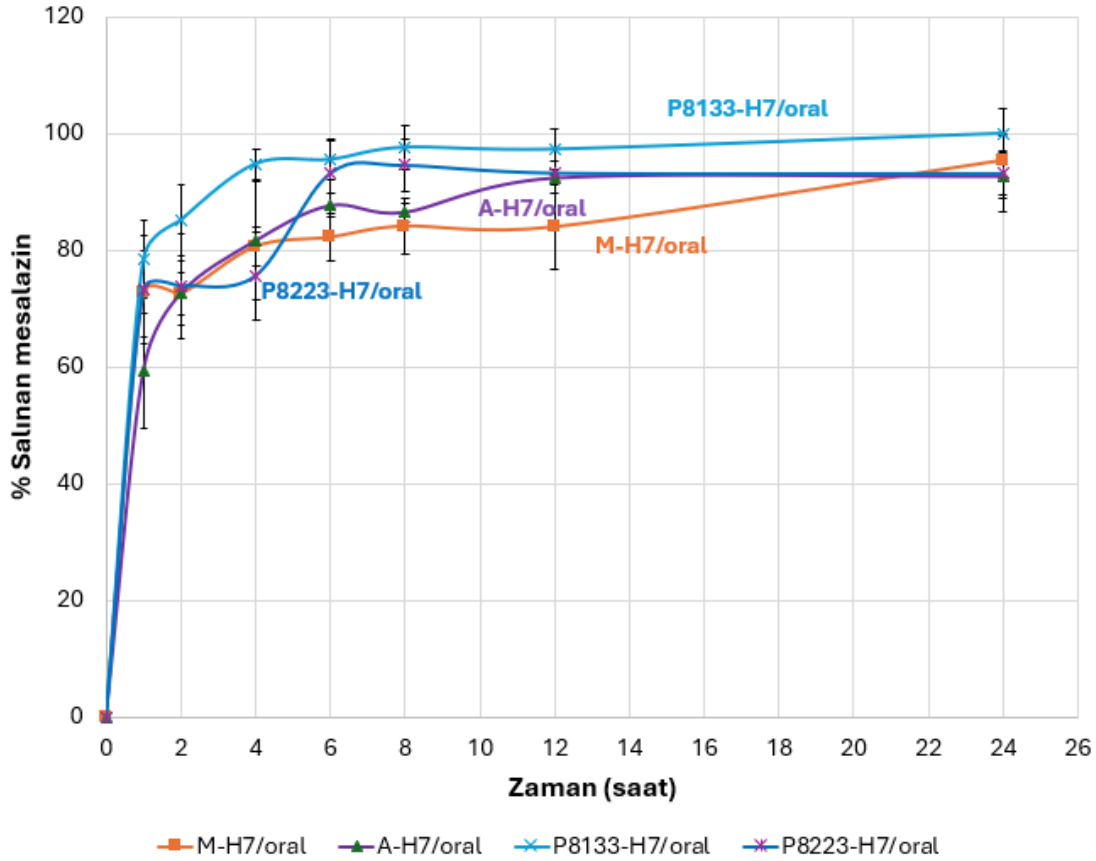
Çizelge 4.28. Farklı aljinat tipleri kullanılarak hazırlanan biyomürekkep formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları sonuçları (n=3)

Formülasyonda kullanılan aljinat tipi	Yüzey gerilimi (mN/m) (Ortalama $\pm$ SS)	Viskozite (cP) (Shear rate:10) (Ortalama $\pm$ SS)	Basılabilirlik
M-B7/oral (Manucol)	40,78 $\pm$ 1,48	13603 $\pm$ 275	+
P8133- B7/oral (Protanal CR8133)	34,89 $\pm$ 0,07	14009 $\pm$ 30	+
P8223-B7/oral (Protanal CR8223)	57,42 $\pm$ 0,93	17501 $\pm$ 61	+
A-B7/oral (Aquateric)	26,21 $\pm$ 0,51	13603 $\pm$ 275	+

Optimum oral formülasyonunun belirlenmesi için in vitro çözünme hızı çalışması

Mesalazin yüklü hidrojel formülasyonları olan M-H7, P8133-H7, P8223-H7, A-H7 hidrojel formülasyonları ile oral uygulama için yapılan in vitro çözünme hızı çalışmaları Bölüm 3.5.1’de yer alan “*Optimum oral hidrojel formülasyonunun belirlenmesi için in vitro çözünme hızı çalışması*” başlığında anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. İn vitro çözünme hızı çalışmaları sonucunda % salınan

mesalazin-zaman grafikleri çizilmiş ve in vitro çözünme hızı sonuçları Şekil 4.68'de sunulmuştur.



Şekil 4.68. Farklı aljinat tipleri kullanılarak geliştirilen oral hidrojel formülasyonlarından mesalazinin in vitro salım profilleri (n=3, Ortalama±SS)

Çözünme hızı çalışmaları, yüzey gerilimi, viskozite ve basılabilirlik sonuçlarına göre oral uygulama için optimum biyomürekkep formülasyonu P8223-B7/oral, optimum hidrojel formülasyonu P8223-H7/oral olarak seçilmiştir.

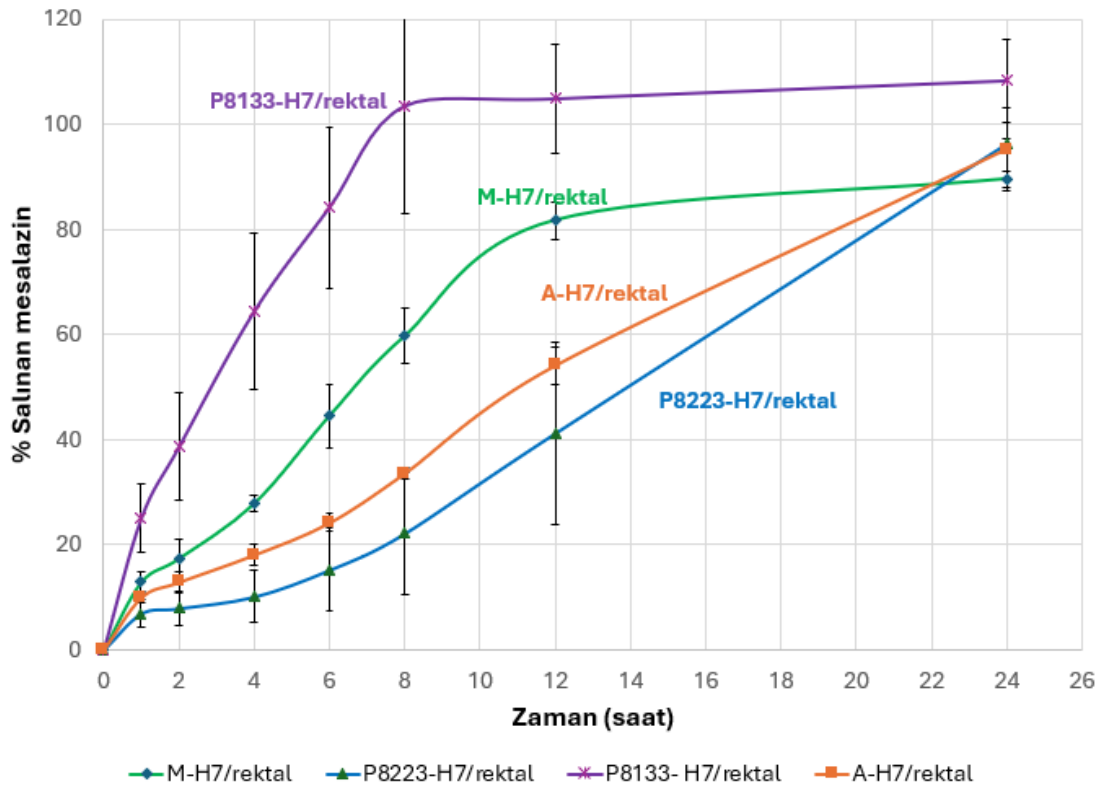
4.4.2. Rektal uygulama için optimum formülasyonun belirlenmesi için yapılan çalışmalar

Oral biyomürekkep formülasyonlarında kullanılan sodyum aljinat tipleri kullanılarak (Protanal LFR 10/60 yerine daha yüksek molekül ağırlığına sahip Manucol, Protanal CR8133, Protanal CR8223 ve Aquateric) oral formülasyon için belirlenen optimum polimer oranlarında biyomürekkep formülasyonları hazırlanmıştır. Bu

formülasyonlar Bölüm 3.5.2’de anlatıldığı gibi kodlanmıştır. Hazırlanan biyomürekkep formülasyonlarının yüzey gerilimi, viskozite ölçümleri ve basılabilirlik parametresinin değerlendirilmesi Bölüm 3.4.1 “Üç boyutlu biyobaskı için gerekli biyomürekkep formülasyonlarının hazırlanması amacıyla yapılan ön çalışmalar” başlığında anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir ve bu sonuçlar Çizelge 4.28’de verilmiştir.

Optimum rektal formülasyonunun belirlenmesi için in vitro çözünme hızı çalışması

Mesalazin yüklü hidrojel formülasyonları olan M-H7, P8133-H7, P8223-H7, A-H7 hidrojel formülasyonları ile rektal uygulama için yapılan in vitro çözünme hızı çalışmaları Bölüm 3.5.2’de yer alan “Optimum rektal formülasyonunun belirlenmesi için in vitro çözünme hızı çalışması” başlığında anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. İn vitro çözünme hızı çalışmaları sonucunda % salınan mesalazin-zaman grafikleri çizilmiş ve in vitro çözünme hızı sonuçları Şekil 4.69’da sunulmuştur.



Şekil 4.69. Farklı aljinat tipleri kullanılarak geliştirilen rektal hidrojel formülasyonlarından mesalazinin in vitro salım profilleri (n=3, Ortalama±SS)

Çözünme hızı çalışmaları yüzey gerilimi, viskozite ve basılabilirlik sonuçlarına göre rektal uygulama için optimum biyomürekkep formülasyonu P8133-B7/rektal, rektal uygulama için optimum hidrojel formülasyonu P8133-H7/rektal olarak seçilmiştir.

4.4.3. Oral ve rektal uygulamada kullanılmak üzere 3B biyobaskı için optimum biyomürekkep formülasyonlarının hazırlanması

Formülasyon geliştirme çalışmaları kapsamında yapılan viskozite, yüzey gerilimi, basılabilirlik ölçümleri ve in vitro çözünme hızı çalışmaları ile oral ve rektal uygulanmak seçilen optimum biyomürekkep formülasyonları Bölüm 3.5.3'te anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

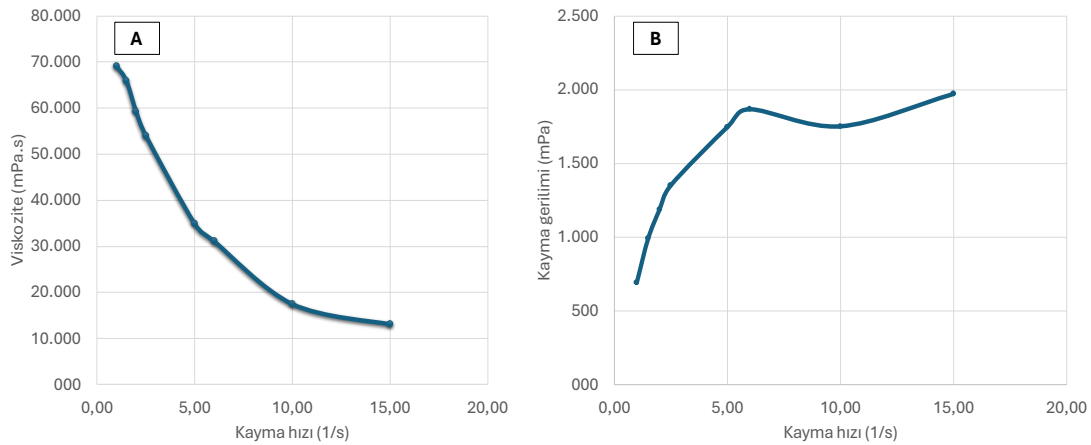
4.5. Optimum Oral ve Rektal Biyomürekkep Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları

4.5.1. Viskozite, yüzey gerilimi ölçümleri ve akış tipinin belirlenmesi

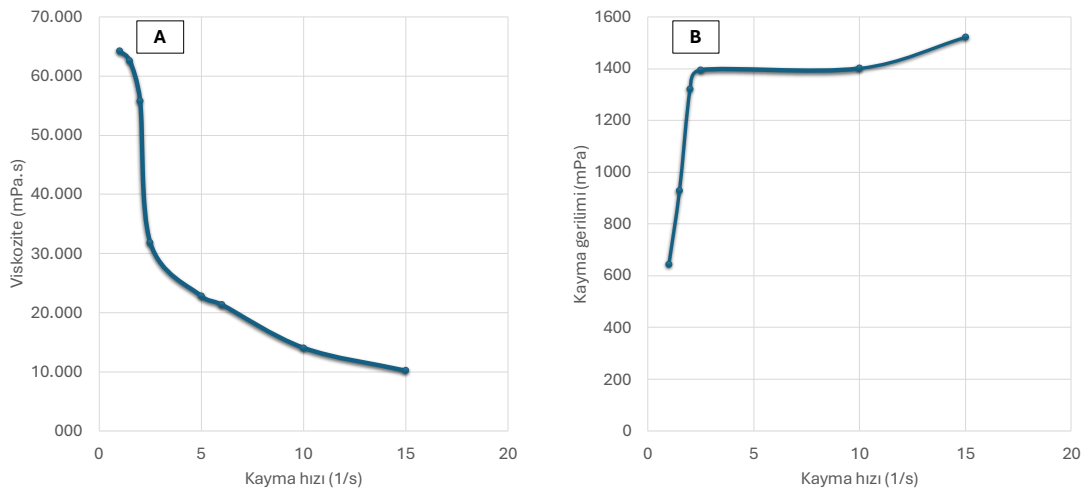
Optimum oral ve rektal biyomürekkep formülasyonları olan P8223-B7/oral ve P8133-B7/rektal biyomürekkep formülasyonlarının viskozite ve yüzey gerilimi ölçümleri Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Viskozite ölçümlerinden sonra akış tipinin belirlenmesi için viskozite-kayma hızı ve kayma hızı-kayma gerilimi grafikleri çizilmiştir. Viskozite ve yüzey gerilimi sonuçları Çizelge 4.29'da (Çizelge 4.28) verilmiştir. Oral biyomürekkep formülasyonunun (P8223-B7/oral) viskozite-kayma hızı ve kayma hızı-kayma gerilimi grafikleri Şekil 4.70'te, rektal biyomürekkep formülasyonunun (P8133-B7/rektal) viskozite-kayma hızı ve kayma hızı-kayma gerilimi grafikleri ise Şekil 4.71'de sunulmuştur.

Çizelge 4.29. Optimum oral ve rektal biyomürekkep formülasyonlarının viskozite ve yüzey gerilimi değerleri (n=3)

Biyomürekkep formülasyonu tipi	Biyomürekkep formülasyon kodu	Yüzey gerilimi (mN/m) (Ortalama $\pm$ SS)	Viskozite (cP) (Shear rate:10) (Ortalama $\pm$ SS)
Oral	P8223- B7/oral	57,42 $\pm$ 0,93	17501 $\pm$ 61
Rektal	P8133-B7/rektal	34,89 $\pm$ 0,07	14009 $\pm$ 30



Şekil 4.70. Optimum oral biyomürekkep formülasyonunun (P8223- B7/oral) A: Kayma hızı-viskozite B: Kayma hızı-kayma gerilimi grafikleri



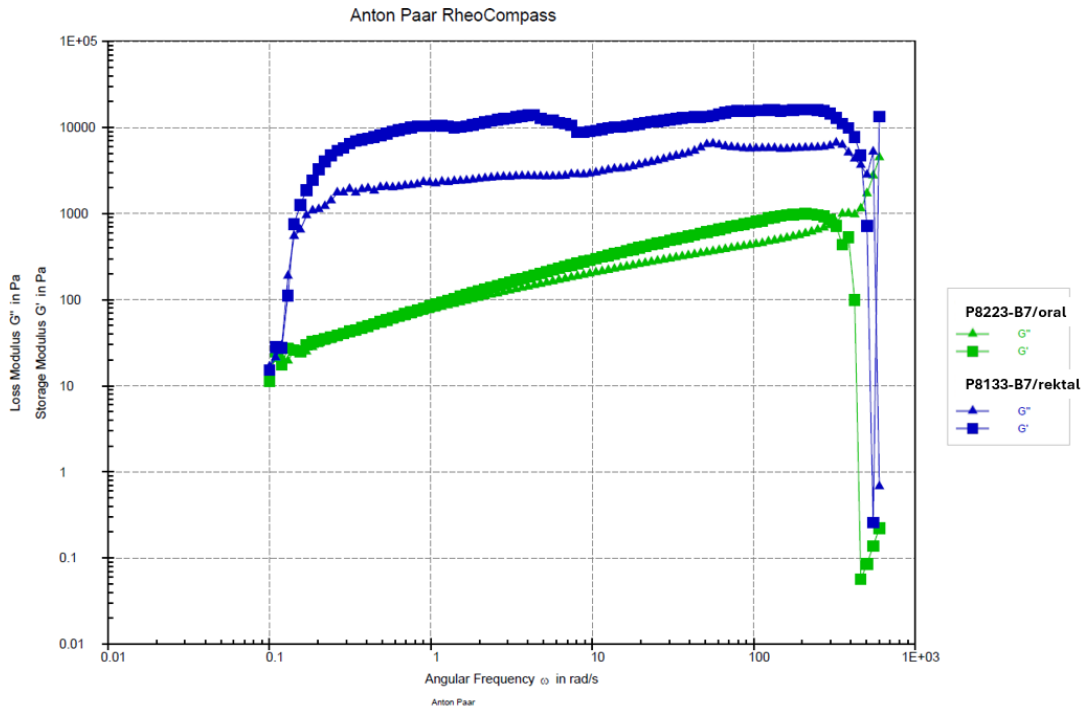
Şekil 4.71. Optimum rektal biyomürekkep formülasyonunun (P8133-B7/rektal) A: Kayma hızı-viskozite B: Kayma hızı-kayma gerilimi grafikleri

Çizelge 4.29'a göre P8223-B7/oral ve P8133-B7/rektal biyomürekkep formülasyonlarının yüzey gerilimi ve viskozite değerleri 3B ekstrüzyon baskı için uygun bulunmuştur. Şekil 4.70 ve Şekil 4.71'e göre her iki biyomürekkep formülasyonunun psödoplastik akış tipi gösterdikleri görülmüş ve 3B ekstrüzyon baskı için uygun akış tipine sahip oldukları sonucuna varılmıştır.

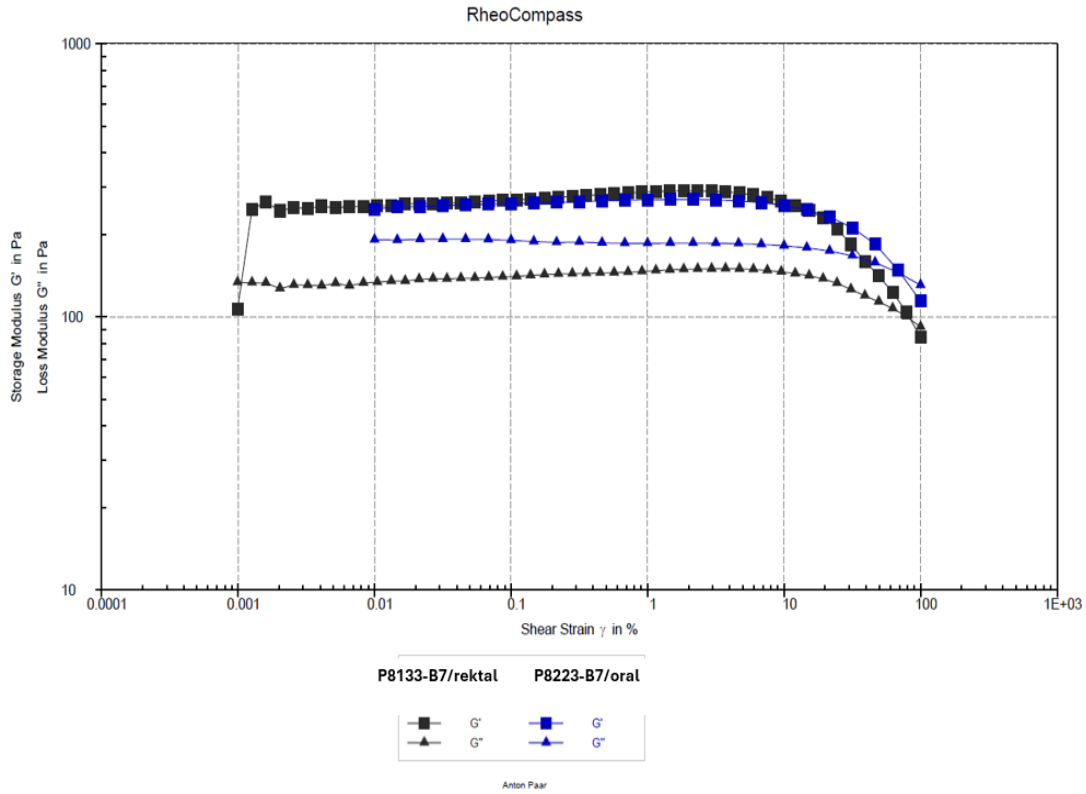
Osilasyonel reometre analizleri

P8223-B7/oral ve P8133-B7/rektal biyomürekkep formülasyonlarının osilasyonel reometre analizleri Bölüm 3.6'da anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Osilasyonel reometre kullanılarak hem oral hem de rektal optimum biyomürekkep formülasyonunun kayıp modülü (G'') ve depolama modülü (G') ölçümleri hem artan frekans değerlerine hem de artan kayma gerilimi değerlerine karşı ölçülmüştür.

Optimum biyomürekkep formülasyonlarının frekansa karşı kayıp modülü (G'') ve depolama modülü (G') ölçümleri grafiği Şekil 4.72'de; kayma gerilimine karşı kayıp modülü (G'') ve depolama modülü (G') ölçümleri grafiği Şekil 4.73'te sunulmuştur. 3B ekstrüzyon temelli biyobaskı için depolama modülü (G') değerlerinin kayıp modülü (G'') değerlerinden büyük olması gerekmektedir. Hem artan frekans hem de artan kayma gerilimi değerlerinde oral ve rektal biyomürekkep formülasyonlarının depolama modülü (G') değerleri kayıp modülü (G'') değerlerinden yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.72. P8223-B7/oral ve P8133-B7/rektal biyomürekkep formülasyonlarının frekansa karşı kayıp modülü (G'') ve depolama modülü (G') ölçümleri grafiği



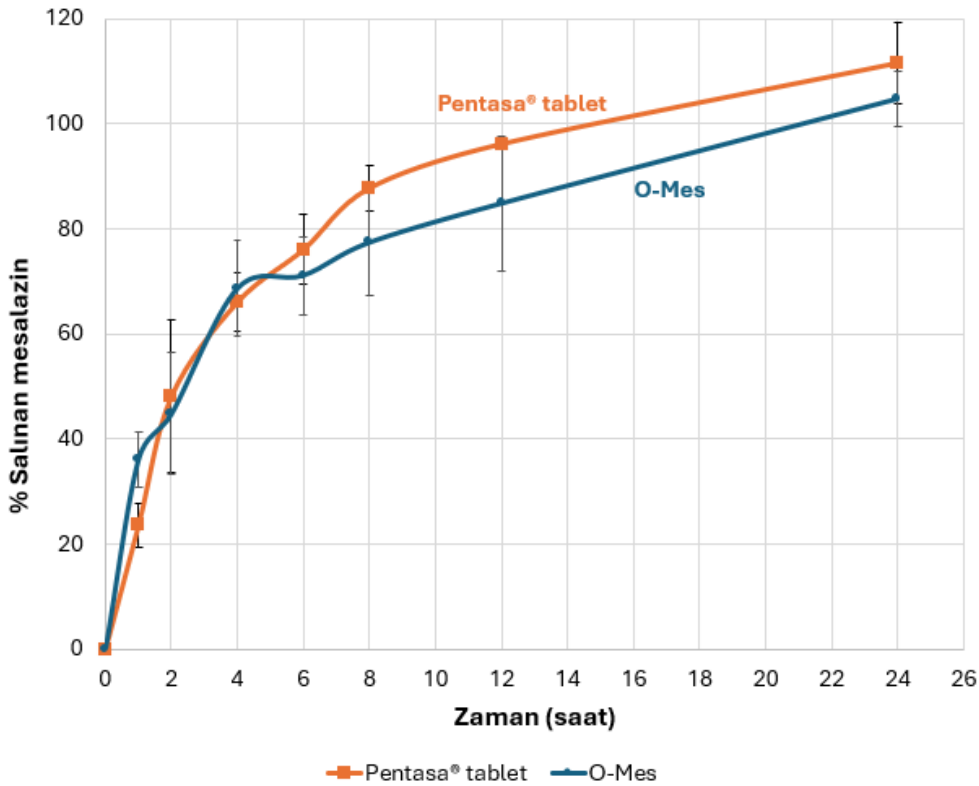
Şekil 4.73. P8223-B7/oral ve P8133-B7/rektal biyomürekkep formülasyonlarının kayma gerilimine karşı kayıp modülü (G'') ve depolama modülü (G') ölçümleri grafiği

4.6. Oral ve Rektal Uygulama İçin Sadece Mesalazin Yüklü Optimum Hidrojel Formülasyonlarının 3B Biyobaskı İşlemi

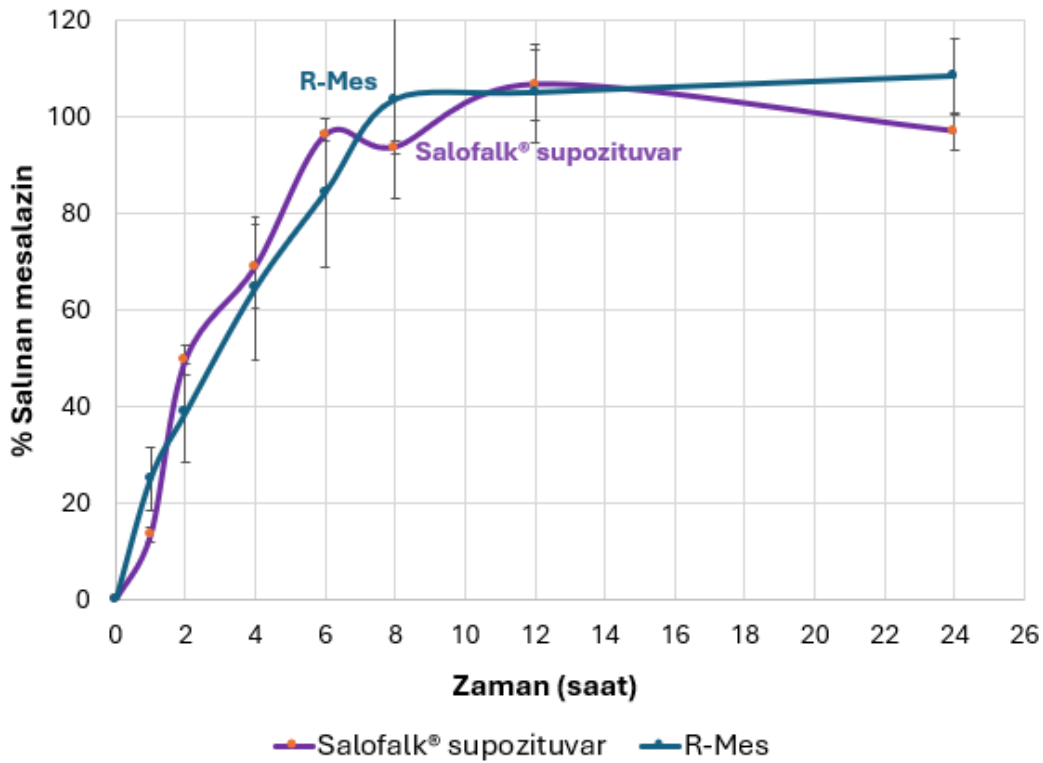
Sadece mesalazin yüklü O-Mes kodlu oral ve R-Mes kodlu rektal hidrojel formülasyonlarının 3B biyobaskı işlemi Çizelge 3.8'de verilen baskı parametreleri kullanılarak Bölüm 3.7'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Uygulama yolu ve kolaylığı açısından O-Mes hidrojel formülasyonu tablet şeklinde, R-Mes hidrojel formülasyonu ise supozitivar şeklinde Resim 3.13'te gösterildiği gibi basılmıştır. 3B Baskı işlemi sonucunda oral hidrojel formülasyonunun (O-Mes) çapı 2 cm yüksekliği ise 1,7 cm olarak ölçülmüştür. O-Mes hidrojel formülasyonu 30 mg mesalazin içermektedir. Rektal hidrojel formülasyonunun (R-Mes) ise uzunluğu 2,8 cm olarak ölçülmüştür. Piyasada yer alan supozitivar formülasyonlarının uzunluğu 3 cm'dir. R-Mes hidrojel formülasyonu 20 mg mesalazin içermektedir.

4.7. Sadece Mesalazin Yüklü Optimum Oral ve Rektal Hidrojel Formülasyonları ile İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları

Sadece mesalazin içeren hidrojel formülasyonlarının (O-Mes ve R-Mes) in vitro çözünme hızı deneyleri Bölüm 3.8’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Oral formülasyonun salım profili, mesalazin içeren piyasa preparatı Pentasa® tablet (O-Ticari) ile karşılaştırılmıştır. Rektal formülasyonun in vitro mesalazin salım profili, mesalazin içeren piyasa preparatı Salofalk® supozituar (R-Ticari) ile karşılaştırılmıştır. İn vitro çözünme hızı sonuçları oral formülasyonlar için Şekil 4.74’te, rektal formülasyonlar için ise Şekil 4.75’te verilmiştir. Oral ve rektal hidrojel formülasyonu ve oral ve rektal piyasa preparatının salım profillerinin karşılaştırılması amacıyla hesaplanan f1(fark faktörü) ve f2(benzerlik faktörü) değerleri Çizelge 4.30’da gösterilmiştir. Çözünme hızı sonuçları ve f1, f2 değerlerine göre hem oral hem de rektal hidrojel formülasyonunun piyasa preparatlarıyla benzer bir salım profiline sahip olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.74. Sadece mesalazin içeren oral hidrojel formülasyonundan (O-Mes) ve oral piyasa preparatı Pentasa® tabletten (O-Ticari) mesalazinin salım profilleri (n=3, Ortalama±SS).



Şekil 4.75. Sadece mesalazin içeren rektal hidrojel formülasyonundan (R-Mes) ve rektal piyasa preparatı Salofalk® supozitivardan (R-Ticari) mesalazinin salım profilleri (n=3, Ortalama±SS).

Çizelge 4.30. Sadece mesalazin yüklü oral ve rektal hidrojellerin piyasa preparatlarıyla salım profillerinin karşılaştırılması amacıyla hesaplanan f2 ve f2 değerleri

	Formülasyon kodu	
	O-Mes	R-Mes
f1	10	12
f2	55	52

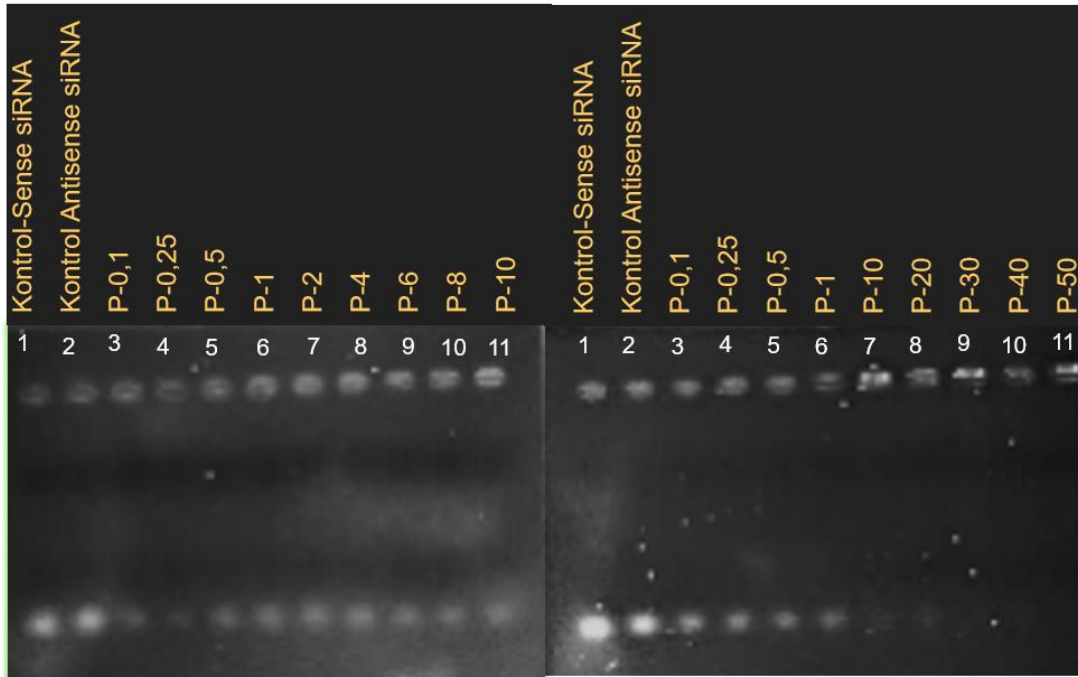
4.8. TNF- α Geninin Susturulması Amacıyla Hazırlanan Formülasyonlar

Kitozan:TNF- α siRNA polipeksleri Bölüm 3.9.1’de anlatıldığı gibi Çizelge 3.10’da verilen oranlarda hazırlanmıştır.

4.8.1. Kitozan:TNF- α siRNA polipekslerinin karakterizasyonu

Polipeksler hazırlandıktan sonra Bölüm 3.9.2’de anlatıldığı gibi kitozan-siRNA polipeks oluşum oranını belirlemek amacıyla jel retardasyon çalışmaları yapılmıştır.

Jel görüntüleri Resim 4.1’de verilmiştir. Resim 4.1’de jellerde yer alan kuyucuklara yüklenen polipekslerin oranı ve polipeks numarası verilmiştir. Buna göre P-10 kodlu polipeksten itibaren (kitozan:TNF- α siRNA oranı 10) polipeks oluşumunun başladığı gözlenmektedir. Polipeks oluşumu kuyucukların dolu olması ve jellerde sürüklenme izi olmaması ile anlaşılmaktadır. Çünkü serbest siRNA sürüklenirken, kompleks haldeki siRNA kuyucukta parlayıp hareket etmemektedir. Optimum kitozan:TNF- α siRNA polipeksinin belirlenmesi amacıyla P-10 kodlu polipeksten itibaren polipekslerin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri Malvern Zetasizer ile gerçekleştirilmiştir, analiz sonuçları Çizelge 4.31’de verilmiştir. Çizelge 4.31’e göre P-40 ve P-50 kodlu polipekslerin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerlerinin uygun olduğu ve literatürle de uyumlu olduğu gözlenmiş, daha sonraki çalışmalar için P-40 ve P-50 numaralı polipekslerin kullanılmasına karar verilmiştir.



Resim 4.1. Polipeks oluşturmak için optimum kitozan-TNF- α siRNA oranının belirlenmesi için yapılan jel retardasyon çalışması ile elde edilen jel görüntüleri

Çizelge 4.31. Kitozan: TNF- α siRNA polipekslerinin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri (n=3)

Polipeks Kodu	Kitozan:TNF- α siRNA Oranı	Partikül Büyüklüğü (nm) (Ortalama $\pm$ SS)	PDI (Ortalama $\pm$ SS)	Zeta Potansiyel (mV) (Ortalama $\pm$ SS)
P-10	10	563,3 $\pm$ 197,4	0,596 $\pm$ 0,157	9,38 $\pm$ 3,73
P-20	20	1165,1 $\pm$ 618,8	0,839 $\pm$ 0,278	12,9 $\pm$ 3,1
P-30	30	509,6 $\pm$ 200,0	0,562 $\pm$ 0,177	17,2 $\pm$ 2,8
P-40	40	291,3 $\pm$ 28,8	0,350 $\pm$ 0,010	20,7 $\pm$ 1,0
P-50	50	314,4 $\pm$ 36,5	0,521 $\pm$ 0,116	16,7 $\pm$ 0,7

4.9. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak hücre hattı olan RAW 264.7 hücreleri Bölüm 3.10' da anlatıldığı gibi üretici protokollerine göre başarıyla kültürlenmiştir.

4.9.1. İn vitro gen susturma çalışmaları

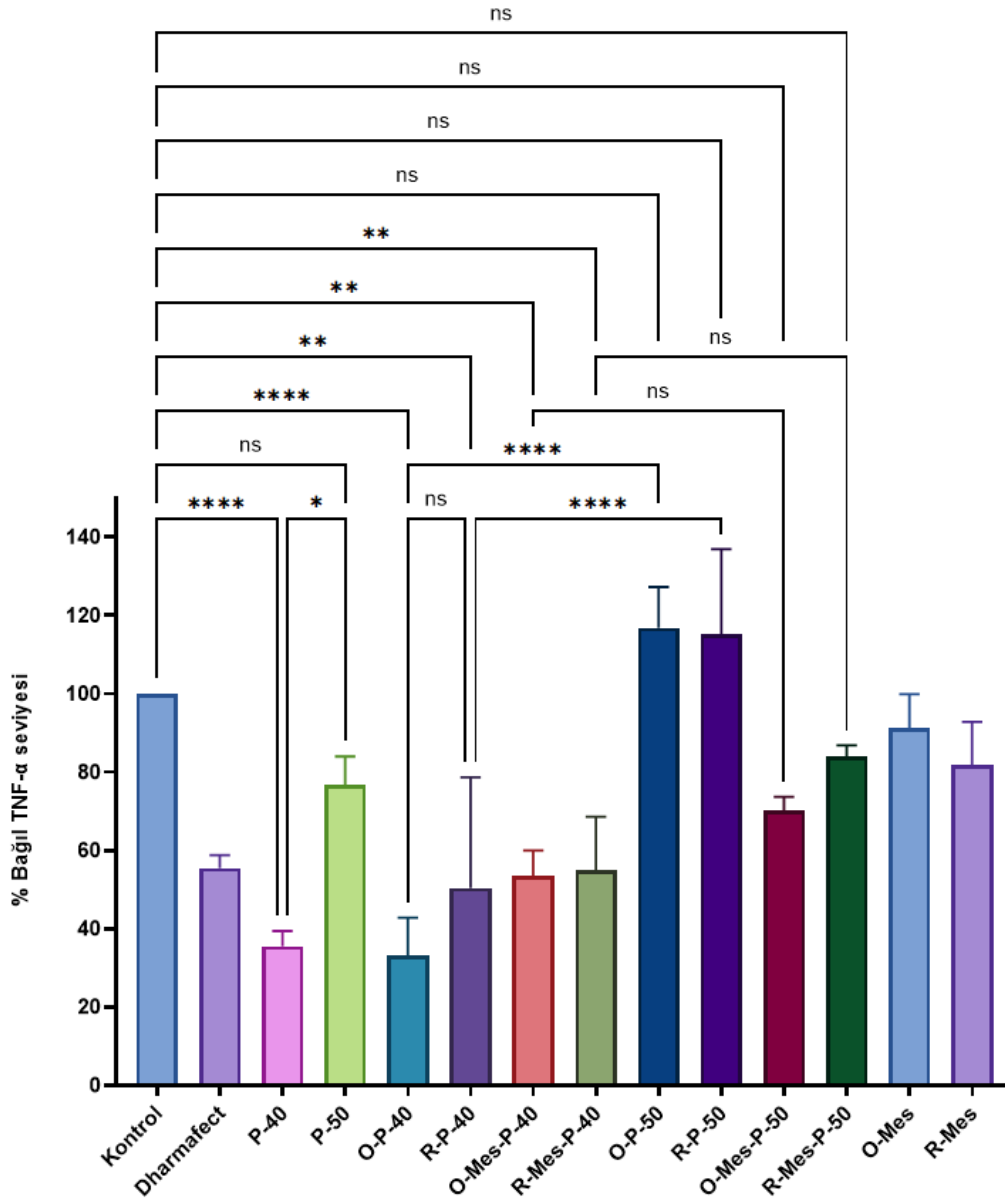
İn vitro gen susturma çalışmaları, hazırlanan formülasyonların inflamatuvar bağırsak hastalığında önemli bir belirteç olan TNF- α geni üzerinde susturma etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. TNF- α geninin susturulması inflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisindeki yeni stratejilerden bir tanesidir. Çalışmada RAW 264.7 hücrelerinde in vitro gen susturma çalışmaları Bölüm 3.10.1'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. İn vitro gen susturma sonuçları Şekil 4.76'da verilmiştir.

Sonuçlara göre P-40'ın %64,47, P-50'nin ise %23,24 gen susturma etkinliğinin olduğu ve P-40'ın P-50'ye göre gen susturma etkinliğinin anlamlı bir şekilde fazla olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Ayrıca P-40'ın pozitif kontrol olan ve %44,54 gen susturma etkinliğine sahip Dharmafect'le karşılaştırıldığında gen susturma etkinliğinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. P-50'nin gen susturma etkinliğinin olmasına rağmen sadece P-50 içeren oral ve rektal hidrojellerin (O-P-50 ve R-P-50) gen susturma etkinliği olmadığı görülmüştür. Ancak sadece P-40'ı içeren oral ve rektal hidrojellerin (O-P-40 ve R-P-40) gen susturma etkinliğinin P-40 ile çok yakın olduğu, pozitif kontrolden ise anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Bütün karakterizasyon çalışmaları ve in vitro gen susturma çalışmaları göz önünde bulundurulduğunda optimum polipeks formülasyonu olarak P-40 seçilmiştir.

Mesalazinin tek başına düşük de olsa O-Mes formülasyonunda yaklaşık %8,92, rektal formülasyonda ise yaklaşık %18,22 gen susturma etkinliğinin olduğu görülmektedir. O-Mes-P-40 hidrojel formülasyonunun gen susturma etkinliğinde, O-P-40 hidrojel formülasyonuna göre azalma izlenmiştir, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.5$). Ancak rektal formülasyonlarda bu durum gözlenmemiştir.

İn vitro gen susturma çalışmaları ile P-40'ın ve P-40'ı içeren hidrojel formülasyonlarının TNF- α genini susturmada etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

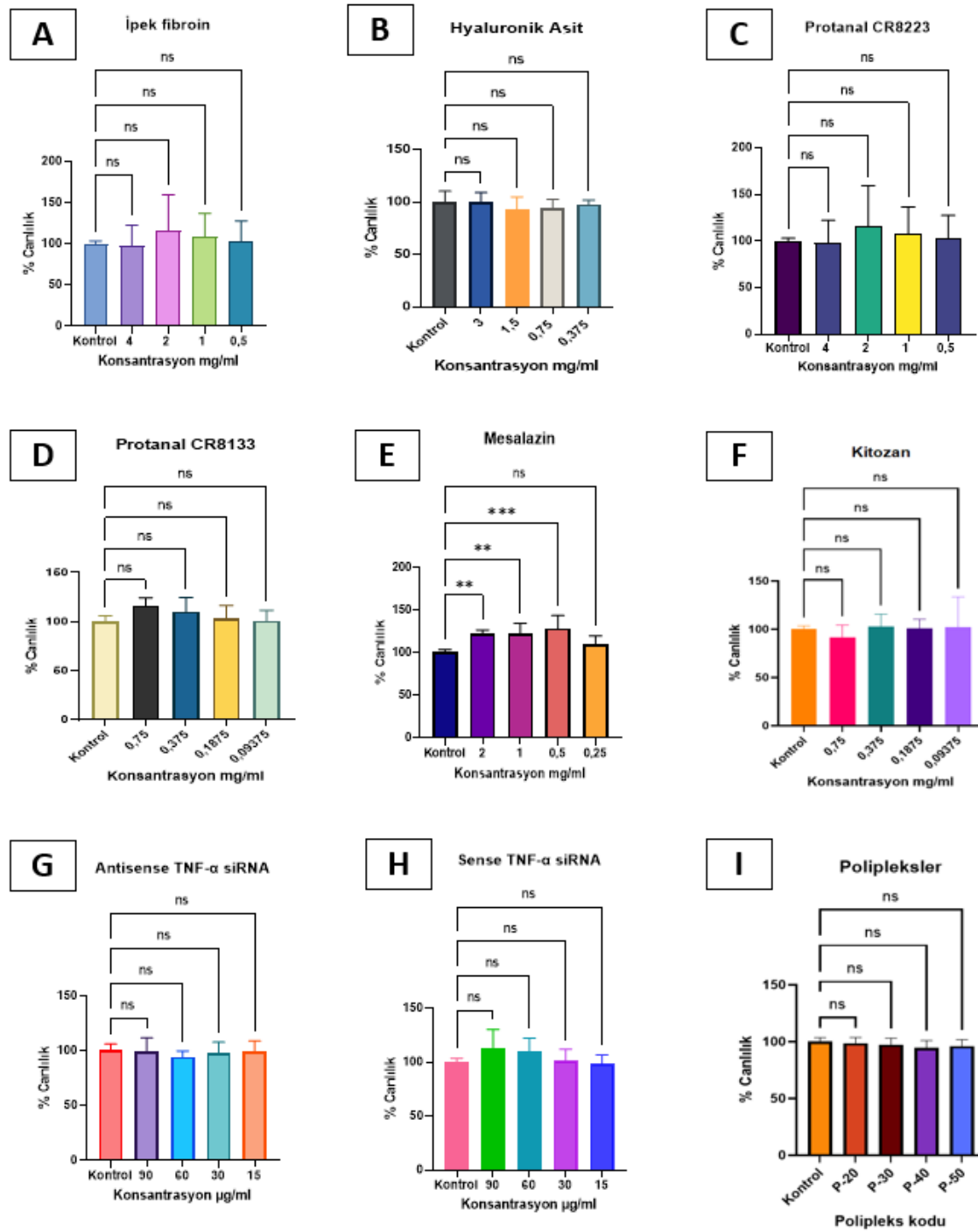




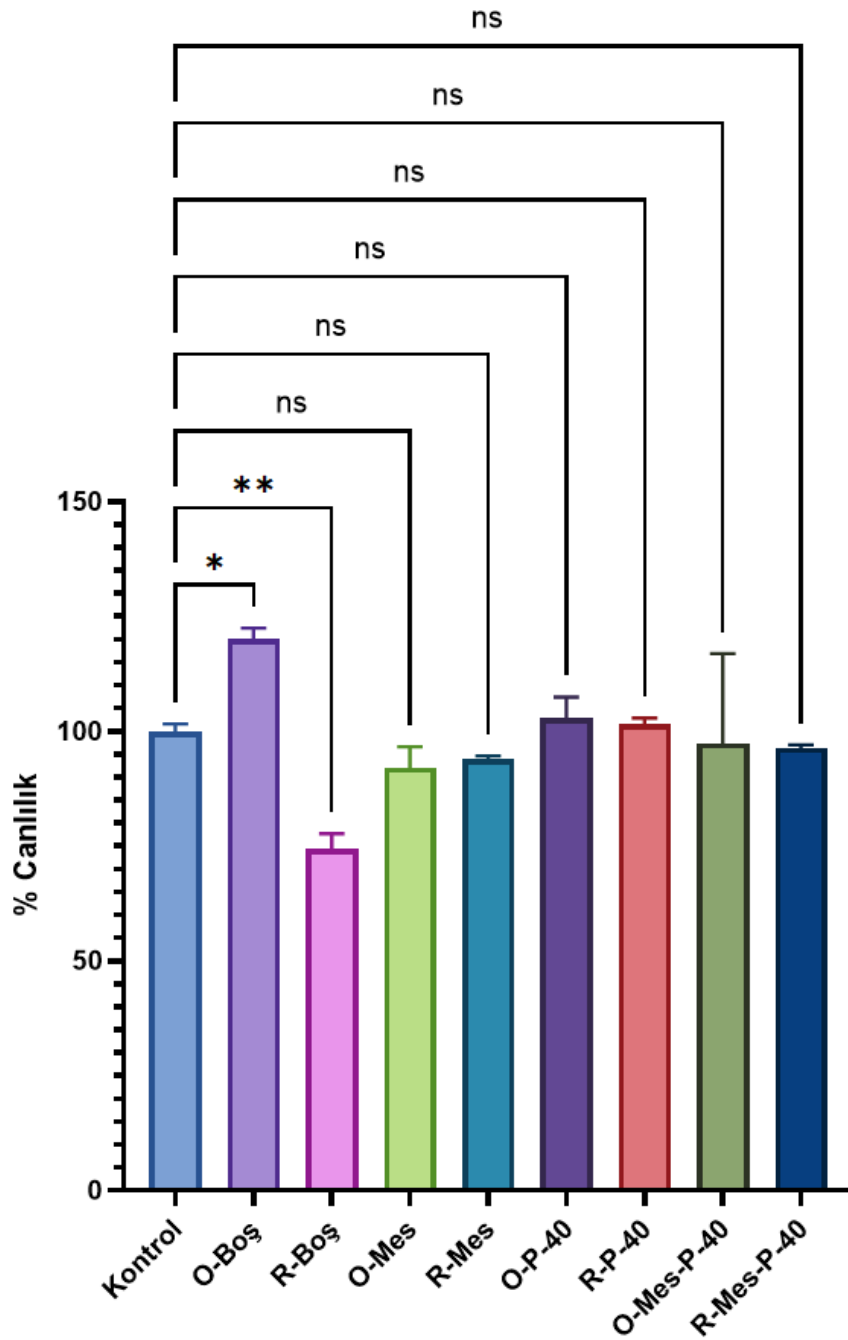
Şekil 4.76. İn vitro TNF- α gen susturma çalışması sonuçları (n=3). O-P-40: Sadece P-40 içeren oral formülasyon, R-P-40: Sadece P-40 içeren rektal formülasyon, O-Mes-P-40: P-40 ve mesalazin içeren oral formülasyon, R-Mes-P-40: P-40 ve mesalazin içeren rektal formülasyon, O-P-50: Sadece P-50 içeren oral formülasyon, R-P-50: Sadece P-50 içeren rektal formülasyon, O-Mes-P-50: P-50 ve mesalazin içeren oral formülasyon, R-Mes-P-50: P-50 ve mesalazin içeren rektal formülasyon, O-Mes: Sadece mesalazin içeren oral formülasyon, R-Mes: Sadece mesalazin içeren rektal formülasyon (ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$)

4.9.2. Sitotoksisite çalışmaları

Formülasyon hazırlanmasında kullanılan polimerlerin (Protanal CR8223, Protanal CR8133, Hyaluronik asit, ipek fibroin, kitozan), etken madde olan mesalazinin, oral ve rektal hidrojel formülasyonların, naked (çıplak) ve polipleks halindeki TNF- α siRNA'nın sitotoksisite analizleri RAW 264.7 hücre hattında Bölüm 3.10.2'de anlatıldığı gibi MTT yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Formülasyonda kullanılan polimerler, mesalazin, naked (çıplak) ve polipleks halindeki TNF- α siRNA'nın sitotoksisite sonuçları Şekil 4.77'de verilmiştir. Buna göre formülasyonda kullanılan polimerlerin, etken maddenin, TNF- α siRNA'nın ve polipleks formülasyonlarının hücreler üzerinde sitotoksisiteye neden olmadığı sonucuna varılmıştır. Bütün polimerlerde, etkin maddede ve TNF- α siRNA'larda derişim değişiminin sitotoksisite üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$). Hidrojel formülasyonlarının sitotoksisite sonuçları Şekil 4.78'de verilmiştir.



Şekil 4.77. Oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının geliştirilmesinde kullanılan polimerlerin, mesalazinin ve TNF- α siRNA'nın farklı derişimlerde RAW 264.7 hücrelerindeki sitotoksosite sonuçları (n=12)



Şekil 4.78. Oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının RAW 264.7 hücrelerindeki sitotoksosite sonuçları (n=3). O-Boş: Boş oral formülasyon, R-Boş: Boş rektal formülasyon, O-Mes: Sadece mesalazin içeren oral formülasyon, R-Mes: Sadece mesalazin içeren rektal formülasyon, O-P-40: Sadece polipeks içeren oral formülasyon, R-P-40: Sadece polipeks içeren rektal formülasyon, O-Mes-P-40: Mesalazin ve polipeks içeren oral formülasyon, R-Mes-P-40: Mesalazin ve polipeks içeren rektal formülasyon (ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

Şekil 4.78'de verilen sonuçlara göre tüm formülasyonların RAW 264.7 hücrelerinde sitotoksositeye neden olmadığı ve yapılan istatistiksel değerlendirme ile de R-Boş

hidrojel formülasyonu hariç diğer formülasyonların hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya neden olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$). R-Boş formülasyonunda ise hücre canlılığı %70'in üzerinde olduğu için bu formülasyon sitotoksik olarak değerlendirilmemiştir.

4.10. Kitozan:TNF- α siRNA Polileksi ile Fizyolojik Sıvılarda Stabilitte Çalışmaları

Karakterizasyon ve in vitro gen susturma çalışmaları sonucu seçilen kitozan:TNF- α siRNA polileksinin (P-40) fizyolojik ortamlarda stabilite çalışması Bölüm 3.11'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Mide ortamını taklit etmek amacıyla pH 1.2, bağırsak ortamını taklit etmek amacıyla da pH 6.8 tamponu kullanılmıştır. Jel retardasyon çalışmaları sonucunda elde edilen jel görüntüleri Resim 4.2'de gösterilmiştir.



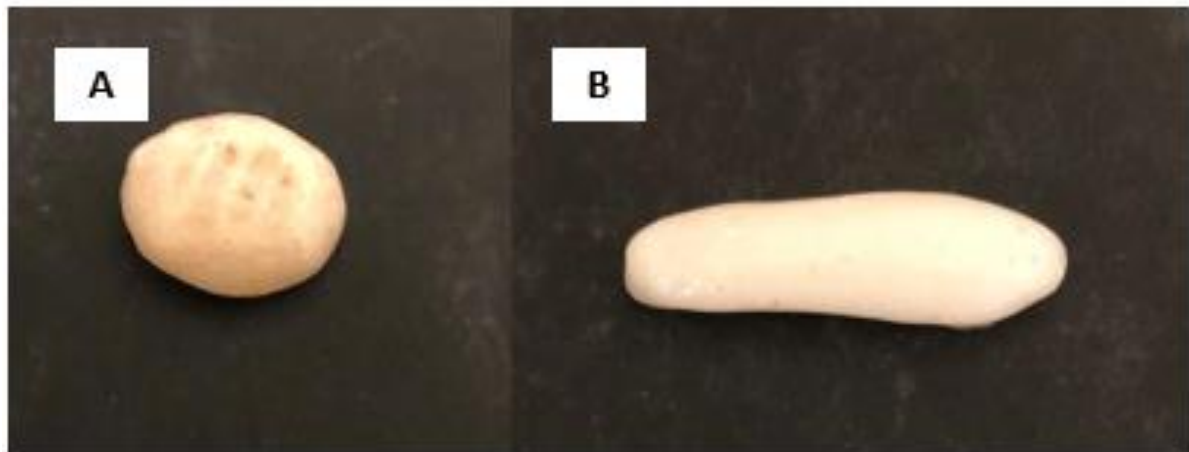
Resim 4.2. P-40'ın fizyolojik ortamlarda in vitro stabilite çalışmasının jel görüntüleri. Şekilde yer alan "P" polileks haldeki siRNA'yı (P-40), "N" ise naked (serbest) haldeki siRNA'yı belirtmek için kullanılmıştır.

Jeldeki kuyucuklara eklenen örnekler şekilde yer almaktadır. Kuyucukların parlak görünmesi polileks haldeki TNF- α siRNA'nın (P-40) elektroforez işlemine bağlı

olarak yürümediği anlamına gelmektedir. Serbest siRNA yüklenmiş kuyucukların elektroforez işlemi sonucunda boş görüntülenmesi beklenmektedir. Buna göre polileks haldeki TNF- α siRNA'nın, naked (çıplak) haldeki TNF- α siRNA'ya göre her iki ortamda da stabilitesinin daha fazla olduğu görülmektedir. Naked (çıplak) TNF- α siRNA'nın ise pH 1.2 ve 6.8'de kısmi parçalanmaya uğradığı görülmektedir. Jel retardasyon çalışmaları sonucunda polileks hazırlamanın siRNA'nın stabilitesini artırdığı ve P-40'ın fizyolojik ortamlarında stabilitesini koruduğu sonucuna varılmıştır.

4.11. TNF- α siRNA ve Mesalazin İçeren Oral ve Rektal Formülasyonların 3B Biyobaskı Yöntemiyle Hazırlanması

TNF- α siRNA ve mesalazin içeren oral ve rektal formülasyonların 3B biyobaskı yöntemiyle hazırlanması Bölüm 3.12'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Biyomürekkep formülasyonlarının 3B biyobaskı işlemi için kullanılan parametreler Çizelge 3.8'de verilmiştir. Oral ve rektal hidrojel formülasyonları Resim 3.13'te gösterilen tasarıma göre basılmıştır. 3B biyobaskı işlemi ile hazırlanan O-Mes-P-40 ve R-Mes P-40 hidrojel formülasyonlarının baskı sonrası görüntüleri Resim 4.3'te gösterilmiştir. Formülasyon içerikleri Çizelge 3.11'de verilmiştir.



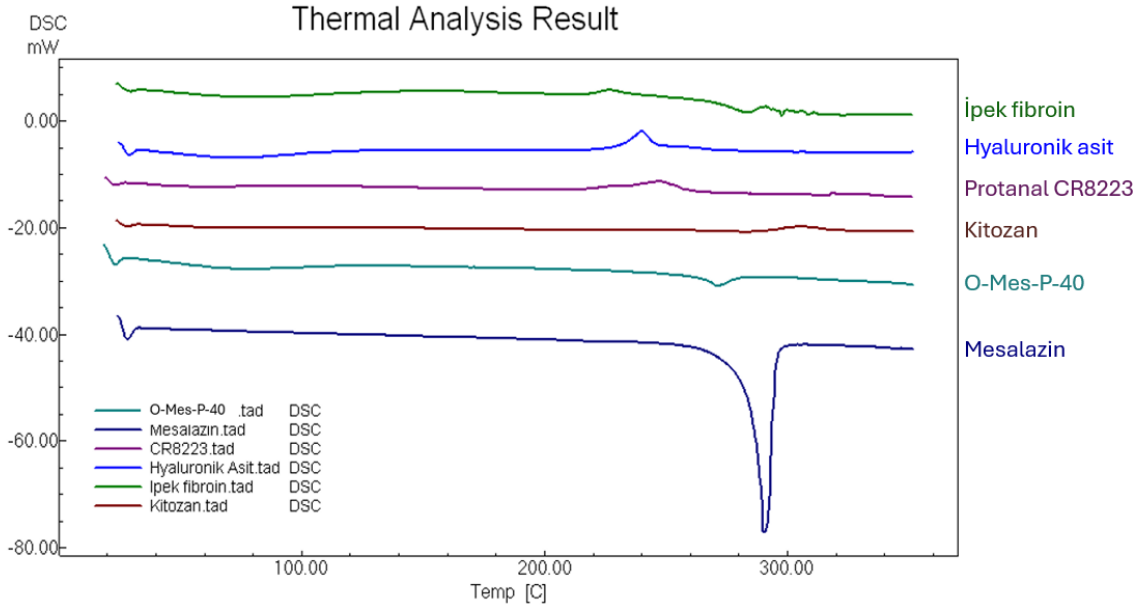
Resim 4.3. 3B biyoyazıcı ile basılan oral ve rektal hidrojel formülasyonların görüntüleri. A: O-Mes B: R-Mes

4.12. TNF- α siRNA ve Mesalazin İçeren Oral ve Rektal Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmaları

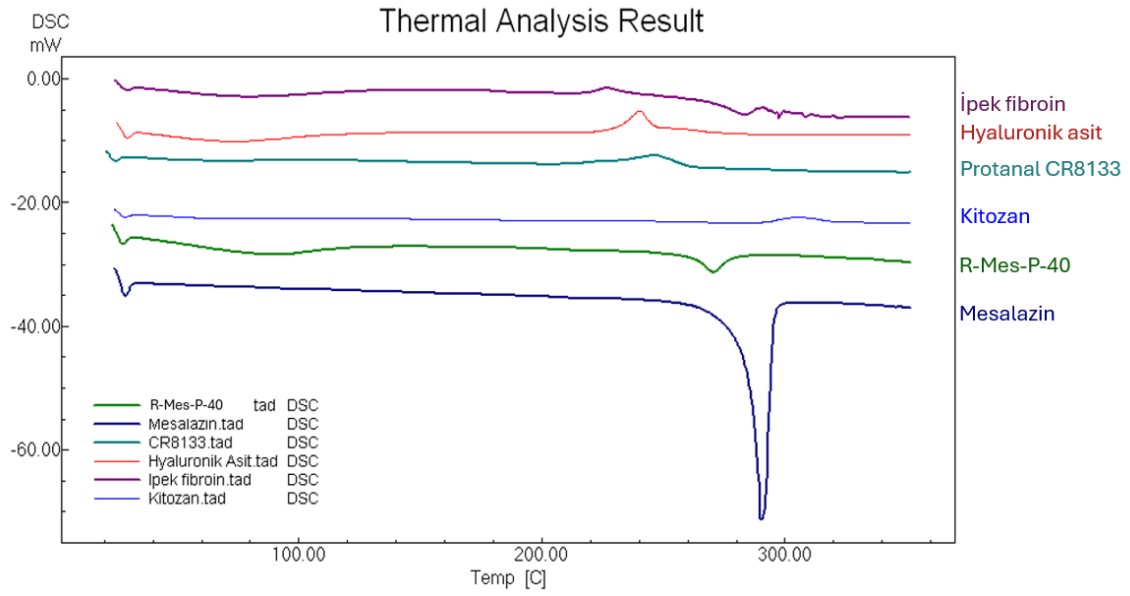
TNF- α siRNA ve mesalazin içeren oral ve rektal 3B basılmış hidrojel formülasyonları üretildikten sonra karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar kapsamında DSC, FT-IR, XRD, TGA analizleri, şişme kapasitesi ölçümleri, in vitro parçalanma deneyi, mekanik testler, mukoadesyon deneyi ve morfolojik analizler gerçekleştirilmiştir.

4.12.1. DSC analizleri

Oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının DSC analizleri Bölüm 3.13.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. O-Mes-P-40’ın DSC termogramı Şekil 4.79’da, R-Mes-P-40’ın DSC termogramı Şekil 4.80’de verilmiştir. Buna göre hem oral hem de rektal formülasyonlarda herhangi bir etkileşime rastlanmamış ve yapısal bir değişiklik gözlenmemiştir.



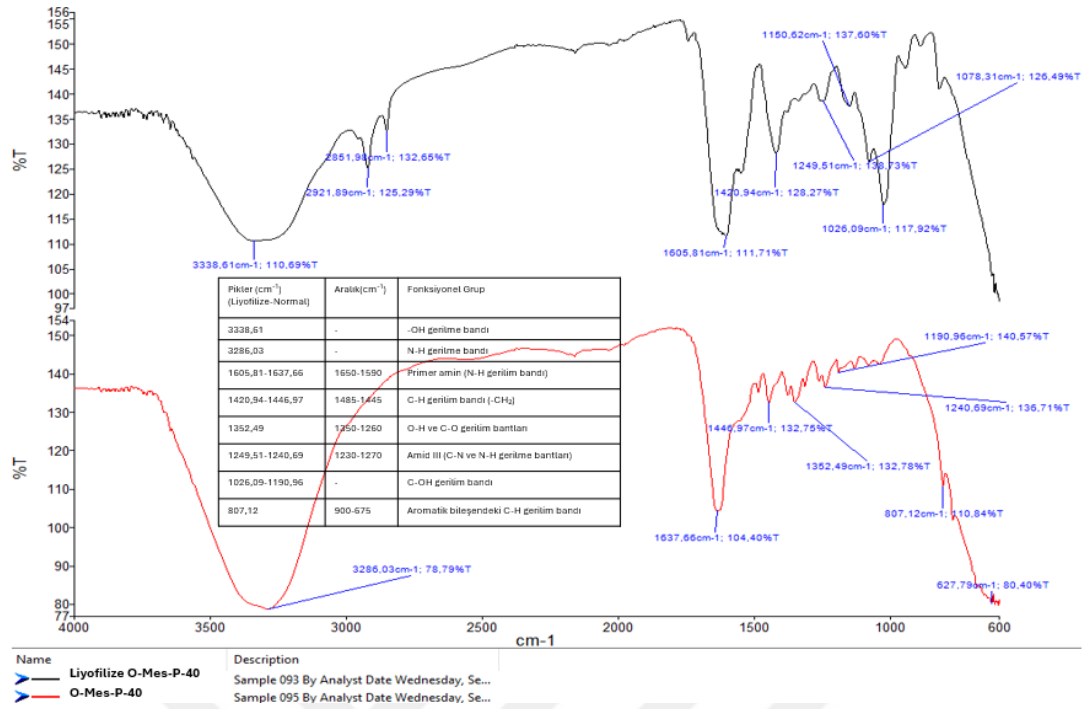
Şekil 4.79. O-Mes-P-40 hidrojel formülasyonunun DSC termogramı



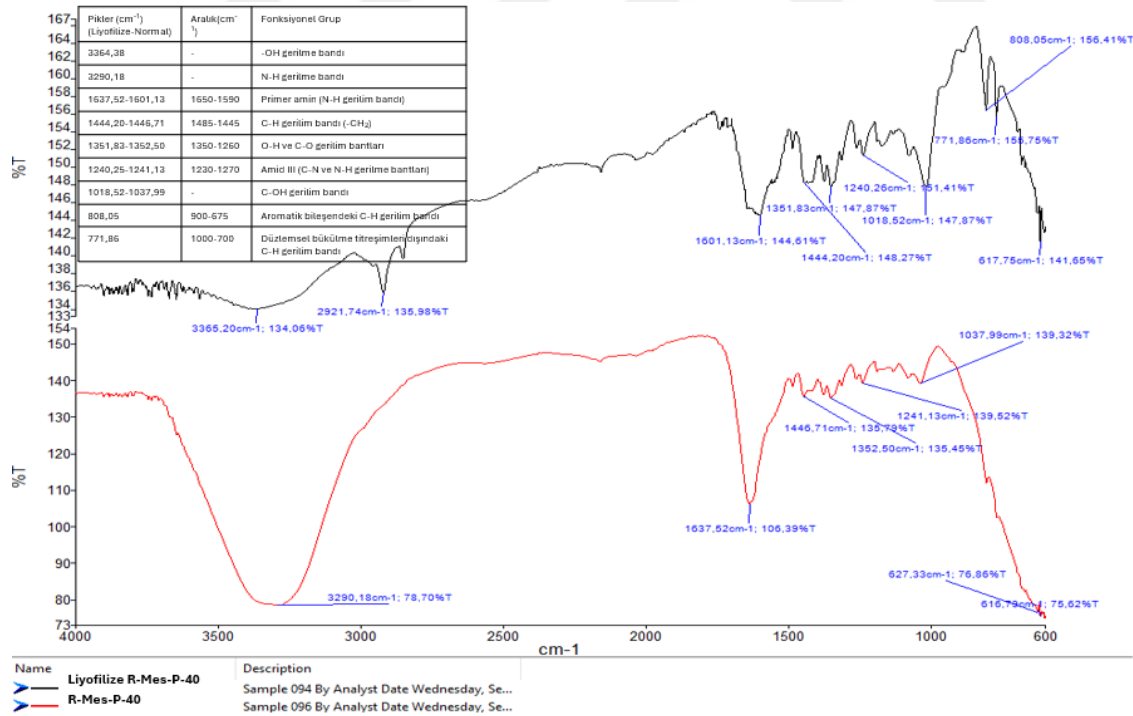
Şekil 4.80. R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonunun DSC termogramı

4.12.2. FTIR analizleri

Oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının FTIR analizleri Bölüm 3.13.2’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. O-Mes-P-40’ın FTIR spektrumu Şekil 4.81’de, R-Mes-P-40’ın FTIR spektrumu Şekil 4.82’de verilmiştir. Buna göre hem oral hem de rektal formülasyonlarda herhangi bir etkileşime rastlanmamış ve yapısal bir değişiklik gözlenmemiştir. Liyofilize ve normal hidrojellerin FTIR spektrumu arasında da bir farklılık gözlenmemiştir.



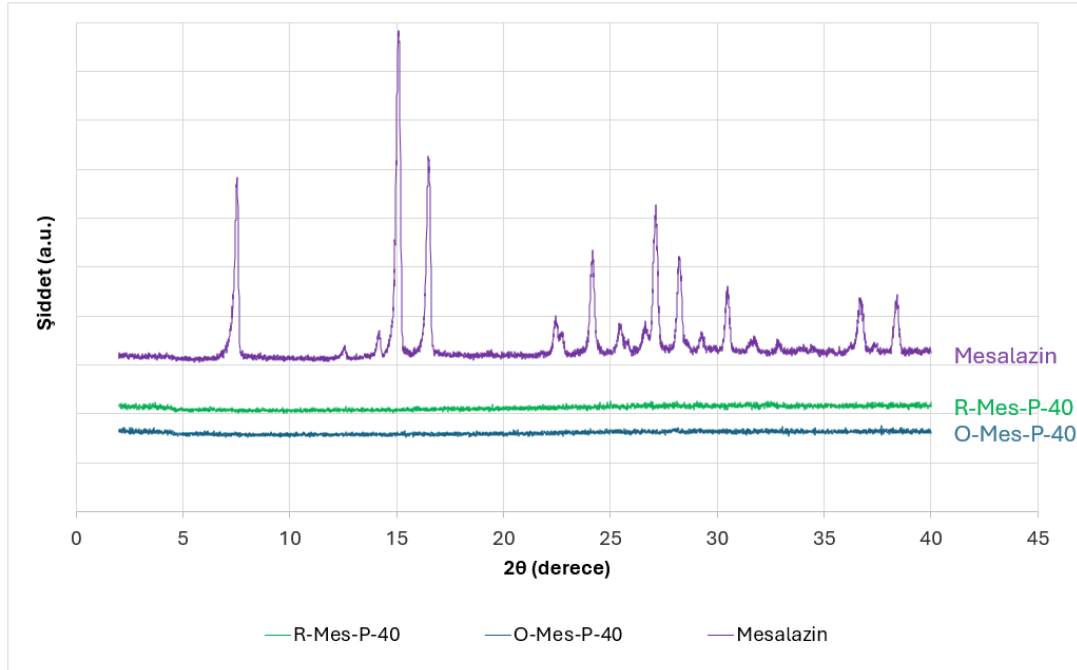
Şekil 4.81. O-Mes-P-40 hidrojel formülasyonunun ve liyofilize formülasyonun FTIR spektrumu



Şekil 4.82. R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonunun ve liyofilize formülasyonun FTIR spektrumu

4.12.3. XRD analizleri

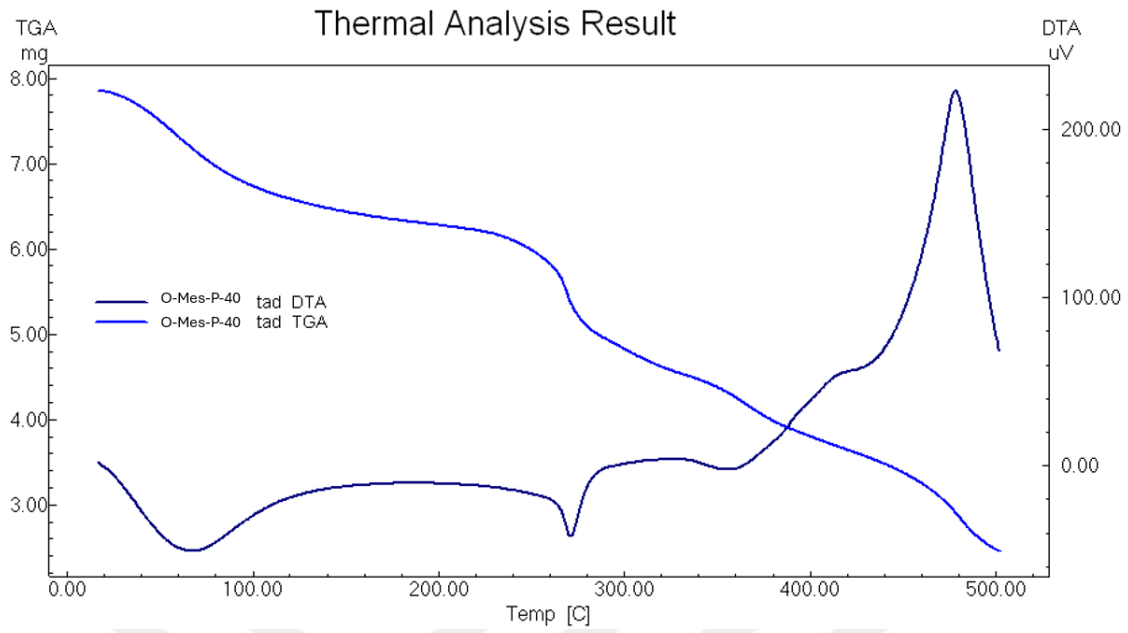
Oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının XRD analizleri Bölüm 3.13.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonlarının XRD difraktogramları Şekil 4.83'te verilmiştir. Buna göre oral ve rektal formülasyonlarda mesalazine ait kristal yapı gözlenmemiştir.



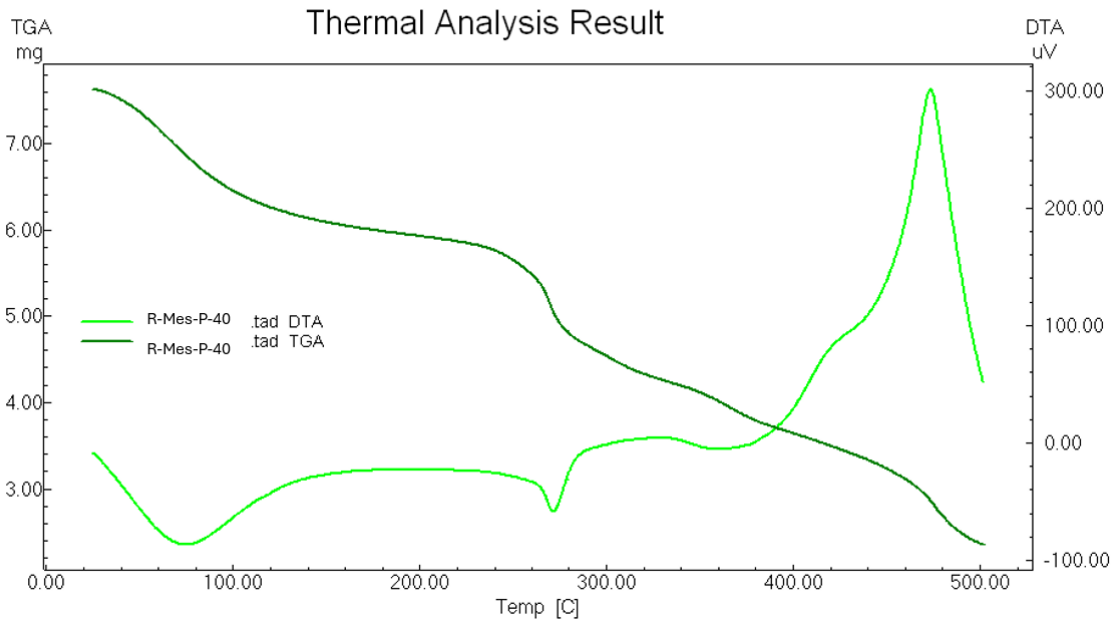
Şekil 4.83. Oral ve rektal 3B basılmış hidrojel formülasyonlarının XRD difraktogramları

4.12.4. TGA analizleri

Oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının TGA analizleri Bölüm 3.12.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. O-Mes-P-40 hidrojel formülasyonunun TGA analiz sonucu şekil 4.84'te, R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonunun TGA analiz sonucu ise Şekil 4.85'te verilmiştir. Hem oral hem de rektal formülasyonun ağırlıklarının sıcaklığa bağlı olarak azaldığı sonucuna varılmıştır.



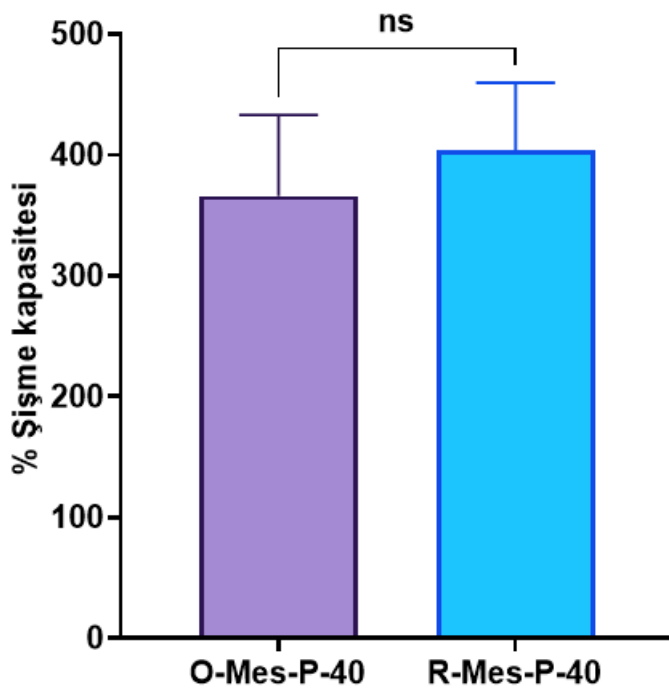
Şekil 4.84. Oral hidrojel formülasyonunun (O-Mes-P-40) TGA analiz sonucu



Şekil 4.85. Rektal hidrojel formülasyonunun (R-Mes-P-40) TGA analiz sonucu

4.12.5. Şişme kapasitesi ölçümleri

O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 formülasyonları hidrojel yapısında şişme indeksleri hesaplanmıştır. O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonlarının şişme kapasitesi ölçümleri Bölüm 3.13.5'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Eşitlik 3.3'e göre her iki formülasyon için de şişme indeksi hesaplanmıştır ve sonuçlar Şekil 4.86'da verilmiştir.

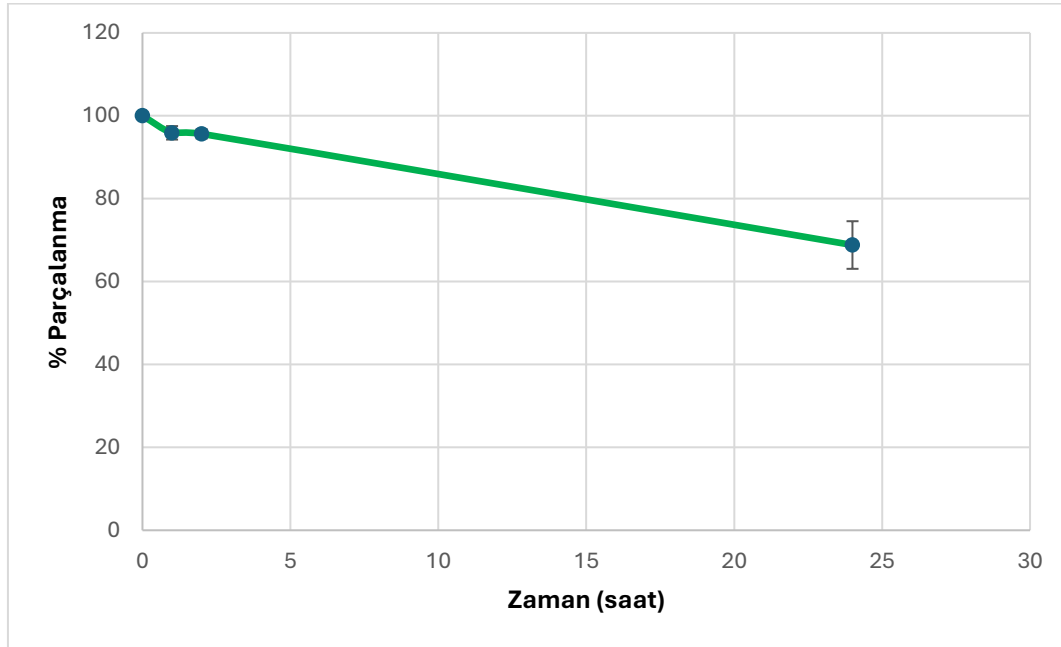


Şekil 4.86. O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonların şişme indeksini gösteren grafik (n=3)

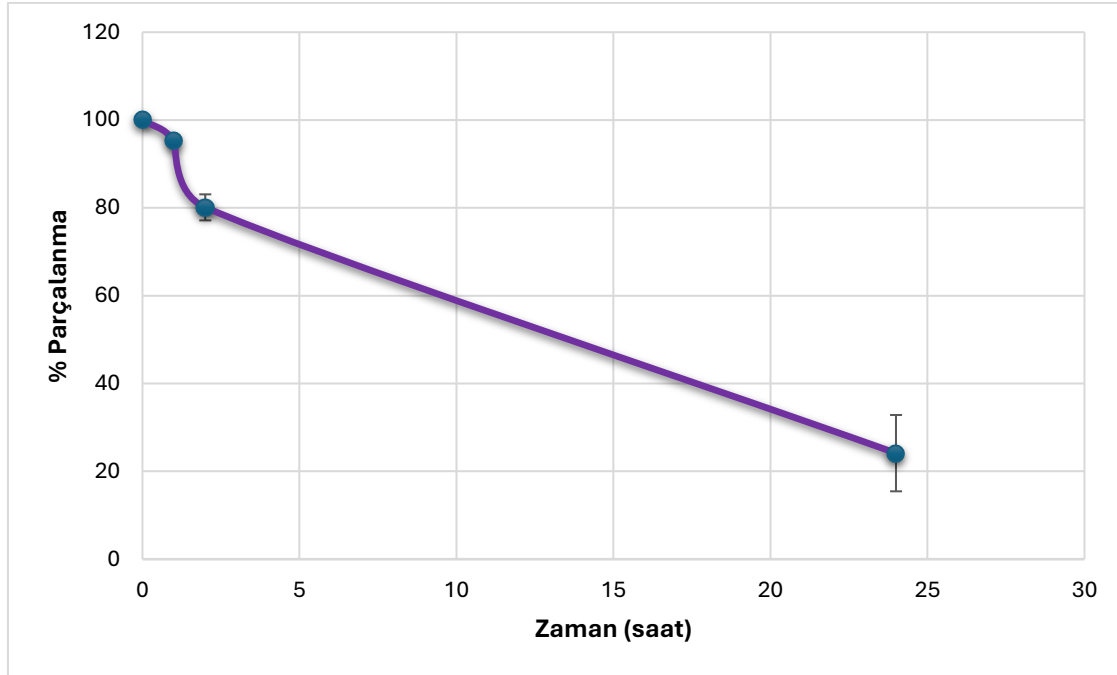
O-Mes-P-40 hidrojel formülasyonunun şişme indeksi 366 ± 67 , R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonunun şişme indeksi 404 ± 56 olarak bulunmuştur. Oral hidrojel formülasyonu ağırlığının 3,66 katı kadar, rektal hidrojel formülasyonu ise ağırlığının 4 katı kadar su tutabilmektedir, böylece uygulama bölgesinde kalış süreleri uzamaktadır. Oral ve rektal formülasyonun şişme indeksleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p < 0,05$).

4.12.6. İn vitro parçalanma deneyi

Oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının in vitro parçalanma deneyi Bölüm 3.13.6'da anlatıldığı gibi yapılmıştır. Eşitlik 3.4'e göre her saat için % parçalanma değerleri hesaplanmış ve % parçalanma-zaman grafikleri çizilmiştir. O-Mes-P-40 için % parçalanma- zaman grafiği Şekil 4.87'de, R-Mes-P-40 için ise % parçalanma zaman grafiği Şekil 4.88'de gösterilmiştir. Sonuçlara göre 24 saat sonunda R-Mes-P-40'ın %75,9'nun, O-Mes-P-40'ın ise %31,2'sinin parçalanmaya uğradığı gözlenmiştir.



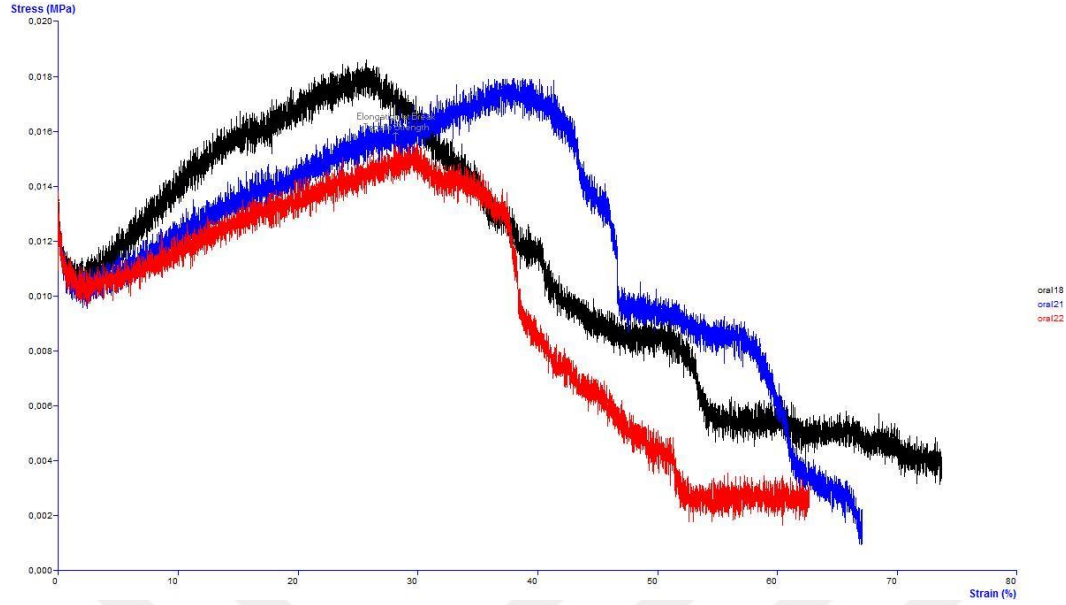
Şekil 4.87. O-Mes-P-40 kodlu hidrojel formülasyonu için % parçalanma-zaman grafiği (n=3)



Şekil 4.88. R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonu için % parçalanma-zaman grafiği (n=3)

4.12.7. Mekanik testler

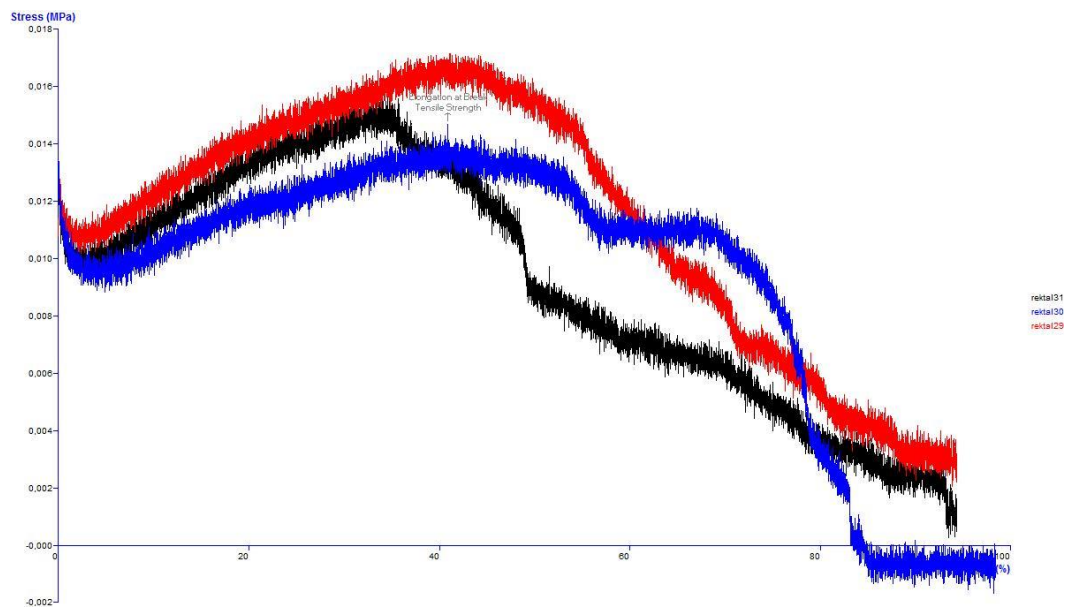
Oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının mekanik dayanıklılığının analiz edilmesi amacıyla mekanik testler Texture Analyzer cihazı kullanılarak Bölüm 3.13.7’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda ölçümler sonrasında gerilim (mPa)’e karşı gerinim (%) grafikleri elde edilmiş ve bu grafikler kullanılarak gerilme direnci ve kopma uzaması değerleri hesaplanmıştır. O-Mes-P-40 hidrojel formülasyonu için gerilim (mPa)’e karşı gerinim (%) grafiği Şekil 4.89’da, gerilme direnci ve kopma uzaması değerleri Çizelge 4.32’de sunulmuştur. R-Mes-P-40 için ise gerilim (mPa)’e karşı gerinim (%) grafiği Şekil 4.90’da, gerilme direnci ve kopma uzaması değerleri Çizelge 4.33’te gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda oral ve rektal formülasyonların kopma uzaması ve gerilme direnci arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($p>0,05$).



Şekil 4.89. O-Mes-P-40 kodlu hidrojel formülasyonu için gerilim (mPa)'e karşı gerinim (%) grafiği (n=3)

Çizelge 4.32. Oral hidrojel formülasyonu için gerilme direnci ve kopma uzaması değerleri

O-Mes-P-40	Gerilme Direnci (Mpa)	Kopma Uzaması (%)
1	0,019	25,738
2	0,018	38,050
3	0,016	28,238
Ortalama	0,017	30,675
SS	0,002	6,508



Şekil 4.90. R-Mes-P-40 kodlu hidrojel formülasyonu için gerilim (mPa)'e karşı gerinim (%) grafiği (n=3)

Çizelge 4.33. Rektal hidrojel formülasyonu için gerilme direnci ve kopma uzaması değerleri

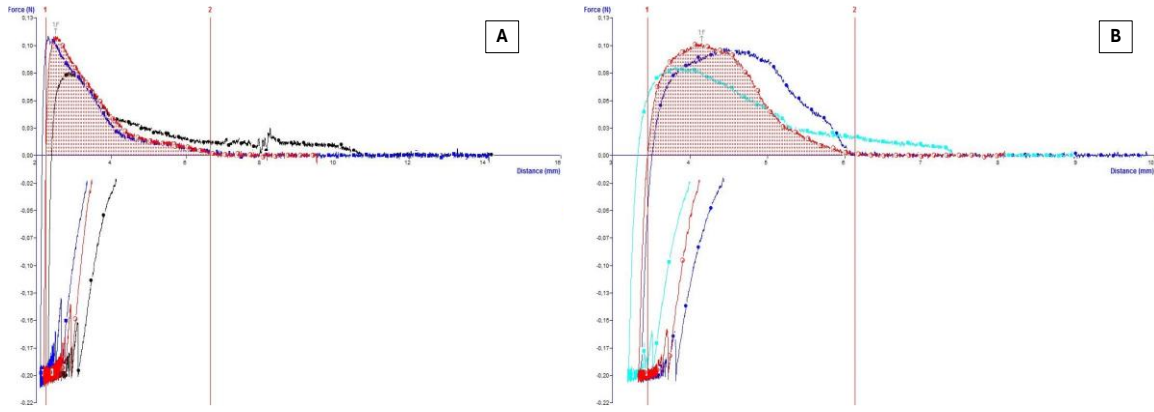
R-Mes-P-40	Gerilme Direnci (Mpa)	Kopma Uzaması (%)
1	0,016	33,188
2	0,015	40,925
3	0,017	41,138
Ortalama	0,016	38,417
SS	0,001	4,530

4.12.8. Mukoadezyon deneyleri

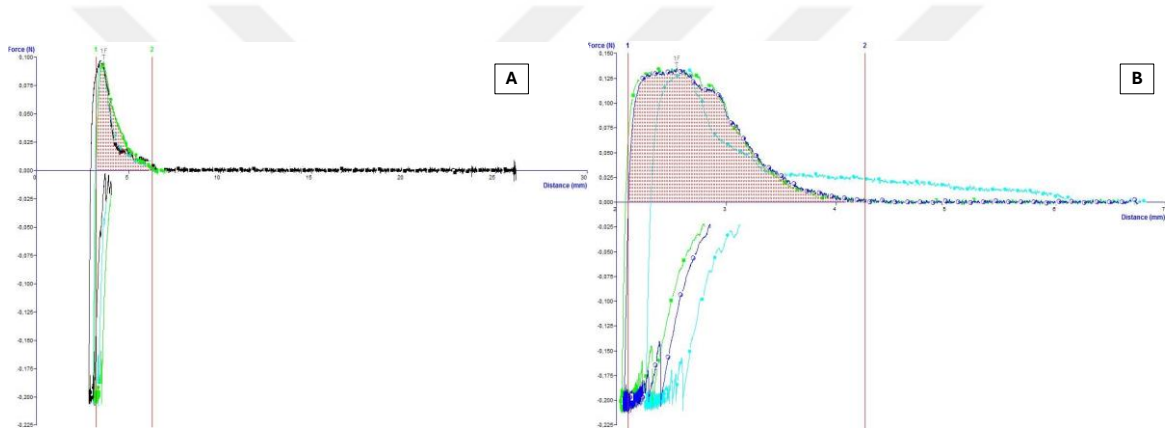
Mukoadezyon hazırlanan bir formülasyonun dokuya yapışarak etki süresinin uzaması açısından önemli bir parametredir. Çalışma kapsamında oral ve rektal formülasyonların mukoadazyonlarının belirlenmesi için Texture-Analyzer TA-TX cihazı kullanılarak mukoadazyon deneyleri yapılmıştır. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşumunun formülasyonların mukoadazyonuna etkisinin incelenmesi amacıyla doku olarak hem sağlıklı kolon hem de inflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulmuş kolon kullanılmıştır. Mukoadezyon deneyleri Bölüm 3.13.8’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonlarının mukoadazyon sonuçları Çizelge 4.34’te verilmiştir. Oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının kuvvet (N)- mesafe (mm) grafikleri sağlıklı dokuda Şekil 4.91’de, İBH oluşturulmuş dokuda ise Şekil 4.92’de verilmiştir.

Çizelge 4.34. Sağlıklı ve inflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulmuş dokuda oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının mukoadazyon sonuçları (n=3)

Formülasyon kodu	Kolon dokusu türü	Mukoadezyon alanı AUC (N.mm) (Ortalama ±SS)	Probun yüzey alanı (πr^2)	Mukoadezyon işi (AUC/ πr^2) (Ortalama ±SS)
O-Mes-P-40	Sağlıklı doku	0,153±0,014	1,1304	0,135±0,012
	İBH oluşturulmuş doku	0,108±0,012	1,1304	0,096±0,011
R-Mes-P-40	Sağlıklı doku	0,164±0,004	1,1304	0,145±0,003
	İBH oluşturulmuş doku	0,139±0,003	1,1304	0,123±0,002



Şekil 4.91. Sağlıklı dokuda O-Mes-P-40 (A) ve R-Mes-P-40 (B) kodlu hidrojel formülasyonlarının kuvvet (N)- mesafe (mm) grafikleri (n=3)

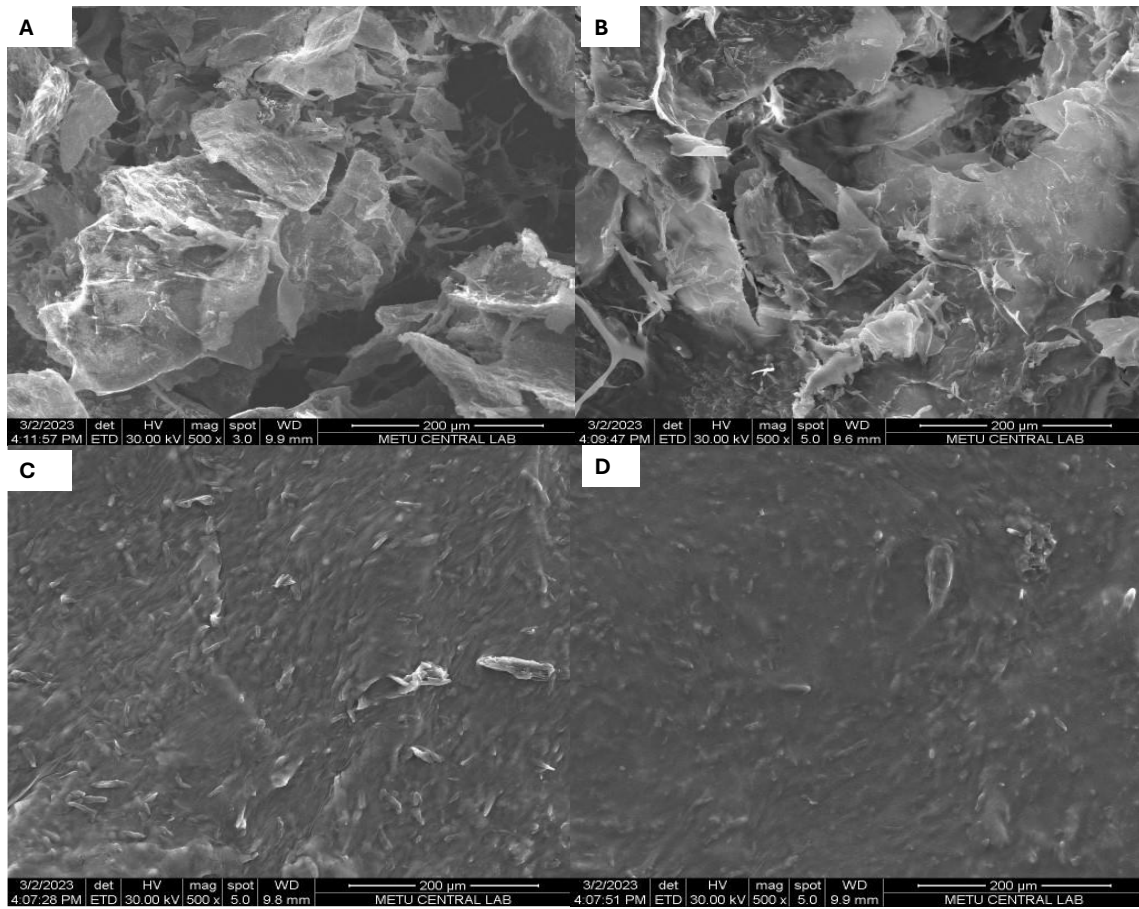


Şekil 4.92. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulmuş dokuda O-Mes-P-40 (A) ve R-Mes-P-40 (B) kodlu hidrojel formülasyonlarının kuvvet (N)- mesafe (mm) grafikleri (n=3)

Yapılan mukoadesyon deneyleri sonucunda sağlıklı ve İBH oluşturulmuş dokuya oral ve rektal formülasyonların mukoadesyonları arasındaki fark istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, hem O-Mes-P-40 hem de R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonunun sağlıklı dokuya mukoadesyonları ve İBH oluşturulmuş dokuya mukoadesyonları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının sağlıklı dokuya mukoadesyonları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ($p > 0,05$), İBH oluşturulmuş dokuya mukoadesyonları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

4.12.9. Morfolojik analizler

Oral ve rektal hidrojel formülasyonların morfolojik analizleri taramalı elektron mikroskobu kullanılarak Bölüm 3.13.9’da anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonları ve bu formülasyonların liyofilize edilmiş hallerinin görüntüleri Resim 4.4’te gösterilmiştir. Hidrojel formülasyonları bulutsu ve homojen bir görüntüye sahipken, liyofilize hidrojel formülasyonlarının poröz bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir.



Resim 4.4. 3B biyobasılmış hidrojellerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri. A: Liyofilize oral (O-Mes-P-40) hidrojel, B: Liyofilize rektal (R-Mes-P-40) hidrojel, C: O-Mes-P-40 kodlu hidrojel, D: R-Mes-P-40 kodlu hidrojel

4.13. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları

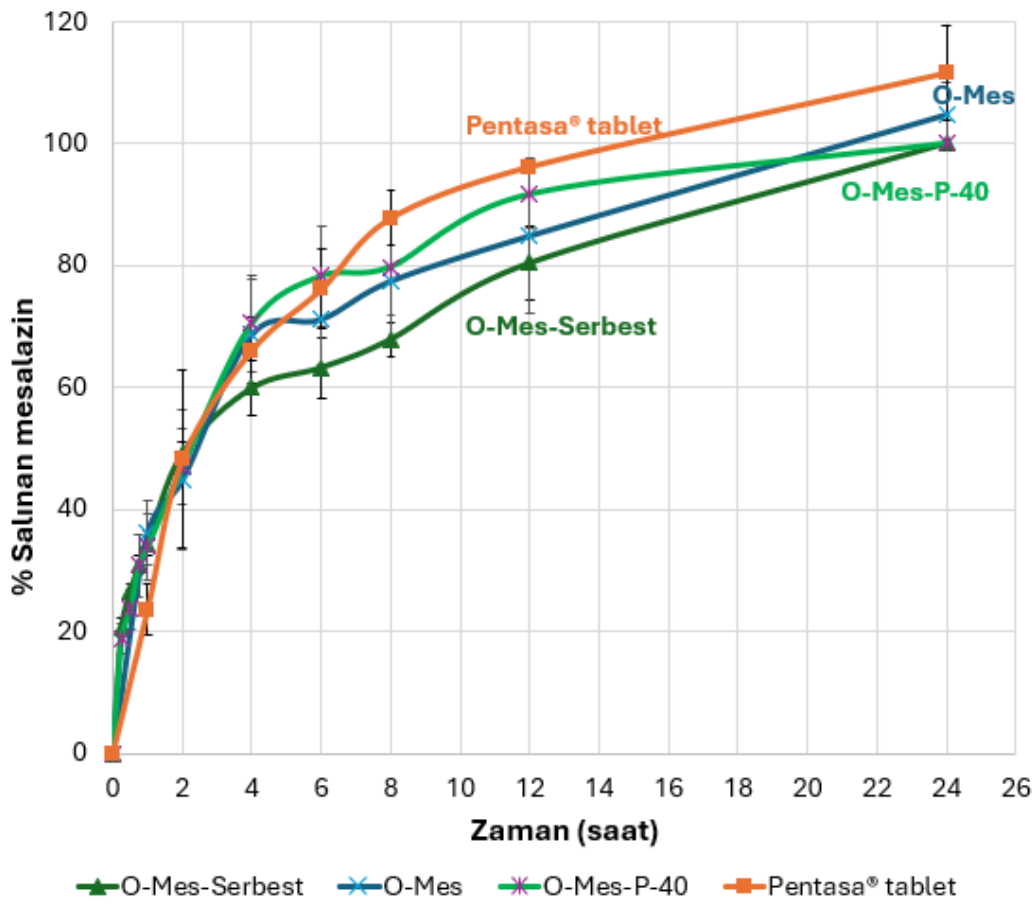
Oral ve rektal hidrojel formülasyonlarından mesalazin ve TNF- α siRNA'nın salımının değerlendirilmesi amacıyla in vitro çözünme hızı çalışmaları Bölüm 3.14'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. TNF- α siRNA'nın hidrojel formülasyonuna serbest veya polipeks halinde eklenmesinin salıma olan etkisinin değerlendirilmesi amacıyla in vitro çözünme hızı çalışmaları mesalazin-serbest TNF- α siRNA ve mesalazin-kitozan: TNF- α siRNA polipeksi yüklü oral ve rektal hidrojel formülasyonları ile gerçekleştirilmiştir.

4.13.1. Oral formülasyonların in vitro çözünme hızı çalışmaları

Oral formülasyonlardan mesalazinin salım profili Şekil 4.93'te gösterilmiştir. Şekil 4.93'te O-Mes, O-Mes-Serbest, O-Mes-P-40 hidrojel formülasyonlarından ve Pentasa® tablet formülasyonundan (O-Ticari) mesalazin salım profilleri birlikte değerlendirilmiştir. Oral formülasyonlara TNF- α siRNA eklenmesinin formülasyonlardan mesalazin salımına etkisinin değerlendirilmesi amacıyla O-Mes hidrojel formülasyonu referans kabul edilerek f1 ve f2 değerleri hesaplanmıştır, hesaplanan değerler Çizelge 4.35'te verilmiştir. O-Mes-Serbest ve O-Mes-P-40 hidrojel formülasyonlarının çözünme hızı profillerinin O-Mes hidrojel formülasyonu ile benzerliği ve farkı değerlendirilmiştir. F2 (benzerlik) değerinin >50 olması, f1 (fark) değerinin ise <15 olması gerekmektedir. Çizelge 4.35 ve Şekil 4.93 birlikte değerlendirildiğinde siRNA'nın serbest veya polipeks halde oral formülasyonlara eklenmesinin, formülasyonlardan mesalazin salımını değiştirmedeği sonucuna varılmıştır.

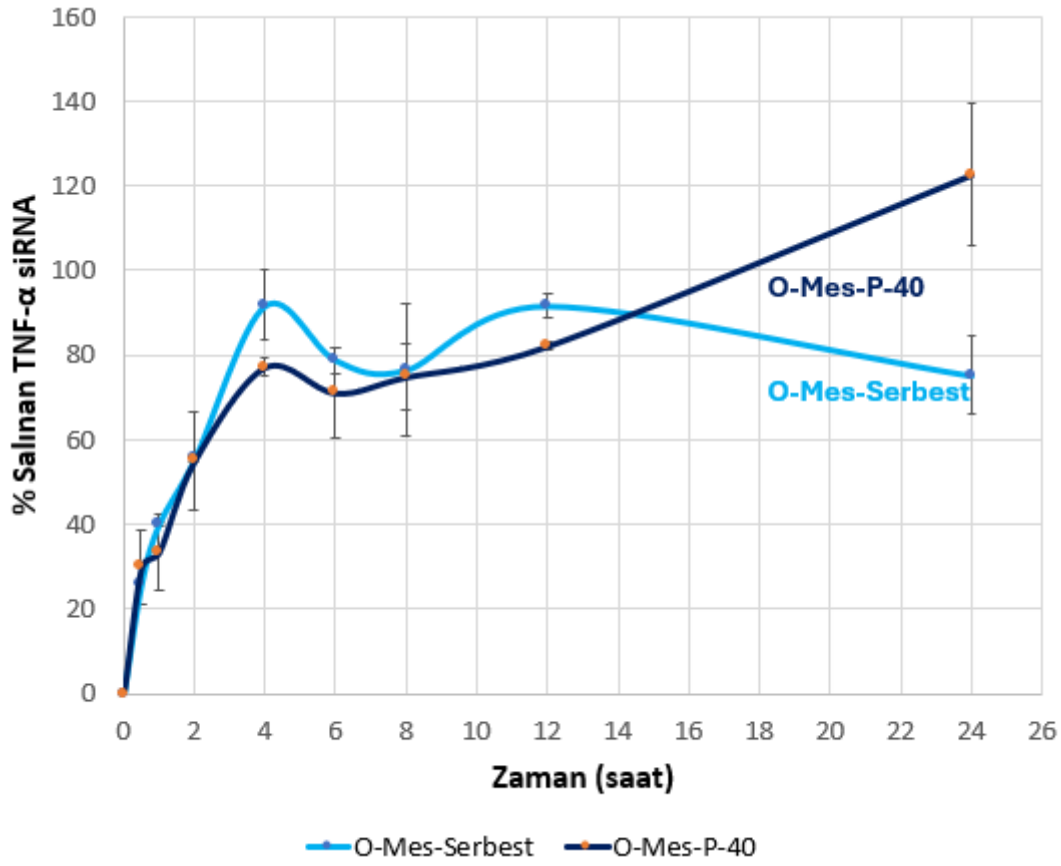
Çizelge 4.35. Oral formülasyonlara TNF- α siRNA eklenmesinin formülasyonlardan mesalazin salımına etkisinin değerlendirilmesi amacıyla siRNA içermeyen oral formülasyon referans kabul edilerek hesaplanan f1 ve f2 değerleri

	Formülasyon kodu	
	O-Mes-Serbest	O-Mes-P-40
f1	8	6
f2	61	68

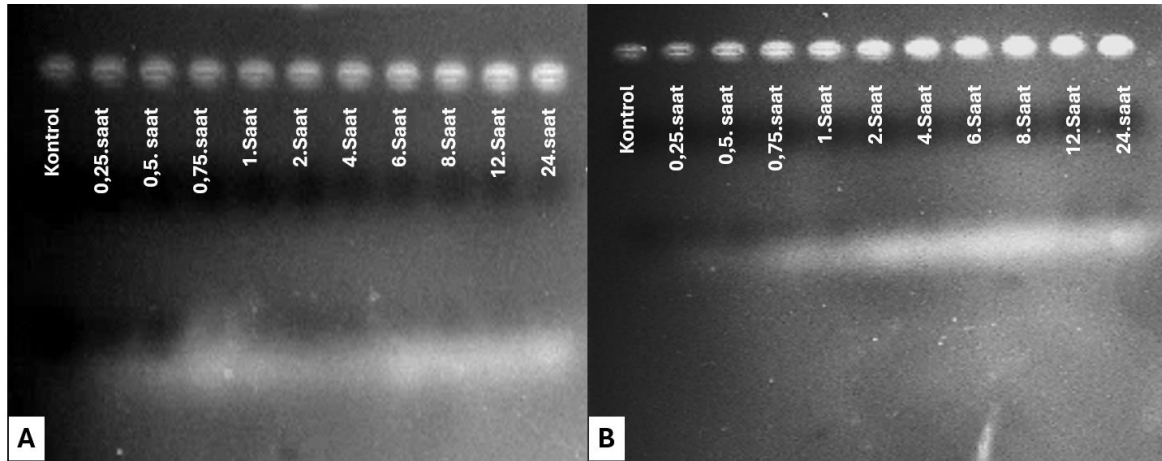


Şekil 4.93. O-Mes, O-Mes-Serbest, O-Mes-P-40 hidrojel formülasyonlarından ve Pentasa® tabletten (O-Ticari) mesalazinin salım profili (n=3, Ortalama±SS).

Oral formülasyonlardan TNF- α siRNA salımı Şekil 4.94'te verilmiştir. TNF- α siRNA oral formülasyonlara serbest halde ve polipeks halinde yüklenmiştir. Bu iki formülasyonun çözünme hızı profilleri birlikte verilmiştir. Ayrıca çözünme hızı ortamından alınan örneklerle jel retardasyon çalışması yapılmıştır, jel görüntüleri Resim 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.94. O-Mes-Serbest ve O-Mes-P-40 hidrojel formülasyonlarından TNF-α siRNA'nın salım profili (n=3, Ortalama±SS).

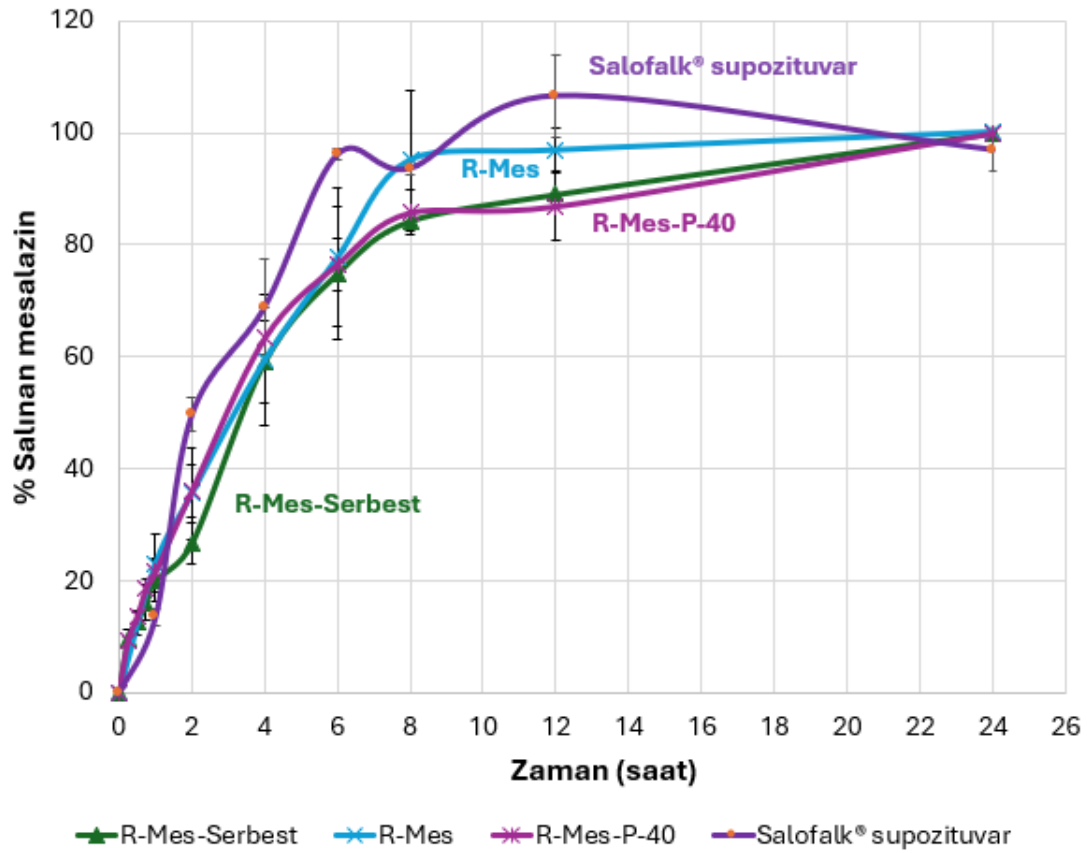


Resim 4.5. O-Mes-Serbest ve O-Mes-P-40 hidrojel formülasyonları ile yapılan in vitro çözünme hızı çalışması sırasında ortamdan alınmış örnekler ile gerçekleştirilen jel retardasyon çalışması sonucu elde edilen jel görüntüleri. A: O-Mes-Serbest, B:O-Mes-P-40

Şekil 4.94'e göre her iki oral formülasyondan da TNF- α siRNA salımının gerçekleştiği ancak serbest TNF- α siRNA yüklü formülasyonda (O-Mes-Serbest) belirli bir süre sonra ortamdaki TNF- α siRNA'nın bozunmaya başladığı gözlenmiştir. Polileks yüklü formülasyonda (O-Mes-P-40) ise TNF- α siRNA'nın polileksten ve formülasyondan yavaş ve kontrollü bir şekilde salındığı görülmektedir. Ayrıca Resim 4.5'te yer alan jel görüntülerine bakıldığı zaman hem serbest TNF- α siRNA yüklü (O-Mes-Serbest) hem de polileks yüklü formülasyonlarda (O-Mes-P-40) 24. Saatin sonunda bile ortamda bozunmadan kalmış TNF- α siRNA'nın bulunduğu görülmektedir. Bu bulgu jel retardasyon çalışmalarıyla da desteklenmiştir, TNF- α siRNA'nın bozunmadan kalması jeldeki kuyucukların parlaması ve jellerdeki sürüklenme izinden de anlaşılmaktadır. Salım sonuçları ve jel retardasyon çalışmaları birbirini destekler niteliktedir. Bu sonuçlara göre, polileks oluşturma ve 3B basılmış oral formülasyonun siRNA'nın bozunmasını engellediği ve siRNA'yı koruduğu sonucuna varılmıştır.

4.13.2. Rektal formülasyonların in vitro çözünme hızı çalışmaları

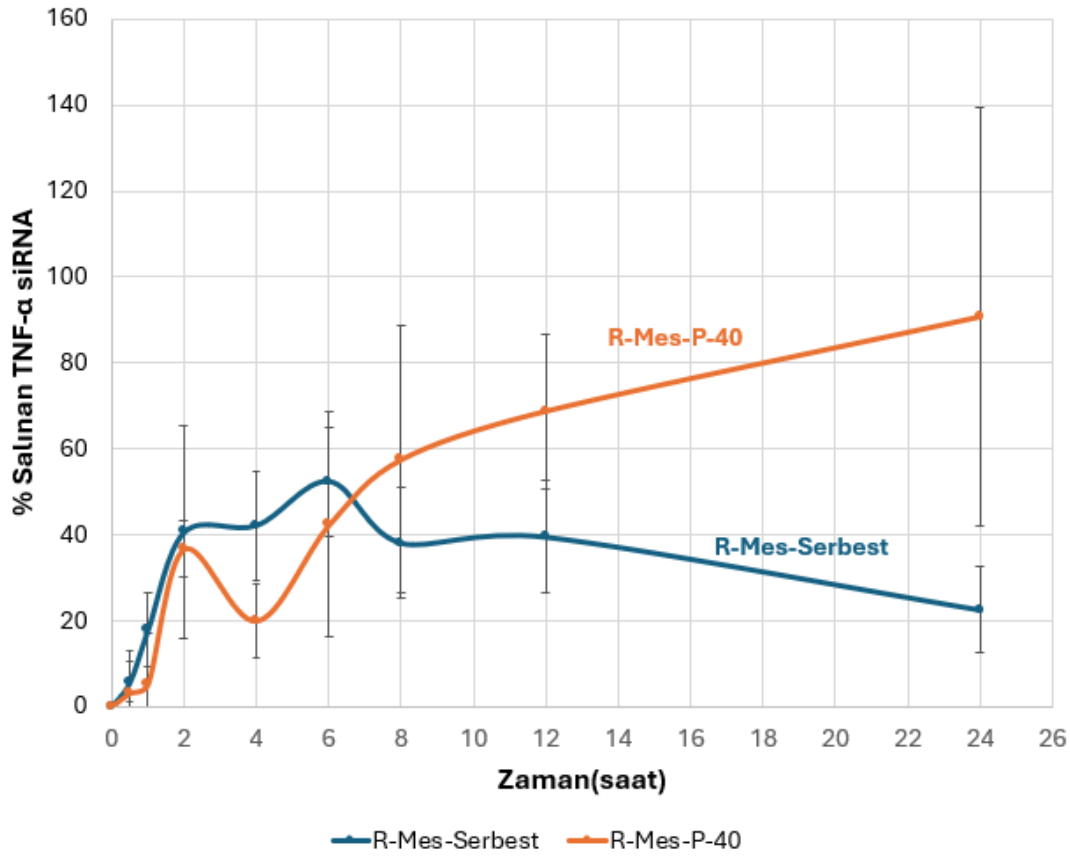
Rektal formülasyonlardan mesalazinin salım profili Şekil 4.95'te gösterilmiştir. Şekil 4.95'te R-Mes, R-Mes-Serbest, R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonlarından ve Salofalk® supozituvardan (R-Ticari) mesalazin salım profilleri birlikte değerlendirilmiştir. Rektal formülasyonlara TNF- α siRNA eklenmesinin formülasyonlardan mesalazin salımına etkisinin değerlendirilmesi amacıyla R-Mes hidrojel formülasyonu referans kabul edilerek f1 ve f2 değerleri hesaplanmıştır, hesaplanan değerler Çizelge 4.36'da verilmiştir. R-Mes-Serbest ve R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonlarının çözünme hızı profillerinin R-Mes hidrojel formülasyonu ile benzerliği ve farkı değerlendirilmiştir. F2 (benzerlik) değerinin >50 olması, f1 (fark) değerinin ise <15 olması gerekmektedir. Çizelge 4.36 ve Şekil 4.95 birlikte değerlendirildiğinde siRNA'nın serbest veya polileks halde rektal formülasyonlara eklenmesinin, formülasyonlardan mesalazin salımını değiştirmede sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.95. R-Mes, R-Mes-Serbest, R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonlarından ve Salfofalk® supozituvardan (R-Ticari) mesalazinin salım profili (n=3, Ortalama±SS)

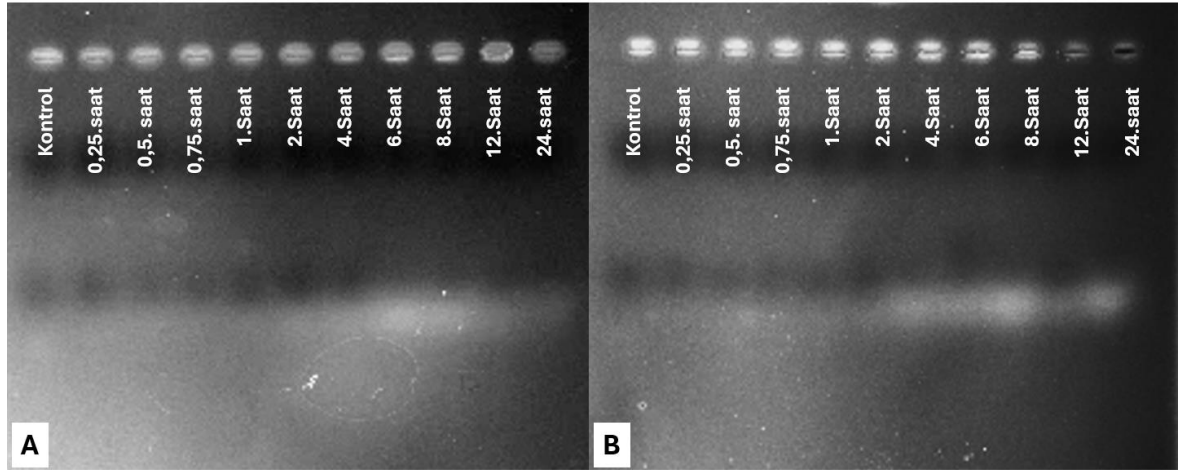
Çizelge 4.36. Rektal formülasyonlara TNF- α siRNA eklenmesinin formülasyonlardan mesalazin salımına etkisinin değerlendirilmesi amacıyla siRNA içermeyen oral formülasyon referans kabul edilerek hesaplanan f1 ve f2 değerleri

	Formülasyon kodu	
	R-Mes-Serbest	R-Mes-P-40
f1	5	5
f2	65	64



Şekil 4.96. Serbest TNF- α siRNA ve polileks yüklü 3B biyobasılan rektal formülasyonlardan TNF- α siRNA'nın salım profili (n=3, Ortalama $\pm$ SS)

Rektal formülasyonlardan TNF- α siRNA salımı Şekil 4.96' da verilmiştir. TNF- α siRNA rektal formülasyonlara serbest halde ve polileks halinde yüklenmiştir. Bu iki formülasyonun çözünme hızı profilleri birlikte verilmiştir. Ayrıca çözünme hızı ortamından alınan örneklerle jel retardasyon çalışması yapılmıştır, jel görüntüleri Resim 4.6'da verilmiştir.



Resim 4.6. R-Mes-Serbest ve R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonları ile yapılan in vitro çözünme hızı çalışması sırasında ortamdan alınmış örnekler ile gerçekleştirilen jel retardasyon çalışması sonucu elde edilen jel görüntüleri. A: R-Mes-Serbest, B:R-Mes-P-40

Şekil 4.96'ya göre her iki rektal formülasyondan da siRNA salımının gerçekleştiği ancak serbest siRNA yüklü formülasyonda (R-Mes-Serbest) belirli bir süre sonra ortamdaki siRNA'nın bozunmaya başladığı gözlenmiştir. Polipeks yüklü formülasyonda (R-Mes-P-40) ise siRNA'nın polipeksten ve formülasyondan yavaş ve kontrollü bir şekilde salındığı görülmektedir. Ayrıca Resim 4.6'da yer alan jel görüntülerine bakıldığı zaman hem serbest siRNA yüklü (R-Mes-Serbest) hem de polipeks yüklü formülasyonlarda (R-Mes-P-40) 24. Saatin sonunda bile ortamda bozunmadan kalmış siRNA'nın bulunduğu görülmektedir. siRNA'nın bozunmadan kalması jeldeki kuyucukların parlaması ve jellerdeki sürüklenme izinden anlaşılmaktadır. Salım sonuçları ve jel retardasyon çalışmaları birbirini destekler niteliktedir. Bu sonuçlara göre, polipeks oluşturma ve 3B basılmış rektal formülasyonun siRNA'nın bozunmasını engellediği ve siRNA'yı koruduğu sonucuna varılmıştır.

4.13.3. Salım kinetiklerinin belirlenmesi

In vitro çözünme hızı sonucunda hem oral (O-Mes-P-40) hem de rektal (R-Mes-P-40) formülasyon için DDSolver yazılımı ile % salım değerleri kullanılarak formülasyonlardan mesalazin ve TNF- α siRNA salım kinetikleri belirlenmiştir. Oral ve rektal formülasyonların farklı salım kinetiklerine göre değerlendirme sonuçları mesalazin salımı için Çizelge 4.37'de, TNF- α siRNA salımı için Çizelge 4.38'de

verilmiştir. Her bir salım kinetiği için hesaplanan uyumluluk kriterleri r^2_{adj} , AIC ve MSC çizelgelerde yer almaktadır.

Çizelge 4.37. O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 formülasyonlarından mesalazın salımının farklı salım kinetiklerine göre değerlendirme sonuçları

Formülasyon türü	O-Mes-P-40		R-Mes-P-40	
Matematiksel modeller	Parametreler		Parametreler	
0. derece	r^2	0,0351	r^2	0,4578
	r^2_{adj}	0,0351	r^2_{adj}	0,4578
	AIC	104,0576	AIC	99,8721
	MSC	-0,4282	MSC	0,2634
	Modele özgü katsayı	$K_0=6,007$	Modele özgü katsayı	$K_0=5,869$
1. derece	r^2	0,9468	r^2	0,9938
	r^2_{adj}	0,9468	r^2_{adj}	0,9938
	AIC	72,1795	AIC	50,6595
	MSC	2,4698	MSC	4,7372
	Modele özgü katsayı	$K_1=0,3316$	Modele özgü katsayı	$K_1=0,2052$
Higuchi	r^2	0,8519	r^2	0,9226
	r^2_{adj}	0,8519	r^2_{adj}	0,9226
	AIC	83,4396	AIC	78,4628
	MSC	1,4461	MSC	2,2097
	Modele özgü katsayı	$K_H=25,9649$	Modele özgü katsayı	$K_H=24,5545$
Korsmeyer-Peppas	r^2	0,8969	r^2	0,8563
	r^2_{adj}	0,8854	r^2_{adj}	0,8403
	AIC	81,4582	AIC	87,2665
	MSC	1,6262	MSC	1,4093
	Modele özgü katsayı	$K_{KP}=38,5011$ $n=0,2696$	Modele özgü katsayı	$K_{KP}=31,9762$ $n=0,3224$
Hixson-Crowell	r^2	0,8254	r^2	0,9717
	r^2_{adj}	0,8254	r^2_{adj}	0,9717
	AIC	85,2518	AIC	68,3707
	MSC	1,2814	MSC	3,2171
	Modele özgü katsayı	$K_{HC}=0,0543$	Modele özgü katsayı	$K_{HC}=0,512$
Weibull	r^2	0,9906	r^2	0,9920
	r^2_{adj}	0,9883	r^2_{adj}	0,9901
	AIC	57,0144	AIC	57,4306
	MSC	3,8484	MSC	4,1217
	Modele özgü katsayı	$\alpha=1,9771$ $\beta=0,5882$ $T_i=0,1$	Modele özgü katsayı	$\alpha=3,2736$ $\beta=0,7891$ $T_i=0,15$

r^2 : Korelasyon Katsayısı, r^2_{adj} : Düzeltilmiş korelasyon katsayısı, MSC: Model seçme kriteri, AIC: Akaike bilgi ölçütü

Çizelge 4.38. O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 formülasyonlarından TNF- α siRNA salımının farklı salım kinetiklerine göre değerlendirme sonuçları

Formülasyon türü	O-Mes-P-40		R-Mes-P-40	
Matematiksel modeller	Parametreler		Parametreler	
0. derece	r^2	0,2291	r^2	0,7581
	r^2_{adj}	0,2291	r^2_{adj}	0,7581
	AIC	82,4005	AIC	70,2902
	MSC	-0,3877	MSC	1,0238
	Modele özgü katsayı	$K_0=6,2575$	Modele özgü katsayı	$K_0=4,6121$
1. derece	r^2	0,7791	r^2	0,9329
	r^2_{adj}	0,7791	r^2_{adj}	0,9329
	AIC	71,1530	AIC	58,7523
	MSC	0,8620	MSC	2,3058
	Modele özgü katsayı	$K_1=0,2319$	Modele özgü katsayı	$K_1=0,0991$
Higuchi	r^2	0,8697	r^2	0,9106
	r^2_{adj}	0,8697	r^2_{adj}	0,9106
	AIC	66,3975	AIC	61,3316
	MSC	1,3903	MSC	2,0192
	Modele özgü katsayı	$K_H=26,1236$	Modele özgü katsayı	$K_H=18,244$
Korsmeyer-Peppas	r^2	0,9150	r^2	0,7589
	r^2_{adj}	0,9029	r^2_{adj}	0,7245
	AIC	64,5542	AIC	72,2624
	MSC	1,5952	MSC	0,8046
	Modele özgü katsayı	$K_{KP}=38,6837$ $n=0,3076$	Modele özgü katsayı	$K_{KP}=7,6901$ $n=0,8822$
Hixson-Crowell	r^2	0,7584	r^2	0,9152
	r^2_{adj}	0,7584	r^2_{adj}	0,9152
	AIC	71,9588	AIC	60,8635
	MSC	0,7725	MSC	2,0712
	Modele özgü katsayı	$K_{HC}=0,0629$	Modele özgü katsayı	$K_{HC}=0,0245$
Weibull	r^2	0,8427	r^2	0,9314
	r^2_{adj}	0,7903	r^2_{adj}	0,9086
	AIC	72,0953	AIC	62,9459
	MSC	0,7573	MSC	1,8398
	Modele özgü katsayı	$\alpha=1,7702$ $\beta=0,6078$ $T_i=0,2$	Modele özgü katsayı	$\alpha=9,6672$ $\beta=0,9842$ $T_i=0,2$

r^2 : Korelasyon Katsayısı, r^2_{adj} : Düzeltilmiş korelasyon katsayısı, MSC: Model seçme kriteri, AIC: Akaike bilgi ölçütü

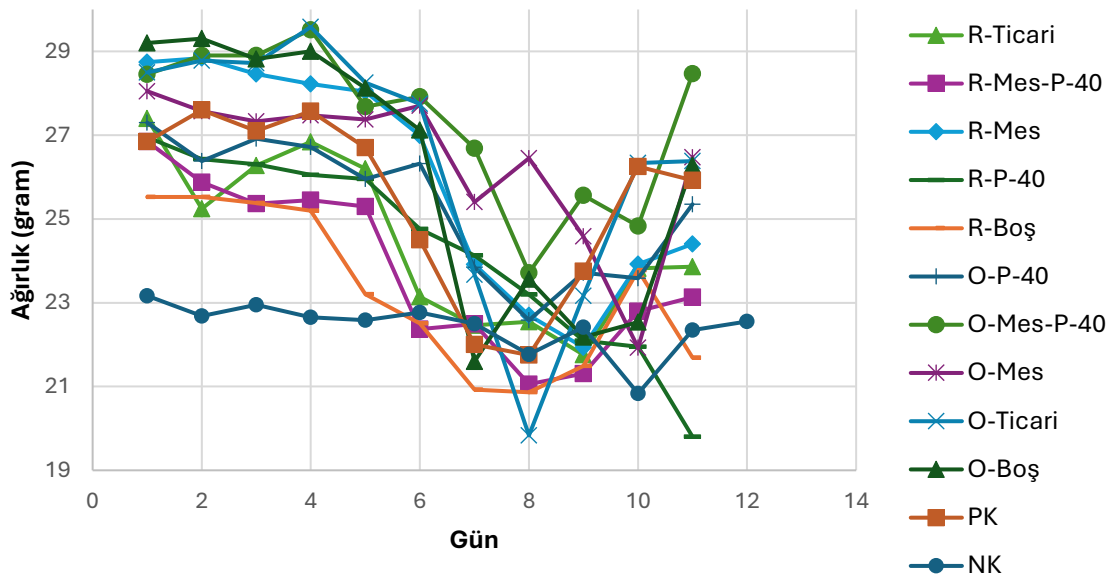
4.14. İn vivo çalışmalar

İn vivo çalışmalar Bölüm 3.15'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Mesalazin yüklü, TNF- α siRNA yüklü, mesalazin ve TNF- α siRNA yüklü ve boş hidrojel formülasyonlar DSS ile inflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulmuş farelere oral ve rektal yoldan uygulanmıştır. Formülasyonların inflamatuvar bağırsak hastalığı üzerine etkisi immünolojik ve histolojik olarak incelenmiştir.

4.14.1. Farelerin fizyolojik özelliklerine ait bulgular

Farelerde görülen %ağırlık kaybına ait bulgular

Farelerin ağırlıkları in vivo çalışmalar boyunca her gün ölçülmüştür. Her grup için farelerin ağırlıklarının güne bağlı olarak değişimi Şekil 4.97’de gösterilmiştir. Farelerin ağırlığındaki değişimin en az olduğu grubun NK (negatif kontrol) grubu olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.97. İn vivo gruplar için farelerin ağırlıklarının güne bağlı olarak değişimi

Farelerin in vivo çalışmaya başladıktan hemen sonra tespit edilen ağırlıkları ile kurban edilmeden hemen önce ölçülen ağırlıkları arasındaki fark kıyaslanarak ağırlıklarında görülen %kayıp hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular Çizelge 4.39’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.39. Gruplara göre farelerin % ağırlık kaybı değerleri

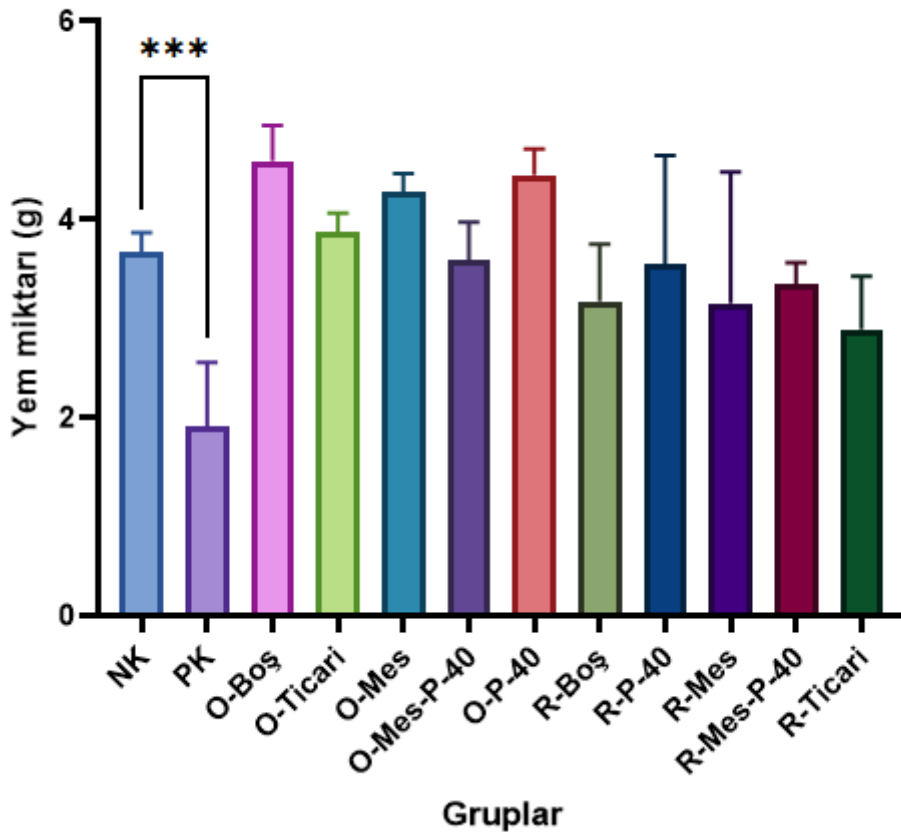
Hayvan grupları	NK	PK	O-Boş	O-Ticari	O-Mes	O-Mes-P-40	O-P-40	R-Boş	R-P-40	R-Mes	R-Mes-P-40	R-Ticari
Ortalama % ağırlık kaybı	3,13	5,54	9,81	4,16	5,73	0,24	0,06	7,74	22,78	12,09	11,81	18,66
SH	0,84	3,09	4,35	5,45	1,46	1,96	2,31	3,5	2,19	2,91	1,44	0,27

Çizelge 4.39'daki sonuçlara göre rektal tedavi grubunda yer alan farelerin % ağırlık kaybının oral tedavi grubuna göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Farelerin tükettikleri pellet yem miktarına ait bulgular

Farelerin tükettikleri pellet yem miktarı her gün düzenli olarak kaydedilmiştir. Çalışmanın sonunda elde edilen verilere göre fare başına günlük tüketilen ortalama yem miktarı Şekil 4.98'de gösterilmiştir. Pozitif kontrol grubu (PK) hariç diğer tüm gruplarda farelerin günlük tükettikleri ortalama yem miktarı negatif kontrol grubu (NK) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Fare başına günlük tüketilen yem miktarının pozitif kontrol grubunda (PK), negatif kontrol grubuna (NK) göre anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir ($p<0,01$).

Fare başına günlük tüketilen ortalama yem miktarı

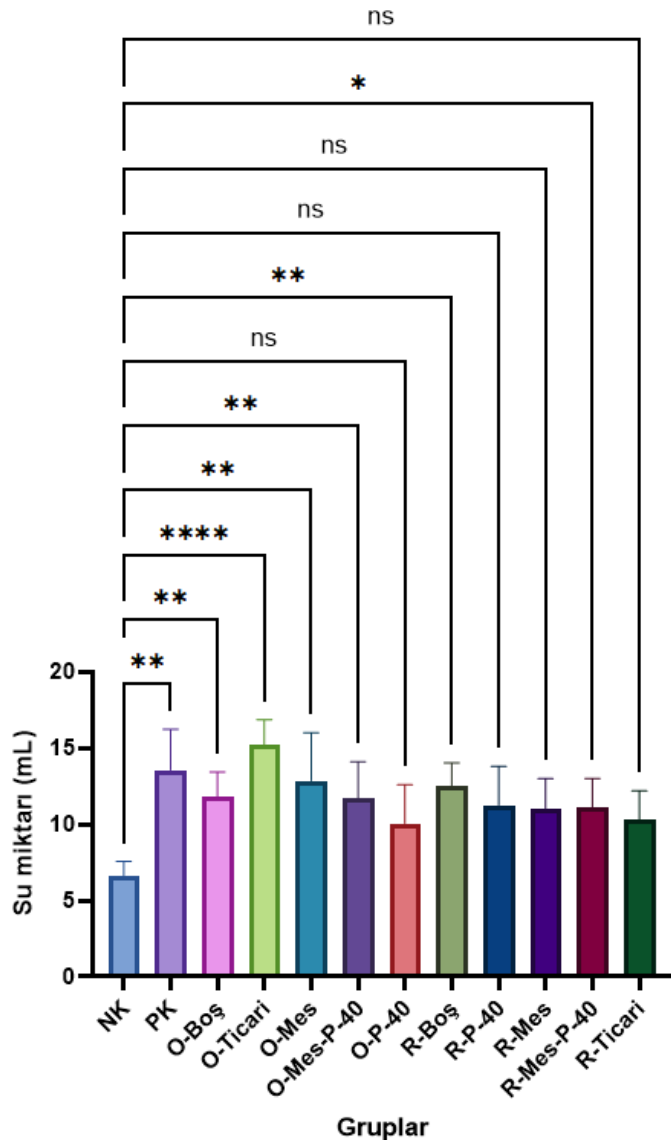


Şekil 4.98. İn vivo deneyler boyunca fare başına günlük tüketilen ortalama yem miktarı (n=4-6, Ortalama±SH, **: $p<0,001$)

Farelerin tükettikleri musluk suyu miktarına ait bulgular

Farelerin tükettikleri musluk suyu miktarı her gün düzenli olarak kaydedilmiştir. Çalışmanın sonunda elde edilen verilere göre tükettikleri ortalama toplam musluk suyu miktarı Şekil 4.99'da gösterilmiştir. Farelerin günlük tükettikleri ortalama su miktarı negatif kontrol grubu (NK) ile karşılaştırıldığında O-P-40, R-P-40 ve R-Mes kodlu gruplar hariç diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,05$).

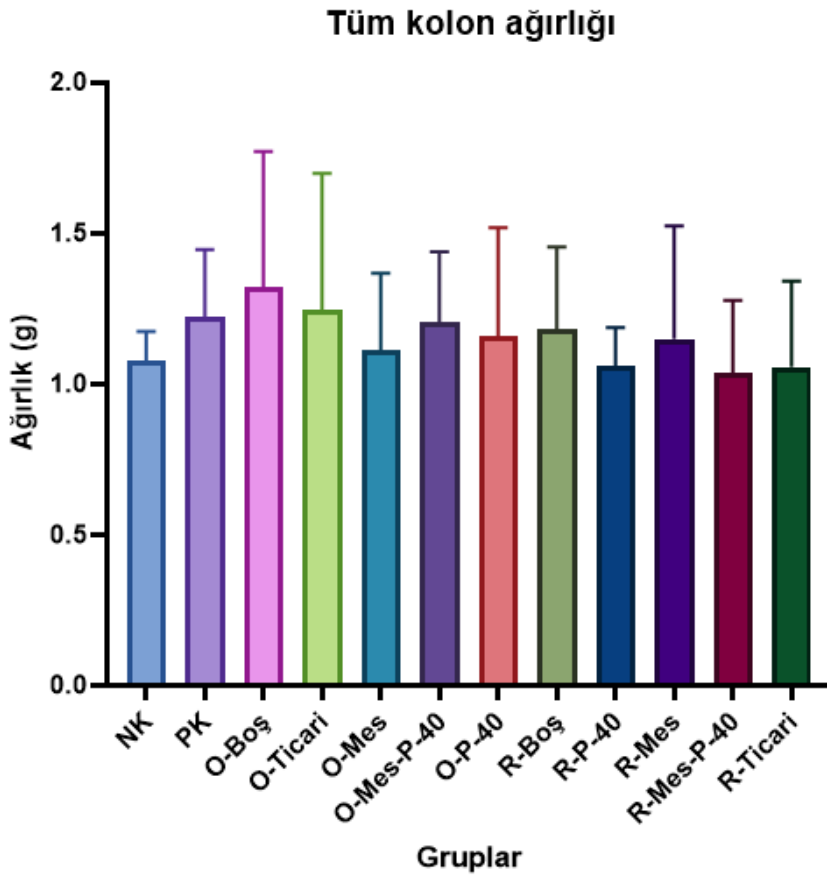
Fare başına günlük tüketilen ortalama su miktarı



Şekil 4.99. İn vivo deneyler boyunca fare başına günlük tüketilen ortalama su miktarı
ns: $p>0,05$, *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$, ****: $p<0,0001$)

Farelerin tüm kolon ağırlığına ait bulgular

Fareler sakrifiye edildikten hemen sonra ksifopubik median kesi ile laparotomi gerçekleştirilmiş ve farelerin tüm kolonu çıkartılmıştır. Kolon, %0,9 NaCl ile yıkanarak gaita kalıntıları temizlenmiştir. Kolon kurulandıktan sonra ağırlığı ölçülerek kaydedilmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 4.100'de verilmiştir. Bütün gruptaki farelerin tüm kolon ağırlıkları negatif kontrol grubu (NK) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

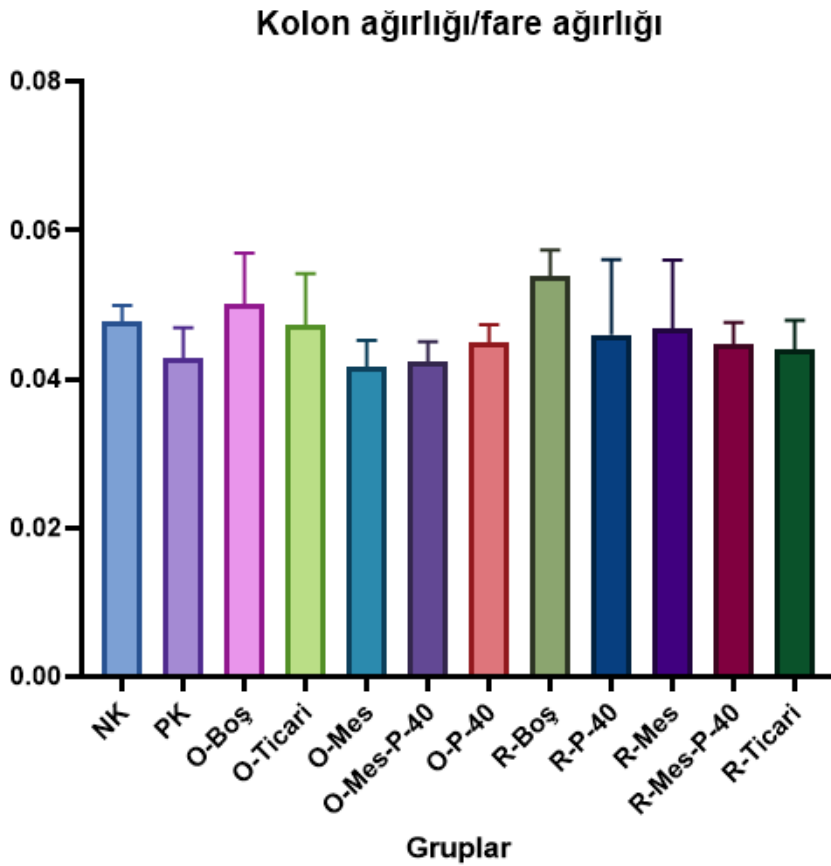


Şekil 4.100. Farelerin tüm kolon ağırlıkları (n=4-6) (Ortalama±SH)

Farelerde kolon/fare ağırlığı değerine ait bulgular

Fareler sakrifiye edilmeden hemen önce ağırlıkları ve laparotomi işlemi ile çıkarılan kolonlarının ağırlıkları belirlenerek kolon/fare ağırlığı değeri hesaplanmıştır. Elde edilen verilere göre hesaplanan kolon/fare ağırlığı değerine ait bulgular Şekil

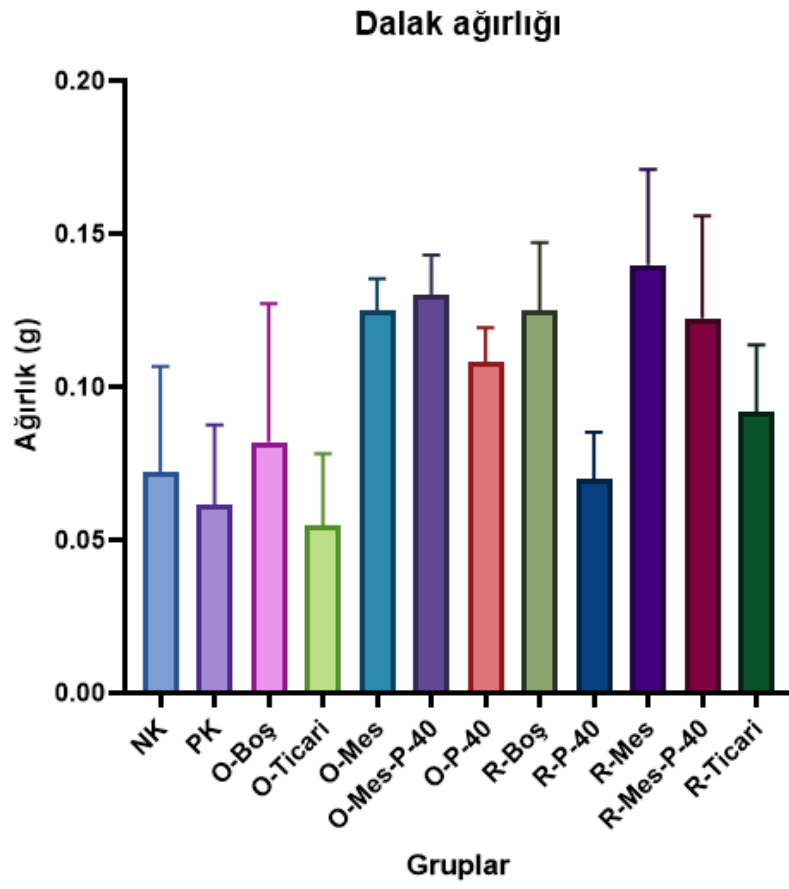
4.101’de verilmiştir. Bütün gruplardaki farelerin tüm kolon ağırlığı/fare ağırlığı değerleri negatif kontrol grubu (NK) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).



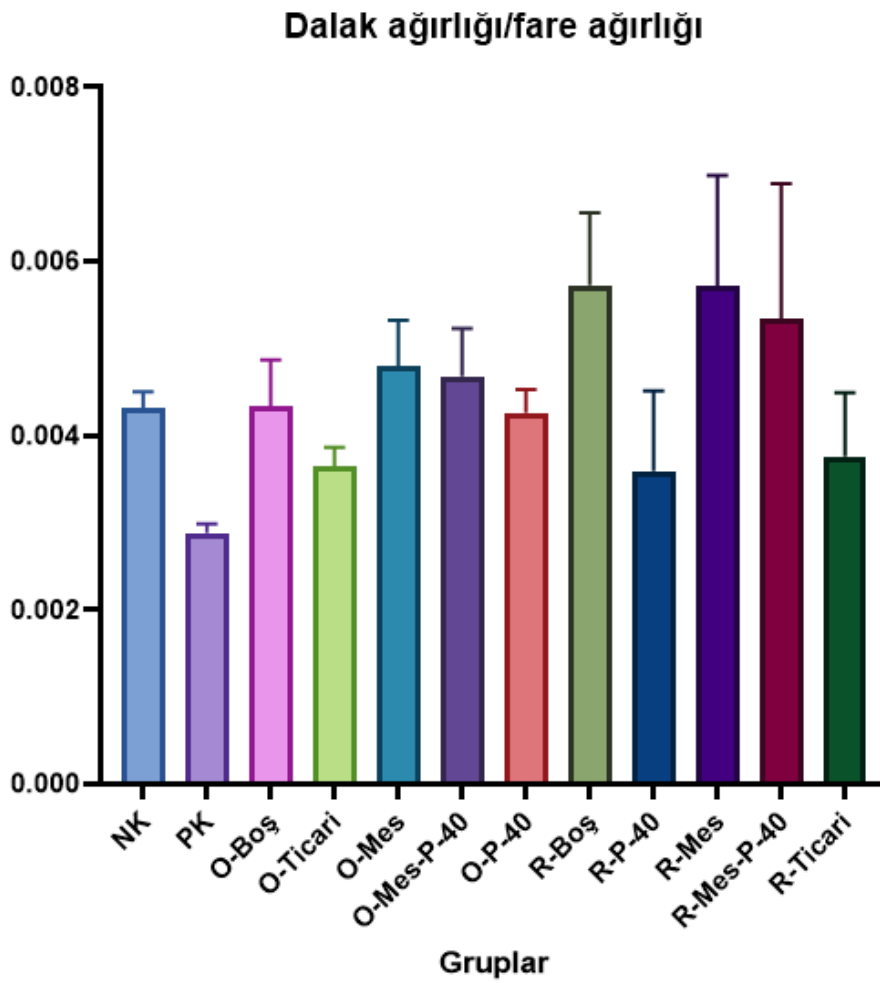
Şekil 4.101. Farelerin kolon ağırlığı/fare ağırlığı değerleri (n=4-6) (Ortalama±SH)

Farelerin dalak ağırlığına ve dalak ağırlığı/fare ağırlığı değerlerine ait bulgular

Fareler sakrifiye edildikten sonra laparotomi işlemi ile çıkarılan dalaklarının ağırlıkları belirlenmiştir. Farelere ait dalak ağırlığı bulguları Şekil 4.102’de verilmiştir. Daha sonra farelerin sakrifiye edilmeden hemen önce ağırlıkları ve dalak ağırlıkları değerleri kullanılan dalak ağırlığı/fare ağırlığı değerleri belirlenmiş ve bu bulgular Şekil 4.103’ te gösterilmiştir. Bütün gruplardaki farelerin dalak ağırlığı ve dalak ağırlığı/fare ağırlığı değerleri negatif kontrol grubu (NK) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).



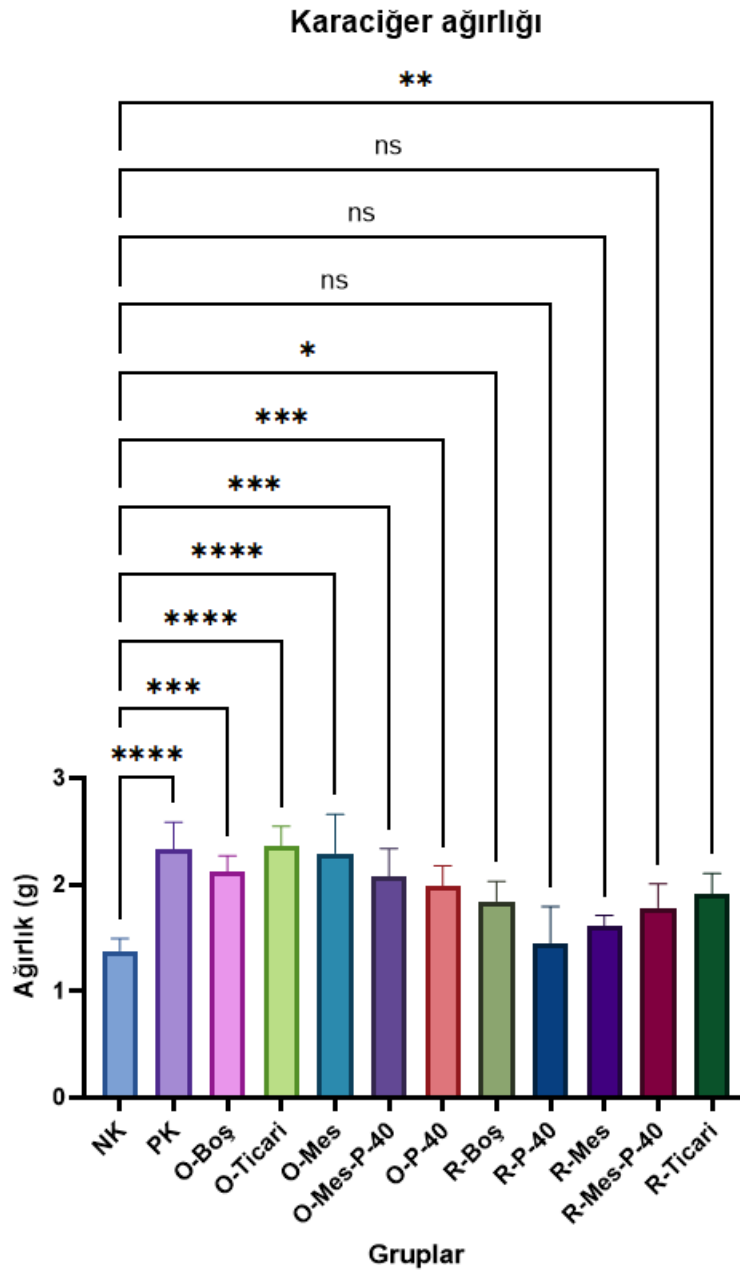
Şekil 4.102. Farelerin dalak ağırlığı değerleri (n=4-6) (Ortalama $\pm$ SH)



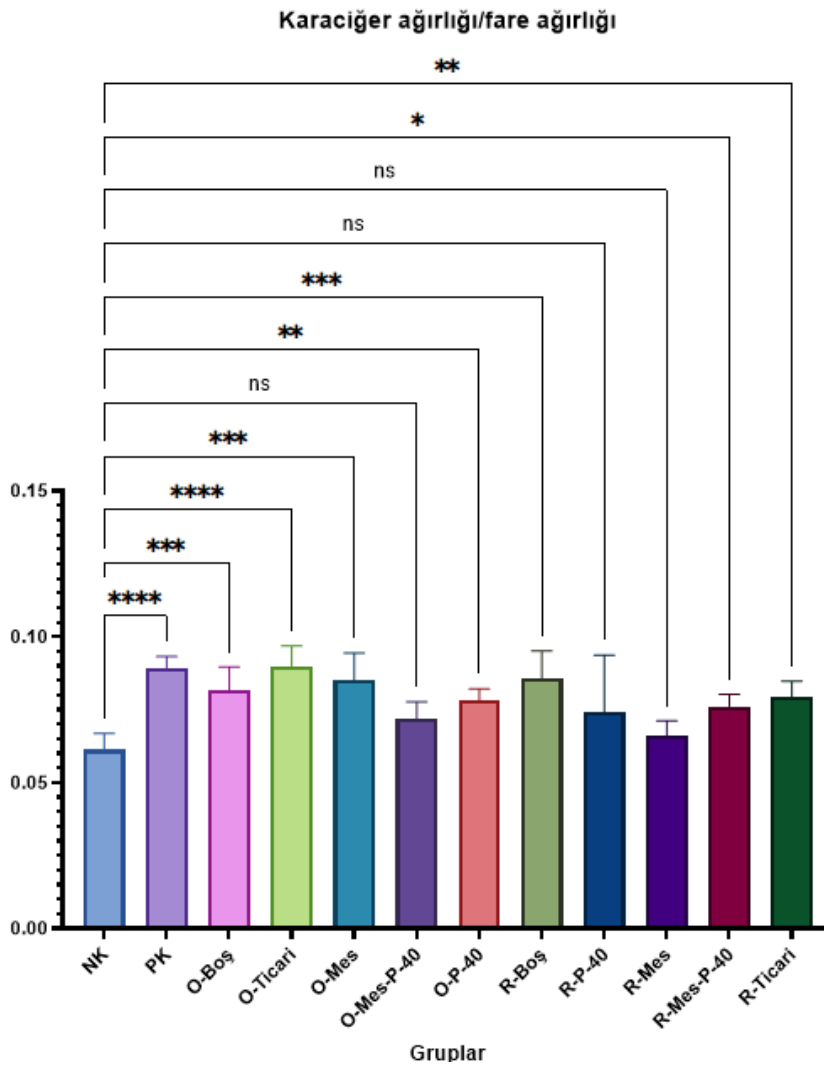
Şekil 4.103. Farelerin dalak ağırlığı/fare ağırlığı değerleri (n=4-6, Ortalama±SH)

Farelerin karaciğer ve karaciğer ağırlığı/fare ağırlığı değerlerine ait bulgular

Fareler sakrifiye edildikten sonra laparotomi işlemi ile çıkarılan karaciğer ağırlıkları belirlenmiştir. Farelere ait karaciğer ağırlığı bulguları ve gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırma Şekil 4.104'te verilmiştir. Daha sonra farelerin sakrifiye edilmeden hemen önce ağırlıkları ve karaciğer ağırlıkları değerleri kullanılan karaciğer ağırlığı/fare ağırlığı değerleri belirlenmiş, bu bulgular gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırma Şekil 4.105'te sunulmuştur.



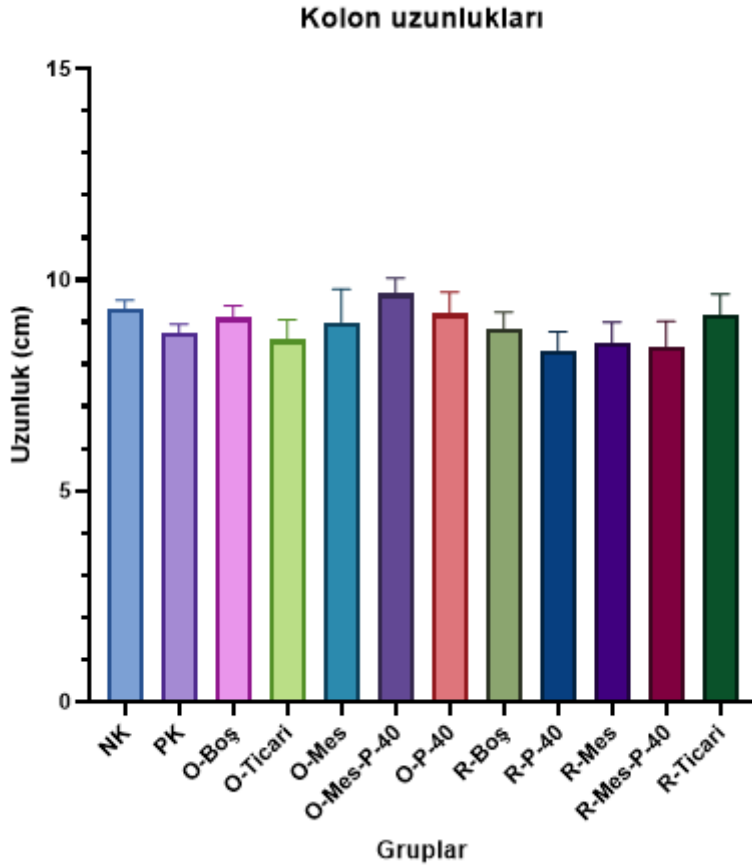
Şekil 4.104. Farelerin karaciğer ağırlığı değerleri (n=4-6, Ortalama±SH, ns: p>0,05, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p <0,0001)



Şekil 4.105. Farelerin karaciğer ağırlığı/fare ağırlığı değerleri (n=4-6, Ortalama±SH, ns: $p>0,05$, *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$, ****: $p<0,0001$)

Farelerin kolon uzunluğuna ait bulgular

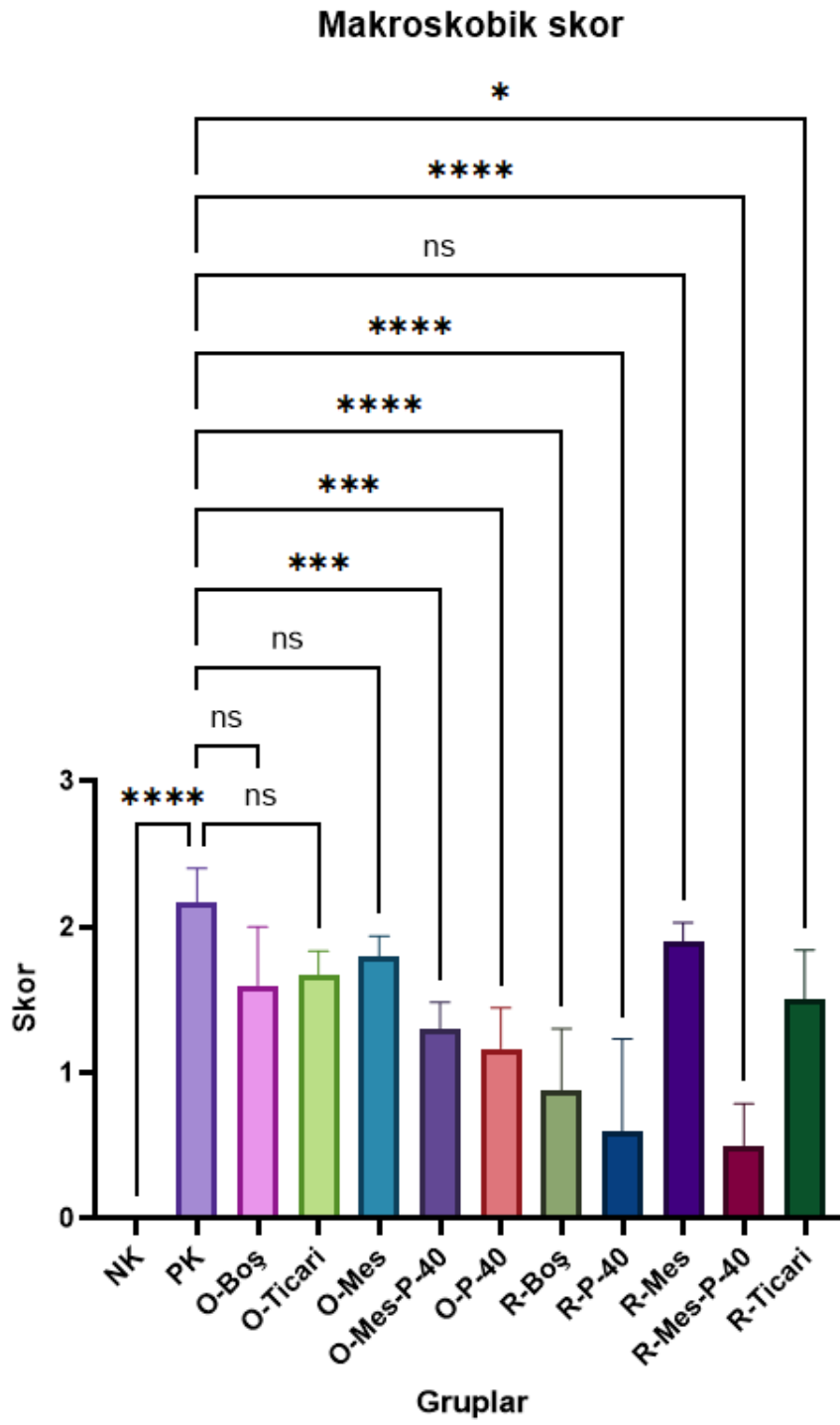
Fareler sakrifiye edildikten sonra laparotomi işlemi ile kolonları çıkarılmış ve kolon uzunlukları ölçülmüştür. Farelerin kolon uzunluklarına ait bulgular Şekil 4.106'da gösterilmiştir. Bütün gruplardaki farelerin kolon uzunluğu değerleri negatif kontrol grubu (NK) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.106. Farelerin kolon uzunluğu değerleri (n=4-6, Ortalama±SH)

Kolon makroskopik skor değerlerine ait bulgular

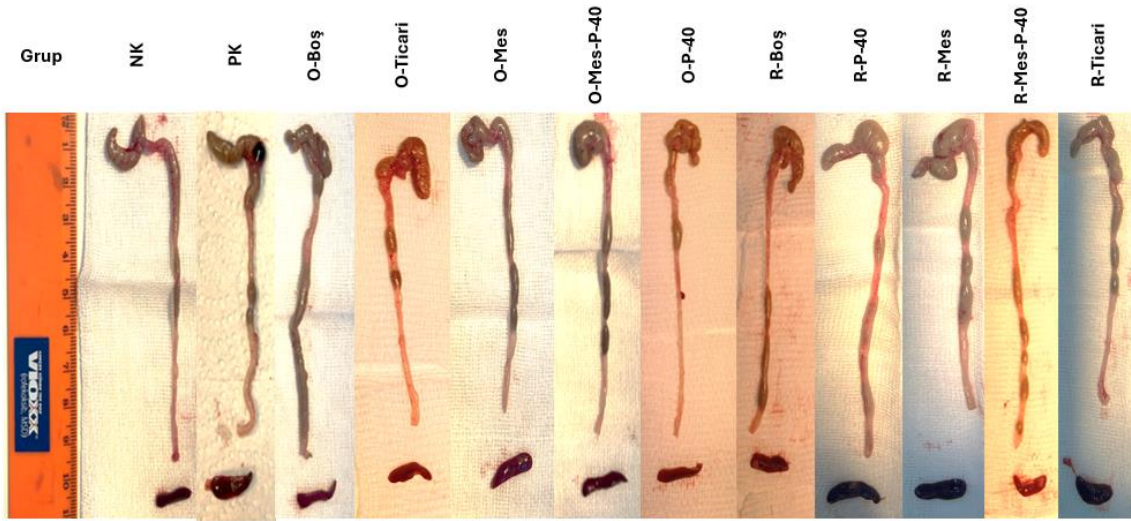
Fareler sakrifiye edildikten sonra laparotomi uygulanarak çıkartılan kolonları, Bölüm 3.15.3'te verilen Çizelge 3.18'de yer alan patolojik bulgular ve bunlara karşılık gelen skora göre makroskopik olarak değerlendirilmiştir. Farelerin kolonik makroskopik skor değerleri ve gruplar arasında istatistiksel karşılaştırma Şekil 4.107'de sunulmuştur. PK grubu ile karşılaştırıldığında R-Mes, O-Mes, O-Boş ve O-Ticari kodlu gruplar hariç diğer grupların makroskopik skorlarında anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.107. Farelerin kolon dokularına ait makroskobik skor değerleri (n=4-6, Ortalama±SH, ns: p>0,05, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p<0,0001)

4.14.2. Gruplara ait kolon örneklerinin makroskobik görünümü

Bölüm 3.15.2’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen tedavi protokolünün tamamlanmasından sonra sıçanlar sakrifiye edilmiş ve batinları açılarak tüm kolonları çıkarılmıştır. Kolonlar çıkarıldıktan hemen sonra on iki farklı gruba ait kolonik doku görüntüleri Resim 4.7’de verilmiştir. Görüntülere göre pozitif kontrol grubuna (PK) göre tüm tedavi gruplarında kolonda iyileşme gözlenmiştir.

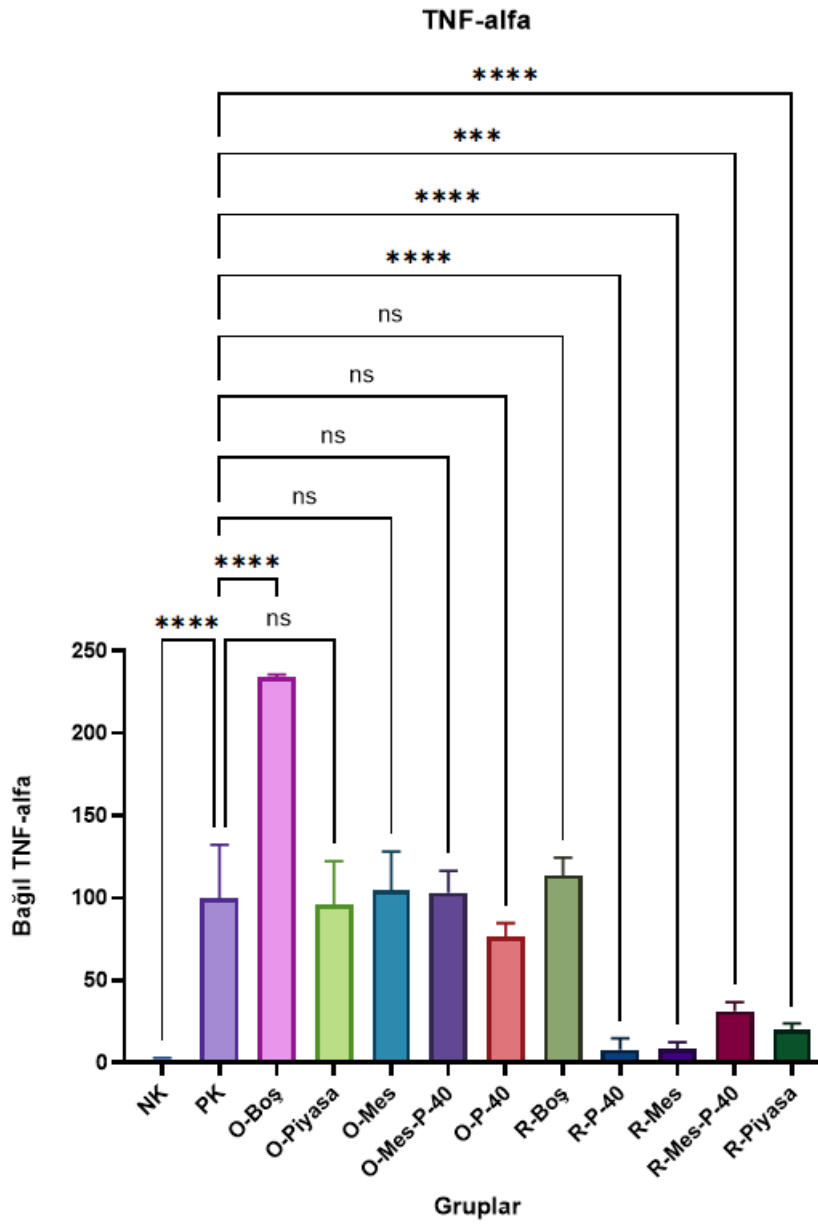


Resim 4.7. Gruplara ait kolon örneklerinin makroskobik görünümü

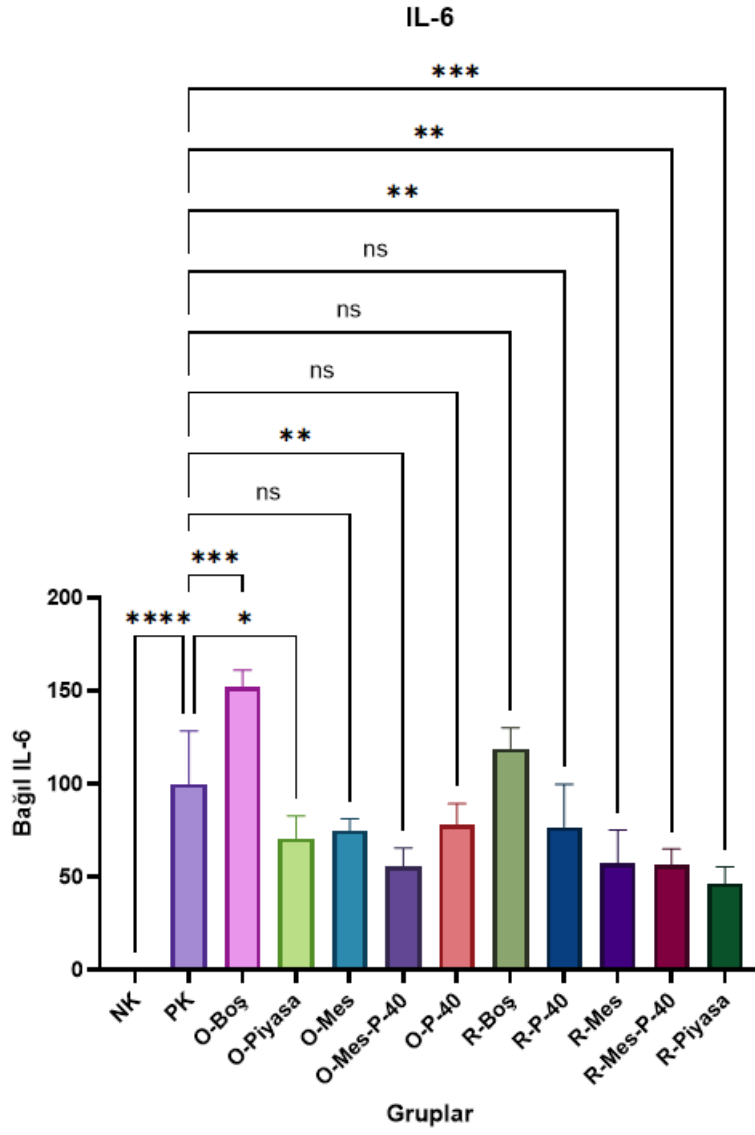
4.14.3. Kolon mukozasında yapılan biyokimyasal çalışmalara ait bulgular

TNF- α , IL-6 ve IL-12 seviyelerine ait bulgular

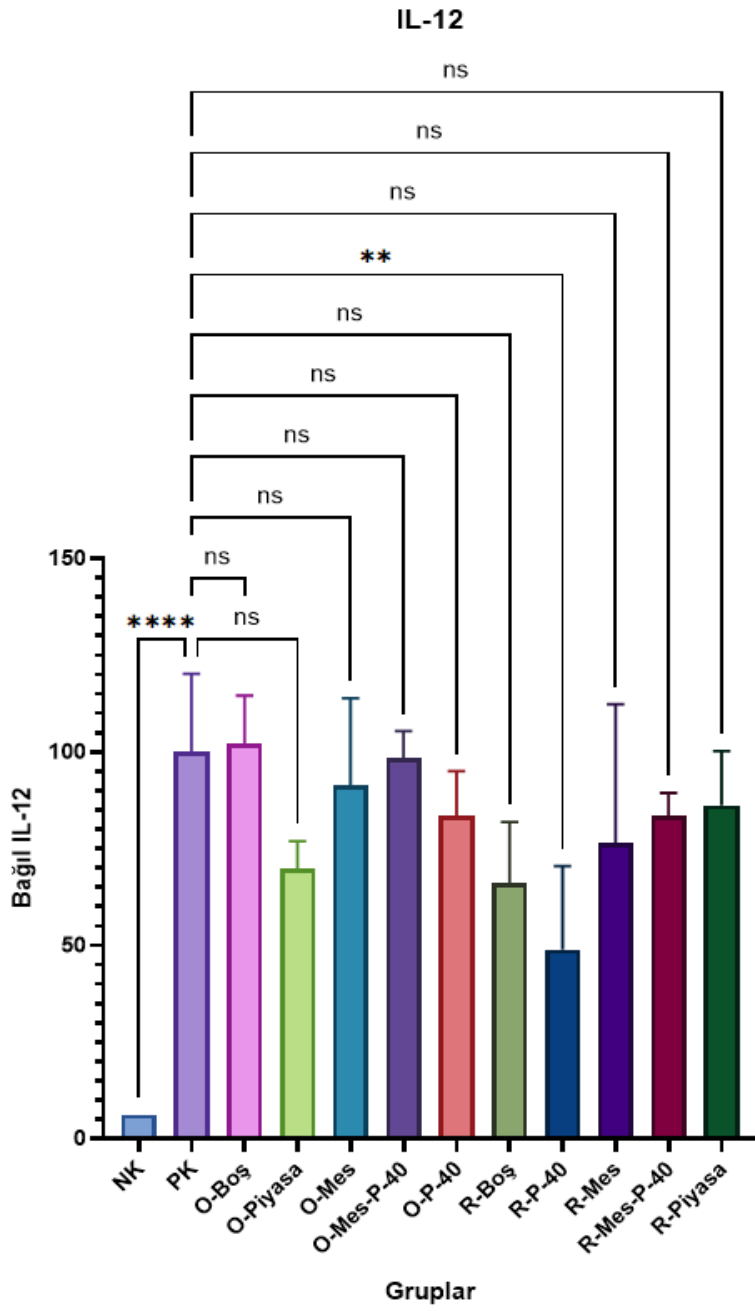
Kolon mukozalarında TNF- α , IL-6 ve IL-12 seviyelerinin ölçülmesi Bölüm 3.15.5’te anlatıldığı gibi ELISA kitleri ile on iki farklı grubun kolon dokuları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. TNF- α seviyeleri Şekil 4.108’de, IL-6 seviyeleri Şekil 4.109’da ve IL-12 seviyeleri Şekil 4.110’da sunulmuştur.



Şekil 4.108. Farelerin kolon dokularındaki TNF- α seviyeleri (n=4-6, Ortalama $\pm$ SH; ns: p>0,05, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p <0,0001)



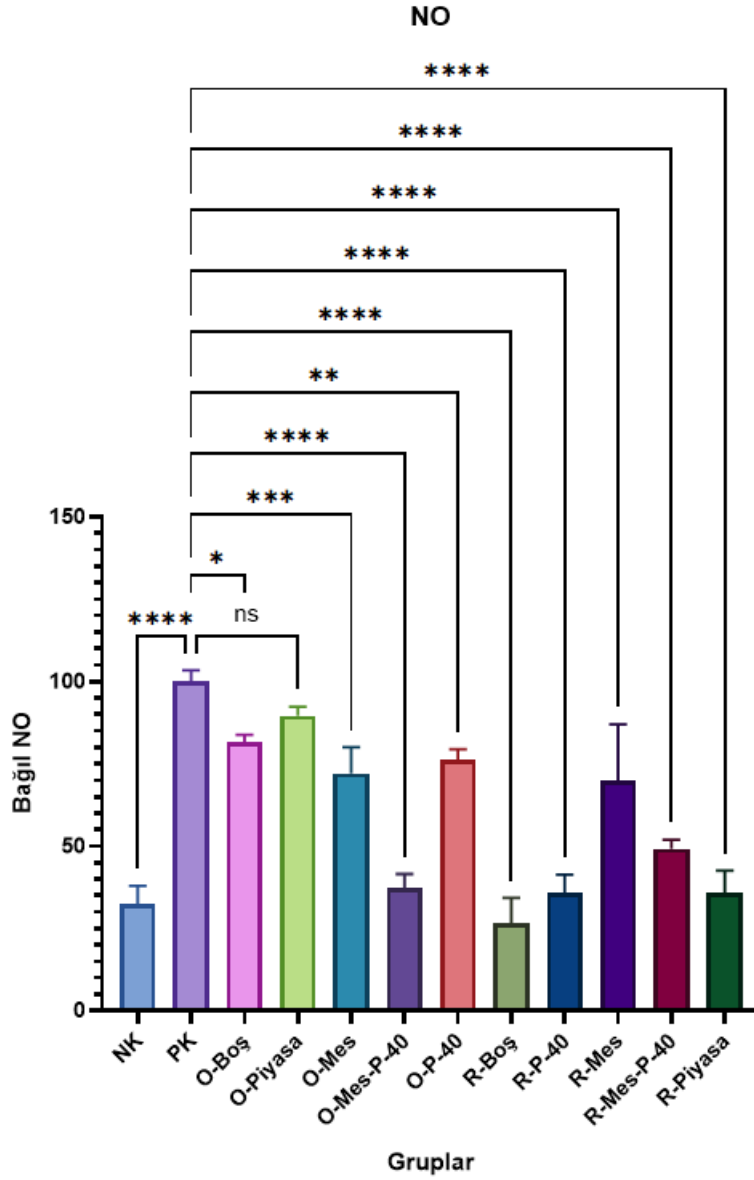
Şekil 4.109. Farelerin kolon dokularındaki IL-6 seviyeleri (n=4-6, Ortalama±SH; ns: p>0,05, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p<0,0001)



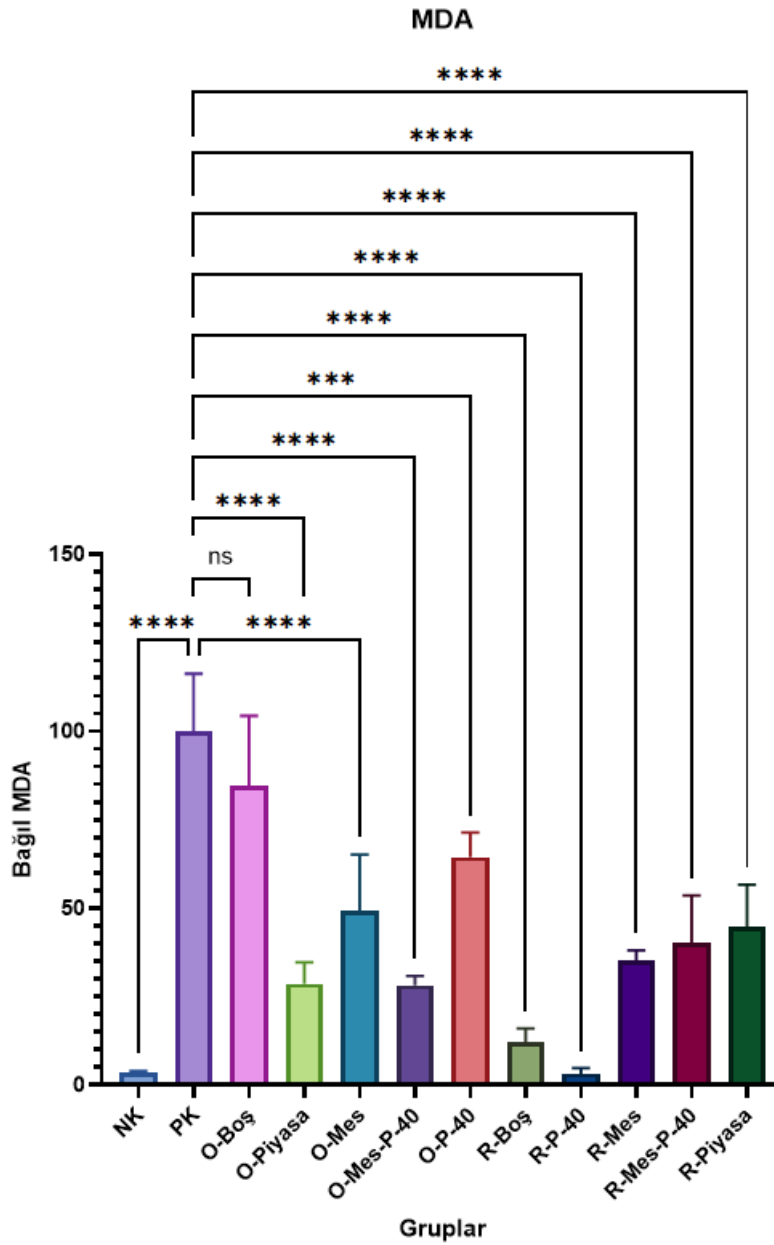
Şekil 4.110. Farelerin kolon dokularındaki IL-12 seviyeleri (n=4-6, Ortalama±SH; ns: p>0,05, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p<0,0001)

NO ve MDA seviyelerine ait bulgular

Kolon mukozalarında NO ve MDA seviyelerinin ölçülmesi Bölüm 3.15.5'te anlatıldığı gibi on iki farklı grubun kolon dokuları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. NO seviyeleri Şekil 4.111'de, MDA Şekil 4.112'de sunulmuştur.



Şekil 4.111. Farelerin kolon dokularındaki NO seviyeleri (n=4-6, Ortalama±SH; ns: p>0,05, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p <0,0001)



Şekil 4.112. Farelerin kolon dokularındaki MDA seviyeleri (n=4-6, Ortalama±SH; ns: p>0,05, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p <0,0001)

4.14.4. Histolojik çalışmalara ait bulgular

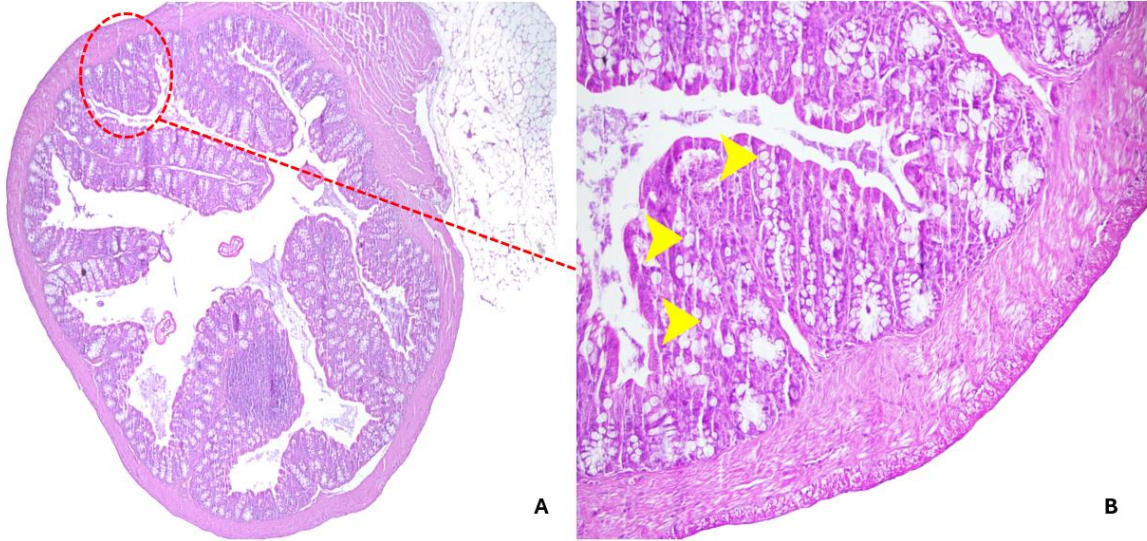
Histolojik çalışmalar kapsamında Bölüm 3.15.6'da anlatıldığı gibi on iki deney grubundan alınan kolon dokuları ile histomorfolojik ve immumohistokimyasal çalışmalar yapılmıştır.

Histomorfolojik çalışmalar

Farelerden alınan kolon doku örnekleri Hematoksilen&Eosin boyaması yapılarak histomorfolojik olarak değerlendirilmiştir.

Grup NK: Negatif kontrol

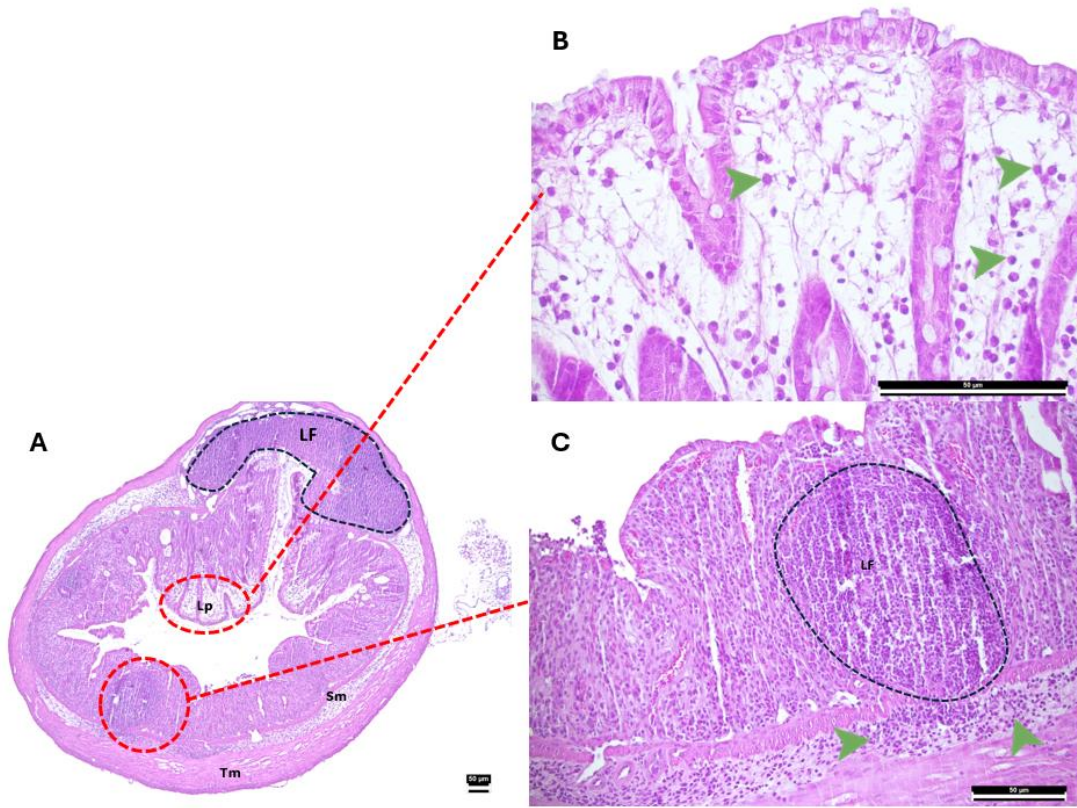
Negatif kontrol olarak incelenen gruptaki kolonlarda kriptlerin derinlikleri, epitel hücrelerinin morfolojisi ve kadeh hücrelerinin (sarı ok başı) yoğunluğu, kolon histolojisi ile uyumlu bulunmuştur. Negatif kontrol grubuna ait histomorfolojik görüntüler Resim 4.8'de sunulmuştur.



Resim 4.8. Negatif kontrol grubunda (Grup NK) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama, Sarı oklar: Kadeh hücreleri)

Grup PK: Pozitif kontrol

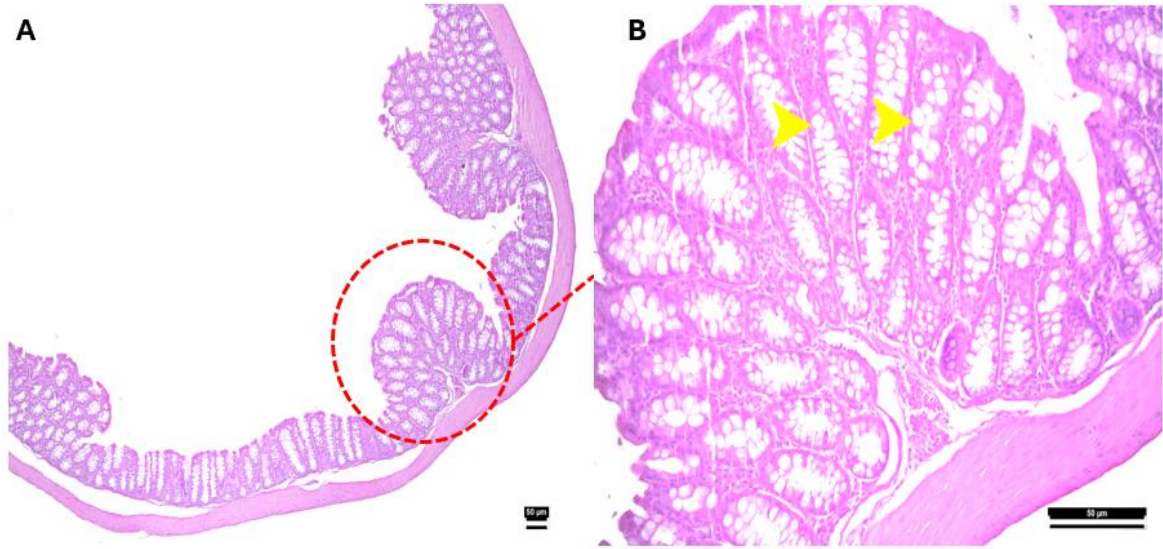
İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulmuş farelerden oluşan pozitif kontrol grubunda kriptlerin ortadan kaybolduğu, kadeh hücresi sayısının azaldığı lamina propriyada (Lp) ve submukozada (Sm) yoğun lenfoid hücre infiltrasyonlarının (yeşil ok) varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca submukozada genişleme ve yaygın lenf foliküllerinin (LF) bulunduğu gözlenmiştir. Pozitif kontrol grubuna ait histomorfolojik görüntüler Resim 4.9'da sunulmuştur.



Resim 4.9. Pozitif kontrol grubunda (Grup PK) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B ve C:20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama, Yeşil oklar: lenfoid hücre infiltrasyonları, Lp: lamina propriya, Sm: submukoza, LF: Lenf folikülleri, Tm: Tunika)

Grup O-Boş: İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulananan grup

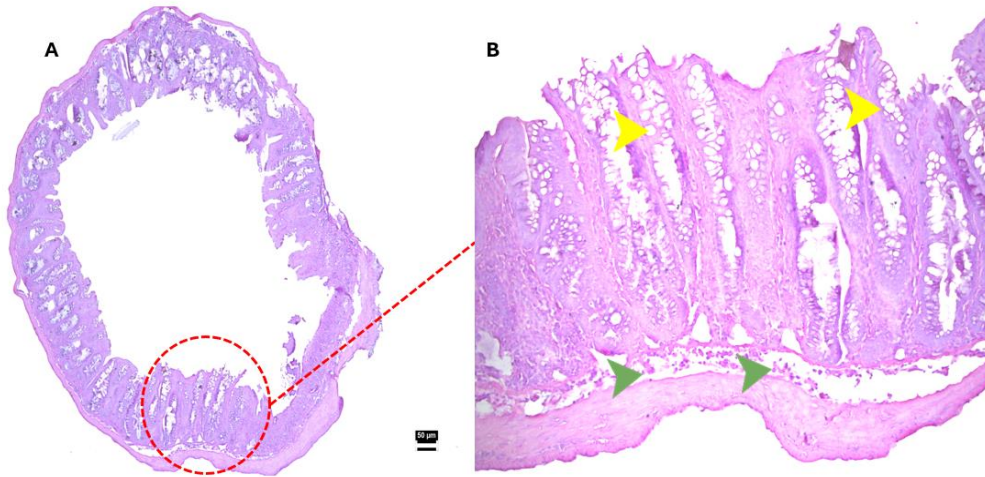
İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulananan grupta oral uygulama sonrası kolon mukozasının normal histolojik görüntüye yakın olduğu ancak submukozada hücre infiltrasyonlarının mevcut olduğu gözlenmiştir. Grup-O-Boş'a ait histomorfolojik görüntüler Resim 4.10'da sunulmuştur.



Resim 4.10. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup O-Boş) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama, Sarı oklar: Kadeh hücreleri)

Grup O-Ticari: İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral ticari Pentasa® (500 mg) preparatı uygulanan grup

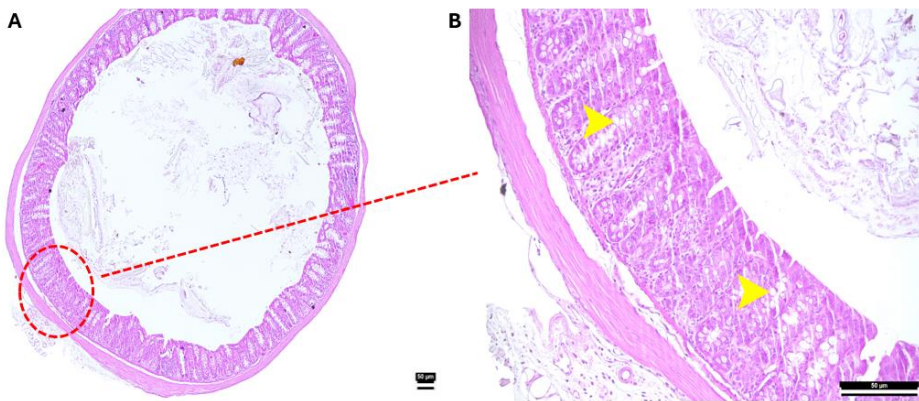
İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral ticari Pentasa® (500 mg) preparatı uygulanan grupta kolon epitelinin bütünlüğü bozulmuştur. Lenfoid hücre infiltrasyonlarına (yeşil ok) ve lenf foliküllerine (LF) rastlanmıştır. Grup O-Ticari'ye ait histomorfolojik görüntüler Resim 4.11'de sunulmuştur.



Resim 4.11. İnfiamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral ticari Pentasa® (500 mg) preparatı uygulanan grupta (Grup O-Ticari) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama, Sarı oklar: Kadeh hücreleri)

Grup O-Mes: İnfiamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral mesalazin yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grup

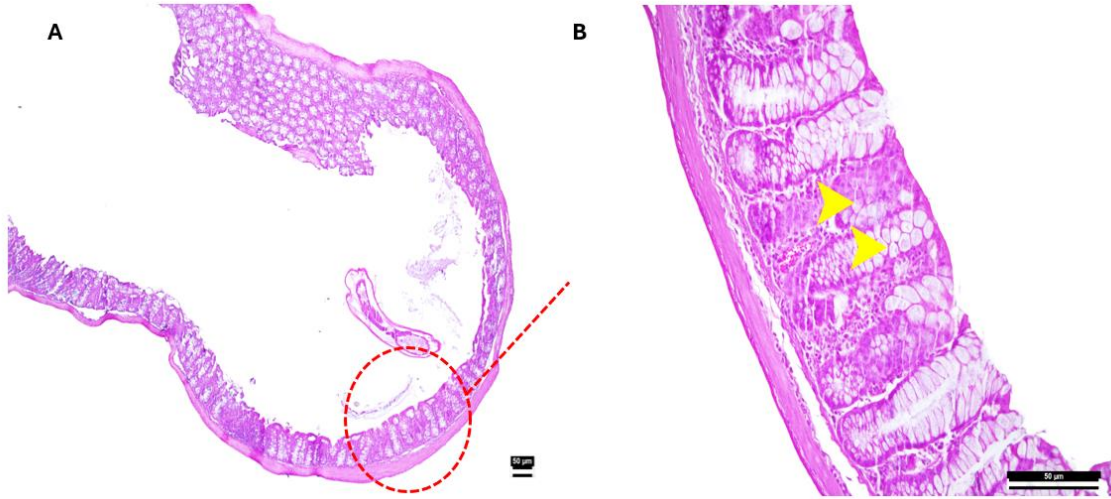
İnfiamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral mesalazin yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta inflamasyonun baskılandığı ancak negatif kontrol grubuna göre kript derinliklerinin ve kadeh hücre yoğunluğunun azaldığı görülmüştür. Grup O-Mes'e ait histomorfolojik görüntüler Resim 4.12'de sunulmuştur.



Resim 4.12. İnfiamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral mesalazin yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup O-Mes) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama, Sarı oklar: Kadeh hücreleri)

Grup O-Mes-P-40: İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral mesalazin ve kitozan:TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grup

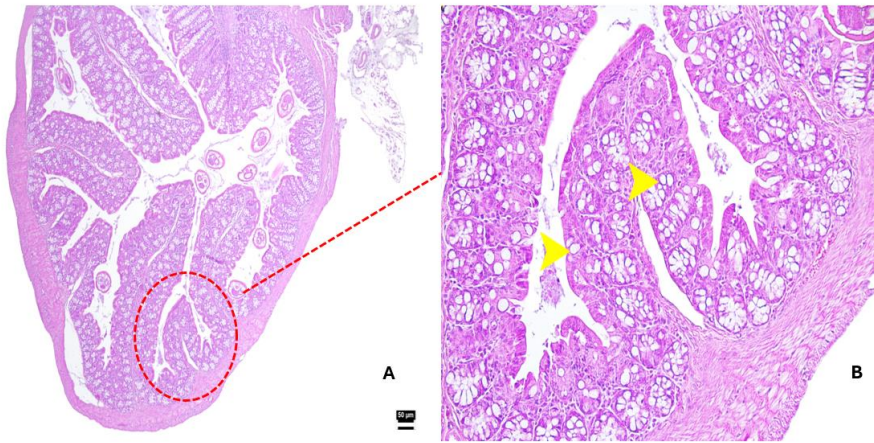
İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral mesalazin ve kitozan:TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta kolonların histomorfolojik değerlendirmesi negatif kontrol grubu (Grup NK) ile benzer bulunmuştur. Grup O-Mes-P-40'a ait histomorfolojik görüntüler Resim 4.13'te sunulmuştur.



Resim 4.13. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral mesalazin ve kitozan:TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup O-Mes-P-40) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoxilen&Eosin boyama, Sarı oklar: Kadeh hücreleri)

Grup O-P-40: İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral kitozan:TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grup

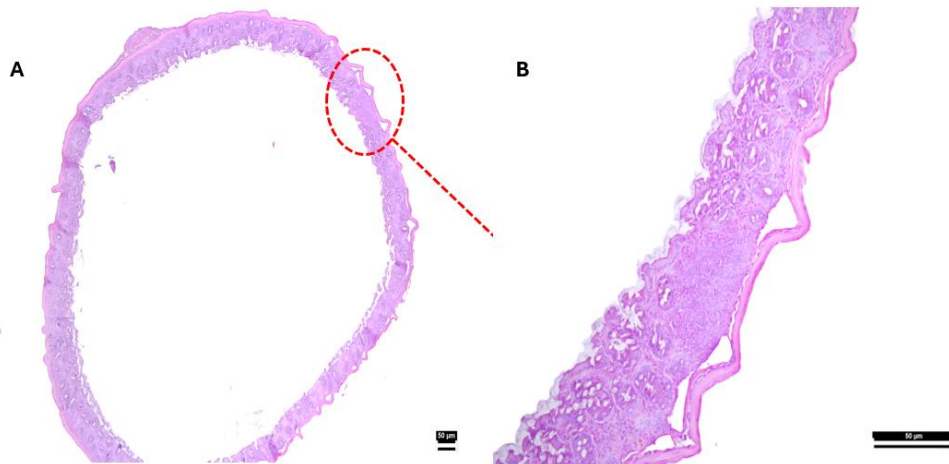
İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral kitozan:TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta kolon mukozasının durumu negatif kontrol grubuna (Grup NK) en yakın gruptan biri olarak bulunmuştur. Grup O-P-40'a ait histomorfolojik görüntüler Resim 4.14'te sunulmuştur.



Resim 4.14. İnfiamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral kitozan:TNF- α siRNA polipleksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup O-P-40) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama, Sarı oklar: Kadeh hücreleri)

Grup R-Boş: İnfiamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grup

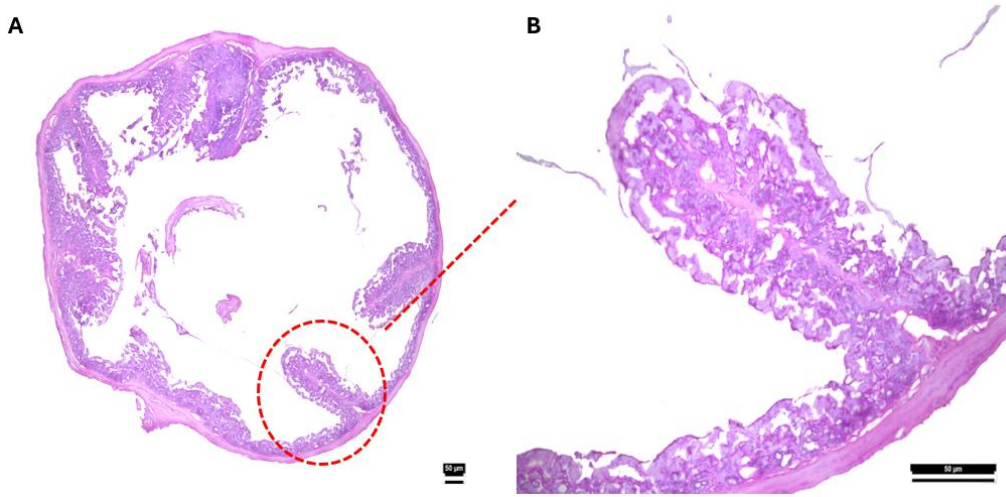
İnfiamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta kriptlerin derinliklerinin ve kadeh hücrelerinin yoğunluğunun negatif kontrol grubuna (Grup NK) göre azaldığı gözlenmiştir. Grup R-Boş'a ait histomorfolojik görüntüler Resim 4.15'te sunulmuştur.



Resim 4.15. İnfiamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup R-Boş) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama)

Grup R-P-40: İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal kitozan:TNF- α siRNA polipleksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grup

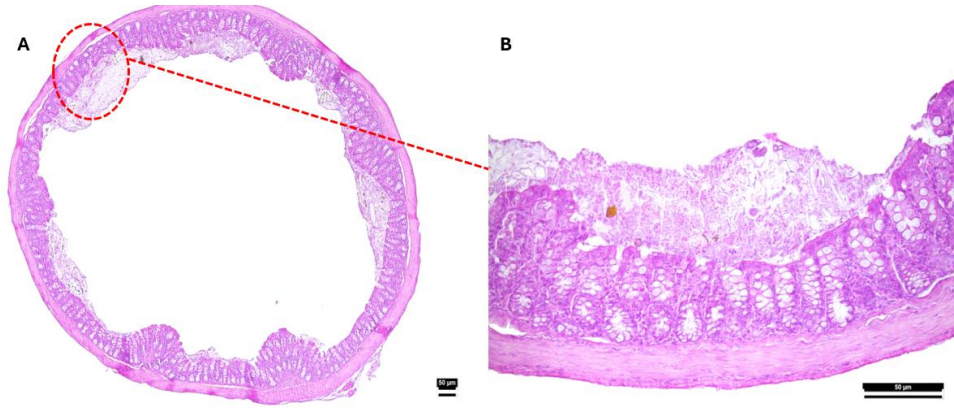
İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal kitozan:TNF- α siRNA polipleksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta epitel hücrelerinde dejenerasyon, kadeh hücresi yoğunluğunda negatif kontrol grubuna göre belirgin azalma ve lenfoid hücre infiltrasyonları tespit edilmiştir. Grup R-P-40'a ait histomorfolojik görüntüler Resim 4.16'da sunulmuştur.



Resim 4.16. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal kitozan:TNF- α siRNA polipleksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup R-P-40) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama)

Grup R-Mes: İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal mesalazin yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grup

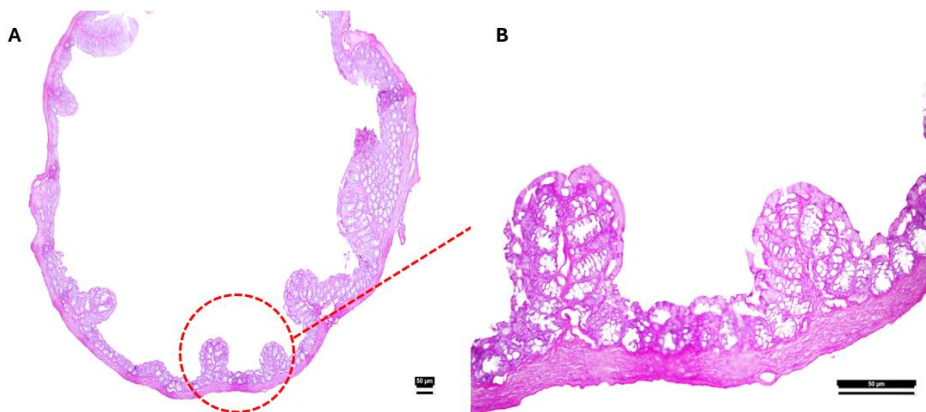
İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal mesalazin yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta inflamasyonun baskılandığı ancak negatif kontrol grubuna (Grup NK) göre kript derinliklerinin ve kadeh hücre yoğunluğunun azaldığı gözlenmiştir. Grup R-Mes'e ait histomorfolojik görüntüler Şekil Resim 4.17'de sunulmuştur.



Resim 4.17. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal mesalazin yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup R-Mes) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama)

Grup R-Mes-P-40: İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal mesalazin ve kitozan:TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grup

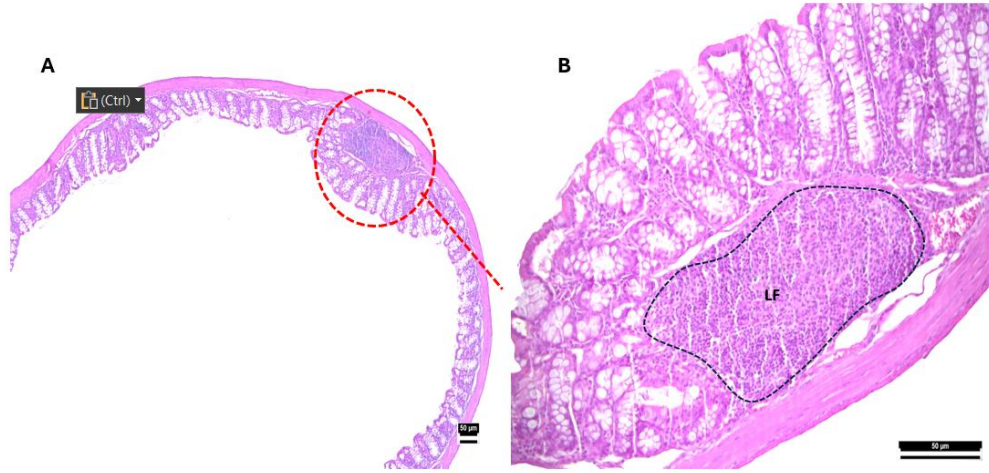
İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal mesalazin ve kitozan:TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta kolonların histomorfolojik değerlendirmesi negatif kontrol grubu (Grup NK) ile benzer bulunmuştur. Grup R-Mes-P-40'a ait histomorfolojik görüntüler Resim 4.18'de sunulmuştur.



Resim 4.18. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal mesalazin ve kitozan/TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (R-Mes-P-40) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama)

Grup R-Ticari: İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal ticari Salofalk® (500 mg) supozitivar uygulanan grup

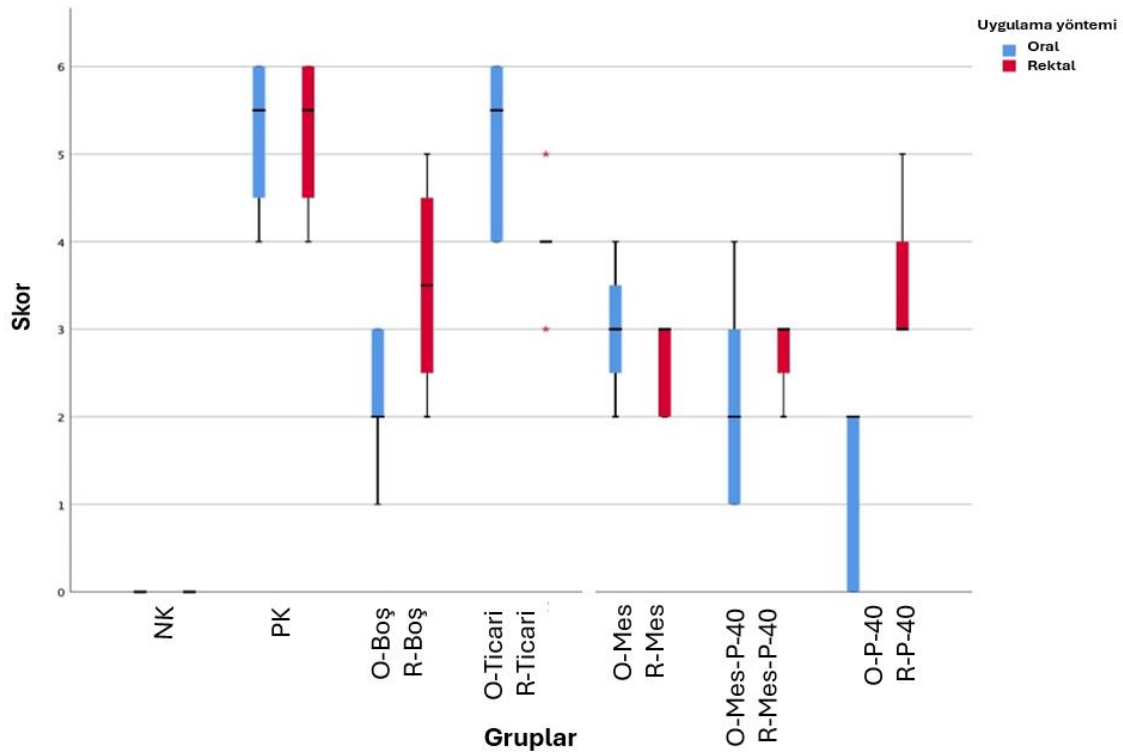
İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal ticari Salofalk® (500 mg) supozitivar uygulanan grupta kolon epitelinin bütünlüğü bozulmuştur. Lenfoid hücre infiltrasyonlarına ve lenf foliküllerine (LF) rastlanmıştır. Grup R-Ticari'ye ait histomorfolojik görüntüler Resim 4.19'da sunulmuştur.



Resim 4.19. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal ticari Salofalk® (500 mg) supozitivar uygulanan grupta (Grup R-Ticari) kolon kesitinin ışık mikroskop görüntüsü, A: 5x büyütme, B: 20x büyütme (Hematoksilen&Eosin boyama, LF: Lenf folikülleri)

Histomorfolojik skorelama

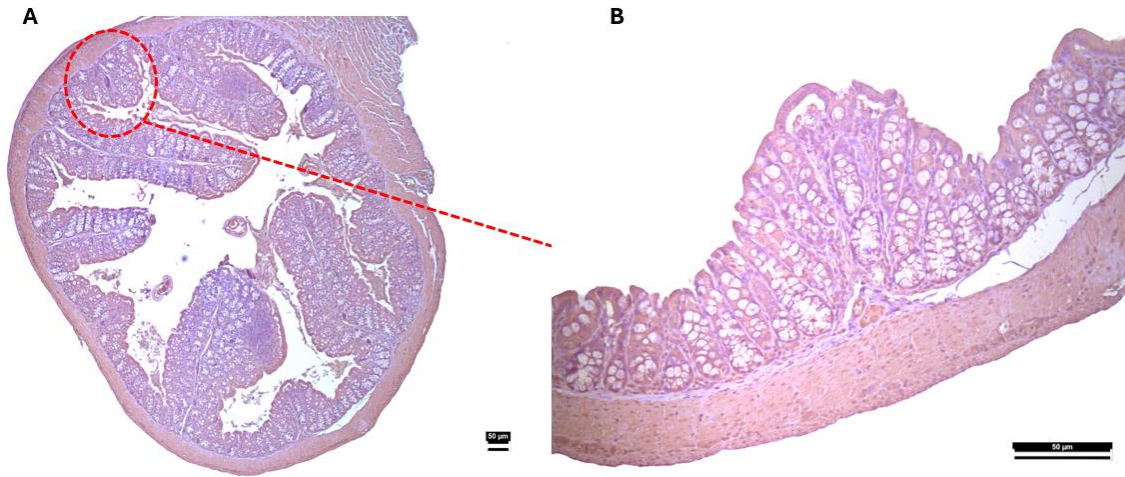
Histomorfolojik çalışmalarda histopatolojik değişikliklerin skorlanması Çizelge 3.19'da göre Bölüm 3.15.4'te anlatıldığı gibi doku hasarı ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu değerlerinin toplamına göre hesaplanmıştır. On iki deney grubuna ait histomorfolojik skorelama Şekil 4.113'te gösterilmiştir.



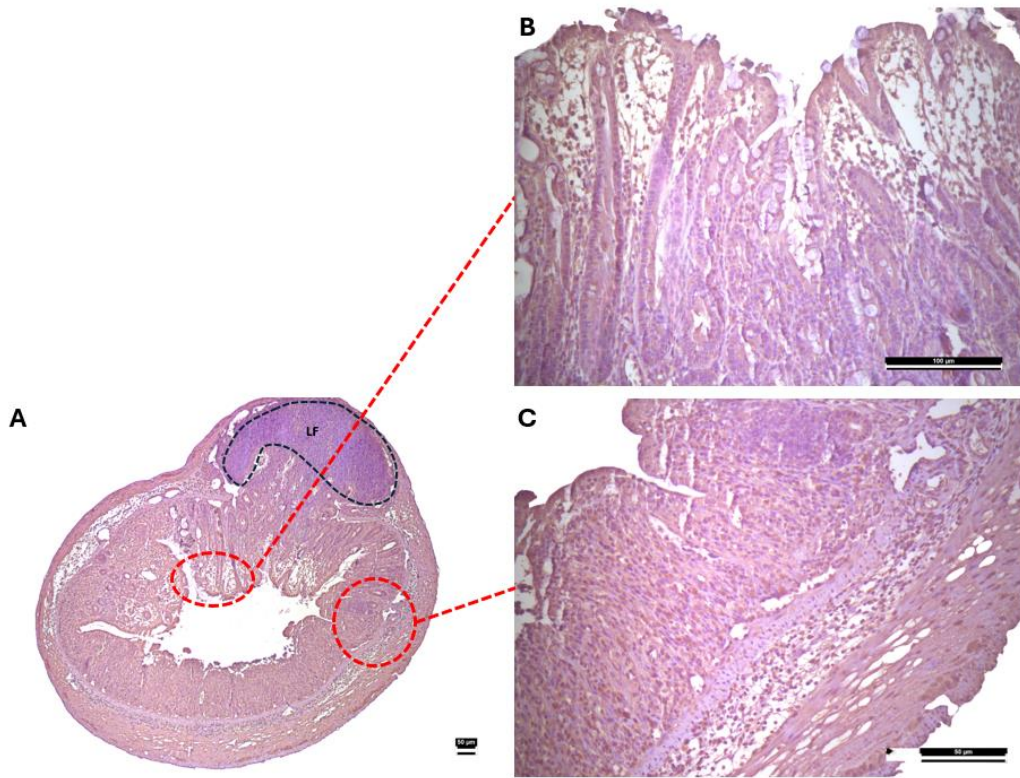
Şekil 4.113. Histomorfolojik skorelama

İmmünohistokimyasal çalışmalar

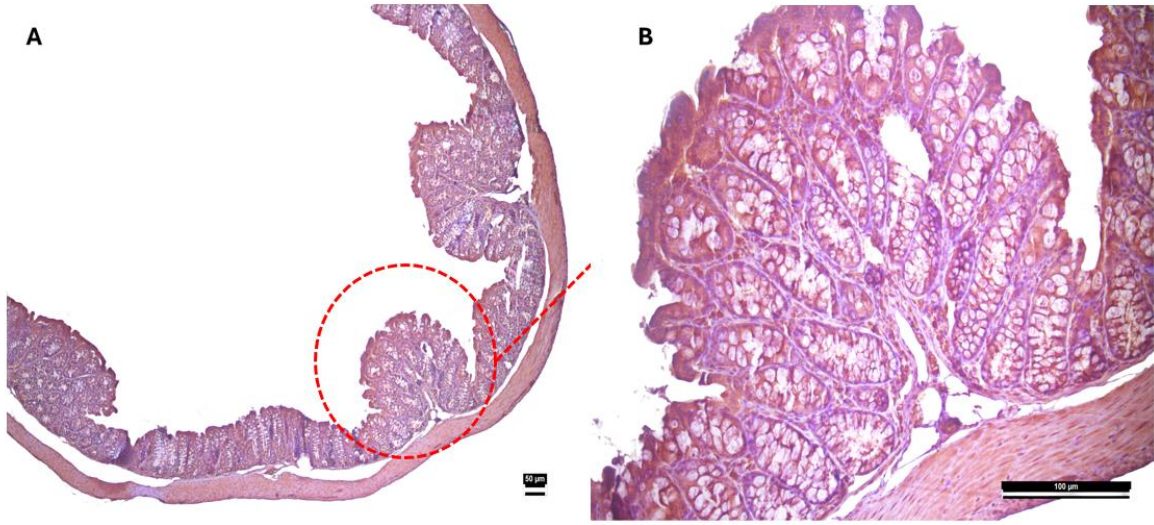
Farelerden alınan kolon doku örnekleri bir inflamasyon belirteci olan TNF- α ekspresyonu yönünden immünohistokimyasal yöntemle incelenmiştir. İmmünohistokimyasal analizler Bölüm 3.15.6'da anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. On iki deney grubunun immünohistokimyasal görüntüleri Resim 4.20-4.31 arasında verilmiştir.



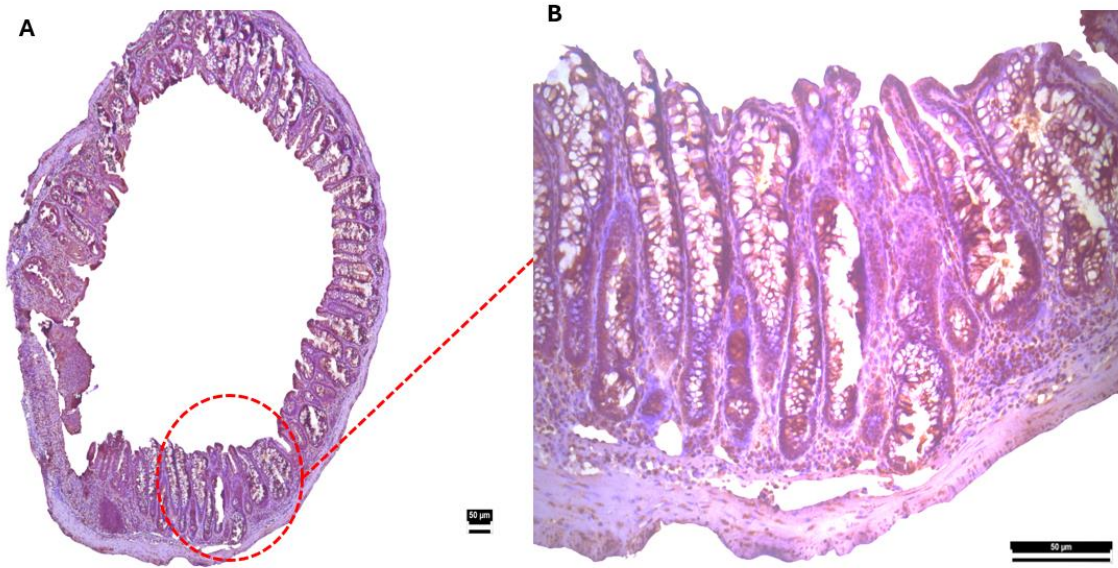
Resim 4.20. Negatif kontrol grubunda (Grup NK) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)



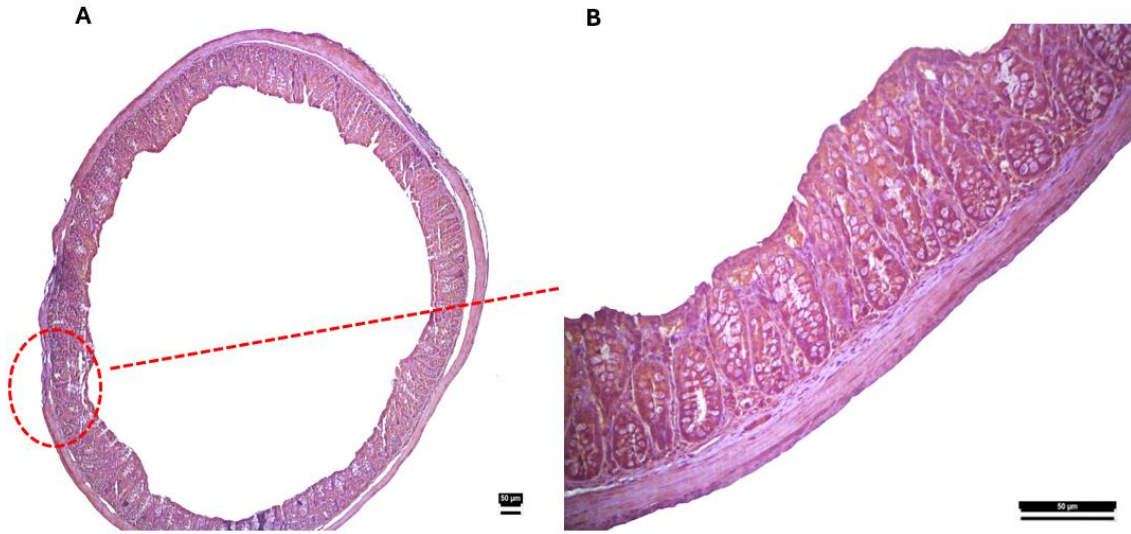
Resim 4.21. Pozitif kontrol grubunun (Grup PK) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B ve C: 20x büyütme, LF: Lenf folikülleri)



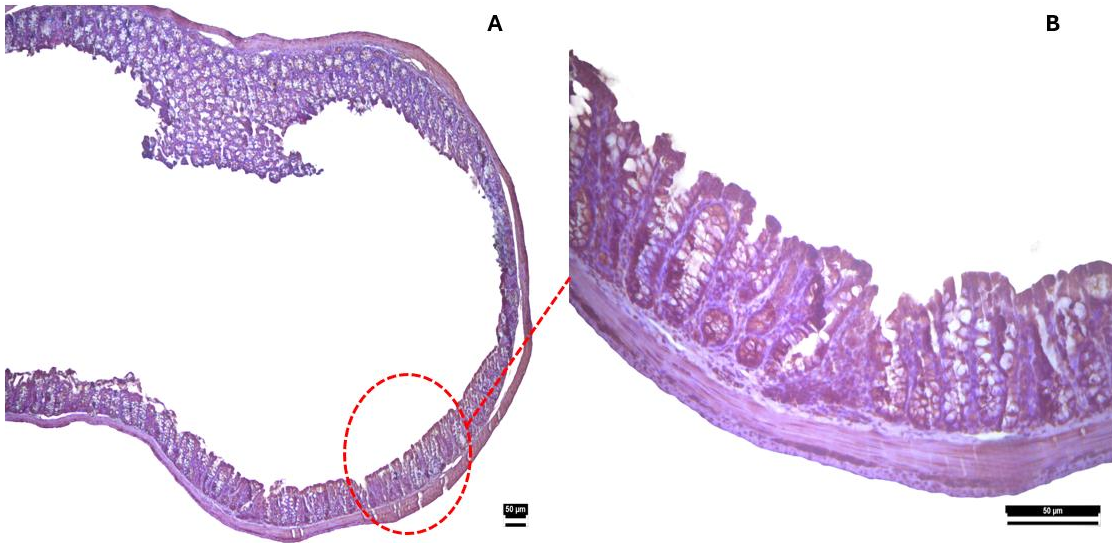
Resim 4.22. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup O-Boş) kolon kesitinin immünohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)



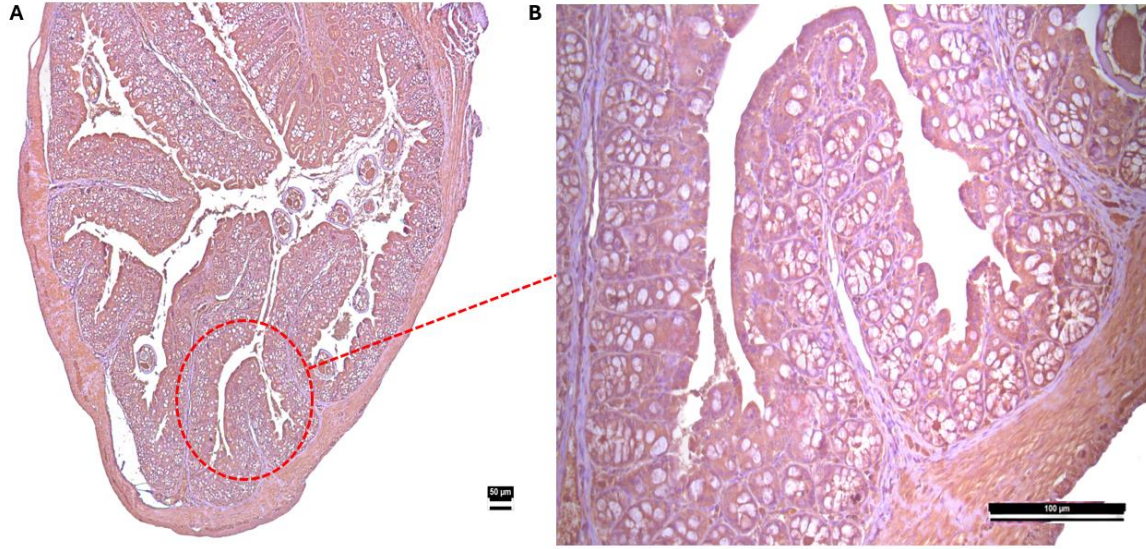
Resim 4.23. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral ticari Pentasa® (500 mg) preparatı uygulanan grupta (Grup O-Ticari) kolon kesitinin immünohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)



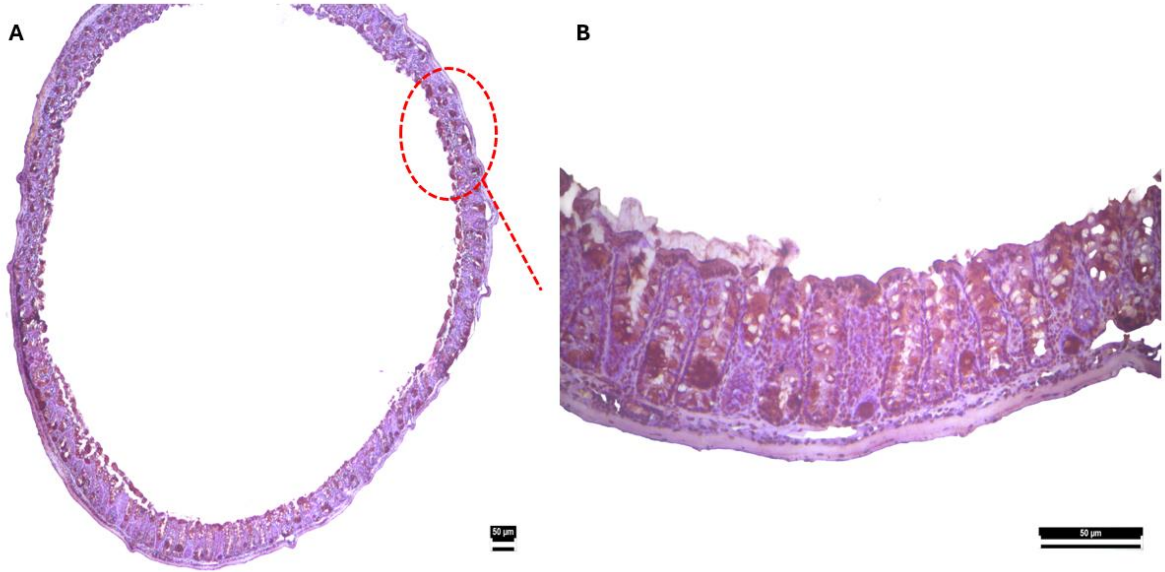
Resim 4.24. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral mesalazin yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup O-Mes) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)



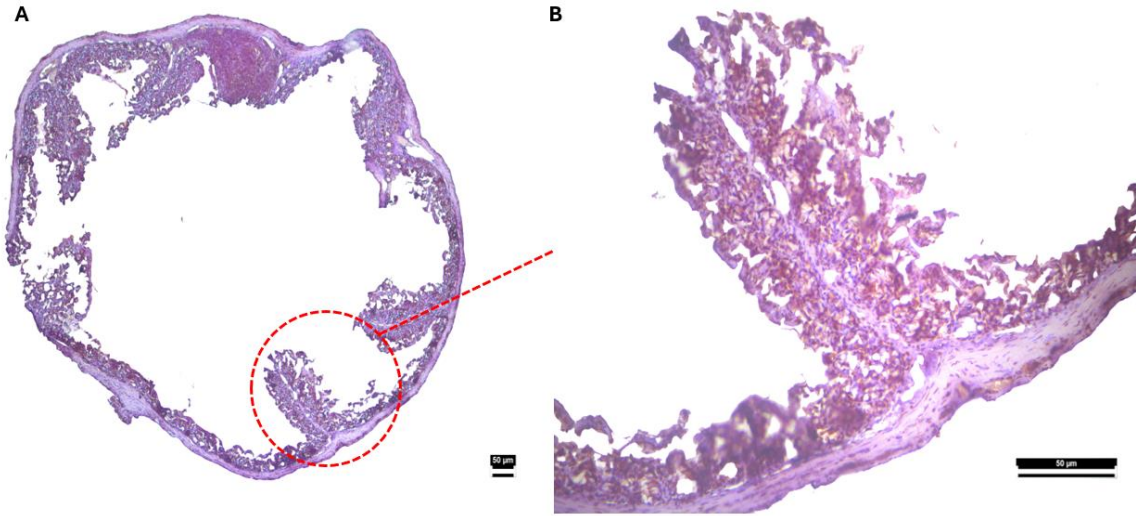
Resim 4.25. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral mesalazin ve kitozan:TNF- α siRNA polipleksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup O-Mes-P-40) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)



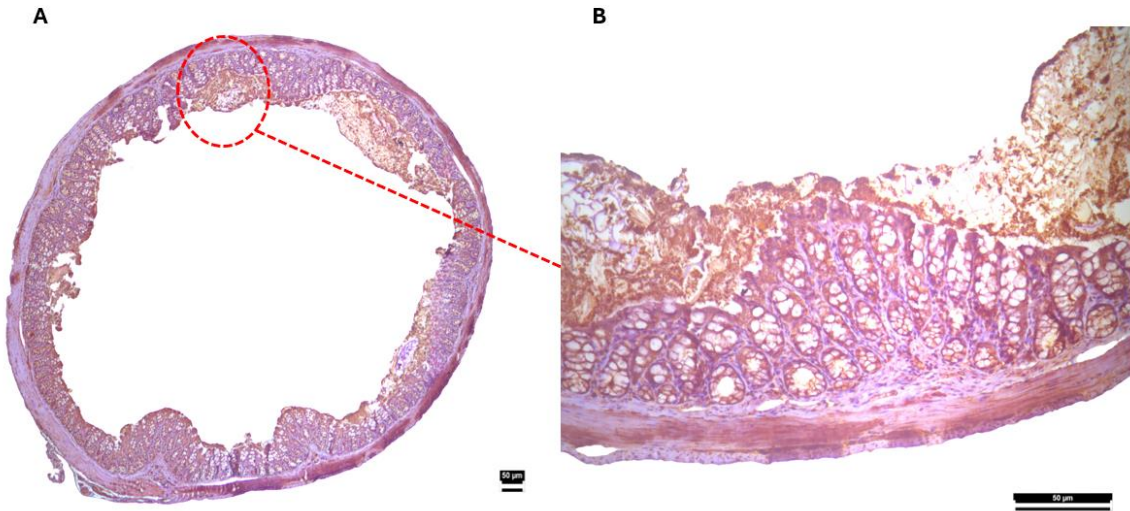
Resim 4.26. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral kitozan:TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup O-P-40) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)



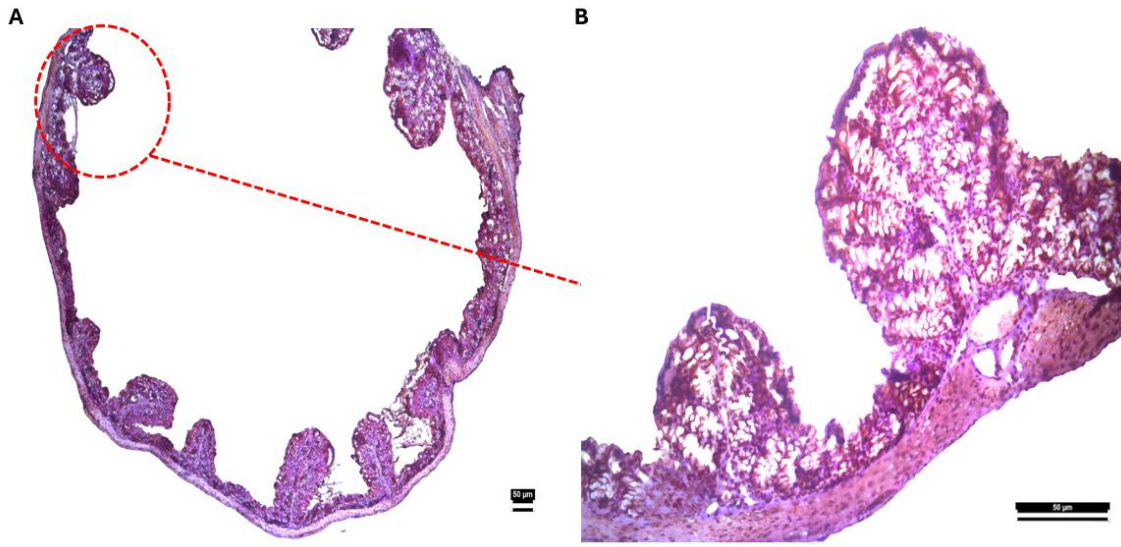
Resim 4.27. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup R-Boş) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)



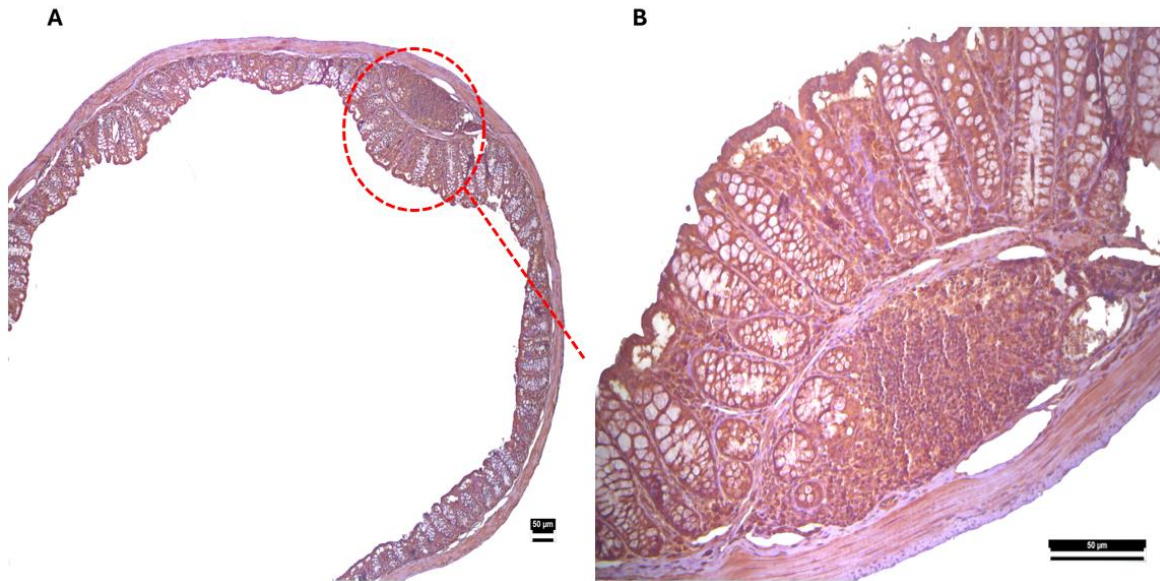
Resim 4.28. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal kitozan:TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup R-P-40) kolon kesitinin immünohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)



Resim 4.29. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal mesalazin yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup R-Mes) kolon kesitinin immünohistokimyasal görüntüsü A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)



Resim 4.30. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal mesalazin ve kitozan:TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta (Grup R-Mes-P-40) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)



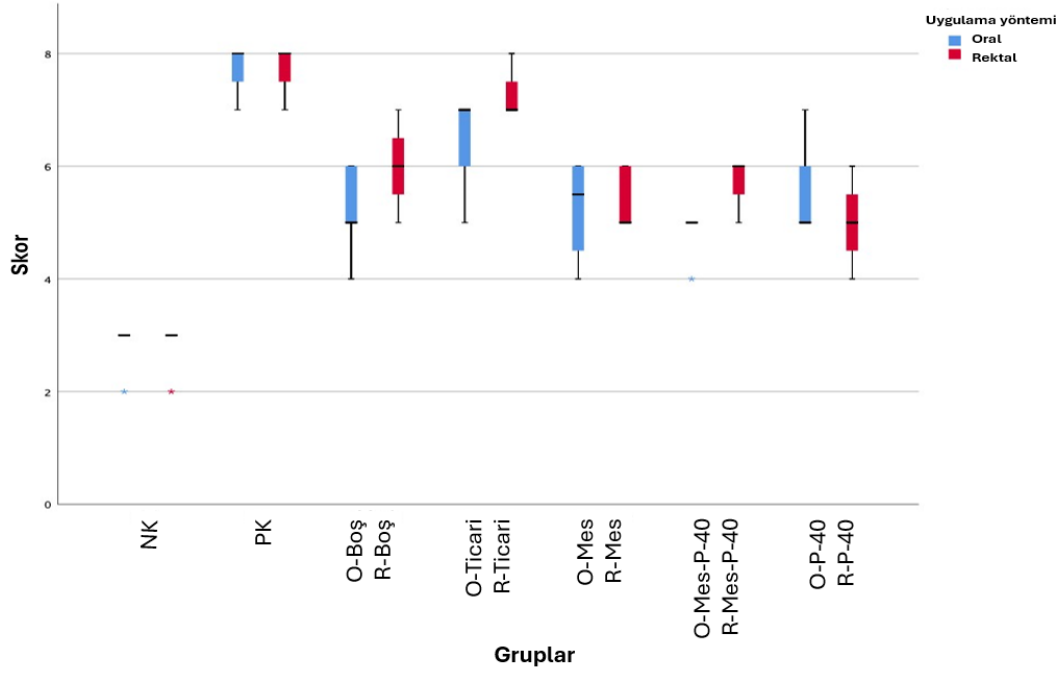
Resim 4.31. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal ticari Salofalk® (500 mg) supozituar uygulanan grupta (Grup R-Ticari) kolon kesitinin immunohistokimyasal görüntüsü (A: 5x büyütme, B: 20x büyütme)

İmmunohistokimyasal analiz sonuçlarına göre negatif kontrol grubunda (Grup NK) epitelin lümenine bakan apikal yüzlerinde ve tunika muscularis (Tm) katmanındaki düz kaslarda pozitifliğe rastlanmıştır. Bu durum TNF- α ekspresyonunun normal

kolonda az da olsa ifade edildiğini göstermiştir. Pozitif kontrol grubunda (Grup PK) ise epitelin tamamında lamina propria ve submukozadaki lenfoid hücrelerde ve yine tunika musculariste TNF- α pozitif alanlar mevcuttur. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra rektal ve oral yolla ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu (Grup O-Boş-Grup R-Boş) uygulanan ve mesalazin yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan (Grup O-Mes- Grup R-Mes) gruplarda pozitif kontrole göre kolon mukozasındaki TNF- α ifadesinin pozitif boyanma yoğunluğu göreceli olarak daha az bulunmuştur. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra Kitozan:TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan grupta oral grupta (Grup O-P-40) TNF- α ifadesi yüksekken rektal grupta (Grup R-P-40) kullanım sonrası düşüktür. Bunun sebebinin epitel hücrelerinde oluşan dejenerasyondan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra mesalazin ve kitozan/TNF- α siRNA polileksi yüklü ipek fibroin-temelli hidrojel formülasyonu uygulanan gruplarda (Grup O-Mes-P-40-Grup R-Mes-P-40) TNF- α ifade düzeyi diğer deney gruplarına göre daha az bulunmuştur. İnflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulduktan sonra oral ticari Pentasa® tablet uygulanan grupta (Grup O-Ticari) TNF- α ifadesi düşük bulunmuşken, rektal ticari Salofalk® supozituar uygulanan grupta (Grup R-Ticari) kullanım sonrası hem kolon epitel hücrelerinde hem de lenf foliküllerinde TNF- α pozitif olarak bulunmuştur.

İmmunohistokimyasal skorlama

TNF- α için immünohistokimyasal skor, pozitif boyalı hücrelerin yüzdesi ve yoğunluk puanlarının toplamına göre Bölüm 3.15.6'da anlatıldığı gibi hesaplanmıştır. On iki deney grubuna ait immunohistokimyasal skorlama Şekil 4.114'te gösterilmiştir.



Şekil 4.114. İmmunohistokimyasal skorelama sonuçları



5. TARTIŞMA

Tez kapsamında 3B biyobaskı teknolojisi kullanılarak sodyum aljinat/ipek fibroin/ hyaluronik asit temelli, mesalazin ve TNF- α siRNA yüklü oral ve rektal hidrojeller geliştirilmiştir. İlk olarak ipek böceği kozalarından ipek fibroin eldesi ve bu işlemin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Farklı oranlarda sodyum aljinat/ipek fibroin/ hyaluronik asit karıştırılarak 3B biyobaskıda kullanılmak üzere biyomürekkep formülasyonları hazırlanmıştır. Karakterizasyon çalışmaları kapsamında biyomürekkep formülasyonlarının viskozite, yüzey gerilimi ölçümleri gerçekleştirilmiş, basılabilirlik parametreleri ve mesalazin salım profilleri değerlendirilmiştir. Yapılan bu çalışmalar sonucunda oral ve rektal uygulamada kullanılmak üzere iki ayrı optimum biyomürekkep formülasyonu seçilmiştir. Daha sonra hidrojellere yüklenmek üzere farklı oranlarda kitozan:TNF- α siRNA polipleksleri hazırlanmış ve jel retardasyon, partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları kapsamında sitotoksosite ve in vitro gen susturma çalışmaları yapılmıştır. İn vitro gen susturma çalışmasından sonra optimum polipleks formülasyonu belirlenmiştir. Daha sonra 3B biyobaskı teknolojisi kullanılarak oral ve rektal mesalazin ve kitozan: kitozan:TNF- α siRNA polipleksi yüklü hidrojel formülasyonları üretilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları kapsamında DSC, FTIR, XRD, TGA analizleri, şişme kapasitesi ölçümleri, in vitro parçalanma çalışması, morfolojik analizler, mekanik testler ve mukoadesyon deneyleri yapılmıştır. Oral ve rektal hidrojellerden mesalazin ve TNF- α siRNA salımı değerlendirilmiş, salım kinetikleri hesaplanmıştır. Hidrojellerden mesalazin salım profili oral ve rektal piyasa preparatlarıyla karşılaştırılmıştır. İn vivo deneyler kapsamında DSS ile İBH oluşturulmuş farelere oral, rektal hidrojeller ve piyasa preparatları uygulanmıştır. İn vivo çalışmalar sonucunda biyokimyasal ve histolojik bulgular elde edilmiştir ve bu bulgular karşılaştırılmıştır. Böylelikle tez çalışmamızda İBH'de kullanılmak üzere 3B biyobaskı teknolojisiyle sodyum aljinat/ipek fibroin/ hyaluronik asit temelli TNF- α siRNA yüklü oral ve rektal hidrojeller başarıyla geliştirilmiştir.

5.1. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

5.1.1. Mesalazinin miktar tayini yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu

Etkin madde miktar tayini yöntemi olarak UV-Vis spektrofotometre kullanılmıştır. Etkin miktar tayininde kullanılan yöntemlerin doğru, kesin ve tekrarlanabilir olduğunun validasyon çalışmalarıyla kanıtlanması gerekmektedir. Bu nedenle çalışmamızda kullanılan UV-Vis spektrofotometre analiz yöntemleri valide edilerek analizlerde elde edilen sonuçların güvenilir olduğu garanti altına alınmıştır.

Çalışmada mesalazinin Şekil 4.1-4.3'te verilen UV spektrumları incelendiğinde, pH 1,2, 0,1 N HCl tampon çözeltilerinde maksimum absorbans verdiği dalga boyunun 300 nm, distile su, pH 6,8-1, 2. pH 6,8 ve pH 7.4 tampon çözeltilerinde ise maksimum absorbans verdiği dalga boyunun 330 nm olduğu görülmüştür. Bu dalga boyu literatür ile uyumlu bulunmuştur (Acharjya ve diğerleri, 2011; Wójcik-Pastuszka ve diğerleri 2020; Brittain, 1994).

Doğrusallık analizleri tüm ortamlar için gerçekleştirilmiş (Şekil 4.4-4.6) ve derişim-absorbans grafikleri çizilmiştir. Derişim-absorbans eğrilerinin r^2 değerleri bütün ortamlar için 1'e yakın bulunmuştur ve bu durum tüm ortamlarda ilişkinin doğrusal olduğunu göstermiştir. Böylece, ölçülen absorbans kullanılarak derişim değerlerinin doğru olarak elde edileceği kanıtlanmıştır.

Analizlerde kullanılacak miktar tayin yönteminin kesinliği, bu yöntem ile elde edilen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanan derişim değerlerinin birbirine yakınlığı ile kanıtlanmaktadır. Çalışmamızda kullanılan analiz yönteminin kesinliği ICH Q2(R1) kılavuzu doğrultusunda bütün ortamlar için gerçekleştirilmiştir. Kesinlik tayinleri deney içi kesinlik ve deneyler arası kesinlik olmak üzere iki farklı çalışma ile yapılmıştır. Derişimlerin yakın olması ICH Q2 (R1) kılavuzunda yer alan %bağıl sapma değerinin %2'nin altında olup olmamasına göre değerlendirilmiştir. Çizelge 4.1-4.12'de yer alan kesinlik çalışmalarının sonuçlarına göre bütün %bağıl sapma değerlerinin %2'nin altında olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar ile kullanılan analiz yönteminin kesinliği ve gün içi veya günler arası gerçekleştirilen deneylerin

tekrarlanabilir olduğu kanıtlanmıştır (Moharana ve diğeri, 2011; Patel ve diğeri, 2010).

Bir analitik yöntemin özgünlüğü ve seçiciliğı bu yöntemin amaçlanan maddeyi tayin edebilme yeteneğı olarak ifade edilmektedir. Analizde kullanılan yöntemin, etkin maddeyi formülasyonda kullanılan diğeri yardımcı maddelerden ayırması gerekmektedir. Yani analiz sonucunda okunan absorbands değeri sadece analiz edilmek istenen maddenin derişimi ile değışmesi ve ortamda bulunan diğeri maddelerden etkilenmemesi gerekmektedir. Her bir ortam için çalışılan dalga boyunda sadece mesalazinin absorbands değeri verdiğinin kanıtlanması amacıyla seçicilik çalışmaları yapılmıştır. Bütün ortamlarda mesalazin harici diğeri formülasyon bileşenleri çözülmüş ve 200-800 nm dalga boyu aralığında UV spektrumları alınmıştır. Formülasyondaki diğeri bileşenlerin çalışılan dalga boyunda absorbands vermediğı görülmüş ve yöntemin mesalazin için seçici olduğı kanıtlanmıştır (Şekil 4.7-4.9) (Tuğcu Demiröz, 2001).

Analitik yöntem validasyonu için bir diğeri parametre olan geri elde ve doğruluk analizlerinin yapılması gerekmektedir. Hazırlanan etkin madde çözeltisindeki etkin madde derişimi ile bu çözeltinin analizi ile elde edilen absorbands değeri kullanarak hesaplanan derişim değeri birbiriye yakın olması, yani ICH Q2 (R1) kılavuzuna göre iki değeri arasındaki %bağıl sapmanın %2'nin altında olması gerekmektedir (Taleuzzaman, 2018). Çalışmamızda yer alan bütün ortamlar için geri elde ve doğruluk analizleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.13-4.18). Çizelgelerde yer alan bütün %bağıl sapma değeri değerlerinin %2'nin altında olduğı görülmüştür ve böylece yöntemin doğruluğı kanıtlanmıştır.

Çalışmamızda hesaplanan LOD ve LOQ değeri değerlerinin (Çizelge 4.19) bütün ortamlar için analizlerde kullanılan derişimlerden daha düşük olduğı görülmüştür. Bu sonuçlar ile analizler sonucu elde edilen değeri değerleri, yöntemin duyarlılık sınırından düşük olmadığı ve çalışmada kullanılacak derişimlerin kullanılan analiz yöntemiyle hassas ve doğru bir şekilde tayin edilebileceğı kanıtlanmıştır.

Çalışmada kullanılacak stok çözelti ve numunelerin analiz sırasında veya saklanacakları süre boyunca stabilitelerinin belirlenmesi amacıyla çözelti stabilitesi

analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda geliştirilecek formülasyonlardaki etkin maddenin ortamlarda çözünmüş halde bulunacakları süre göz önünde bulundurulmuş ve bütün ortamlar için 37 °C'de 24 saat analizler gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.10-4.12). Bu sonuçlara göre mesalazinin 24 saat boyunca bütün ortamlarda stabilitesini koruduğu gözlenmiştir. Başlangıç derişimi ile deney sonunda elde edilen derişimler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$.)

Bütün sonuçlar değerlendirildiğinde, bütün ortamlar için validasyon işleminin başarıyla gerçekleştirildiği görülmektedir.

5.1.2. DSC Çalışmaları

Formülasyonlarda kullanılan mesalazin ve polimerler arasında herhangi bir geçimsizlik ya da etkileşim olup olmadığının incelenmesi amacıyla DSC çalışmaları yapılmıştır. Mesalazin ve polimerlerin tek başına ve fiziksel karışımlarının termogramları alınarak karşılaştırılmıştır.

DSC termogramları incelendiğinde mesalazin 290,67 °C'de endotermik bir pik (Şekil 4.13), ipek fibroin 226,75 °C'de ekzotermik, 283,75'te °C'de endotermik bir pik (Şekil 4.15), hyaluronik asit 240,24 °C'de ekzotermik bir pik, kitozan ise 305,55 °C'de ekzotermik bir pik vermiştir (Şekil 4.16). Sodyum aljinat türevleri olan Protanal CR8223 ve Protanal CR8133'ün termogramlarına bakıldığı zaman sırasıyla 247,38 °C'de ve 246,87 °C'de ekzotermik pikler gözlenmiştir (Şekil 4.17-4.18) (Praveen ve diğerleri, 2015; Newton ve diğerleri., 2012; Chlapanidas ve diğerleri, 2011; Han ve diğerleri, 2012; Saber-Samandari ve diğerleri, 2012).

Mesalazinin formülasyonda kullanılan diğer polimerler ile 1:1 oranda karışımlarından elde edilen DSC termogramlarına bakıldığı zaman (Şekil 4.19-4.23) mesalazinin karışımlardaki miktarındaki azalmaya bağlı olarak piklerde küçülme meydana gelmiştir ve bunun dışında herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Polimerlerin kendi aralarında fiziksel karışımlarından elde edilen termogramlara bakıldığı zaman polimerler arasında herhangi bir etkileşime rastlanmamıştır (Şekil 4.24-4.34). Sonuçlar bu polimerler kullanılarak hazırlanacak formülasyonlarda geçimsizlik olmayacağı şeklinde değerlendirilmiştir.

5.1.3. FTIR Çalışmaları

FTIR maddelerin ve formülasyonların kimyasal yapılarının aydınlatılması için kullanılan bir analiz yöntemidir. Bu yöntemle formülasyon geliştirilmeden önce kullanılacak bileşenlerin kimyasal yapısı belirlenebilir ve bu bileşenlerin kalite kontrolü yapılabilir. Ayrıca formülasyon geliştirildikten sonra meydana gelen yapısal değişiklikler analiz edilebilmektedir. FTIR yöntemi, çalışmamızın ilk aşamasında mesalazin ve diğer formülasyon bileşenlerinin yapı tayini amacıyla kullanılmıştır. Mesalazin ve formülasyonda kullanılan polimerlere ait spektrumlar Şekil 4.35-4.42 arasında gösterilmiştir.

Mesalazinin spektrumunda $2525,75\text{ cm}^{-1}$ 'de moleküller arası hidrojen bağlarından kaynaklanan bir bant, $1646,06\text{ cm}^{-1}$ 'de primer amin (N-H) gerilme bandı, $1485,11$ ve $1445,93\text{ cm}^{-1}$ 'de C-H gerilme bandı, $1351,81\text{ cm}^{-1}$ 'de C-H ve O-H gerilme bantları, $807,81\text{ cm}^{-1}$ 'de aromatik bileşenden kaynaklı C-H gerilme bandı, $772,02\text{ cm}^{-1}$ 'de düzlemsel bükülme titreşimleri dışındaki C-H gerilme bandı ve $684,80\text{ cm}^{-1}$ 'de düzlemsel bükülme titreşimleri dışındaki aromatik C-H gerilme bandı gözlenmiştir. Bu gerilme bantları literatürle uyumlu bulunmuştur (Şekil 4.35) (Alam ve diğerleri, 2019; Coates, 1996; Chebion ve diğerleri, 2022).

Çalışma kapsamında elde edilen ipek fibroinin spektrumunda $3282,31\text{ cm}^{-1}$ 'de N-H gerilme bandı, $1621,50\text{ cm}^{-1}$ 'de amid I (C=O) gerilme bandı, $1513,40\text{ cm}^{-1}$ 'de amid II (sekonder N-H) gerilme bandı, $1448,85\text{ cm}^{-1}$ 'de CH_3 gerilme bandı, $1229,15\text{ cm}^{-1}$ 'de amid III (C-N ve N-H gerilme bantları), $1162,02\text{ cm}^{-1}$, CH_2OH polifenol yapısından kaynaklanan gerilme bandı ve $992,43\text{ cm}^{-1}$ 'de ikincil yapıdaki polialaninden kaynaklanan gerilme bandı görülmüştür (Şekil 4.36). İpek fibroin için elde edilen gerilme bantları literatürle uyumlu bulunmuştur (Gianak ve diğerleri, 2018; Hong ve diğerleri, 2020; Zhong ve diğerleri, 2021).

Hyaluronik asitin spektrumunda $1505,98\text{ cm}^{-1}$ 'de C=O ve C-H gerilme bantları, $1373,68\text{ cm}^{-1}$ 'de amid III gerilme bandı ve $1029,85\text{ cm}^{-1}$ 'de C-OH gerilme bandı gözlenmiştir (Şekil 4.37). Bu gerilme bantları literatürle uyumlu bulunmuştur (Manju ve Sreenivasan, 2011; Pan ve diğerleri 2017).

Kitozanın spektrumunda, 3362,80 cm^{-1} 'de -OH gerilme bandı, 1647,56 cm^{-1} 'de amit I (C=O) gerilme bandı, 1373,57 cm^{-1} 'de amit III (CH₂) gerilme bandı, 1151,67 cm^{-1} 'de C-O-C gerilme bandı ve 1025,44 cm^{-1} 'de C-O gerilme bandı görülmüştür (Şekil 4.40). Kitozanın gerilme bantları literatürle uyumlu bulunmuştur (Queiroz ve diğerleri, 2014).

Sodyum aljinat türevleri olan Protanal CR8223 ve Protanal CR8133 polimerlerinin spektrumlarına bakıldığı zaman sırasıyla 3647,71 cm^{-1} ve 3364,38 cm^{-1} 'de -OH gerilme bantları, 1598,22 cm^{-1} ve 1596,23 cm^{-1} 'de asimetric gerilme titreşimleri (COO), 1404,43 cm^{-1} ve 1405,73 cm^{-1} 'de simetrik gerilme titreşimleri (COO) ve 1026,81 cm^{-1} ve 1025,9 cm^{-1} 'de C-O gerilme bantları gözlenmiştir (Şekil 4.38-4.39). Aljinat türevi polimerlerin gerilme bantları literatürle uyumlu bulunmuştur (Taha ve diğerleri, 2005).

Mesalazin ve diğer formülasyon bileşenlerinin spektrumlarına bakıldığı zaman, Şekil 4.41'de 2529,21 cm^{-1} , 1645,85 cm^{-1} , 1485,23 cm^{-1} , 1446,37 cm^{-1} , 1351,82 cm^{-1} , 807,81 cm^{-1} , 772,07 cm^{-1} ve 684,78 cm^{-1} 'de mesalazine özgü gerilme bantları gözlenmiştir. Ayrıca fiziksel karışımlarda diğer formülasyon bileşenlerine ait pikler de görülmüştür.

Şekil 4.42'ye bakıldığı zaman ise, 1486,45 cm^{-1} , 1447,63 cm^{-1} , 1353,22 cm^{-1} , 808,51 cm^{-1} , 772,74 cm^{-1} ve 685,01 cm^{-1} 'de mesalazine ait gerilme bantları gözlenmiştir. Ayrıca fiziksel karışımlarda diğer formülasyon bileşenlerine ait pikler de görülmüştür.

Bu sonuçlara göre mesalazine ait karakteristik gerilme bantlarının, diğer formülasyon bileşenleriyle olan fiziksel karışımda bozulmadan yer aldığı gözlenmiştir. Fiziksel karışımlarda mesalazin derişiminin azalmasına bağılı olarak pikler küçülmüştür ancak maddenin oranının değışmesine bağılı olarak bu durum beklenen bir sonuçtur. FTIR analizleri ile formülasyon bileşenleri ve etkin maddenin herhangi bir kimyasal geçimsizlik göstermeden bir arada bulunabileceğı sonucuna varılmıştır.

5.1.4. XRD Analizleri

XRD analizleri katı maddelerin kristal yapısının aydınlatılması amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde amorf yapılar pik vermezken, kristal yapılar karakteristik pikler vermektedir. Etkin madde ve polimerlere ait XRD difraktogramları Şekil 4.43-4.50 arasında gösterilmiştir.

Mesalazinin XRD difraktogramı incelendiğinde (Şekil 4.43), $2\theta = 7,53^\circ, 12,59^\circ, 14,22^\circ, 15,08^\circ, 16,5^\circ, 22,47^\circ, 24,19^\circ, 25,52^\circ, 27,1^\circ, 28,56^\circ, 30,51^\circ, 31,82^\circ, 36,78^\circ, 38,46^\circ$ de karakteristik pikler gözlenmiştir (Seifirad ve diğerleri, 2016). İpek fibroinin difraktogramında (Şekil 4.44), $2\theta = 23,72^\circ$ noktasında karakteristik pik görülmüştür (Gianak ve diğerleri, 2018; Sah ve Pramanik, 2011). Hyaluronik asitin difraktogramında (Şekil 4.45), $2\theta = 23,33^\circ$ noktasında karakteristik pik görülmüştür (Cassimjee ve diğerleri, 2022). Kitozanın difraktogramı incelendiğinde (Şekil 4.48), $2\theta = 10,9^\circ, 20,21^\circ$ noktalarında karakteristik pikler gözlenmiştir (Kumar ve Koh, 2012). Sodyum aljinat-Protanal CR8223 (Şekil 4.46) ve sodyum aljinat Protanal CR8133 (Şekil 4.47) polimerlerinin XRD difraktogramlarına bakıldığı zaman ise, Protanal CR8223 için $2\theta = 13,05^\circ, 21,98^\circ, 26,09^\circ$ noktalarında, Protanal CR8133 için ise $2\theta = 14,06^\circ, 22,05^\circ$ noktalarında karakteristik pikler gözlenmiştir (Bhagyaraj ve Krupa, 2020).

Formülasyon bileşenleri ve mesalazinin fiziksel karışımlarının XRD difraktogramları Şekil 4.49 ve 4.50'de gösterilmiştir. Bu difraktogramlara bakıldığı zaman mesalazinin ve diğer formülasyon bileşenlerinin karakteristik piklerinin difraktogramlarda yer aldığı görülmektedir. Ancak fiziksel karışım olduğu için maddelerin miktarının azalmasına bağlı olarak pik şiddetinde azalmalar görülmektedir. Bu beklenen bir durumdur.

5.2. İpek fibroin eldesi ve karakterizasyon çalışması bulguları

Tez çalışması kapsamında ipek böceği kozalarından ipek fibroin eldesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

5.2.1. Protein miktar tayini yönteminin geliştirilmesi

Bradford yöntemi ve Lowry yöntemi proteinlerin miktar tayini amacıyla yaygın kullanılan yöntemlerdir (Bradford, 1976; Lowry, 1951). Bradford yöntemi, yöntemde kullanılan boya olan Coomassie Brilliant Blue G-250'nin proteinde yer alan arjininin, lizin ve histidin aminoasitleriyle asidik bir ortamda bağ oluşturarak parlak mavi bir renk vermesi esasına dayanmaktadır (Lu ve diğerleri 2010; Bradford, 1976). Lowry yöntemi ise proteinin alkalik bakır tartarat çözeltisi ve Folin reaktifi ile etkileşimine dayanan kolorimetrik bir testtir (Lowry, 1951).

Yapılan çalışmalarda Bradford yönteminin, Lowry yöntemine göre protein miktar tayini için daha hassas bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır (Zambari ve diğerleri, 2021). Bu durum Bradford yönteminde kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250'nin protein dışındaki diğer moleküllerle etkileşiminin daha az olup, proteinlere karşı duyarlılığının yüksek olmasından kaynaklanmaktadır (Pavel ve diğerleri, 2013). Bu nedenle çalışmamızda ipek böceği kozalarından elde edilen ipek fibroinin protein miktar tayini için Bradford yöntemi kullanılmıştır.

Miktar tayini yöntemi ipek fibroin çözeltisi ve liyofilize ipek fibroin olmak üzere iki farklı ipek fibroin örneği için geliştirilmiştir. Liyofilize ipek fibroin için miktar tayini yöntemi geliştirilmesinin sebebi bazı karakterizasyon çalışmalarında liyofilize ipek fibroinin kullanılmasıdır. Protein miktar tayini yöntemi için model protein olarak BSA kullanılmıştır. İpek fibroin çözeltisi için (Şekil 4.51) ve liyofilize ipek fibroin için (Şekil 4.52) oluşturulan derişim-absorbans eğrilerinin r^2 değeri 1'e yakın bulunmuştur ve bu durum her iki ipek fibroin için de derişim-absorbans arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunu göstermiştir. Literatürde ipek fibroinin protein miktar tayini için Bradford yönteminin kullanıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Nikam ve diğerleri, 2020; Sah ve Pramanik, 2010; Chung ve diğerleri, 2020).

5.2.2. İpek fibroin eldesi için optimizasyon çalışmaları

Çalışma boyunca üretilcek ipek fibroinin aynı kaliteye ve aynı protein içeriğine sahip olması ve yüksek protein içeriğine sahip ipek fibroin elde etmek için

optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon için istatistiksel analiz yapılmıştır.

İpek böceği kozasından ipek fibroin eldesi zamb giderme, ekstraksiyon, diyaliz, santrifüj ve liyofilizasyon işlemlerinden oluşmaktadır. Zamb giderme işleminde kozadaki bir diğer protein olan serisinin uzaklaşma işlemi gerçekleştirilmektedir. İpek böceği kozalarının yaklaşık %25-30'unu serisin oluşturmaktadır. Zamb giderme serisinin uzaklaştırılmasının kanıtlanması ve her seferinde uzaklaşan serisin miktarının birbirine yakın olduğunun gösterilmesi amacıyla zamb giderme işleminde uzaklaşan serisin miktarı gravimetrik olarak analiz edilmiştir. Çizelge 4.20'de yer alan sonuçlara göre, zamb giderme işlemiyle ortalama $26,72 \pm 0,98$ serisinin uzaklaştırıldığı görülmektedir. Bu sonuçlar zamb giderme işleminin başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada ipek fibroin eldesi için zamb giderme işlemi gerçekleştirilmiştir. İpek böceği kozaları 1 saat boyunca Na_2CO_3 çözeltisinde kaynatılmış ve 1 saat sonunda zamb giderme işlemi sonucunda uzaklaşan serisin miktarı %27 olarak bulunmuştur (Cao ve diğerleri, 2013). Çalışmamızda elde edilen bulgular literatürle uyumludur.

Zamb giderme işlemi sonucunda elde edilen materyalin ekstraksiyonu için farklı ekstraksiyon ajanları kullanılmaktadır. Bunlara LiBr çözeltisi ve Ajisawa ajanı örnek verilebilir. Çalışmamızda her iki ekstraksiyon ajanı kullanılarak ipek fibroin üretilmiştir. Ekstraksiyon ajanlarının ipek fibroinin protein içeriğine etkisini incelemek amacıyla diğer tüm parametreler sabit tutulmuştur.

Ajisawa ajanı İF-1-İF-12 numaralı deneylerde kullanılmış ve LiBr çözeltisi ise İF-12-İF-24 numaralı deneyler için kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Diğer tüm parametreler sabit tutularak istatistiksel değerlendirme her grup için ayrı ayrı yapılmıştır. Tüm analizlerde p değeri $< 0,0001$ olup, ekstraksiyon ajanının ipek fibroinin protein içeriğine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.53). Liyofilize numuneler için ekstraksiyon ajanı tipinin etkisini incelemek amacıyla aynı işlem tekrarlanmıştır. L-İF-1-L-İF-7 ve L-İF-2-L-İF-8 deney numaraları arasındaki p değeri $< 0,0001$ bulunmuştur. L-İF-3-L-İF-9 arasında yapılan analizde p değeri 0,0072, L-İF-4-L-İF-10 arasında yapılan analizde ise 0,0019 olarak bulunmuş ve deneyler arasındaki fark tüm analizlerde anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.54). Liyofilize

numuneler için kullanılan ekstraksiyon ajanının ipek fibroinin protein içeriği üzerindeki etkisi istatistiksel olarak kanıtlanmıştır. LiBr kullanılarak elde edilen liyofilize ipek fibroinlerin protein içeriğinin genellikle daha fazla olduğu gözlenmiştir. L-İF-9 ve L-İF-4 numaraları deneylerde Ajisawa ajanı kullanılarak liyofilize ipek fibroin elde edilmiştir, LiBr kullanılarak elde edilen liyofilize ipek fibroinlere göre protein içeriği farkı istatistiksel olarak anlamlı olsa da çok düşüktür. Bu durumun diğer deney koşullarından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

İpek fibroin çözeltisi için Çizelge 4.21 ve Şekil 4.53'te verilen sonuçlara göre LiBr kullanılarak elde edilen ipek fibroinin protein içeriğinin genelde daha fazla olduğu görülmektedir. Liyofilize ipek fibroin için ise Çizelge 4.22 ve Şekil 4.54'te yer alan sonuçlara bakıldığında da LiBr kullanılarak elde edilen ipek fibroinin protein içeriğinin genel olarak daha fazla olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). İpek fibroin eldesi için Ajisawa ajanının içeriğinde alkol bulunduğu için alkolün buharlaşmasından kaynaklı olarak her zaman aynı içeriğe sahip Ajisawa ajanı kullanılamamaktadır. Ayrıca Ajisawa ajanı ipek fibroin yapısının tamamen açılmasına yol açabilmekte, dolayısıyla bu durum ipek fibroin çözeltisinin diyaliz işlemi sırasında agregasyona daha duyarlı olmasına neden olmaktadır (Abdel-Fattah ve diğerleri., 2015; Zheng ve diğerleri., 2016). Literatürde yapılan çalışmalarda LiBr kullanılarak elde edilen ipek fibroinin Ajisawa ajanı kullanılarak elde edilen ipek fibroine göre gravimetrik olarak daha fazla olduğu görülmektedir (Kopp ve diğerleri, 2009; Nikam ve diğerleri, 2020). Yapılan çalışmalarda LiBr ile hazırlanan ipek fibroin çözeltisinin daha stabil olduğu ve agregasyona yatkın olmadığı da rapor edilmiştir (Jin ve Kaplan 2003). Yapılan analizler ve literatür bilgisi doğrultusunda en yüksek protein içeriğine sahip ipek fibroinin üretilmesi için ekstraksiyon ajanı olarak LiBr kullanılmasına karar verilmiştir.

İpek fibroin eldesinde ekstraksiyon işleminden sonra diyaliz işlemi yer almaktadır. Diyaliz işleminde hem diyaliz membranının MWCO değerinin hem de diyaliz süresinin ipek fibroinin protein içeriğine olan etkisi değerlendirilmiştir. Diyaliz süresinin ve diyalizde kullanılan membranın MWCO değerinin optimizasyonu için diğer tüm parametreler sabit tutulmuştur. Literatürde ipek fibroin eldesinde diyaliz membran olarak 3.500 Da ve 12.000 Da MWCO değerine sahip membranlar kullanılmıştır. Diyaliz süresi olarak da 2 gün ve 3 gün süreyle diyaliz işleminin gerçekleştirildiği

literatürler bulunmaktadır (Sinna ve diğerleri, 2021; Wöltje ve diğerleri, 2021). Çalışmamızda da diyaliz membran olarak 3.500 Da ve 12.000 Da MWCO değerine sahip diyaliz membranlar kullanılmış, diyaliz süresi olarak da 1 gün, 2 gün ve 3 gün süreyle diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir.

İpek fibroin çözeltisi için Çizelge 4.21 ve Şekil 4.55'e bakıldığı zaman 3500 Da MWCO değerine sahip olan membran kullanıldığı zaman, çoğunlukla elde edilen ipek fibroindeki protein içeriğinin daha fazla olduğu görülmektedir ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0,0001$). Liyofilize ipek fibroin için Çizelge 4.22 ve Şekil 4.56 birlikte değerlendirildiğinde diyaliz işlemi için 3500 Da MWCO değerine sahip olan membran kullanıldığı zaman elde edilen ipek fibroindeki protein miktarının çözeltide olduğu gibi daha fazla olduğu görülmektedir ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0,0001$). Ayrıca daha düşük MWCO değerine sahip bir diyaliz membranı kullanılması, diyaliz hızının düşmesine ve önemli ölçüde yavaşlamasına neden olmaktadır. Diyaliz hızının yavaşlatılması, tuzun daha kontrollü bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlayarak, tuz derişimindeki hızlı değişim nedeniyle ipek fibroin agregasyonunun önlenmesine yardımcı olmaktadır. Bu nedenlerle diyaliz işleminde kullanılacak diyaliz membranın MWCO değeri 3500 Da olarak belirlenmiştir.

Diyaliz işlemi için bir diğer parametre diyaliz süresidir. Bu amaçla 1 gün, 2 gün ve 3 gün diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Ortamdaki yüksek tuz derişimleri ipek fibroinin stabilitesini etkilemektedir, dolayısıyla tuzların ortamdan uzaklaştırılma süresi ve hızı, ipek fibroinin jelleşmesini doğrudan etkiler. İpek fibroin diyaliz sırasında yarı stabil bir durumdadır ve tuzlar uzaklaştırıldığında jelleşme hızlanmaktadır (Ribeiro ve diğerleri 2014; Nogueira ve diğerleri, 2011). Deneylerde 3 günlük diyalizden sonra ipek fibroinin jel fazına dönüşerek agregatlar halinde çöktüğü gözlenmiştir. Bunun nedeni, ipek fibroinin tuzlar uzaklaştırıldığında stabilitesini koruyamamasıdır. Dolayısıyla, deney sonuçlarından diyaliz süresinin 3 gün olduğu analizler çıkarılmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda (Şekil 4.57), İF-16 ve İF-20 numaralı deneyler arasındaki analiz dışında sonuçların anlamlı olduğu; ancak İF-13 ve İF-17 numaralı deneylerde yapılan analizin anlamlılık düzeyinin diğer analizlere göre daha düşük olduğu bulunmuştur. Analize göre diyaliz süresinin ipek fibroinin protein içeriğini doğrudan etkilediği gözlenmiştir. Liyofilize ipek fibroin örneklerinde

ise tüm analizlerde p değeri $< 0,0001$ bulunmuştur. Sonuç istatistiksel olarak anlamlı olup, diyaliz süresinin liyofilize örneklerde bulunan ipek fibroin protein içeriği üzerine etkisi kanıtlanmıştır (Şekil 4.58). Daha yüksek protein içeriğine sahip ipek fibroin elde edilmesi ve ipek fibroin üretiminde kullanılan yüksek yoğunluklu tuzların tamamen uzaklaştırılması için iki günlük diyaliz süresinin optimum olduğuna karar verilmiştir.

Santrifüj işlemi, çözeltideki yabancı maddeleri uzaklaştırmanın başka bir yöntemidir. Merkezkaç kuvvetlerinin etkisiyle istenmeyen maddeler çöker ve böylece saf malzeme elde edilir (Masoodi ve diğerleri, 2001). Santrifüj işlemi, ipek fibroin üretiminin son adımıdır ve diyaliz işlemiyle uzaklaştırılamayan safsızlıkların uzaklaştırılmasında kullanılır. Çalışmamızda santrifüj işleminin ipek fibroin protein içeriği üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, ipek fibroin çözeltilerinin protein içeriği santrifüj işleminden önce ve sonra analiz edilmiştir. İpek fibroin çözeltileri santrifüjden sonra liyofilize edildiğinden, liyofilize numuneler için santrifüjlemenin etkisi değerlendirilmemiştir. İstatistiksel analiz sonucunda (Şekil 4.59), tüm analizlerde p değeri $< 0,0001$ bulunmuştur ve bu durum santrifüj işleminin ipek fibroin protein içeriğine olan etkisini kanıtlamaktadır. İF-7 ve İF-8 numaralı deneyler arasında yapılan analizler dışında tüm deneylerde, ipek fibroinin protein içeriğinin santrifüj öncesinde daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni, santrifüj işleminde bir miktar proteinin de çökmesidir. Diyaliz işlemiyle uzaklaştırılmayan yabancı maddelerin santrifüj olmadan uzaklaştırılması mümkün değildir; bu nedenle optimum ipek fibroin eldesi için santrifüj işleminin yapılmasına karar verilmiştir. Santrifüj işlemiyle ipek fibroin kaybı gözlemlendiğinden, santrifüj hızı ve süresinin protein içeriğine etkisi değerlendirilmiştir (Çizelge 4.23). Farklı devirlerde ve farklı sürelerde santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve ipek fibroinin protein içeriği tayin edilerek % kayıp değerleri hesaplanmıştır. Bir çalışmada ipek fibroin eldesinde santrifüj 9000 rpm (6895 RCF) devirde 5 dakika gerçekleştirilmiştir (Rockwood ve diğerleri, 2013), ipek fibroinin elde edildiği başka bir çalışmada ise santrifüj 9000 rpm devirde 20 dakika gerçekleştirilmiştir (Sah ve Pramani, 2010). Ancak çalışmamızda 10000 rpm devirde 10 dakika yapılan santrifüj işleminde %9,33 ipek fibroin kaybı gözlenmiştir. Santrifüj işlemi koşulları % kayıp değerlerine göre 2500 RPM (532 RCF) devir ve 5 dk süre olarak belirlenmiştir. İpek fibroin protein yapısında bir materyal olduğu için zorlu deney koşulları altında bozunmaya

eğilimlidir. İpek fibroin çözeltisindeki safsızlıkların düşük devir değerlerinde ve kısa santrifüj sürelerinde çöktüğü gözlenmiştir. Bu nedenle ipek fibroinin bozunmasını önlemek amacıyla yüksek devirde ve daha uzun süreli santrifüj işlemi tercih edilmemiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonucunda en yüksek protein içeriğine sahip ipek fibroin eldesi için geçerli protokolü doğrulayacak şekilde aynı işlem parametreleri seçilerek optimizasyon işlemi başarıyla gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.24) (Rockwood ve diğerleri, 2011).

5.2.3. İpek fibroinin karakterizasyon çalışmaları

Optimum ipek fibroin eldesi sonucunda yapılan karakterizasyon çalışmalarında, ipek fibroinin ve ticari ipek fibroinin DSC, FTIR ve sirküler dikroizm analizleri gerçekleştirilmiştir.

Optimum ipek fibroinin ve ticari ipek fibroinin DSC termogramına bakıldığı zaman analiz sırasında, her iki ipek fibroin örneğinde de ipek fibroinin ikincil yapısının kristalizasyonu nedeniyle 226,65°C'de ekzotermik, 283,75 °C'de ise termal bozunma nedeniyle endotermik bir pik gözlenmiştir (Şekil 4.60). Tarama sırasında ipek fibroin bozulmasının başlaması nedeniyle ipek fibroin DSC termogramında erime endotermik piki gözlenmemiştir. Yapılan bir çalışmada ipek fibroinin DSC termogramı alınmış ve yaklaşık 216 °C'de ekzotermik bir pik ve yaklaşık 260 °C'de endotermik bir pik gözlenmiştir (Hu ve diğerleri, 2007). Başka bir çalışmada ise ekzotermik pik 216 °C'de gözlenirken, bozunmanın başlangıcını ifade eden endotermik pik ise 281 °C'de gözlenmiştir (Xu ve diğerleri, 2005). DSC sonuçlarının literatürle uyumlu olduğu görülmüş ve optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen ipek fibroinin ticari ipek fibroinle aynı sıcaklıklarda pik verdiği gözlenmiştir.

Optimum ipek fibroinin FTIR spektrumunda 3282,31 cm⁻¹'de N-H gerilme bandı, 1621,50 cm⁻¹'de amit I (C=O) gerilme bandı, 1513,40 cm⁻¹'de amit II (sekonder N-H) gerilme bandı, 1448,85 cm⁻¹'de CH₃ gerilme bandı, 1229,15 cm⁻¹'de amit III (C-N ve N-H gerilme bantları), 1162,02 cm⁻¹, CH₂OH polifenol yapısından kaynaklanan gerilme bandı ve 992,43 cm⁻¹'de ikincil yapıdaki polialaninden kaynaklanan gerilme

bandı görülmüştür. Ticari ipek fibroinde ise, çalışmamızda elde edilen ipek fibroinin spektrumuna benzer şekilde 3210,86 cm^{-1} 'de N-H gerilme bandı, 1641,77 cm^{-1} 'de amit I (C=O), 1514,19 cm^{-1} 'de amit II (sekonder N-H) gerilme bandı, 1235,28 cm^{-1} 'de amit III (C-N ve N-H gerilme bantları), 1057,05 cm^{-1} 'de ikincil yapıdaki polialaninden kaynaklanan gerilme bandı görülmüştür. İpek fibroinin ve ticari ipek fibroinin FTIR spektrumları benzer bulunmuştur (Şekil 4.61). Ayrıca bu spektrumlar literatürle de uyumlu bulunmuştur (Gianak ve diğerleri, 2018; Hong ve diğerleri, 2020; Zhong ve diğerleri, 2021).

Çalışma kapsamında elde edilen ipek fibroinin ve ticari ipek fibroinin yapı analizleri için sirküler dikroizm ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.62). Ölçümler her iki örnek için de ipek fibroinin sulu çözeltisinde 1 mg/mL derişim olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Hem optimum ipek fibroin çözeltisi hem de ticari ipek fibroin çözeltisi 192 nm'de ipek fibroine ait karakteristik pik (rastgele kıvrım-random coil) yapısı göstermişlerdir. Literatürde yapılan bir çalışmada ipek fibroinin sulu çözeltisi yaklaşık 195 nm'de bu karakteristik yapıyı göstermiştir (Li ve diğerleri, 2001). Bir diğer çalışmada ise ipek fibroinin sulu çözeltisi karakteristik pik yapısını 200 nm'de göstermiştir (Delezuk ve diğerleri, 2017). İpek fibroinin 195 nm civarlarında güçlü bir negatif bant ve 215 nm civarlarında zayıf bir negatif bant göstermesi ipek fibroinin suda çözünebilir Silk I yapısında olduğunu göstermektedir. Ancak ipek fibroinin ikincil yapısı ortaya çıktığında yani Silk I formundan Silk II formuna geçtiğinde 195 nm'deki negatif pik pozitif bir pike dönüşmekte ve 215 nm'de güçlü bir negatif pik oluşmaktadır. Bu durum da ipek fibroinin yapısını değiştirecek işlemlere maruz kaldığının göstergesidir (Jia ve diğerleri, 2022). Çalışmamızda elde edilen ipek fibroin çözeltisinde ve ticari ipek fibroin çözeltisinde Silk I yapısının korunduğu gözlenmektedir.

5.3. Önformülasyon çalışmalarının bulgularının değerlendirilmesi

Önformülasyon çalışmaları kapsamında 3B biyobaskı için gerekli biyomürekkep formülasyonlarının hazırlanması için ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Biyomürekkep formülasyonlarında sodyum aljinat-LFR-10/60, hyaluronik asit ve ipek fibroin kullanılmıştır. Biyomürekkep formülasyonlarının hazırlanması amacıyla ilk olarak sodyum aljinat-LFR-10/60 ve hyaluronik asit çözeltileri karıştırılmış daha

sonra tez kapsamında elde edilen ipek fibroin bu karışıma yapısının bozulmaması amacıyla damla damla eklenmiştir. Biyomürekkep formülasyonları Çizelge 3.3'te verilen oranlara göre hazırlanmıştır. Literatüre göre hazırlanan biyomürekkep formülasyonlarının ekstrüzyon temelli 3B biyobaskı ile basılabilmesi için belirli bir viskozite ve yüzey gerilimi değerlerine sahip olması gerekmektedir. Ekstrüzyon temelli 3B biyobaskıda yüzey gerilimi baskı kalitesini ve çözünürlüğü etkileyebilmektedir. Ayrıca basılan materyalin baskı katmanında yayılabilirliğini de etkilemektedir. Basılabilirliği iyi olan bir biyomürekkebin baskıdan sonra yayılmaması ve şeklini koruyabilmesi beklenmektedir (Naghieh ve Chen, 2021). Basılan materyalin baskı katmanında şeklini koruyabilmesi için viskozitenin yüksek olması tercih edilmektedir (Udofia ve Zhou, 2019). Literatüre göre bir biyomürekkebin basılabilirliğinin iyi olması için yüzey geriliminin yaklaşık 28-350 mN.m⁻¹ değerine sahip olması ve viskozite değerlerinin 1-60.000.000 mPa.s aralığı gibi geniş bir aralıkta olması basım için yeterli olmaktadır (O'Connel ve diğerleri, 2020; Tofan ve diğerleri, 2022). Viskozite ve yüzey gerilimi ölçümlerinden sonra biyomürekkeplerin basılabilirlik parametresi 3B biyoyazıcı ile değerlendirilmiştir. Çizelge 4.25'te verilen sonuçlara göre bütün biyomürekkep formülasyonlarının viskozite ve yüzey gerilimi sonuçları literatürde verilen aralıkta bulunmuştur. Ancak B1/100-75-20 formülasyonu basılabilirlik açısından uygun bulunmamıştır. İpek fibroin çözeltisinin viskozitesi düşük olduğu için ve B1/100-75-20 formülasyonunda ipek fibroin miktarı yüksek olduğu için formülasyonun viskozitesi düşük bulunmuştur. Düşük viskoziteye sahip bir biyomürekkep formülasyonu basıldığı zaman şeklini koruyamamaktadır.

Ayrıca hazırlanan biyomürekkep formülasyonunun ipek fibroin içeriğinin yüksek olması beklenmektedir. Basılan formülasyonun çapraz bağlanması gerektiği için biyomürekkep formülasyonundaki sodyum aljinat miktarının da düşük olmaması gerekmektedir, çünkü kalsiyum klorür çözeltisi ile sodyum aljinat çapraz bağlanmaktadır. B8/75-50-75 formülasyonu, formülasyonda bulunan ipek fibroin miktarının düşük olması, B9/50-75-75 formülasyonu ise formülasyonda bulunan sodyum aljinat miktarının çapraz bağlama işlemi için yeterli olmaması nedeniyle daha sonraki çalışmalarda kullanılmamıştır.

Seçilen biyomürekkep formülasyonları her seferinde eēit miktarda formülasyon hazırlanması ve biyomürekkeplere yüklenecek olan mesalazin ve TNF- α siRNA miktarlarında sapma olmaması amacıyla sabit hacimde (5 mL) olacak Şekilde tekrar hazırlanmıētır (izelge 3.4). Sabit hacimde hazırlanan biyom rekkeplerde polimer miktarı deėiēmemiētir, bu amaçla bu formülasyonların hazırlanması için aljinat deriēimi deėiētirilmiētir. Biyomürekkeplerin sabit hacimde hazırlanmasının sebebi, her seferinde eēit miktarda polimer içeren sabit hacimde formülasyon hazırlanması ve biyomürekkeplere yüklenecek olan mesalazin ve TNF- α siRNA miktarlarında hacime bağlı sapma olmasının istenmemesidir. Sabit hacimde hazırlanan biyomürekkep formülasyonlarının viskozite ve yüzey gerilimi ölçümleri gerekleētirilmiē ve basılabilirlik parametreleri deėerlendirilmiētir (izelge 4.26). B2/100-75-25 kodlu formülasyon baskıdan sonra yüzey geriliminin yeterli olmaması sebebiyle Şeklini koruyamadığı için elenmiētir. Diğer biyomürekkep formülasyonlarının viskozite, yüzey gerilimi ve basılabilirlik parametreleri uygun bulunmuētur. Formülasyonlarda apraz bağlamanın sağlanması için sodyum aljinat miktarları yüksek tutulmuētur. İpek fibroin ve hyaluronik asit miktarının biyomürekkeplerin ve biyomürekkeplerden basılarak hazırlanacak hidrojellerin etkin madde salım profilini incelemek amacıyla en d ē k oranda hyaluronik asit içeren B3/100-50-25 kodlu formülasyon, en yüksek oranda hyaluronik asit ve en d ē k oranda ipek fibroin içeren B6/100-25-75 kodlu formülasyon, eēit oranda ipek fibroin ve hyaluronik asit içeren B4/100-50-50 kodlu formülasyon ve en yüksek oranda ipek fibroin içeren B7/75-75-50 kodlu formülasyon sonraki alıēmalar için seilmiētir.

Literatürde sodyum aljinat/ipek fibroin/hyaluronik asit temelli biyomürekkep formülasyonlarının hazırlandığı bir alıēma bulunmamaktadır. Ancak sodyum aljinat/hyaluronik asit ve sodyum aljinat/ipek fibroin temelli biyomürekkep formülasyonları kullanılarak ekstrüzyon temelli 3B biyobaskı iēlemi gerekleētirilmiētir. alıēmalarda hazırlanan biyomürekkeplerin basılabilir olduğu g r lm ēt r (Nguy n, Ratanavaraporn ve Yodmuang, 2019; Lee ve diğerleri, 2021).

Tez alıēması kapsamında 3B biyobasılan hidrojellerin çapraz bağlama iēlemi sodyum aljinatın kalsiyum iyonları varlığında, kalsiyum aljinata d n ēerek çapraz bağlı bir forma geçmesi sebebiyle %5 kalsiyum klorür çözeltisi ile gerekleētirilmiētir (Gir n-Hern ndez ve diğerleri, 2021). Çapraz bağlama süresinin optimizasyonu için

yapılan çalışmalar sonucunda çapraz bağlama sürelerine göre hidrojellerin ağırlık kaybı değerleri birbirine yakın olduğu (Çizelge 4.27) ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmediği için (Şekil 4.63) çapraz bağlama süresinin artırılmasının çapraz bağlanma derecesini değiştirmede sonucuna varılmıştır. Hidrojel formülasyonlarının 15 dakikada yeterli miktarda çapraz bağlandığı görülmüştür ve tez boyunca yapılan çalışmalarda bu süre kullanılmıştır.

Biyomürekkep formülasyonları arasından seçim yapabilmek amacıyla, formülasyonlara mesalazin yüklenmiş ve 3B biyobaskı ile bu biyomürekkeplerden hidrojeller hazırlanmıştır. Hem biyomürekkeplerden hem de hidrojellerden Franz difüzyon yöntemi ile salım çalışması yapılmıştır. Oral uygulama için hazırlanan formülasyonun mide ortamında daha yavaş salım yapması ve salımın 24 saat sürmesi beklenmektedir. Franz difüzyon sonuçlarına göre, B3/100-50-25, H3/100-50-25, B4/100-50-50 ve H4/100-50-50 formülasyonlarından iki saatte yaklaşık %60 mesalazin salımı gerçekleşmiştir. B6/100-25-75 ve H6/100-25-75 ve B7/100-25-75 ve H7/100-25-75 formülasyonlarında bu oran düşmüştür. Hazırlanan formülasyonların mide ortamında (ilk 2 saat) daha düşük salım yapıp bağırsaklarda salım yaparak uzatılmış salım profili göstermesi istenmektedir. İBH tedavisinde uzatılmış salımın konvansiyonel mesalazin uygulamasına göre daha yüksek dozlarda bile daha iyi tolere edilerek yan etki potansiyelinin azaldığı ve terapötik etkinliğinin arttığı gözlenmiştir (Mulder ve diğerleri, 1998). İlk iki saatlik salım sonuçlarına bakıldığı zaman en düşük salım B7/75-75-50 ve H7/75-75-50 kodlu formülasyonlarda gözlenmiştir (Şekil 4.64-4.67). Ayrıca salımın 24 saat boyunca devam etmesi beklenmektedir. Salım profilleri ve mide ortamındaki salım oranları değerlendirildiğinde sonraki çalışmalar için B7/75-75-50 kodlu biyomürekkep formülasyonu ve H7/75-75-50 kodlu formülasyon seçilmiştir. Salım hızının düşük olmasının sebebi biyomürekkep formülasyonunda bulunan ipek fibroinin oranının yüksek olmasıdır. İpek fibroinin kontrollü salım sağlayarak salım hızını azalttığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Bayraktar ve diğerleri, 2005; Pritchard ve Kaplan, 2011).

5.4. Formülasyon geliştirme çalışmalarının bulgularının değerlendirilmesi

5.4.1. Oral uygulama için optimum biyomürekkep formülasyonun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmaların bulgularının değerlendirilmesi

Oral uygulama için hazırlanacak biyomürekkep ve hidrojel formülasyonlarının salım hızının yavaşlatılması amacıyla önformülasyon çalışmaları kapsamında seçilmiş olan B7/75-75-50 formülasyonu baz alınarak formülasyonda bulunan aljinat tipi değiştirilmiştir. LFR 10/60 yerine, aynı oranda Manucol, Protanal CR8133, Protanal CR8223 ve Aquateric eklenmiştir. Bu aljinatlar arasından sadece Aquateric, LFR 10/60'la yaklaşık aynı molekül ağırlığına sahiptir, diğer polimerlerin molekül ağırlıkları LFR 10/60'tan büyüktür (Protanal CR8223> Manucol> Protanal CR8133). Molekül ağırlığının artışıyla birlikte polimerler arasındaki zincirlerden difüzyon hızının yavaşlamasına bağlı olarak salım hızının yavaşlaması beklenmektedir (Toews ve Bates, 2023; Choi ve diğerleri, 2008). Aljinat tipleri değiştirilerek biyomürekkep formülasyonları hazırlanmış, viskozite, yüzey gerilimi ölçümleri gerçekleştirilmiş ve basılabilirlik parametresi değerlendirilmiştir. Aljinatların molekül ağırlığı artışıyla birlikte viskozite değerlerinde artış gözlenmiştir (Çizelge 4.28). Bütün formülasyonlar basılabilir olarak değerlendirilmiştir, ancak A/H7-oral formülasyonu basıldıktan sonra şeklini tam olarak koruyamamıştır. Basıldıktan sonra şeklini koruyamamasının sebebi viskozitenin düşük olması veya yüzey geriliminden kaynaklanabilmektedir. Ekstrüzyon temelli biyobaskıda bir biyomürekkebin baskıdan sonra şeklini koruyabilmesi için yüzey gerilimi değerinin yüksek olması gerekmektedir, çok düşük yüzey gerilimi değerlerinde biyomürekkep baskı katmanında yayılmaya eğilimli olmaktadır (Chen ve diğerleri, 2023). Formülasyonun hazırlanmasında kullanılan biyomürekkebin (A-B7/oral) yüzey gerilimi düşük bulunmuştur. P8223/H7-oral formülasyonu basıldıktan sonra şeklini en iyi koruyan formülasyon olarak bulunmuştur. Daha sonra biyomürekkep formülasyonlarına mesalazin yüklenerek oral uygulama için belirlenen tasarıma göre (Resim 3.9) 3B biyobaskı işlemi gerçekleştirilerek hidrojel formülasyonları hazırlanmıştır. Hidrojel formülasyonları oral uygulama için tablet şeklinde basılmıştır. Bu hidrojel formülasyonları ile in vitro çözünme hızı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çözünme hızı sonuçlarına göre 2 saat sonunda, P8223/H7-oral, A/H7-oral ve M/H7-oral formülasyonlardan %salınan mesalazinin miktarında farklılık

gözlenmemiştir (Şekil 4.68). Ancak genel salım profiline bakıldığı zaman P8223/H7 formülasyonunun uzatılmış salım profiline daha çok uyduğu görülmektedir. Basılabilirlik parametresi ve in vitro çözünme hızı sonuçları birlikte değerlendirildiğinde optimum oral biyomürekkep formülasyonu P8223/B7-oral olarak belirlenmiştir.

5.4.2. Rektal uygulama için optimum biyomürekkep formülasyonun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmaların bulgularının değerlendirilmesi

Rektal uygulama için hazırlanan formülasyonun oral formülasyonun aksine kolonda hızlı bir salım yaparak hızlı etki etmesi beklenmektedir. Rektal uygulama için hazırlanan biyomürekkep formülasyonları kullanılarak hazırlanan hidrojel formülasyonlarının in vitro çözünme hızı sonuçlarına bakıldığı zaman pH 7,4 kolon ortamında biyomürekkep formülasyonlarında kullanılan polimerlerin molekül ağırlıkları salım hızını etkilemektedir. Bu nedenle düşük molekül ağırlıklı polimerlerin daha hızlı salım yapması beklenmektedir. Polimerlerin molekül ağırlıkları göz önünde bulundurulduğunda en yüksek salım hızı en düşük molekül ağırlığına sahip Protanal CR8133 polimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonda (P8133/H7-rektal) gözlenmiştir (Şekil 4.69). Bu nedenle rektal uygulama için optimum biyomürekkep formülasyonu P8133/B7-rektal olarak belirlenmiştir.

5.5. Optimum oral ve rektal formülasyonlarının karakterizasyon çalışmalarının bulgularının değerlendirilmesi

Optimum oral ve rektal biyomürekkep formülasyonu belirlendikten sonra bu formülasyonların karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hem oral hem de rektal optimum biyomürekkep formülasyonlarının viskozite ve yüzey gerilimi değerleri ekstrüzyon temelli 3B biyobaskı için uygun aralıktadır (Çizelge 4.29).

Ekstrüzyon temelli 3B biyobaskı kullanılarak basılacak bir biyomürekkebin psödoplastik akış tipi göstermesi gerekmektedir. Psödoplastik akış tipine uyan sıvıların viskozitesi artan kayma hızlarına bağlı olarak azalmaktadır (Albar ve diğerleri, 2020; Brillinger ve diğerleri, 2020). 3B biyobaskı teknolojisinde bu akış tipi kartuşa doldurulan biyomürekkebin uygulanan basınçla birlikte viskozitesinin azalarak baskı ucundan kolayca akmasını sağlamaktadır. Baskı işlemi

gerçekleştikten sonra ise kayma hızının ortadan kalkmasıyla birlikte biyomürekkebin viskozitesinin eski haline dönmesini ve böylece şeklini korumasını sağlamaktadır. Oral ve rektal biyomürekkep formülasyonlarının kayma hızı-kayma gerilimi, kayma hızı-viskozite grafiklerine bakıldığı zaman her iki biyomürekkep formülasyonunun da psödoplastik bir akış gösterdiği sonucuna varılmıştır (Şekil 4.70-4.71). Formülasyonların viskoziteleri beklendiği gibi artan kayma hızlarında azalmış, kayma gerilimleri ise kayma hızının artışına bağlı olarak artmıştır.

Osilasyonel reometre kullanılarak hem oral hem de rektal optimum biyomürekkep formülasyonunun kayıp modülü (G'') ve depolama modülü (G') ölçümleri hem artan frekans değerlerine hem de artan kayma gerilimi değerlerine karşı ölçülmüştür. Biyomürekkep formülasyonlarının viskoelastisitesi arttıkça basılabilirlikleri kolaylaşmaktadır. Biyomürekkeplerin viskoelastisitesinin değerlendirilebilmesi için viskozite modülü ve elastik modül adı verilen iki önemli parametre bulunmaktadır. Viskozite modülü bir akışkanın katı özelliklerini temsil eden depolama modülü G' olarak da adlandırılır. Elastik modül ise akışkanın sıvı özelliğini temsil eden kayıp modülü G'' olarak da bilinir. Ekstrüzyon temelli 3B biyobaskı teknolojisinde biyomürekkeplerin iyi bir basılabilirliğe sahip olması için katı özelliklerinin baskı sırasında sıvı özelliklerinden daha zayıf olmaması gerekmektedir. Yani 3 boyutlu yapıların oluşumunu sağlamak için viskozite modülü (G') elastik modüle (G'') eşit veya hatta daha yüksek olmalıdır (Xiaorui ve diğerleri, 2023).

Bir materyalin ekstrüzyon temelli 3B biyobaskı teknolojisiyle kolay bir şekilde basılabilmesi için artan kayma gerilimi değerlerinde depolama modülü değerlerinin (G'), kayıp modülü (G'') değerlerinden yüksek olması gerekmektedir (Pellens ve diğerleri, 2004). Ayrıca artan frekans değerlerinde belirli bir frekans değerine kadar depolama modülü değerlerinin (G') kayıp modülü (G'') değerlerinden fazla olması beklenmektedir. Belirli bir frekans değerinden sonra G' değeri, G'' değerine eşit olmakta ve materyalin elastikiyeti ortadan kalkmaktadır (Amorim ve diğerleri, 2021). Oral ve rektal biyomürekkep formülasyonlarının kayma gerilimi-kayıp modülü (G'') ve depolama modülü (G') grafiklerine bakıldığı zaman (Şekil 4.73) her iki biyomürekkep formülasyonunun da artan kayma değerlerinde G' değerlerinin G'' değerlerinden fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca frekans- kayma gerilimi- kayıp modülü (G'') ve depolama modülü (G') grafiklerinde de belirli bir frekans değerine

kadar G' değerlerinin G" değerlerinden fazla olduğu görülmekte belirli bir frekans değerinden sonra her iki parametrenin eşitlendiği ve birden azaldığı görülmektedir (Şekil 4.72).

Karakterizasyon çalışmalarına bakıldığında optimum oral ve rektal biyomürekkep formülasyonlarının akış tipinin ve osilasyonel reometre kullanılarak analiz edilen viskoelastisite sonuçlarının literatürlere göre değerlendirildiğinde ekstrüzyon temelli 3B biyobaskı için uygun olduğu sunucuna varılmıştır.

5.6. Sadece mesalazin yüklü optimum oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının 3B biyobaskısı ve in vitro çözünme hızı çalışmalarının bulgularının değerlendirilmesi

Sadece mesalazin yüklü oral ve rektal hidrojel formülasyonları, salım profillerinin mesalazin içeren oral ve rektal piyasa preparatlarıyla karşılaştırılması amacıyla geliştirilmiştir. Oral formülasyonun 3B biyobaskısında tasarımın Z eksen yönünde boyutu artırılarak Resim 3.13'te yer alan tasarım kullanılmıştır. Tasarımın boyutunun artırılmasıyla formülasyondan mesalazin salımının yavaşlatılması amaçlanmıştır. Oral hidrojin Z eksen yönünde boyutu artınca, hidrojin daha geç parçalanmasına bağlı olarak salım hızının yavaşlaması beklenmektedir.

Tez çalışmamızda salım profillerinin karşılaştırılması amacıyla mesalazin içeren oral piyasa preparatı olarak Pentasa tablet kullanılmıştır. Pentasa tablet, inflamatuvar bağırsak hastalığının tedavi edilmesinde kullanılan uzatılmış salımlı bir tablettir. Etil selüloz kaplı mikrogramüller ile bu uzatılmış salım sağlanmaktadır. Yapılan bir çalışmada Pentasa tabletin pH bağımsız bir salım profili gösterdiği ve mide ortamında 2 saat sonunda tablettten %48 mesalazin salımı gerçekleştiği gösterilmiştir (Abinusawa ve Tenjarla, 2015). İnflamatuvar bağırsak hastalığı ülseratif kolit ve Crohn hastalığı olarak ayrılmaktadır. Crohn hastalığı gastrointestinal sistemin bütün bölümlerinde görülebildiği gibi, ülseratif kolit sadece kolonda görülmektedir. Pentasa tablettten mesalazin salımı midede başlayıp bağırsak ve kolonda da devam etmektedir. Dolayısıyla Pentasa tablet hem Crohn hastalığı tedavisi hem de ülseratif kolit tedavisinde kullanılabilir. Yapılan çalışmalarda her iki hastalık türünde de etkili olduğu gösterilmiştir (Larouche ve diğerleri, 1995; Hanauer ve Strömber, 2004).

Pentasa tablet ve çalışmamızda geliştirilen mesalazin yüklü hidrojelin (O-Mes) salım profillerine bakıldığı zaman, Pentasa tabletten 2 saat sonunda %48,18 mesalazin salımı gerçekleştiği gözlenmiştir. Mesalazin yüklü oral hidrojelden ise 2 saat sonunda %44,81 mesalazin salımı gerçekleşmiştir. Oral hidrojel (O-Mes) ve Pentasa tabletin salım profillerinin benzer olduğu görülmektedir (Şekil 4.74). Çözünme hızı profillerinin benzer olduğunun kanıtlanması için f_2 (benzerlik) değerinin >50 olması, f_1 (fark) değerinin ise <15 olması gerekmektedir. Çalışmadaki fark ve benzerlik faktörleri bu sınırların içerisinde bulunmuştur (Çizelge 4.30). Pentasa tabletten mesalazin salımı uzatılmış salım profiline uyumlu şekilde gerçekleşmektedir. Oral hidrojel formülasyonundan da mesalazin salımı uzatılmış salım profiline uyumlu şekilde gerçekleşmiştir.

Salofalk® supozituar özellikle ülseratif kolit olmak üzere İBH tedavisinde yaygın olarak kullanılan mesalazin içeren rektal piyasa preparatıdır. Salofalk supozituvardan mesalazinin in vitro çözünme hızı çalışması literatürde bulunmamaktadır. Ancak yapılan klinik çalışmalarda Salofalk® supozituarın İBH tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (Andus ve diğerleri, 2010; Watanebe ve diğerleri, 2013). Salofalk® supozituar ve çalışmamızda geliştirilen mesalazin yüklü hidrojelin (R-Mes) salım profillerine bakıldığı zaman her iki formülasyonun da 4 saat sonunda %60'tan fazla mesalazin salımı gösterdiği, 8 saatin sonunda ise her iki formülasyondan yaklaşık %100 mesalazin salımı gerçekleştiği gözlenmiştir. Rektal hidrojel (R-Mes) ve Salofalk® supozituarın salım profillerinin benzer olduğu görülmektedir (Şekil 4.75). Çalışmadaki fark ve benzerlik faktörleri değerleri ile bu durum kanıtlanmıştır (Çizelge 4.30).

Her iki formülasyonun da piyasa preparatı ile benzer bir salım profiline sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca piyasa preparatlarının aksine formülasyonların istenilen tasarımda, istenilen boyutta ve ölçülerde, istenen dozda mesalazin içerecek şekilde hazırlanabilmesi, formülasyonların piyasa preparatına karşı avantajlı olmasını sağlamaktadır.

5.7. TNF- α geninin susturulması amacıyla formülasyonların hazırlanması ve bu formülasyonların karakterizasyon çalışmaları bulgularının değerlendirilmesi

Tez çalışması kapsamında İBH patogenezinde önemli rol oynayan proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- α geninin susturulması amacıyla kitozan:TNF- α siRNA polipeksleri geliştirilmiştir. Kitozan/siRNA oranı 0,1/1-50/1 arasında 13 farklı oranda kitozan:TNF- α polipeksi hazırlanmıştır ve polipeks oluşum oranının belirlenmesi için yatay elektroforezle jel retardasyon çalışmaları yapılmıştır.

siRNA ile stabil polipeks oluşumu için yüksek oranda polikasyon gerekmektedir (Liu ve diğerleri, 2007). Polikasyon derişimi arttıkça polipeksin stabilitesi artmaktadır. Yapılan çalışmalara bakıldığı zaman belirli bir orana kadar artan polimer derişimine bağlı olarak polipekslerin stabilitesinin ve in vitro ve in vivo olarak gen susturma etkinliğinin arttığı gösterilmiştir.

Hazırlanan kitozan:TNF- α siRNA polipekslerinin partikül büyüklüğünün ve polidispersite indeksinin düşük olması zeta potansiyel değerinin ise yüksek olması istenmektedir. Partikül büyüklüğü siRNA'nın hücreye transferi ve dağılımında en önemli faktörlerden birisidir. Polipekslerin partikül büyüklüğü 200-300 nm olduğunda siRNA bozunmaya uğramadan endositoz ile hücrelere kolaylıkla geçebilmektedir (Kim ve diğerleri, 2006).

Çizelge 4.31'e bakıldığı zaman artan kitozan derişimi ile doğru orantılı olarak polipekslerin partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi değerlerinin azaldığı ve zeta potansiyel değerinin arttığı gözlenmiştir. P-40 (kitozan:siRNA oranı 40/1) ve P-50 (kitozan:siRNA oranı 50/1) kodlu polipekslerin partikül büyüklüğü değerinin 200-300 nm civarında olduğu ve polidispersite değerlerinin düşük olduğu, zeta potansiyel değerinin ise yüksek olduğu gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada kitozan:siRNA polipeksi oluşturmak amacıyla düşük molekül ağırlıklı kitozan kullanılmış ve polipeks oranı olarak 10/1, 50/1, 100/1 kitozan:siRNA oranları denenmiştir. Bütün oranlarda polipeks oluşumu gözlenmiştir. Polipeks oluşumu başladıktan sonra, kitozan oranının artmasının partikül büyüklüğü artışına neden olduğu gözlenmiştir (Fernandes ve diğerleri, 2012). Ayrıca çalışmada 50 kDa molekül ağırlığına sahip kitozanla hazırlanan 50/1 kitozan:siRNA oranına sahip

polipeks formülasyonunun partikül büyüklüğü 200-300 nm arasında, zeta potansiyel değeri yaklaşık 15 mV ve polidispersite indeksi 0,3-0,4 arasında bulunmuştur. Yapılan başka bir çalışmada ise 5/1, 10/1, 20/1 ve 100/1 kitozan:siRNA oranlarında polipeksler hazırlanmış ve çalışmamızdaki verilerle uygun şekilde 10/1-100/1 arasında polipeks oluşumunun gözlemlendiği belirtilmiştir. Elde edilen bu veriler literatürle uyumludur (Şalva, 2009). siRNA negatif yüke sahiptir, çalışmamızda hazırlanan polipekslerin pozitif yüke sahip olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.31), bu durumun sebebi siRNA'nın kitozanla polipeks oluşturmalarıdır ki bu istenen bir durumdur. Polipeks oluşturmak amacıyla kullanılan kitozan miktarı arttıkça zeta potansiyel değerlerinin artması bu durumu doğrulamaktadır. siRNA negatif yüke sahip olduğu için, negatif yüklü hücre membranını geçerek hücre içine kolayca taşınması için pozitif yüke sahip bir taşıyıcı gerekmektedir. Kitozan:siRNA polipeksi yüzey yükünün pozitif olması sebebiyle siRNA'nın taşınması için uygun bir taşıyıcı sistemdir.

5.8. Hücre kültürü çalışmalarının bulgularının değerlendirilmesi

5.8.1. TNF- α gen susturma çalışmalarına ait bulguların değerlendirilmesi

Tez çalışmasında hazırlanan formülasyonların TNF- α geninin susturulması üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla gen susturma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında RAW 264.7 (fare monosit makrofaj) hücre hattı kullanılmıştır. RAW 264.7 hücreleri ile kitozan bazlı transfeksiyon çalışmalarının validasyonu literatürde yer almaktadır (Cao ve diğerleri, 2019). Bu hücreler inflamasyon, ülseratif kolit ve İBH çalışmalarında antiinflamatuvar etkinin değerlendirilmesi amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (Laroui ve diğerleri, 2014; Xu ve diğerleri, 2019). Mesalazinin, TNF- α geninin susturulması üzerinde tek başına etkisinin değerlendirilmesi amacıyla mesalazin içeren ve içermeyen oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının gen susturma etkinliği değerlendirilmiştir. Ayrıca P-40 ve P-50 polipekslerinin gen susturma etkinliği tek başına ve mesalazin içeren ve içermeyen hidrojel formülasyonlarına ayrı ayrı yüklenerek değerlendirilmiştir (Çizelge 3.11). Gen susturma çalışmaları sonuçları Şekil 4.76'da gösterilmiştir. Dharmafect pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlara göre P-40'ın gen susturma etkinliğinin P-50'ye oranla anlamlı olarak ($p<0,05$) daha fazla olduğu

görülmektedir, ayrıca P-40'ın gen susturma etkinliği, pozitif kontrol olan Dharmafect'e oranla da daha fazla bulunmuştur. O-P-40 ve R-P-40 formülasyonlarının gen susturma etkinliği kontrole göre anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur ($p<0,05$). İn vitro ve in vivo olarak gen susturma etkinliği stabil bir polileks oluşumuyla ilişkilidir. Polilekslerin partikül büyüklüğü 200-300 nm olduğunda siRNA bozunmaya uğramadan endositoz ile hücrelere kolaylıkla geçebilmektedir ve in vitro gen susturma etkinliği artmaktadır. P-40 polileks formülasyonunun P-50'ye göre zeta potansiyeli değerinin daha yüksek olmasından dolayı daha stabil bir polileks olması ayrıca partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi değerlerinin de daha düşük olması nedeniyle in vitro gen susturma etkinliğinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir (Kim ve diğerleri, 2006). O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 formülasyonlarının gen susturma etkinliği, P-50 yüklü formülasyonlara göre istatistiksel olarak anlamlı olarak farklı olmamakla birlikte oral formülasyonda yaklaşık %15, rektal formülasyonda ise yaklaşık %3 daha fazla bulunmuştur. P-50'nin tek başına yaklaşık %23,24 gen susturma etkinliği olmasına rağmen P-50 yüklü oral ve rektal formülasyonlarda bu etkinlik gözlenmemiştir. Mesalazinin tek başına %10-20 arasında bir etkinliğe sahip olduğu görülmüştür. Kitozanla polileks oluşturma, siRNA'nın hücre içine girmesini sağlamaktadır, siRNA tek başına hücre membranını geçememekte ve dolayısıyla gen susturma etkinliği gösterememektedir. Özellikle P-40 ile, siRNA'nın hücre içine başarıyla girebildiği görülmektedir. O-P-40 ve O-Mes-P-40 formülasyonlarında sırasıyla %66,93 ve %46,53; R-P-40 ve R-Mes-P-40 formülasyonlarında ise sırasıyla %49,64 ve %45,06 gen susturma etkinliğinin görülmesi, formülasyonların 3B biyobaskısı sırasında siRNA'nın parçalanmadığı ve etkinliğini kaybetmediğini kanıtlar niteliktedir. Xu ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada TNF- α siRNA içeren polimerzomlar üretilmiş ve bu polimerzomların RAW 264.7 hücreleri ile in vitro gen susturma etkinlikleri değerlendirilmiştir siRNA yüklü polimerzomların TNF- α genini yaklaşık %50 oranında susturduğu gözlenmiştir (Xu ve diğerleri, 2019). Bir başka çalışmada ise TNF- α siRNA içeren tiyoketal nanopartiküller geliştirilmiş ve bu partiküllerin gen susturma etkinliği RAW 264.7 hücrelerinde değerlendirilmiştir. siRNA içeren partiküllerin, negatif kontrol grubuna göre TNF- α seviyesini yaklaşık %40 düşürdüğü gözlenmiştir (Wilson ve diğerleri, 2010). Formülasyonların uygulandığı hücrelerdeki bağıl TNF- α seviyesine bakıldığı zaman, alışmamızda geliştirdiğimiz 3B biyobasılmış O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 formülasyonlarının

TNF- α genini susturmada daha etkili oldukları görülmektedir ve bu formülasyonların TNF- α geninin susturulmasında etkili olduğu yapılan gen susturma çalışmalarıyla kanıtlanmıştır.

5.8.2. Sitotoksisite çalışmalarına ait bulguların değerlendirilmesi

MTT yöntemiyle RAW 264.7 hücre hattında sitotoksisite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. RAW 264.7 hücre hattı inflamatuvar bağırsak hastalığı çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. RAW 264.7 hücre hattı bağırsak ortamını doğru bir şekilde simüle ettiği ve İBH patogeneğinde önemli rol oynayan toll-benzeri reseptörleri (TLR) taklit etme yetenekleri nedeniyle İBH çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Joshi, Soni ve Acharya, 2022).

Formülasyon hazırlanmasında kullanılan polimerlerin, poliplekslerin (Çizelge 3.13) ve hidrojel formülasyonlarının (Çizelge 3.14) sitotoksisiteleri değerlendirilmiştir. Sitotoksisite değerlendirilmesinde kullanılan derişim literatürler değerlendirilerek seçilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar göz önünde bulundurularak stok çözeltiler hazırlanmış ve bu çözeltilerden seyreltmeler yapılmıştır (Wang ve diğerleri, 2015; Rahmani ve diğerleri, 2019; Onur ve diğerleri, 2013; Wu ve diğerleri, 2021; Fernandes ve diğerleri, 2012). Sodyum aljinat türevi olan Protanal CR8223'ün sitotoksisitesi 3, 1,5, 0,75 ve 0,375 mg/mL; Protanal CR8133'ün sitotoksisitesi ise 0,75, 0,375, 0,1875, ve 0,09375 mg/mL olmak üzere dört farklı derişimde değerlendirilmiştir. Sonuçlara bakıldığı zaman herhangi bir sitotoksik etki gözlenmemiştir (Şekil 4.77). Literatürde bulunan aljinat türevlerinin sitotoksisitesinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda aljinatın çalışmamızda kullanılan RAW 264.7 (Krol ve diğerleri, 2017) ve L929 fibroblast hücrelerinde farklı derişimlerde herhangi bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir (Wang ve diğerleri, 2015). İpek fibroinin sitotoksisitesi 4, 2, 1 ve 0,5 mg/ml olmak üzere dört farklı derişimde değerlendirilmiş ve herhangi bir sitotoksik etki gözlenmemiştir, literatürde de ipek fibroinin MCF7 and HT29 hücrelerinde de sitotoksisiteye neden olmadığı belirtilmiştir (Rahmani ve diğerleri, 2019). Formülasyon hazırlanmasında kullanılan bir diğer polimer hyaluronik asit hücrelere 3, 1,5, 0,75 ve 0,375 mg/mL derişimlerinde uygulanmış ve sitotoksisite gözlenmemiştir. Yapılan bir çalışmada hyaluronik asitin kondrosit hücrelerinde de sitotoksisiteye neden olmadığı ifade

edilmiştir (Onur ve diğerleri, 2013). Çalışmamızda etkin madde olarak mesalazin kullanılmaktadır, mesalazinin sitotoksitesi 2, 1, 0,5, 0,05 mg/mL derişimlerinde değerlendirilmiş, herhangi bir sitotoksiste gözlenmemiş ve mesalazinin diğer maddelere göre hücre canlılığını anlamlı bir şekilde artırdığı görülmüştür ($p<0,01$). Literatürde yapılan bir çalışmada da mesalazinin RAW 264.7 hücrelerinde sitotoksik bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Wu ve diğerleri, 2021). Çalışmamızda kitozan, siRNA ile polipeks oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Kitozanın sitotoksitesi 0,75, 0,375, 0,1875, ve 0,09375 mg/mL; sense ve antisense TNF- α siRNA'ların ise 90, 30, 60 ve 15 μ g/mL derişimlerinde değerlendirilmiştir. Ayrıca polipeks halinde de sitotoksiste değerlendirmesi yapılmıştır. siRNA ve kitozanın tek başında ve polipeks halde herhangi bir sitotoksisteye neden olmadığı gözlenmiştir. Fernandes ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada HeLa, OV-3, MG-63 hücre hatlarında, kitozan, siRNA ve kitozan:siRNA polipeksinin sitotoksiteleri değerlendirmiş ve herhangi bir sitotoksik etki gözlenmemiştir (Fernandes ve diğerleri, 2012). Mesalazin hariç diğer tüm maddelerin hücre canlılığı üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır ($p>0,05$).

Çalışma kapsamında boş, sadece polipeks içeren, sadece mesalazin içeren ve polipeks ile mesalazini birlikte içeren oral ve rektal formülasyonların sitotoksiteleri değerlendirilmiştir (Şekil 4.78). Formülasyonda bulunan polimerler, etkin madde ve siRNA polipekslerinin sitotoksik etki göstermemesi sebebiyle formülasyonların da sitotoksisteye neden olmaması beklenmektedir. Boş rektal formülasyon (R-Boş) hariç diğer formülasyonların hücre canlılığı üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$). Boş rektal formülasyonun (R-Boş) hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığı görülse de ($p<0,01$), hücre canlılığı %70'in üzerinde olduğu için sitotoksik olarak değerlendirilmemiştir.

Sitotoksiste çalışmaları sonucunda geliştirilen formülasyonların RAW 264.7 hücrelerine sitotoksik bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

5.9. Kitozan:TNF- α siRNA polipleksi ile fizyolojik sıvılarda stabilite çalışmalarının bulgularının değerlendirilmesi

İn vitro gen susturma çalışmalarından sonra gen susturma etkinliği daha fazla bulunan P-40'ın fizyolojik ortamlarda stabilite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Mide ortamını taklit etmek amacıyla pH 1.2, bağırsak ortamını taklit etmek amacıyla da pH 6.8 tamponu kullanılmıştır. Bu deneydeki amaç TNF- α siRNA içeren formülasyonların özellikle oral uygulamadan sonra vücuttaki davranışının in vitro olarak değerlendirilmesidir. Jellerde uygulamanın yapıldığı kuyucuklardaki parlaklık siRNA'nın kompleks halde bulunduğunu göstermektedir. Buna göre pH 1.2'de polipleks haldeki siRNA'nın hem 1. hem de 2. saatte parçalanmadığı görülürken, naked (çıplak) TNF- α siRNA'nın parçalandığı görülmektedir. pH 6.8 ortamında 2. saatte naked (çıplak) TNF- α siRNA kısmi parçalanmaya uğrarken, polipleksin 6. saatte kadar parçalanmadan kaldığı, 6. saatte ise hem polipleks halde hem de siRNA'nın parçalandığı görülmektedir. Buna göre, her iki ortamda da polipleks haldeki TNF- α siRNA'nın, naked (çıplak) haldeki TNF- α siRNA'ya göre stabilitesinin daha fazla olduğu görülmektedir (Resim 4.2). Jel retardasyon çalışmaları sonucunda polipleks hazırlamanın siRNA'nın stabilitesini artırdığı ve in vitro çözünme hızı çalışmalarından önce P-40'ın çözünme hızı ortamlarında stabilitesini koruduğu sonucuna varılmıştır.

Yapılan bir çalışmada, TNF- α siRNA nanopartiküllerinin fizyolojik ortamlar olan simüle mide ortamı, simüle bağırsak ortamı, mide ortamı ve bağırsak ortamındaki stabilitesi değerlendirilmiştir. Çalışmada partiküler halde ve naked (çıplak) halde siRNA'lar kullanılmıştır. Çalışma sonucunda partiküler haldeki siRNA'nın fizyolojik ortamlardan ve RNAaz enziminden, naked (çıplak) haldeki siRNA'ya göre daha fazla korunduğu gözlenmiştir (Iqbal ve diğerleri, 2018). Bir başka çalışmada ise hisditin aracılı hidrojen bağlarıyla siRNA polipleksleri geliştirilmiş ve bu poliplekslerin serumda stabiliteleri 24 saat boyunca değerlendirilmiştir. Poliplekslerin naked (çıplak) siRNA'ya göre serumda stabilitesinin daha fazla olduğu görülmüştür. Poliplekslerde bozunma 6. saatten sonra başlarken, naked (çıplak) siRNA'lar 4. saatte bozunmuştur (Chou ve diğerleri, 2014). Bir diğer çalışmada yapılan stabilite deneylerinde polipleks oluşturma'nın siRNA'nın stabilitesini artırdığı sonucu bulunmuştur (Raval ve diğerleri, 2019). Literatürde yer alan çalışmalardan elde edilen bulgular elde ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir. Sonuç olarak polipleks

oluşturmak siRNA'nın stabilitesini artırmaktadır ve fizyolojik ortamlarda bulunan RNAaz enzimine, midenin asit ortamına karşı siRNA'yı parçalanmaktan korumaktadır.

5.10. TNF- α siRNA ve mesalazin içeren oral ve rektal formülasyonların 3B biyobaskı yöntemiyle hazırlanması ve karakterizasyon çalışmaları bulgularının değerlendirilmesi

5.10.1. DSC analizlerinin bulgularının değerlendirilmesi

O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonlarının DSC analizleri gerçekleştirilmiştir. O-Mes-P-40 formülasyonunun DSC termogramına bakıldığı zaman formülasyonda yaklaşık 280 °C'de mesalazine ait endotermik bir pike rastlanmıştır. (Şekil 4.79). R-Mes-P-40 formülasyonunun DSC termogramına bakıldığı zaman oral formülasyonda olduğu gibi yaklaşık 280 °C'de mesalazine ait endotermik bir pik görülmektedir. (Şekil 4.80). Formülasyonda yer alan diğer polimerlerin erime piklerine rastlanmamıştır. Formülasyonlarda mesalazine ait erime pikinin görülmesi, formülasyonun hazırlanması sırasında mesalazinin polimorfik bir değişime uğramadığını göstermektedir. Mesalazin normalde kristal formdadır. Ancak formülasyon geliştirme işlemleri sırasında amorf forma geçebilmektedir (Patil, Hajare ve Awale, 2011).

5.10.2 FTIR analizlerinin bulgularının değerlendirilmesi

O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonlarının FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. FTIR analizleri hem hidrojel formülasyonları hem de liyofilize hidrojel formülasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Oral formülasyonun FTIR spektrumuna bakıldığı zaman, liyofilize edilmiş formülasyonda hidrojel formülasyonunda görülen 3286,53 cm⁻¹'deki H bağlarından ve ipek fibroinin karakteristik piki olan N-H gerilme bandından kaynaklanan geniş pikin küçüldüğü ama kaybolmadığı görülmektedir. Bu durumun formülasyonun liyofilize edilmesiyle yapısındaki suyu kaybetmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca O-Mes-P-40 formülasyonunun spektrumunda mesalazine ait 1637,66 cm⁻¹'de primer amin (N-H) gerilme bandı, 1445,97 cm⁻¹'de C-H gerilme bandı, 1352,49 cm⁻¹'de C-H ve O-H gerilme bantları, 807,12 cm⁻¹'de aromatik bileşenden kaynaklı C-H gerilme

bandı ve $627,79\text{ cm}^{-1}$ 'de düzlemsel bükülme titreşimleri dışındaki aromatik C-H gerilme bandı gözlenmiştir (Şekil 4.81). Bu durum formülasyon hazırlanırken mesalazinin polimorfik bir değişime uğramadığını ve kristal yapısını koruduğunu göstermektedir.

Rektal formülasyonun FTIR spektrumuna bakıldığı zaman, hidrojel formülasyonunda liyofilize edilmiş formülasyonda hidrojel formülasyonunda görülen H bağlarından ve ipek fibroinin karakteristik piki olan N-H gerilme bandından kaynaklanan pikin küçüldüğü ama kaybolmadığı görülmüştür. Bunun sebebinin, oral formülasyonda olduğu gibi liyofilizasyon işlemi ile yapıda su kalmamasından kaynakladığı düşünülmüştür. Spektruma bakıldığı zaman mesalazine ait $1637,52\text{ cm}^{-1}$ 'de primer amin (N-H) gerilme bandı, $1446,71\text{ cm}^{-1}$ 'de C-H gerilme bandı, $1352,50\text{ cm}^{-1}$ 'de C-H ve O-H gerilme bantları ve $627,33\text{ cm}^{-1}$ 'de düzlemsel bükülme titreşimleri dışındaki aromatik C-H gerilme bandı gözlenmiştir (Şekil 4.82). Bu durum formülasyon hazırlanırken mesalazinin polimorfik bir değişime uğramadığını ve kristal yapısını koruduğunu göstermektedir.

Hem oral hem de rektal formülasyonun FTIR sonuçları değerlendirildiğinde mesalazin ve ipek fibroine ait karakteristik pikler gözlenmiştir. 3B biyobaskı işleminin polimorfik bir dönüşüme neden olmadığı sonucuna varılmıştır.

5.10.3. XRD analizlerinin bulgularının değerlendirilmesi

O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonlarının ve mesalazinin XRD difraktogramları incelendiğinde (Şekil 4.83), mesalazine ait kristal yapıya işaret eden piklere rastlanmamıştır. Bu durum formülasyonlarda mesalazin miktarının az olmasından ya da mesalazinin kristal formdan amorf forma geçmesiyle açıklanabilmektedir. Ancak FTIR ve DSC analizlerinde hem oral hem de rektal formülasyonda mesalazine ait piklerin görülmesi mesalazinin kristal yapısını koruyarak polimorfik dönüşümün gerçekleşmediğini göstermektedir. Bu nedenle formülasyonların XRD difraktogramlarında mesalazine ait pik görülmemesinin formülasyon örneklerinde saf mesalazinin difraktogramına göre mesalazin miktarının az olmasından kaynakladığı düşünülmektedir.

5.10.4. Termogravimetrik analiz bulgularının değerlendirilmesi

Termogravimetrik analiz, zamanın veya sıcaklığın bir fonksiyonu olarak numunenin ağırlığındaki değişimin ölçülmesi esasına dayanan bir yöntemdir.

Çalışmamızda hazırlanan oral ve rektal hidrojel formülasyonların termal stabilitesinin ve formülasyonlardaki su içeriğinin belirlenmesi amacıyla termogravimetrik analizler gerçekleştirilmiştir. O-Mes-P-40 hidrojel formülasyonunun termal analiz grafiğine bakıldığı zaman formülasyonunun sıcaklığa bağlı olarak parçalanmasının iki aşamada gerçekleştiği görülmektedir. 0-200 °C arasındaki parçalanma, hidrojel formülasyonunun yapısındaki suyu tamamen kaybetmesiyle gözlenirken, 200-500 °C arasında hidrojel yapısında bulunan polimerlerin ana zincirlerinin parçalanması gerçekleşmiştir (Şekil 4.84). O-Mes-P-40 formülasyonunun termal stabilitesi düşük bulunmuştur.

R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonunun da termal parçalanma profili O-Mes-P-40 formülasyonuna benzer bulunmuştur. Rektal hidrojel formülasyonu ilk olarak yapısındaki suyu tamamen kaybetmiş, daha sonra formülasyon bileşenlerinin ana zincirlerinin parçalanması gerçekleşmiştir. R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonunun termal stabilitesi de düşük bulunmuştur (Şekil 4.85).

Hidrojel formülasyonlarının termal stabilitelerinin düşük olmasının nedeni formülasyonların yapısında bulunan doğal ve biyoparçalanabilir polimerlerdir. Formülasyon yapısındaki sentetik madde miktarı arttıkça formülasyonun termal stabilitesinin arttığı bilinmektedir. Termal stabilitenin artırılması amacıyla formülasyonlara sentetik materyallerin eklendiği çalışmalar bulunmaktadır (Dodero ve diğerleri, 2019; Phang ve diğerleri, 2011; Gomathi ve diğerleri, 2017).

Oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının termal parçalanma profilleri, literatürde aljinat temelli hidrojellerle yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (Reddy ve diğerleri, 2014).

5.10.5. Şişme kapasitesi analizleri bulgularının değerlendirilmesi

Şişme kapasitesi, bir hidrojin su tutma kapasitesini ifade etmektedir. Şişme kapasitesinin belirlenmesi için şişme indeksi değeri hesaplanmaktadır. Şişme kapasitesi formülasyonların uygulandığı bölgede kalış süresini, ilaç salımı gibi özelliklerini etkilemektedir. Hidrojeller çapraz bağlanan hidrofilik polimerlerden oluşmaktadır. Bu polimerik yapıların içine su girdikçe polimerik zincir genişler ve bir direnç kuvveti gösterirler. Şişme denge durumuna geldiği zaman polimerlerin gösterdiği direnç kuvveti ile polimerik yapıya giren suyun osmotik kuvveti dengelenir ve böylece şişme tamamlanır (Park ve diğerleri, 1993).

Çalışmamız kapsamında hazırlanan oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının şişme kapasitelerinin değerlendirilebilmesi amacıyla şişme indeksleri hesaplanmıştır. O-Mes-P-40 formülasyonunun şişme indeksi %366, R-Mes-P-40 formülasyonunun ise şişme indeksi %404 olarak bulunmuştur (Şekil 4.86). Yani oral hidrojel formülasyonu ağırlığının 3,66 katı kadar, rektal hidrojel formülasyonu ise ağırlığının 4 katı kadar su tutabilmektedir. Bu durum hidrojel formülasyonlarında yer alan polimerlerin hidrofilik olmasından kaynaklanmıştır. Hidrofilik polimerlerin şişme kapasiteleri daha yüksektir. Hidrojellerin şişme kapasiteleri salım özelliklerini etkilemektedir. Hidrojeller ortam sıvısıyla temasa geçtiklerinde şişerler. Başlangıçta hidrojel ortamdaki sıvıyla temasa geçtiğinde ortam sıvısı polimerik ağa geçerek hidrojin parçalanmasına ve bu parçalanma da daha çok ortam sıvısının hidrojele geçmesine neden olmaktadır. Daha çok ortam sıvısının hidrojele geçmesi de hidrojelde bulunan etkin maddenin salımını hızlandıracaktır (Kojima ve diğerleri, 1998). Sonuçlar değerlendirildiğinde rektal hidrojelden etkin madde salım hızının oral hidrojelle karşılaştırıldığında daha yüksek olması beklenmektedir. Çalışma kapsamında geliştirdiğimiz hidrojellerin salım hızlarına bakıldığı zaman (Şekil 4.74-4.75) rektal hidrojelden etkim madde salımının daha hızlı gerçekleştiği görülmektedir. Bu durumun formülasyonların şişme kapasiteleri ile de ilgili olduğu düşünülmüştür.

Hidrojelde yer alan polimerlerin molekül ağırlığı arttıkça çapraz bağlanma derecesi artmaktadır. Çapraz bağlanma derecesinin artması da şişme kapasitesinde azalmaya neden olmaktadır (Hoti ve diğerler, 2021). O-Mes-P-40 formülasyonunda bulunan sodyum aljinatın (Protanal CR8223) molekül ağırlığı, R-Mes-P-40

formülasyonunda bulunan sodyum aljinatın (Protanal CR8133) molekül ağırlığından daha yüksektir. Dolayısıyla oral formülasyonun şişme indeksinin rektal formülasyondan düşük olması beklenmektedir. Formülasyonların şişme indeksi sonuçları bu doğrultuda bulunmuştur. Oral ve rektal formülasyonların şişme kapasiteleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

5.10.6. İn vitro parçalanma deneyi bulgularının değerlendirilmesi

Çalışma kapsamında hazırlanan oral ve rektal formülasyonların vücut ortamında parçalanma sürelerinin belirlenmesi amacıyla in vitro parçalanma çalışması gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlara göre 24 saat sonunda R-Mes-P-40'ın %75,9'nun, O-Mes-P-40'ın ise %31,2'sinin parçalanmaya uğradığı gözlenmiştir. O-Mes-P-40 formülasyonunda bulunan sodyum aljinatın (Protanal CR8223) molekül ağırlığı R-Mes-P-40 formülasyonunda bulunan sodyum aljinatın (Protanal CR8133) molekül ağırlığından daha yüksektir. Polimerin molekül ağırlığı arttıkça çapraz bağlanma derecesi de artmaktadır ve bu durum da parçalanma oranını düşürmektedir. İn vitro parçalanma çalışmaları sonucunda beklenildiği gibi rektal formülasyonun parçalanma oranının oral formülasyona göre daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.87-4.88). Oral formülasyon gastrointestinal kanaldan geçerek kolona ulaştığı için parçalanma oranının daha yavaş olması, etki süresi açısından istenen bir sonuçtur.

Yapılan bir çalışmada aljinat jel kullanılarak in vitro parçalanma deneyi gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda 20 saat sonunda aljinat jelin tamamının degrade olduğu görülmüştür (El Moussaoui ve diğerleri, 2021). Bizim çalışmamızda geliştirdiğimiz hidrojel formülasyonlarında aljinat dışında ipek fibroin ve hyaluronik asitin bulunması ve hidrojellerin çapraz bağlı olmasının parçalanma süresini uzattığı düşünülmektedir.

5.10.7. Mekanik testlerin bulgularının değerlendirilmesi

Oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının uygulama sırasında ve vücuda alındıktan sonra mekanik dayanıklılığının analiz edilmesi amacıyla Texture Analyzer cihazı

kullanılarak mekanik testler gerçekleştirilmiştir. Mekanik testler sonucunda gerilim (mPa)'e karşı gerinim (%) grafikleri çizilerek bu grafikler yardımıyla kopma uzaması ve gerilme direnci değerleri hesaplanmıştır.

Kopma uzaması değeri materyallerin hangi gerilim değeri altında bütünlüğünü kaybetmeye başladığının göstergesidir. Kopma uzaması değeri yüksek olan materyallerin daha dayanıklı olduğu söylenebilmektedir. Gerilme direnci değeri ise materyallerin kopmadan önce ne kadar esneyebildiğinin göstergesi olarak kullanılmaktadır.

Oral formülasyonun kopma uzaması değeri %30,675, gerilme direnci değeri 0,017 mPa; rektal formülasyonun kopma uzaması değeri %38,417, gerilme direnci değeri 0,016 mPa olarak bulunmuştur (Çizelge 4.32-4.33). Bu değerler gerilim (mPa)'e karşı gerinim (%) grafikleri kullanılarak cihaz yazılımı yardımıyla hesaplanmıştır (Şekil 4.89-4.90). Sonuçlara göre rektal formülasyonun kopma uzaması ve oral formülasyona göre yüksek bulunmuştur. Oral formülasyonun ise gerilme direnci değeri rektal formülasyona göre fazladır. Ancak formülasyonların kopma uzaması ve gerilme direnci değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu sonuçlara göre rektal formülasyonun oral formülasyona göre daha dayanıklı olduğu ancak oral formülasyonun rektal formülasyona göre daha esnek olduğu söylenebilmektedir. Rektal uygulama, oral uygulamaya göre daha zor bir yöntemdir. Bu nedenle rektal uygulama sırasında rektal formülasyonun dayanıklılığının oral formülasyona göre daha fazla olması gerekmektedir. Esneklik ise formülasyonun parçalanmasını engelleyen bir özelliktir, formülasyonun uygulandıktan sonra daha geç parçalanması formülasyonun salım özelliklerini etkilemektedir. Oral formülasyonun rektal formülasyona göre daha esnek olması, oral formülasyonun parçalanmasını geciktirip, formülasyondan etkin madde salımını yavaşlatacaktır. Çalışmamızda geliştirilen rektal formülasyonun dayanıklılığının; oral formülasyonun ise esnekliğinin yüksek olması istenen bir özelliktir.

Yapılan bir çalışmada sodyum aljinat/ipek fibroin/hyaluronik asit temelli doku iskeleleri geliştirilmiştir. İskeleler kimyasal bir çapraz bağlama yöntemi olan EDC/NHS ile çapraz bağlanmıştır. Bu iskelelerin kopma uzaması değeri %136, gerilim direnci değeri ise 8.34 MPa olarak bulunmuştur (Yang ve diğerleri, 2019). Bu

çalışmada hidrojellerin çapraz bağlama yöntemi kimyasal bir yöntem olduğu için ve formülasyon doku iskelesi olarak geliştirildiği için sonuçların bizim çalışmamızdaki sonuçlardan yüksek olması beklenen bir durumdur. Ayrıca çalışma kapsamında geliştirdiğimiz formülasyonların 24 saat etki göstermesi beklendiği için kopma uzaması ve gerilme direnci değerlerinin doku iskelelerindeki kadar yüksek olması gerekli değildir.

Bir başka çalışmada ise sodyum aljinat-poliakrilamid hidrojeller geliştirilmiş, mekanik özelliklerine bakıldığı zaman gerilme direnci 0.55 MPa olarak bulunmuştur (Wang ve diğerleri, 2015). Bu çalışmadaki sonuç bizim değerlerimize benzer bulunmuştur ancak sentetik polimerin gerilme direnci doğal polimerlere göre yüksektir (Reddy, 2021). Gerilme direncindeki bu farkın poliakrilamid polimerinin sentetik kaynaklı olmasından dolayı, bu polimerin gerilme direncini artırmasında kaynaklandığı düşünülmektedir.

5.10.8. Mukoadezyon deneylerinin bulgularının değerlendirilmesi

Mukoadezyon hazırlanan bir formülasyonun dokuya yapışarak etki süresinin uzaması açısından önemli bir parametredir. Çalışmamızda ise hidrojellerin İBH tedavisi için gastrointestinal sistemde daha fazla kalması ve daha uzun süre etki göstermesi istenen bir durumdur. Çalışma kapsamında oral ve rektal formülasyonların mukoadesyon özelliklerinin belirlenmesi için Texture-Analyzer TA-TX cihazı kullanılmıştır. Oral ve rektal formülasyonların etki bölgesinin kolon olması amaçlandığı ve in vivo deneylerde deney hayvanı olarak fare kullanıldığı için çalışmalar fare kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İBH oluşumunun formülasyonların mukoadesyonuna etkisinin incelenmesi amacıyla doku olarak hem sağlıklı kolon hem de İBH oluşturulmuş kolon kullanılmıştır. Formülasyonların normal dokuya oranla İBH oluşturulmuş dokuya mukoadesyonlarının çok fazla azalmaması istenmektedir.

O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 formülasyonlarının mukoadesyon sonuçları Çizelge 4.34'te ve Şekil 4.91-4.92'de verilmiştir. Mukoadesyon işi parametresine göre değerlendirilmiştir. Sonuçlara bakıldığı zaman hem oral hem de rektal hidrojel formülasyonunun İBH oluşturulmuş dokuya mukoadesyonu, sağlıklı dokuya göre

azalmıştır. İBH sonucu kolon dokusunun doğal yapısında bozulmalar meydana geldiği için beklenen bir durumdur.

Rektal formülasyonun her iki dokuya da mukoadazyonu oral formülasyona göre daha fazla bulunmuştur. Hidrojellerin mukoadazyonunu şişme kapasiteleri etkilemektedir, hidrojellerin şişme kapasiteleri arttıkça mukoadazyonlarının da artması beklenmektedir (Chaturvedi, Kumar ve Pathak, 2011). Oral ve rektal hidrojellerin şişme kapasitesi değerlerine bakıldığı zaman (Şekil 4.86) rektal hidrojelin şişme kapasitesinin oral hidrojele göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumda rektal hidrojelin mukoadazyonunun oral hidrojele göre daha yüksek olması beklenen bir durumdur.

Hem oral hem de rektal hidrojel formülasyonun sağlıklı dokuya ve inflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulmuş dokuya mukoadazyonları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca formülasyonların sağlıklı dokuya mukoadazyonları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ($p>0,05$), inflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulmuş dokuya mukoadazyonları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Ancak formülasyonların İBH oluşturulmuş dokuya da mukoadazyonları bulunmaktadır.

Geliştirilen formülasyonların mukoadezif özelliğe sahip olmaları formülasyonda yer alan polimerlerden kaynaklanmaktadır. Formülasyonda bulunan ipek fibroin, sodyum aljinat ve hyaluronik asit mukoadezif özelliğe sahip polimerlerdir. Yapılan çalışmalarda ipek fibroin, sodyum aljinat ve hyaluronik asitin vajinal, nazal, bukkal dokulara mukoadazyon sağladığı gösterilmiştir (Kesavan ve diğerleri, 2010; Guarise ve diğerleri, 2023; Laffleur, 2018; Dong ve diğerleri, 2015).

5.10.9. Morfolojik analiz bulgularının değerlendirilmesi

Çalışma kapsamında O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonlarının morfolojik analizleri taramalı elektron mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Formülasyonların morfolojisinin daha iyi analiz edilmesi amacıyla, oral ve rektal formülasyonlar $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 40 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Formülasyonların

hem liyofilize hem de liyofilize olmamış halleri taramalı elektron mikroskobu kullanılarak görüntülenmiş ve formülasyonların morfolojisi değerlendirilmiştir.

Liyofilize edilmemiş hidrojel pürüzsüz, bulutsu yüzey özelliği göstermiştir (Resim 4.4-C-D). Yapılan bir çalışmada, aljinat hidrojellerin kriyo-SEM ile yapılan morfolojik analizlerinde çalışmamıza benzer şekilde pürüzsüz ve bulutsu bir yüzeye sahip olduğu gözlenmiştir (Karnik ve diğerleri, 2016).

Liyofilize edilmiş hidrojel ise liyofilizasyon işlemi sonucunda beklenildiği gibi poröz bir görüntü vermiştir (Resim 4.4-A-B). Yapılan bir çalışmada liyofilize edilmiş aljinat hidrojellerin morfolojik analizinde bizim çalışmamızdaki sonuçlara benzer bir şekilde birbirine bağlı poröz bir yapı gözlenmiştir (Feyzmanesh ve diğerleri 2022).

Bizim çalışmamızda olduğu gibi ipek fibroin, sodyum aljinat ve hyaluronik asit temelli doku iskelelerinin geliştirildiği bir çalışmada yapılan morfolojik analizlerde çalışmamızda benzer şekilde poröz bir yapı elde edilmiştir (Yang ve diğerleri, 2019).

5.11. İn vitro çözünme hızı çalışmalarının bulgularının değerlendirilmesi

Hidrojel formülasyonlarına serbest halde TNF- α siRNA eklenmesinin amacı polipeks oluşturmanın salıma olan etkisinin değerlendirilmesidir.

5.11.1. Oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının in vitro çözünme hızı çalışmalarının bulgularının değerlendirilmesi

Oral formülasyondan mesalazin salım profili Şekil 4.93'te gösterilmiştir. Grafiğe göre, formülasyona siRNA eklenmesinin mesalazinin salım profilini değiştirmedeği görülmektedir bu durum DDSolver yazılımı kullanılarak hesaplanan f1(fark faktörü) ve f2(benzerlik) ile kanıtlanmıştır (Çizelge 4.35). Oral formülasyondan serbest ve polipeks halde TNF- α siRNA salım profili Şekil 4.94'te verilmiştir. Her iki oral formülasyondan da TNF- α siRNA salımının gerçekleştiği, ancak serbest TNF- α siRNA yüklü hidrojelde (O-Mes-Serbest) 12.saatten itibaren ortamdaki TNF- α siRNA'nın bozunmaya başladığı gözlenmiştir. Polipeks yüklü formülasyonda (O-Mes-P-40) ise TNF- α siRNA'nın polipeksten ve formülasyondan yavaş ve kontrollü

bir şekilde salındığı ve salımın 24 saat boyunca devam ederek %100'e ulaştığı görülmektedir.

Rektal formülasyondan mesalazin salım profili Şekil 4.95'te gösterilmiştir. Grafiğe göre, formülasyona siRNA eklenmesinin mesalazinin salım profilini değiştirmedığı Çizelge 4.36'da yer alan f1 ve f2 faktörleriyle kanıtlanmıştır (Çizelge 4.36). Rektal formülasyondan serbest ve polipeks halde TNF- α siRNA salım profili ise Şekil 4.96'da verilmiştir. Buna göre her iki oral formülasyondan da TNF- α siRNA salımının gerçekleştiği, ancak serbest TNF- α siRNA yüklü formülasyonda (R-Mes-Serbest) gastrointestinal ortamdan farklı olarak bağırsak ortamında 8.saatten itibaren ortamdaki TNF- α siRNA'nın bozunmaya başladığı gözlenmiştir. Polipeks yüklü formülasyonda (R-Mes-P-40) ise TNF- α siRNA'nın polipeksten ve formülasyondan yavaş ve kontrollü bir şekilde salındığı ve salımın 24 saat boyunca devam ederek %100'e ulaştığı görülmektedir. Rektal formülasyonlarda serbest halde hidrojellere yüklenen TNF- α siRNA'nın ortamda daha çok parçalandığı gözlenmiştir.

Bu sonuçlar polipeks oluşturma ve bu polipekslerin polimerik bir ağ yapısına sahip 3B basılmış hidrojele yüklenmesinin siRNA'yı pH 1.2 mide ortamı, pH 6.8 bağırsak ortamı ve pH 7.4 kolon ortamında parçalanmaktan koruduğu gözlenmiştir. Ayrıca ekstrüzyon temelli 3B biyobaskının TNF- α siRNA yapısını parçalamadığı gen susturma çalışmalarından sonra in vitro salım çalışmaları ile de kanıtlanmıştır. Çözünme hızı sonuçlarının desteklenmesi amacıyla hem oral hem de rektal formülasyonlar için ortamdan belirli saatlerde alınan örneklerle jel retardasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Jel görüntülerine bakıldığı zaman oral ve rektal uygulama için hem serbest TNF- α siRNA yüklü (O-Mes-Serbest ve R-Mes-Serbest) hem de polipeks yüklü formülasyonlarda (O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40) 24. saatin sonunda bile her iki ortamda da bozunmadan kalmış siRNA'nın bulunduğu görülmektedir. TNF- α siRNA'nın bozunmadan kalması jeldeki kuyucukların parlaması ve jellerdeki sürüklenme izinden anlaşılmaktadır, jel retardasyon çalışmaları ve in vitro çözünme hızı sonucu elde edilen grafikler birbirini destekler nitelikte bulunmuştur (Resim 4.5 ve 4.6).

Bu sonuçlara göre, polipleks oluşturma ve 3B basılmış oral formülasyonun TNF- α siRNA'nın bozunmasını engellediği ve TNF- α siRNA'yı gastrointestinal ortamda bozunmadan koruduğu sonucuna varılmıştır.

Dormenval ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada, inhalasyon için püskürterek kurutma yöntemiyle siRNA yüklü lipidoid polimer hibrit nanopartiküller hazırlanmıştır. Formülasyondan siRNA salımının değerlendirilmesi amacıyla pH 7.4 tamponunda 4 saatlik bir salım çalışması yapılmıştır. 4 saatlik sürenin sonunda ortamdaki siRNA miktarının %80'e ulaştığı gözlenmiştir ve ortamdaki siRNA parçalanmamıştır. Hibrit nanopartikül yapısı, siRNA'nın ani salımını engellemiş ve siRNA yapısını parçalanmaktan korumuştur (Dormenval ve diğerleri, 2019). Bir başka çalışmada ise yaptığımız çalışmaya benzer şekilde siRNA polipleksi termosensitif konvansiyonel yöntemle hazırlanan hidrojel formülasyonuna yüklenmiştir. Hidrojel formülasyonlarından siRNA salımının değerlendirilmesi amacıyla pH 7.4 tamponunda 128 saat boyunca in vitro salım deneyi gerçekleştirilmiştir. siRNA, hidrojel formülasyonuna hem serbest, hem de polipleks olarak yüklenmiştir. Salım sonuçlarına bakıldığı zaman, hidrojel yapısının siRNA'nın parçalanmasını engellediği ve 128 saatlik bir kontrollü salım sağladığı gözlenmiştir ve ayrıca polipleks halde siRNA içeren formülasyonun serbest siRNA içeren formülasyona göre salım hızının daha yavaş olduğu gözlenmiştir (Fliervoet ve diğerleri, 2020). Thanki ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada ise polimerik hibrit nanopartiküle yüklenen siRNA'nın 6 saat boyunca kontrollü bir şekilde salındığı ve bu polimerik yapının siRNA'yı parçalanmaktan koruduğu gözlenmiştir (Thanki ve diğerleri, 2020). Literatürde yer alan çalışmalarda elde edilen bulgular çalışmamızı desteklemektedir. Literatür ve proje kapsamında yapılan in vitro salım çalışmaları birlikte değerlendirildiğinde polipleks veya partiküler bir yapı oluşturma ve bu yapıların polimerik bir ağ yapısı olan hidrojel formülasyonlarına yüklenmesinin siRNA'yı parçalanmaktan koruduğunu ve salım ortamına siRNA'nın kontrollü bir şekilde salınmasını sağladığı sonucuna varılmıştır.

İn vitro çözünme hızı sonuçlarına bakıldığı zaman, optimum oral (O-Mes-P-40) ve rektal hidrojelden (R-Mes-P-40) TNF- α siRNA ve mesalazin salımın 24 saat boyunca devam ettiği ve salım profillerinin uzatılmış salım profiline uyduğu gözlenmiştir.

5.11.2. Salım kinetikleri bulgularının değerlendirilmesi

İn vitro çözünme hızı çalışmalarından sonra oral ve rektal hidrojel formülasyonlardan mesalazin ve TNF- α siRNA'nın salım kinetiklerinin 0. derece, 1.derece, Higuchi, Weibull, Hixson-Crowell ve Korsmeyer-Peppas kinetik modellerine uyumlulukları DDSolver yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Yapılan analizlerde uyumluluk kriterleri olarak r^2 , r^2_{adj} , AIC, MSC ve modellere özgü katsayılar kullanılmıştır.

Salım kinetiklerini değerlendirme parametreleri arasında r^2 parametresi belirleme katsayısı olarak bilinmektedir ve bu değerin 1'e yakın olması modelin uyumlu olduğunu göstermektedir. Ancak kinetik modelleme yapılırken parametre eklendikçe r^2 değeri yükselme eğilimindedir ve bu durum salım profillerinin yeteri kadar uyumlu olmamasına rağmen r^2 değerinin yüksek hesaplanmasına neden olmaktadır. Bu durumun önlenmesi için r^2 yerine r^2_{adj} (ayarlanmış r^2) değeri kullanılır (Costa ve Sousa Lobo, 2001). AIC parametresi uyumluluk parametresidir. AIC değerinin küçük olması formülasyonun salımının modele uyumlu olduğunu göstermektedir. AIC değeri ne kadar küçükse formülasyonun salımının modele uyumluluğu o kadar fazla demektir.

MSC parametresi ise model seçim kriteri olarak bilinmektedir ve bu değerin yüksek olması salım profilinin modele uyumluluğunu göstermektedir (Yılmaz Usta ve diğerleri, 2018; Tuğcu-Demiröz ve diğerleri, 2021). MSC parametresi AIC değerinin normalize edilmesiyle elde edilmektedir. MSC değerinin 3'ten fazla olması modelin yüksek oranda uyumlu olduğunu göstermektedir.

Mesalazin salımı için salım kinetiklerinin değerlendirilmesi

Mesalazin salımı için in vitro çözünme hızı deneyleri sonucunda elde edilen parametreler değerlendirildiğinde hidrojel formülasyonlarının 0.derece ve Hixson-Crowell kinetikleriyle düşük oranda uyum sağladıkları r^2 , r^2_{adj} ve MSC değerleri ile belirlenmiştir. Formülasyonlar 1.derece, Higuchi, Korsmeyer-Peppas ve Weibull kinetikleriyle yüksek oranda uyumlu bulunmuştur.

O-Mes-P-40 formülasyonundan mesalazin salımının en uyumlu olduğu kinetik Weibull olarak bulunmuştur. 1. Derece salım kinetiği için de r^2_{adj} değeri yüksek olmasına rağmen MSC değeri 3'ün altında olduğu için Weibull kinetiğine daha çok uyum sağladığı gözlenmiştir. Weibull kinetiği için analiz verileri değerlendirildiği zaman, modele özgü katsayı olan b değeri 0,5882 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.37). Bu kinetikte salım profilinden elde edilen b değerinin 0,75'ten küçük olması salımın Fick difüzyona benzer şekilde gerçekleştiğini göstermektedir (Tuğcu-Demiröz ve diğerleri, 2021). Weibull kinetiği polimerik matrislerden salım modellerine yüksek seviyede uyum gösteren bir kinetik modeldir (Dash ve diğerleri, 2010; Goldsmith ve diğerleri, 1978). O-Mes-P-40 hidrojel formülasyonundan mesalazin salımı Weibull kinetiğine göre gerçekleşmiştir. O-Mes-P-40 formülasyonundan mesalazin salım profiline bakıldığı zaman mesalazinin O-Mes-P-40 formülasyonundan kontrollü bir şekilde salındığı gözlenmiştir (Şekil 4.93). Mesalazin çıkışı Weibull kinetiğine uyumlu ve Fick difüzyona benzer bir şekilde hızlı olarak başlamıştır ancak bir noktadan sonra kontrollü olarak devam etmiştir.

R-Mes-P-40 formülasyonu 1.derece, Hixson-Crowell ve Weibull kinetikleriyle uyumlu bulunmuştur. Her üç kinetik için de r^2_{adj} değeri yüksek ve MSC değeri 3' ten fazladır. Ancak r^2_{adj} değerinin en yüksek olduğu kinetik 1. Derece kinetik olduğu için hidrojel formülasyonunun en uyumlu olduğu kinetik 1.derece kinetik olarak bulunmuştur (Çizelge 4.37). 1.derece kinetikte sabit koşullarda bir reaksiyonun hızı, reaksiyona giren maddelerin derişimleri ile orantılıdır. Modele özgü reaksiyon k değeri reaksiyon hız sabiti olarak bilinmektedir. 1.derece kinetik poröz matrisler yapılarından salım modellerine uyum gösteren bir kinetik modeldir (Dash ve diğerleri, 2010). R-Mes-P-40 hidrojel formülasyondan mesalazin salımı 1.derece kinetiğe göre gerçekleşmiştir. R-Mes-P-40 formülasyonundan mesalazin salım profiline bakıldığı zaman mesalazinin R-Mes-P-40 formülasyonundan ani bir şekilde salındığı daha sonra salım hızının yavaşladığı görülmüştür (Şekil 4.95). 1.derece kinetikte salım hızı etkin madde miktarına bağlı olarak değiştiği için formülasyonda bulunan mesalazin miktarı azaldıkça 1.derece kinetiğe uyumlu olarak salım hızının da azaldığı gözlenmiştir.

TNF- α siRNA salımı için salım kinetiklerinin değerlendirilmesi

TNF- α siRNA salımı için in vitro çözünme hızı deneyleri sonucunda elde edilen parametreler değerlendirildiğinde hidrojel formülasyonlarının 0.derece, 1.derece, Hixson-Crowell ve Higuchi kinetikleriyle düşük oranda uyum sağladıkları r^2 , r^2_{adj} ve MSC değerleri ile belirlenmiştir. Formülasyonlardan TNF- α siRNA salımı Korsmeyer-Peppas ve Weibull kinetikleriyle yüksek oranda uyumlu bulunmuştur.

O-Mes-P-40 formülasyonunun en uyumlu olduğu kinetik r^2_{adj} değerinin en yüksek olduğu kinetik olan Korsmeyer- Peppas olarak bulunmuştur. Bu kinetiğe uyumluluk analizi sonuçları değerlendirildiği zaman modele özgü katsayı olan $n=0,3076$ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.38). Bu kinetik modelde n değerinin 0,5'ten küçük olması yarı-Fick difüzyon, 0,5 değeri Fick difüzyon, 0,5 ile 1 arasında olması ise non-Fick transport olarak değerlendirilmektedir (Paarakh ve diğerleri, 2019). n değeri 0,5'ten küçük olduğu için O-Mes-P-40 formülasyonundan TNF- α siRNA salımı yarı-Fick difüzyon ile Korsmeyer-Peppas kinetiğine uyumlu bir şekilde gerçekleşmiştir. O-Mes-P-40 formülasyonundan TNF- α siRNA salım profiline bakıldığı zaman TNF- α siRNA'nın O-Mes-P-40 formülasyonundan TNF- α siRNA salım profiline bakıldığı zaman TNF- α siRNA'nın görece hızlı bir biçimde çıktığı daha sonra ise çıkışın çok yavaş bir şekilde devam ettiği görülmüştür (Şekil 4.94). Bu verilere göre O-Mes-P-40 formülasyonu şişme bağımlı olmayan matris difüzyonu ile TNF- α siRNA salımını gerçekleştirmiştir.

R-Mes-P-40 formülasyonu 1.derece, Hixson-Crowell, Higuchi ve Weibull kinetikleriyle uyumlu bulunmuştur. Her üç kinetik için de r^2_{adj} değeri yüksektir (Çizelge 4.38). Ancak r^2_{adj} değerinin en yüksek olduğu kinetik 1. Derece kinetik olduğu için hidrojel formülasyonunun en uyumlu olduğu kinetik 1.derece kinetik olarak bulunmuştur. 1.derece kinetikte sabit koşullarda bir reaksiyonun hızı, reaksiyona giren maddelerin derişimleri ile orantılıdır. Modele özgü reaksiyon k değeri reaksiyon hız sabiti olarak bilinmektedir. 1.derece kinetik, poröz matris yapılardan salım modellerine uyum gösteren bir kinetik modeldir (Dash ve diğerleri, 2010) R-Mes-P-40 hidrojel formülasyonundan TNF- α siRNA salımı mesalazin salımında olduğu matris yapılarda görülen 1.derece kinetiğe uyumlu bir şekilde gerçekleşmiştir. R-Mes-P-40 formülasyonundan TNF- α siRNA salım profiline

bakıldığı zaman TNF- α siRNA'nın R-Mes-P-40 formülasyonundan ani bir şekilde salındığı daha sonra salım hızının yavaşladığı görülmüştür (Şekil 4.96). 1.derece kinetikte salım hızı etkin madde miktarına bağlı olarak değişmektedir. Formülasyonda bulunan TNF- α siRNA miktarı azaldıkça 1.derece kinetiğe uyumlu olarak salım hızının da azaldığı gözlenmiştir.

5.12. İn vivo çalışmaların bulgularının değerlendirilmesi

İn vivo çalışmalarda deney hayvanı olarak fare (Balb/c fare erkek, 25-30 gram ağırlığında) kullanılmıştır. 12 tane deney grubu oluşturulmuştur ve her deney grubu için 6'şar adet fare kullanılmıştır. Deney grupları Çizelge 3.17'de verilmiştir. Farelere 5 gün boyunca DSS uygulanarak farelerde inflamatuvar bağırsak hastalığı oluşturulmuştur. Daha sonra 5 gün boyunca tedavi uygulanarak fareler deneyin 11. gününde sakrifiye edilmiştir. Deney hayvanlarında TNBS, asetik asit, oksazolon gibi maddelerle İBH oluşturmak mümkündür (Ramshankar ve diğerleri, 2008; Niebel ve diğerleri, 2012; Qelliny ve diğerleri, 2019). Çalışmamızda DSS ile İBH oluşturma yöntemi tercih edilmiştir. Farelerde İBH oluşumu için en yaygın kullanılan model DSS ile İBH oluşturma yöntemidir. Bu yöntemin daha çok kullanılmasının sebebi insanlardaki İBH'ye en çok benzeyen modelin DSS ile oluşturulmasıdır. Diğer yöntemlere kıyasla tekrar edilebilirliği ve kontrol edilebilirliği en yüksek yöntemdir. Akut, kronik ve tekrarlayan bağırsak iltihabı modelleri, DSS derişiminin ve uygulama sıklığının değiştirilmesiyle elde edilebilir (Chassaing ve diğerleri, 2014). İn vivo çalışmalar kapsamında farelerin fizyolojik özelliklerinin değerlendirilmesi, farelerden alınan kolon dokularına ait makroskopik incelemeler, biyokimyasal ve histolojik analizler gerçekleştirilmiştir.

5.12.1. Farelerin fizyolojik özelliklerine ait bulguların değerlendirilmesi

Farelerde görülen % ağırlık kaybı bulgularının değerlendirilmesi

DSS ile İBH oluşturulması hayvanlarda iştahsızlık, uykusuzluk, diyare, kanlı dışkılama gibi semptomlara neden olmaktadır (Chassaing ve diğerleri, 2004). Bu semptomlar da Çizelge 4.39'da gösterildiği gibi hayvanların ağırlıklarında değişime neden olmaktadır. Şekil 4.97'de verilen farelerin günlük ağırlık değişimi grafiğine

bakıldığı zaman, farelerin tedaviye başlanmadan önce ve tedavinin ilk günlerinde ağırlıklarında azalma meydana geldiği görülmektedir. Ancak tedaviden sonra farelerin ağırlıklarında artış meydana gelmiştir. Ayrıca beklenildiği gibi negatif kontrol grubunun deney süresince ağırlığının sabit kaldığı, tedavi gruplarında ağırlık kayıplarının tedaviden önce düştüğü ve tedavi süresince arttığı gözlenmiştir.

Ayrıca Çizelge 4.39'da verilen sonuçlara göre en az % ağırlık kaybı O-Mes-P-40 ve O-P-40 gruplarında gözlenmiştir. Diğer tedavi gruplarında % ağırlık kaybı değerlerinin fazla olmasının sebebinin fareler arasındaki bireysel farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Farelerin tükettikleri pellet yem miktarının değerlendirilmesi

İn vivo çalışmalar boyunca farelerin tükettikleri pellet yem miktarı her gün ölçülmüştür. Fare başına günlük tüketilen ortalama yem miktarları hesaplanmış ve Şekil 4.98'de gösterilmiştir. Beklenildiği gibi negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında pozitif kontrol grubunun tükettikleri pellet yem miktarının anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir ($p < 0,05$). Negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tedavi gruplarının tükettikleri yem miktarlarındaki farkın anlamlı olmadığı gözlenmiştir ($p > 0,05$).

Farelerin tükettikleri musluk suyu miktarının değerlendirilmesi

Farelerin günlük tükettikleri ortalama su miktarlarının, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında O-P-40, R-P-40, R-Mes ve R-Ticari hariç diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir ($p < 0,05$). Ancak tedavi gruplarının günlük tükettikleri ortalama su miktarları O-Ticari grubu hariç pozitif kontrol grubuna göre daha az bulunmuştur (Şekil 4.99).

Tedavi gruplarında ve pozitif kontrol grubunda DSS ile iBH oluşturulduğu için bu hayvanlarda meydana gelen rektal kanama ve diyare sebebiyle hayvanların su içme miktarının arttığı düşünülmektedir. Bu gruplarda görülen aşırı sıvı kaybı farelerde daha fazla su içme isteği oluşturmuştur.

Yapılan bir çalışmada sıçanlarda TNBS ile kolit oluşturulmuş ve sıçanlar budesonid yüklü nanotaşıyıcılarla tedavi edilmiştir. Çalışmada bizim çalışmamıza benzer şekilde pozitif kontrol grubu ve ilaç içermeyen tedavi gruplarının su tüketimi daha fazla bulunmuştur (Turanlı, 2022).

Farelerin tüm kolon ağırlığına ait bulguların değerlendirilmesi

Şekil 4.100'de yer alan farelerin tüm kolon ağırlığı bulgularına bakıldığı zaman tedavi gruplarında negatif kontrol grubuna göre farelerin kolon ağırlığında artış meydana gelmiştir ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Pozitif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise O-Boş ve O-Ticari grupları hariç diğer tüm tedavi gruplarının kolon ağırlığında azalma görülmüştür ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Farelerde kolon/fare ağırlığı değerine ait bulguların değerlendirilmesi

Çalışmamızda fareler sakrifiye edilmeden önce ağırlıkları ölçülmüş, sakrifiye edildikten sonra ise laparotomi ile çıkarılan kolon ağırlıkları ölçülmüştür. Daha sonra bu verileri kullanılarak kolon/fare ağırlığı değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değer İBH oluşturulmuş hayvanlarda, inflamasyona bağlı olarak kolon ağırlığının artması ve diyare ve iştahsızlığa bağlı olarak da fare ağırlığının azalmasına bağlı olarak yüksek olması beklenmektedir. Sağlıklı farelerde ise bu değer düşük olması beklenmektedir. Hesaplanan kolon/fare ağırlığı değeri kolonik inflamasyon indeksi olarak değerlendirilmektedir (Makhlof ve diğerleri, 2009). Farelere ait kolon/fare ağırlığı değerleri Şekil 4.101'de gösterilmiştir. Tedavi gruplarına bakıldığı zaman özellikle O-Boş ve R-Boş gruplarında negatif kontrol grubuna göre farelerin kolon/fare ağırlığı değerlerinde artış meydana gelmiştir, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Pozitif kontrol grubunun kolon/fare ağırlığı değerinin düşük olmasının hayvanlar arasındaki bireysel farklılıktan kaynaklandığı düşünülmüştür.

Farelerin dalak ağırlığına ve dalak ağırlığı/fare ağırlığı değerlerine ait bulguların değerlendirilmesi

Çalışmamızda fareler sakrifiye edildikten sonra dalak dokuları çıkarılmış ve ağırlıkları ölçülmüştür. Farelere ait dalak ağırlığı değerleri Şekil 4.102’de gösterilmiştir. Ayrıca farelerin sakrifiye edilmeden önceki ağırlık değerleri kullanılarak dalak/fare ağırlığı değerleri hesaplanmıştır ve farelere ait bu değer Şekil 4.103’te gösterilmiştir.

DSS ile İBH oluşturulmuş hayvanlarda, kolonda olduğu gibi dalakta da inflamasyon ve hastalık sırasındaki aktif kanama sebebiyle oluşan anemiye bağlı olarak dalak ağırlıkları artmaktadır (Chassaing ve diğerleri, 2014). Dolayısıyla İBH’ye sahip farelerde dalak ağırlığı ve dalak/fare ağırlığı değerlerinin yüksek olması beklenirken, sağlıklı farelerde düşük olması beklenmektedir.

Dalak ağırlığı değerlerine bakıldığı zaman, negatif kontrol grubuna göre O-Ticari grubu hariç diğer tüm gruplarda dalak ağırlığının arttığı görülmektedir. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Pozitif kontrol grubunun dalak ağırlığı değerinin tedavi gruplarından ve negatif kontrol grubundan düşük olmasının hayvanlar arasındaki bireysel farklılıktan kaynaklandığı düşünülmüştür (Şekil 4.102).

Dalak/fare ağırlığı değerlerine bakıldığında ise, negatif kontrol grubuna göre O-Ticari, O-P-40, R-P-40 ve R-ticari grupları hariç diğer tüm gruplarda dalak ağırlığının arttığı görülmektedir. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Dalak ağırlığında olduğu gibi pozitif kontrol grubunun dalak/fare ağırlığı değerinin tedavi gruplarından ve negatif kontrol grubundan düşük olmasının hayvanlar arasındaki bireysel farklılıktan kaynaklandığı düşünülmüştür (Şekil 4.103).

Farelerin karaciğer ve karaciğer ağırlığı/fare ağırlığı değerlerine ait bulguların değerlendirilmesi

Yapılan çalışmalarda İBH'nin hepatobiliyer sistem (karaciğer, safra kesesi, dalak ve pankreası) hastalıklarına ve ilerlemesi durumunda karaciğer kanserlerine ve metastaza yol açabileceği belirtilmiştir. Bu hepatobiliyer hastalıklarda özellikle karaciğerde inflamasyon görülmektedir (Gaspar ve diğerleri, 1956). Karaciğerdeki inflamasyon ve buna bağlı olarak oluşan ödem dolayısıyla İBH'de karaciğerin büyümesi beklenmektedir. Çalışmamızda elde edilen karaciğer ağırlığı ve karaciğer/fare ağırlığı değerlerinin İBH'ye sahip farelerde yüksek olması beklenirken, sağlıklı farelerde düşük olması beklenmektedir.

Şekil 4.104'te yer alan karaciğer ağırlığı değerlerine bakıldığı zaman negatif kontrol grubuna göre R-P-40, R-Mes ve R-Mes-P-40 grupları hariç diğer grupların karaciğer ağırlıkları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,05$). Pozitif kontrol grubuyla kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da O-Mes ve O-Ticari grupları hariç diğer tedavi gruplarının karaciğer ağırlıklarının azaldığı görülmektedir. Bu durum hayvanların tedavi olarak iyileşmesi olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.104).

Şekil 4.105'te yer alan karaciğer/fare ağırlığı değerlerine bakıldığı zaman ise negatif kontrol grubuna göre O-Mes-P-40, R-Mes ve R-P-40 grupları hariç diğer grupların karaciğer ağırlıkları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,05$). Pozitif kontrol grubuyla kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da O-Ticari ve R-Boş grupları hariç diğer tedavi gruplarının karaciğer/fare ağırlığı değerlerinin azaldığı görülmektedir. Bu durum hayvanların tedavi sonucunda iyileşmesi olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.105).

Farelerin kolon uzunluğuna ait bulguların değerlendirilmesi

İBH'de kolon uzunluğunun oluşan inflamasyona bağlı olarak azalması beklenmektedir. Yapılan çalışmalarda DSS ile kolit oluşturulmuş farelerin kolon uzunluklarının sağlıklı farelere göre anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (Chen ve diğerleri, 2017; Deguchi ve diğerleri, 2006).

Şekil 4.106'ya bakıldığı zaman negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında diğer grupların kolon uzunluklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Tedavi gruplarının kolonu uzunlukları pozitif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise O-Mes-P-40, O-P-40 ve R-Ticari gruplarının kolon uzunluklarında artış gözlenmiştir, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Kolon makroskopik skor değerlerine ait bulguların değerlendirilmesi

Fareler sakrifiye edilip laparotomi ile kolonları çıkarıldıktan sonra kolon dokuları makroskopik olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme uluslararası standardizasyon uygun olması amacıyla Wallace Skalası kullanılarak gerçekleştirilmiştir Wallace Skalası kolon dokusundaki hasarın değerlendirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu skalada kolondaki doku hasarının boyutuna göre skorlandırma yapılmaktadır (Wallace ve diğerleri, 1989).

Kolon makroskopik skorlarına ait değerler Şekil 4.107'de gösterilmiştir. Buna göre beklenildiği gibi en yüksek makroskopik skor pozitif kontrol grubunda bulunmuştur. Pozitif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında O-Boş, O-Mes, O-Ticari ve R-Mes grupları hariç diğer tüm tedavi gruplarının makroskopik skorlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). O-Boş, O-Mes, O-Ticari ve R-Mes tedavi gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte kolon makroskopik skorları değerlerinde pozitif kontrol grubuna göre azalma gözlenmiştir.

Negatif kontrol grubuna en yakın en düşük makroskopik skor, oral tedavi grubundan O-P-40 ve O-Mes-P-40 gruplarında; rektal tedavi grubundan ise R-P-40 ve R-Mes-P-40 gruplarında gözlenmiştir. Buna göre formülasyona TNF- α siRNA polipeksinin eklenmesiyle kolon makroskopik skorunun önemli ölçüde azaldığı sonucuna varılabilir. Tek başına mesalazin içeren gruplarda (O-Mes ve R-Mes) makroskopik skordaki azalmanın düşük olması bu durumu doğrular niteliktedir. Bu durumun TNF- α siRNA polipeksinin TNF- α genini susturarak kolondaki TNF- α seviyesinin düşmesini ve dolayısıyla kolon dokusunda daha fazla iyileşmeyi sağlamasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

5.12.2. Gruplara ait kolon örneklerinin makroskopik görünümü

Resim 4.7'ye bakıldığı zaman negatif kontrol grubuna ait kolon dokusu makroskopik olarak incelendiğinde, bu gruba ait kolon dokusunda inflamasyon belirtisi (ülser, kalınlaşma, ödem) gözlenmemiştir. Pozitif kontrol grubuna ait kolon dokusunda İBH'ye bağlı ülser, kanlanma ve yapısal farklılıklar görülmektedir.

O-Boş tedavi grubunda pozitif kontrolde olduğu gibi ülser ve kanlanma yapısı gözlenmemiştir, ancak kolonda yapısal farklılıklar ve kalınlaşma görülmüştür. Bu durumun formülasyonun tedavi edici ajan içermemesine bağlı olduğu, ancak pozitif kontrol grubuna göre kolonun görüntüsünde görülen iyileşmenin formülasyonda bulunan ipek fibroinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. İpek fibroin tek başına antiinflamatuvar bir özellik göstermektedir. Yapılan bir çalışmada fare kulaklarında inflamasyon modeli oluşturulmuş ve inflamasyonlu bölgeye ipek fibroin topikal uygulanmıştır. İpek fibroinin uygulamasıyla inflamasyonun azaldığı gözlenmiştir (Kim ve diğerleri, 2011).

O-Ticari tedavi grubunda kolonda pozitif kontrol grubunda gözlenen ülser ve yapısal bozukluklar gözlenmemiştir. Kolonda iyileşme gerçekleşmiştir, ancak kolon dokusunda kısmi kanlanmaların olduğu görülmektedir. O-Mes tedavi grubuna ait kolon dokusunda pozitif kontrol grubundaki ülser gözlenmemiştir. Ancak kolon dokusunun bazı bölümlerinde kanlanmalar ve yapısal bozukluklar mevcuttur. Bu grup pozitif kontrol grubuna en yakın tedavi gruplarından biridir. O-Mes grubuna ait kolon dokusu O-Ticari grubuna ait kolon dokusuyla benzer bulunmuştur.

O-Mes-P-40 tedavi grubuna ait kolon dokusu ise negatif kontrol grubuna en yakın tedavi gruplarından biridir. Kolon dokusunda ülser, kalınlaşma ve kanlanma gözlenmemiştir. Kolonun yapısal bütünlüğü korunmuş ve yapısal bozukluklar gözlenmemiştir. Bu durumun bu grubun tedavisi için kullanılan hidrojelin hem mesalazin hem de TNF- α siRNA polileksi içermesine ve bu polileksin TNF- α genini susturarak TNF- α seviyesini düşürmesine bağlı olabileceği düşünülmüştür. O-P-40 tedavi grubuna ait kolon dokusu O-Mes-P-40 grubuyla benzer bir görüntüye sahiptir ancak O-Mes-P-40 grubundan farklı olarak kolon dokusunda az da olsa kanlanma görülmüştür.

R-Boş tedavi grubuna ait kolon dokusunda pozitif kontrol grubunda görülen ülser gözlenmemiştir. Dokuda yapısal bozukluklar ve kanlanmalar mevcuttur, ancak O-Boş tedavi grubuna ait kolonla karşılaştırıldığında R-Boş tedavi grubuna ait kolon dokusunda kalınlaşmalar görülmemiştir ve iyileşme daha fazladır. Bu durumun hidrojelin rektal uygulama ile doğrudan hastalık bölgesine uygulanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca pozitif kontrol grubuna göre kolonun görüntüsünde görülen iyileşmenin formülasyonda bulunan ipek fibroinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. R-P-40 tedavi grubuna ait kolon dokusu negatif kontrol grubuna çok benzemektedir. Kolon normal görünümündedir, yapısal bozukluklar, kolon dokusunda kalınlaşma, ülser ve kanlanmalar görülmemiştir. O-P-40 grubuyla karşılaştırıldığında R-P-40 grubuna ait kolon dokusundaki iyileşmenin daha fazla olmasının sebebi, R-P-40 tedavi grubunda hidrojelin rektal uygulama ile doğrudan hastalık bölgesine uygulanması olduğu düşünülmektedir.

R-Mes tedavi grubuna ait kolon dokusunda O-Mes tedavi grubuyla benzer bir görünüm elde edilmiştir. O-Mes grubu gibi negatif kontrol grubuna en yakın gruplardan biridir. Kolon dokusunda ülser mevcut değildir ancak yapısal bozukluklar, kalınlaşma ve kanlanmalar mevcuttur.

R-Mes-P-40 tedavi grubuna ait kolon dokusu da negatif kontrol grubuna çok benzemektedir. Kolon dokusunda ülser, kalınlaşma ve kanlanma gözlenmemiştir. Kolonun yapısal bütünlüğü korunmuş ve yapısal bozukluklar gözlenmemiştir. Bu tedavi grubunda O-Mes-P-40 grubunda olduğu gibi farelerin tedavisi için kullanılan hidrojel hem mesalazin hem de TNF- α siRNA içerdiği için iyileşmenin fazla olduğu düşünülmektedir.

R-Ticari tedavi grubuna ait kolon dokusunda pozitif kontrol grubunda görülen ülser gözlenmemiştir ve kolon dokusunun pozitif kontrol grubuna göre iyileştiği görülmektedir. Ancak dokuda kanlanmalar, yapısal bozukluklar ve kalınlaşma mevcuttur.

Sonuç olarak oral ve rektal tedavi gruplarında negatif kontrol gruplarına en yakın grupların TNF- α siRNA polipleksi içeren hidrojeller ile tedavi edilen gruplar olduğu görülmüştür. Mesalazin İBH tedavisinde konvansiyonel olarak kullanılmaktadır.

Formülasyona mesalazin dışında TNF- α siRNA polipleksinin eklenmesiyle TNF- α geninin susturulmasına bağlı olarak TNF- α seviyesi düşmüş ve buna bağlı olarak kolon dokusunda mesalazinin tek başına kullanımına kıyasla daha fazla iyileşme gözlenmiştir. TNF- α inflamasyonda önemli bir role sahiptir ve İBH'nin en önemli belirteçlerinden bir tanesidir. TNF- α siRNA polipleksinin ile TNF- α geni susturularak TNF- α ekspresyonu azaltılmaktadır böylece inflamasyon engellenmiş olur. İnflamasyonun engellenmesiyle İBH'den kaynaklanan kolon hasarı azalmaktadır (Neuhaus ve diğerleri, 2015).

5.12.3. Kolon mukozasında yapılan biyokimyasal çalışmalara ait bulgular

İnflamatuvar bağırsak hastalığında oluşan inflamasyona bağlı olarak kolon mukozasında bulunan epitelyal ve immün hücreler tarafından (proinflamatuvar) sitokin üretimi gerçekleşmektedir. Bu sitokinler glikoprotein yapısındadır ve hücreler arası iletişimi düzenleyerek immün yanıtın düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. Vücutta inflamatuvar bir yanıtın oluşmasında bu inflamatuvar sitokinler önemli bir rol oynamaktadır. Crohn hastalığında yüksek seviyede TNF- α , IL-1 β , IL-12, IFN- γ ve IL 17, IL-6 üretimi gözlenirken, ülseratif kolitte IL 10, IL-5, IL-13'ün yüksek üretimi gözlenmektedir (Melgar ve Shanahan, 2010; Mudter ve Neurath, 2007). Tez çalışmamız kapsamında TNF- α , IL-6, IL-12, MDA ve NO seviyeleri ölçülmüş ve bu seviyelerin gruplararası karşılaştırmaları gerçekleştirilmiştir.

Kolonik mukozada TNF- α seviyelerine ait bulguların değerlendirilmesi

İBH esnasında DSS'ye bağlı olarak doku hasarı oluşmaktadır. Bu doku hasarı oluşum sürecinde bağırsak mukozasında bulunan lenfositler, makrofajlar, kolon epitelyal hücreleri tarafından TNF- α başta olmak üzere birçok proinflamatuvar sitokin üretilmekte, bu proinflamatuvar sitokinler inflamatuvar yanıtın oluşumunda etkili olmaktadır. TNF- α düzeyinin artması dokuda inflamasyon varlığının önemli bir göstergesidir (Sands ve Kaplan, 2007). TNF- α , İBH patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır bu yüzden İBH tedavilerinde genellikle anti-TNF- α tedavileri dikkat çekmektedir (McCarthy ve diğerleri, 2013).

Tedavi gruplarındaki farelerden alınan kolon dokularındaki TNF- α seviyeleri Şekil 4.108'de gösterilmiştir. TNF- α seviyesi pozitif kontrol grubunda yüksek bulunmuştur. Rektal gruplar olan R-P-40, R-Mes, R-Mes-P-40 ve R-Ticari gruplarında pozitif kontrol grubuna göre TNF- α seviyesinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p < 0,05$). R-Boş grubunun TNF- α seviyesinde pozitif kontrole göre anlamlı bir azalma gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Bu durum formülasyonda yer alan polimerlerin TNF- α seviyesini etkin madde içeren gruplar kadar düşürmediğini göstermektedir. Oral tedavi gruplarında ise TNF- α seviyesinde pozitif kontrole göre anlamlı bir azalma gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

Yapılan bir çalışmada, aljinat türevlerinin NF- κ B yolağının aktivasyonu yoluyla immunojenik etki göstererek immun sistemi aktive ettiği ve buna bağlı olarak IL-1 β , IL-6, IL-12 ve TNF- α üretilmesine neden olduğu gösterilmiştir. Bu proinflatuvar sitokinlerin üretimi aljinatın dozuna ve zamanına bağlı olarak gerçekleşmiştir. Aljinat miktarı ve aljinata maruziyet süresi arttıkça aljinatın immunojenik etkisi artmış ve proinflatuvar sitokin seviyelerinde daha fazla artış gözlenmiştir. Kullanılan aljinatın molekül ağırlığı da proinflatuvar sitokinlerin üretiminde etkili bulunmuştur (Yang ve Jones, 2009). Yapılan bir diğer çalışmada ise, aljinat oligomerleri RAW 264.7 hücrelerini uyararak yüksek miktarlarda IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ve TNF- α üretilmesine neden olmuştur (Iwamoto ve diğerleri, 2005). Oral tedavi gruplarında görülen yüksek TNF- α seviyesinin aljinattan kaynaklandığı düşünülmektedir. Tez kapsamında geliştirilen oral hidrojeldeki sodyum aljinatın (Protanal-CR8223) molekül ağırlığı, rektal hidrojeldeki sodyum aljinattan (Protanal-CR8133) yüksek olduğu için rektal gruplarda böyle bir durum gözlenmemiştir. Oral tedavi gruplarından O-Mes, O-P-40 ve O-Mes-P-40 gruplarının TNF- α seviyesinin, O-Boş grubuna göre daha düşük olması, bu grupların tedavisi için kullanılan hidrojelde bulunan mesalazin ve TNF- α siRNA'nın TNF- α seviyesinin düşmesinde etkili olduğunu göstermektedir (Şekil 4.108).

Tez çalışması kapsamında geliştirilen oral ve rektal mesalazin ve TNF- α siRNA yüklü hidrojel ile tedavi edilen O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 tedavi gruplarının TNF- α seviyesi oral ve rektal piyasa preparatlarıyla tedavi edilen gruplarla çok yakın bulunmuştur. Ancak piyasa preparatlarında aljinat gibi TNF- α seviyesinin artmasına neden olacak bir polimer bulunmamaktadır ve dolayısıyla piyasa preparatının TNF-

α seviyesini düşürmede olan etkisi ile hidrojel formülasyonlarının etkisinin aynı olduğu düşünülmemektedir. Hidrojel formülasyonlarının piyasa preparatına göre TNF- α seviyesini düşürmede daha etkili olduğu ancak aljinatın immunojik özellik göstermesi sebebiyle etkisinin azaldığı ve TNF- α seviyesinin piyasa preparatına benzer bulunduğu düşünülmüştür.

Yapılan bir çalışmada DSS ile İBH oluşturulmuş farelerin tedavisi için TNF- α siRNA yüklü nanotaşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Tedaviden sonra farelerin kolon dokularındaki TNF- α seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü gözlenmiştir (Kriegel ve Amiji, 2011). Çalışma sonuçlarımız literatürle uyumlu bulunmuştur.

Kolonik mukozada IL-6 seviyelerine ait bulguların değerlendirilmesi

IL-6 inflamasyonlu bölgede inflamatuvar yanıtın devam etmesini önleyen antiinflamatuvar sitokinlerdendir. İnflamatuvar bir hastalık durumu varlığında IL-6 inflamasyonu sınırlandırmak ve dokularda meydana gelecek olan hasarın azalması için üretilmektedir. İBH'de IL-6 üretiminin arttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Mudter ve Neurath,2007; Shahini ve Shaini, 2023).

Tedavi gruplarındaki farelerden alınan kolon dokularındaki IL-6 seviyeleri Şekil 4.109'da gösterilmiştir. Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında R-P-40, R-Boş, O-P-40 ve O-Mes tedavi grupları dışında diğer grupların IL-6 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana geldiği gözlenmiştir ($p<0,05$). Ancak istatistiksel olarak anlamlı olmasa da O-Boş ve R-Boş tedavi grupları hariç diğer grupların da IL-6 seviyesinin azaldığı görülmektedir. Çalışma kapsamında hazırlanan boş hidrojel formülasyonları hariç bütün formülasyonlar pozitif kontrol grubuna göre IL-6 seviyesini düşürmüştür.

O-Boş tedavi grubunun IL-6 seviyesi pozitif kontrolden daha fazla bulunmuştur. Bu durumun, oral hidrojel formülasyonunda yer alan molekül ağırlığı yüksek aljinatın immün yanıtı neden olarak IL-6 üretimini uyarmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 tedavi gruplarının IL-6 seviyelerine bakıldığı zaman, beklenildiği gibi mesalazin ve TNF- α siRNA polipeksi içeren

hidrojel formülasyonları ile tedavinin IL-6 seviyesini düşürdüğü görülmektedir. Sadece mesalazin içeren hidrojellerle tedavi edilen gruplarda (O-Mes ve R-Mes) ve sadece TNF- α siRNA polileksi içeren hidrojeller ile tedavi edilen gruplarda (O-P-40 ve R-P-40) da IL-6 seviyesinin düştüğü gözlenmiştir, ancak mesalazin ve TNF- α siRNA'nın birlikte kullanımı ile daha etkin bir azalma sağlanmıştır. Tez kapsamında geliştirilen optimum oral ve rektal hidrojellerin IL-6 seviyesini düşürmede etkili oldukları sonucuna varılmıştır.

O-Mes-P-40 grubunun IL-6 seviyesi O-Ticari grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Ancak R-Mes-P-40 ve R-Ticari tedavi gruplarının IL-6 seviyeleri birbirine çok yakındır. Tez kapsamında geliştirilen mesalazin ve TNF- α siRNA polileksi yüklü hidrojel formülasyonunun oral piyasa preparatına göre IL-6 seviyesini daha fazla düşürdüğü gözlenmiştir. Hidrojel formülasyonlarının IL-6 seviyesini piyasa preparatına göre daha fazla düşürdüğü ancak formülasyonlarda bulunan sodyum aljinatın immunojik özelliği sebebiyle bu etkisinin azaldığı ve bu yüzden IL-6 seviyelerinin çok yakın olduğu düşünülmüştür.

Yapılan bir çalışmada DSS ile İBH oluşturulmuş fareler TNF- α siRNA yüklü nanopartiküller ile tedavi edilmiştir. Farelerden alınan kolon dokusunda IL-6 seviyeleri ölçülmüş ve TNF- α siRNA yüklü nanopartiküllerin pozitif kontrol grubuna göre IL-6 seviyesini anlamlı bir şekilde düşürdüğü gözlenmiştir (Wilson ve diğerleri 2010). Çalışma sonuçlarımız literatürle uyumlu bulunmuştur.

Kolonik mukozada IL-12 seviyelerine ait bulguların değerlendirilmesi

IL-12, inflamasyonlu bölgede inflamatuvar yanıtın devam etmesini önleyen bir sitokin türevidir. İnflamasyonlu bir hastalık durumu varlığında, inflamasyonu ve buna bağlı olarak dokularda meydana gelecek olan hasarın azalması için üretilmektedir. Hücreler tarafından salgılanmaları sonrasında hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar reseptör aracılı etkiler göstermektedir (Verstockt ve diğerleri, 2023). İBH'de inflamasyona bağlı olarak IL-12 seviyeleri artmaktadır.

Tedavi gruplarına ait IL-12 seviyeleri Şekil 4.110'da gösterilmiştir. Pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında R-P-40 grubu hariç diğer gruplarda istatistiksel olarak IL-12 seviyelerinde anlamlı bir azalma gözlenmemiştir ($p>0,05$).

O-Mes-P-40 ve O-Boş tedavi gruplarında pozitif kontrol grubuna göre IL-12 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan azalmalar meydana gelmiştir. Şekil 4.110'a bakıldığında zaman IL-12 seviyesinin rektal tedavi gruplarında oral tedavi gruplarına göre daha düşük olduğu görülmektedir. Ancak bu durumun oral hidrojel formülasyonunda yer alan molekül ağırlığı yüksek aljinatın immün yanıtı neden olarak IL-12 üretimini uyarmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Oral tedavi gruplarına bakıldığında ise en düşük IL-12 seviyesi O-Ticari tedavi grubunda gözlenmiştir. Bu durumun da oral piyasa preparatında IL-12 üretimini uyaracak bir bileşen olmamasından kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.

Sadece TNF- α siRNA polipeksi içeren oral ve rektal hidrojeller ile tedavi edilen grupların (O-P-40 ve R-P-40) IL-12 seviyeleri mesalazin ve TNF- α siRNA polipeksini birlikte içeren hidrojeller ile tedavi edilen gruplardan (O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40) daha düşük bulunmuştur. Tez kapsamında geliştirilen optimum oral ve rektal hidrojellerin IL-12 seviyesini düşürmede etkili oldukları sonucuna varılmıştır.

Kolonik mukozada NO seviyelerine ait bulguların değerlendirilmesi

İBH'de ve deneysel İBH modellerinde görülen inflamatuvar süreç lenfosit, monosit, nötrofil gibi lökositlerin kolon mukozasına infiltrasyonu ile ortaya çıkmaktadır. İnflamasyonlu kolon dokusunda reaktif oksijen metabolitlerinin ana kaynağı bu lökositlerdir. Reaktif oksijen metabolitleri hücre ve dokularda çeşitli hasarlara neden olmaktadır. Tüm bu inflamasyon sürecinde nitrik oksit (NO) makrofajların kullandığı önemli bir mediyatör görevi görmektedir. Kolon dokusu DSS veya TNBS gibi maddelere maruz kaldığında makrofajlarda bulunan NO sentetaz enzimi uyarılır ve yüksek miktarda NO üretimi meydana gelir. Bu oluşan NO sitotoksik bir maddedir ve daha toksik bir madde olan ROM'ların oluşmasına neden olmaktadır. Makrofajlardan salınan yüksek miktardaki NO kolon dokusunda doku hasarı oluşturur. NO seviyesinin artması oksidatif stresin arttığının göstergesidir (Rokutan

ve diğerleri, 2008). İnflamasyon iyileştiği zaman dokulardaki NO seviyesinin azalması beklenmektedir.

Çalışmamızdaki tedavi gruplarına ait NO seviyeleri Şekil 4.111'de gösterilmiştir. Pozitif kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman O-Ticari hariç diğer tedavi gruplarının NO seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü gözlenmiştir ($p<0,05$).

Oral tedavi grupları arasından en düşük NO seviyesi O-Mes-P-40 tedavi grubunda gözlenmiştir. Mesalazin ve TNF- α siRNA polipeksinin birlikte kullanımı NO seviyesinin daha fazla düşmesini sağlamıştır. O-Mes-P-40 grubunun NO seviyesi O-Ticari grubuna göre de daha düşük bulunmuştur.

Rektal gruplar arasında ise R-Boş, R-Mes-P-40 ve R-P-40 tedavi gruplarında en düşük NO seviyesi gözlenmiştir. Çalışmamız kapsamında geliştirilen optimum oral ve rektal hidrojelilerin inflamasyonu azaltarak kolon dokusunda NO seviyesinin düşmesinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Kolonik mukozada MDA seviyelerine ait bulguların değerlendirilmesi

Lipid peroksidasyonu, serbest oksijen radikalleri ile hücre membranında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin reaksiyonu sonucunda meydana gelmektedir. Bu reaksiyon sonucunda oluşan lipid peroksil radikalleri hidroperoksitlere dönüşmekte, hidroperoksitler de daha toksik bir madde olan aldehitlere dönüşmektedir. Malondialdehit (MDA) bu aldehitlerden birisidir. Dokularda MDA seviyesinin artması serbest oksijen radikalleri ve bu radikallere bağlı olarak oksidatif doku yıkımının arttığını göstermektedir (Alzoghaibi ve diğerleri, 2007).

Tedavi gruplarına ait MDA seviyeleri Şekil 4.112'de gösterilmiştir. Pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında O-Boş tedavi grubu hariç diğer grupların MDA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p<0,05$).

Oral gruplarda en düşük MDA seviyesi O-Mes-P-40 tedavi grubunda gözlenmiştir. Oral optimum hidrojel formülasyonu ile tedavinin MDA seviyesinin düşürülmesinde etkili olduğu gözlenmiştir. O-Mes ve O-P-40 tedavi gruplarının MDA seviyesi, O-Mes-P-40 grubundaki MDA seviyesinden yüksek bulunmuştur. Oral yoldan

mesalazin ve TNF- α siRNA'nın tek başına kullanıldığında (O-Mes ve O-Mes-P-40), birlikte kullanıldığı gruba göre (O-Mes-P-40) MDA seviyesini daha az düşürdüğü gözlenmiştir. Mesalazin ve TNF- α siRNA'nın oral yoldan birlikte kullanımının MDA seviyesini daha fazla düşürerek inflamasyon tedavisinde etkili olduğu sonucuna varılabilir.

Ancak rektal kullanımda en düşük MDA seviyesi e TNF- α siRNA'nın tek başına kullanıldığı grupta (R-Mes-P-40) elde edilmiştir. Rektal uygulamada TNF- α siRNA'nın daha fazla etkili olmasının sebebinin uygulamanın direkt inflamasyon bölgesine yapılmasına bağlı olduğu düşünülmüştür. Ancak pozitif kontrol grubuna göre R-Mes ve R-Mes-P-40 grupları da MDA seviyesi anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p < 0,05$). Tez kapsamında geliştirilen optimum oral (O-Mes-P-40) ve rektal (R-Mes-P-40) hidrojelilerin MDA seviyesininin düşmesinde etkili olduğu gözlenmiştir.

O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 tedavi gruplarının MDA seviyesi O-Ticari ve R-Ticari gruplarından daha düşük bulunmuştur. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$).

Yapılan bir çalışmada, TNBS ile İBH oluşturulmuş sıçanlar melatonin yüklü nanopartiküller ile tedavi edilmiş ve pozitif kontrol grubuna göre sıçanların MDA seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Yener, 2013).

Bütün biyokimyasal parametreler değerlendirildiğinde tez kapsamında geliştirilen oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının İBH patogenezinde önemli rol oynayan TNF- α , IL-6, IL-12, NO ve MDA seviyelerini düşürdüğü ve İBH tedavisinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

5.12.4 Histolojik çalışmalara ait bulguların değerlendirilmesi

Histoloji çalışmaları kapsamında histomorfolojik ve immunohistokimyasal analizler yapılmıştır.

Histomorfolojik çalışmaların bulgularının değerlendirilmesi

Sağlıklı bir kolon yapısında çok sayıda müsin salgılayan kadeh hücreleri bulunur, Lamina propiia (Lp) adı verilen kolajen iplikler, elastik iplikler ve retikulum iplikleri içeren bir bağ doku yapısı bulunmaktadır. Bu bağ dokunun içinde kript denilen yapılar, makrofajlar, plazma hücreleri ve diğer bağışıklık bulunmaktadır ve doludur. Submukoza (Sm) yapısı ise kan damarlarını, lenf düğümlerini ve özellikle yağ dokusunu içerir (Dame ve diğerleri, 2010; Levine ve Haggitt, 1989).

Farelerden elde edilen kolon doku örnekleri Hematoksilen&Eosin boyaması yapılarak histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Histomorfolojik görüntüler Resim 4.8-4.19 arasında gösterilmiştir.

Negatif kontrol grubunda kolonlarda kriptlerin derinlikleri, epitel hücrelerinin morfolojisi ve kadeh hücrelerinin yoğunluğu, kolon histolojisi ile uyumlu iken (Resim 4.8), İBH oluşturulmuş hayvanlardan oluşan pozitif kontrol grubunda (Resim 4.9) kriptlerin ortadan kaybolduğu, kadeh hücresi sayısının azaldığı lamina propriada (Lp) ve submukozada (Sm) yoğun lenfoid hücre infiltrasyonlarının varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca submukozada genişleme ve yaygın lenf foliküllerinin (LF) bulunduğu gözlenmiştir.

O-Boş tedavi grubunda kolon mukozasının normal histolojik görüntüye yakın olduğu (Resim 4.10) ancak submukozada hücre infiltrasyonlarının mevcut olduğu gösterilmiştir. R-Boş tedavi grubunda (Resim 4.15) ise kriptlerin derinliklerinin ve kadeh hücrelerinin yoğunluğunun negatif kontrol grubuna göre azaldığı gözlenmiştir. O-Mes (Resim 4.12) ve R-Mes (Resim 4.17) tedavi gruplarında uygulama sonrası inflamasyonun baskılandığı ancak negatif kontrol grubuna göre kript derinliklerinin ve kadeh hücre yoğunluğunun azaldığı görülmüştür. O-P-40 tedavi grubunda (Resim 4.14) uygulama sonrası kolon mukozasının durumu negatif kontrol grubuna en yakın gruptan biri iken R-P-40 tedavi grubunda (Resim 4.16) kolon dokularında epitel hücrelerinde dejenerasyon, kadeh hücresi yoğunluğunda negatif kontrol grubuna göre belirgin azalma ve lenfoid hücre infiltrasyonları tespit edilmiştir.

O-Mes-P-40 (Resim 4.13) ve R-Mes-P-40 (Resim 4.18) tedavi gruplarına ait kolonların histopatolojik değerlendirmesi negatif kontrol grubu ile benzer bulunmuştur. O-Ticari (Resim 4.11) ve R-Ticari (Resim 4.19) gruplarında ise kolon epitelinin bütünlüğü bozulmuştur. Lenfoid hücre infiltrasyonlarına ve lenf foliküllerine (LF) rastlanmıştır.

Gruplar karşılaştırıldığında O-P-40 ve R-P-40 ile O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 tedavi gruplarının kolon dokularında epitel hücrelerinin morfolojik durumu, kadeh hücrelerinin ve lenfoid hücre infiltrasyonunun yoğunluk seviyesi gibi iyileşme belirtileri yönünden ticari preparat uygulanan gruplara (O-Ticari ve R-Ticari) göre daha iyi seviyede olduğu görülmüştür. Bazı gruplarda rektal ve oral kullanım yolu sonucu ortaya fark çıkmazken, O-Boş ve R-Boş arasında ve O-P-40 ve R-P-40 tedavi grupları arasında fark olduğu gözlenmiştir. Bu durumun birçok farklı nedenden kaynaklanabileceği gibi hayvanlar arasındaki bireysel farklılıklardan da meydana gelebileceği düşünülmüştür.

Mesalazin ve TNF- α siRNA içermeyen hidrojel formülasyonları ile tedavi edilen gruplardan (O-Boş ve R-Boş) elde edilen kolon dokularından oral tedavi grubunda iyileşme sağlanırken, rektal tedavi grubunda iyileşme oranı daha az bulunmuştur. Bu durum ipek fibroin, sodyum aljinat ve hyaluronik asitin tek başına inflamasyonu az da olsa iyileştirdiğini göstermektedir. Bu sonuçlara göre Mesalazin ve TNF- α siRNA'nın tek başına inflamasyonu azalttığı, ancak birlikte kullanımlarıyla kolon dokusunda yüksek oranda iyileşme sağlandığı gözlenmiştir.

Histomorfolojik skora yapılarak kolon dokularındaki iyileşme değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre, en düşük histomorfolojik skora sahip gruplar O-Mes-P-40, R-Mes-P-40 ve O-P-40 tedavi gruplarıdır (Şekil 4.113).

Yapılan bir çalışmada DSS ile kolit oluşturulmuş fareler, siRNA ve deksametazon yüklü polimerzom formülasyonları ile tedavi edilmiştir. Çalışmada yapılan histopatolojik değerlendirme sonuçlarına bakıldığında zaman DSS ile İBH oluşturulmuş kolon dokusunda kript anormallliği, epitelyal hücre kaybı ve mononükleer hücrelerin belirgin infiltrasyonu gibi belirgin inflamasyon ve doku hasarı ortaya çıkmıştır. Polimerzom ile tedavi edilen grupta ise bu belirtilerin büyük ölçüde kaybolduğu

epitelyal hücrelerde fark edilmeyecek bir hasar ve infiltrasyonun azalmasıyla doğrulanmıştır (Xu ve diğerleri, 2019). Bir diğer çalışmada ise DSS ile İBH oluşturulmuş fareler mesalazin ile tedavi edilmiş ve pozitif kontrol grubunda görülen görünür kript apsesi, inflamatuvar infiltrasyon ve sitoklaz gibi yapısal değişikliklerin iyileştiği gözlenmiştir (Li ve diğerleri, 2021).

Histomorfolojik çalışma bulgularına bakıldığı zaman biyokimyasal çalışmalarla paralel olacak şekilde beklenildiği gibi çalışmamızda elde edilen mesalazin ve TNF- α siRNA yüklü hidrojel formülasyonları ile tedavi edilen gruplardan elde edilen kolon dokularının (O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40), normal kolon histolojisine en yakın gruplar olduğu görülmüştür. Çalışmamızda elde edilen bulgular literatürle de uyumlu bulunmuştur.

İmmunohistokimyasal çalışmaların bulgularının değerlendirilmesi

Doku örnekleri İBH'nin en önemli belirteçlerinden biri olan TNF- α ekspresyonu yönünden immunohistokimyasal yöntemle incelenmiştir. DSS ile İBH oluşturulmuş kolon dokularında TNF- α seviyesinin yüksek olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Bonfiglio ve diğerleri, 2021). İmmunohistokimyasal analiz sonuçları Resim 4.20-4.31 arasında gösterilmiştir.

TNF- α ifadesinin yüksek olması kolon dokusunda TNF- α seviyesinin yüksek olduğunu, TNF- α ifadesinin düşük olması ise kolon dokusunda TNF- α seviyesinin düşük olduğunu göstermektedir.

Negatif kontrol grubunda epitelin lümen bakan apikal yüzlerinde ve tunika muscularis (Tm) katmanındaki düz kaslarda TNF- α pozitifliğine rastlanmıştır. Bu durum normal kolonda az da olsa TNF- α ifadesi olduğunu göstermektedir (Resim 4.20).

Pozitif kontrol grubunda ise epitelin tamamında lamina propria ve submukozadaki lenfoid hücrelerde ve yine tunika musculariste TNF- α pozitif alanlar mevcuttur (Resim 4.21). O-Boş ve R-Boş tedavi grupları (Resim 4.22 ve Resim 4.27) ve O-Mes ve R-Mes tedavi gruplarında (Resim 4.24 ve Resim 4.29) pozitif kontrole göre

kolon mukozasındaki TNF- α ifadesinin pozitif boyanma yoğunluğu göreceli olarak daha az bulunmuştur. Bu durum ipek fibroinin ve mesalazinin tek başına kolon dokusunda az da olsa iyileşme sağladığını göstermiştir.

O-P-40 tedavi grubunda (Resim 4.26) TNF- α ifadesi yüksek bulunmuşken R-P-40 tedavi grubunda (Resim 4.28) düşük bulunmuştur. Bunun sebebinin epitel hücrelerinde oluşan dejenerasyondan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

O-Mes-P-40 (Resim 4.25) ve R-Mes-P-40 (Resim 4.30) tedavi gruplarının TNF- α ifade düzeyi diğer deney gruplarına göre daha az bulunmuştur. O-Ticari tedavi grubunda TNF- α ifadesi düşük bulunmuşken, R-Ticari tedavi grubunda ise hem kolon epitel hücrelerinde hem de lenf foliküllerinde TNF- α pozitif bulunmuştur.

İmmunohistokimya çalışmalarından sonra immunohistokimyasal skorlama yapılmıştır, bu skorlama sonuçları Şekil 4.114'te gösterilmiştir. Sonuçlara bakıldığında en düşük immunohistokimyasal skor O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 tedavi gruplarıyla elde edilmiştir. O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40 gruplarının skoru O-Ticari ve R-Ticari gruplarından daha düşük bulunmuştur. Bu sonuca bakılarak çalışmamız kapsamında geliştirilen oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının piyasa preparatlarına göre TNF- α seviyesini düşürmede daha etkili oldukları değerlendirilmiştir.

İmmunohistokimyal çalışma bulgularına bakıldığı zaman, biyokimyasal ve histomorfolojik çalışmalarla paralel olacak şekilde beklenildiği gibi, kolon dokusundaki en düşük TNF- α seviyesi çalışmamızda elde edilen mesalazinin ve TNF- α siRNA yüklü hidrojel formülasyonları ile tedavi edilen gruplarda (O-Mes-P-40 ve R-Mes-P-40) görülmüştür.

İn vivo çalışmalardan elde edilen bulgulara bakıldığı zaman, formülasyonda yer alan polimerler olan ipek fibroin, sodyum aljinat ve hyaluronik asitin ve mesalazinin tek başına inflamasyonu azalttığı ancak yeterli olmadığı görülmüştür. TNF- α siRNA'nın hem oral hem de rektal yoldan inflamasyonu iyileştirmede etkili olduğu görülmüştür, bu durum tez kapsamında geliştirilen hidrojel formülasyonunun in vitro çözünme hızı ve in vitro gen susturma çalışmalarıyla paralel olacak şekilde TNF- α siRNA yapısını koruduğunu göstermiştir. Bütün in vivo çalışma sonuçları göz önünde

bulundurulduğunda çalışmamızda geliştirilen mesalazin ve TNF- α siRNA yüklü optimum oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının İBH tedavisinde etkili olduğu ve bu etkinin piyasa preparatlarıyla karşılaştırıldığında daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır.

.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 75:75:50 oranında İpek fibroin: sodyum aljinat: hyaluronik asit içeren B7/75-75-50 kodlu biyomürekkep formülasyonu önformülasyon çalışmaları sonucunda seçilmiştir.
- Optimum biyomürekkep formülasyonları oral uygulama için 75:75:75 oranında sodyum aljinat-ProtanalCR8223/ipek fibroin/hyaluronik asit içeren P8223-B7/oral olarak, rektal uygulama için ise 75:75:75 oranında sodyum aljinat-ProtanalCR8133/ipek fibroin/hyaluronik asit içeren P8133-B7/rektal olarak seçilmiştir.
- Çalışmada geliştirilen oral ve rektal hidrojel formülasyonlarının RAW 264.7 hücre canlılığı üzerinde olumsuz ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı etkilerinin olmadığı kanıtlanmıştır.
- 3B biyobaskı teknolojisiyle 30 mg mesalazin ve 110,8 µg TNF-α siRNA içeren oral hidrojel; 20 mg mesalazin ve 110,8 µg TNF-α siRNA içeren rektal hidrojel hazırlanmıştır.
- Tez kapsamında geliştirilen optimum oral hidrojin gen susturma etkinliği %46,53, rektal hidrojin gen susturma etkinliği ise %45,06 olarak bulunmuştur.
- Formülasyonların DSC, XRD, FT-IR sonuçları ile 3B biyobaskı işleminden sonra formülasyonlarda yapısal bir değişiklik olmadığı ve formülasyon bileşenleri arasında geçimsizlik olmadığı gösterilmiştir.
- Oral hidrojin %366, rektal hidrojin ise %404 şişme kapasitesine sahip olduğu formülasyonların şişme kapasitesinin uygulanan bölgede uzun süre kalarak etki süresinin artırılması için uygun olduğu bulunmuştur.
- 24 saat sonunda rektal hidrojin %75,9'nun, oral hidrojin ise %31,2'sinin in vitro parçalanmaya uğradığı gözlenmiştir.
- Mekanik analizlerde kopma uzaması değerleri oral hidrojel için $30,7 \pm 6,5$, rektal hidrojel için $38,4 \pm 4,5$; gerilme direnci değerleri ise oral hidrojel için $0,017 \pm 0,002$ mPa, rektal hidrojel için ise $0,016 \pm 0,001$ mPa olarak ölçülmüştür.
- Formülasyonların hem sağlıklı hem de İBH oluşturulmuş kolon dokusuna mukoadesyonunun yüksek olduğu bulunmuştur.
- Morfolojik çalışmalarda hidrojellerin bulutsu ve homojen bir görünüme sahip olduğu, liyofilize hidrojellerin ise poröz bir görünüme sahip olduğu gösterilmiştir.

- İn vitro çözünme hızı çalışmaları ile hidrojel formülasyonlarından mesalazin ve TNF- α siRNA salımının 24 saat boyunca devam ettiği ve hidrojellerin uzatılmış salım profiline sahip olduğu gösterilmiştir.
- İn vivo çalışmadaki biyokimyasal analizler sonucunda tez kapsamında geliştirilen mesalazin ve TNF- α yüklü optimum oral ve rektal hidrojellerin TNF- α , IL-6, IL-12, NO ve MDA seviyelerinde azalma sağladığı gözlenmiştir.
- İn vivo çalışmalardaki histolojik analizler ile mesalazin ve TNF- α siRNA pozitif kontrol grubuna göre kolon dokusunda iyileşmeyi sağladığı gösterilmiştir.
- Çalışma kapsamında ipek fibroin temelli, mesalazin ve kitozan:TNF- α polileksi yüklü oral ve rektal hidrojel formülasyonları 3B biyobaskı yöntemiyle başarıyla geliştirilmiştir.

Öneriler

- Hidrojellerin hazırlanmasında ekstrüzyon temelli biyobaskı kullanılmıştır ve basım sırasında basınç değerinin değişmesi sebebiyle formülasyonda boşluklar meydana gelebilmektedir. Basıncın sabit tutulduğu bir sistem ile baskı işlemi gerçekleştirilebilir.
- Hidrojeller 3B basıldıktan sonra kalsiyum klorür çözeltisi ile çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlama ajanı değiştirilerek hidrojellerde salım hızı yavaşlatılabilir.
- İn vivo çalışmalarda DSS ile farelerde İBH oluşturulurken DSS'nin içme suyuna karıştırılarak uygulanması sebebiyle hastalık modelinde fareler arasında yüksek varyasyon görülmüştür. Ayrıca İBH sırasında fareler diyare ve kan kaybı ile gelişen elektrolit kaybını tolere edemedikleri için hayvan kayıpları görülmüştür. Bu nedenle İBH modelinde sıçanlarla çalışılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abasalizadeh, F., Moghaddam, S. V., Alizadeh, E., Akbari, E., Kashani, E., Fazljou, S. M. B., and Akbarzadeh, A. (2020). Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting. *Journal of Biological Engineering*, 14, 1-22.
- Abdel-Fattah W. I., Atwa N., Ali G. W. (2015). Influence of the protocol of fibroin extraction on the antibiotic activities of the constructed composites. *Progress in Biomaterials*, 4(2), 77-88.
- Abdel-Fattah W. I., Atwa N., Ali G. W. (2015). Influence of the protocol of fibroin extraction on the antibiotic activities of the constructed composites. *Progress in Biomaterials*, 4(2), 77-88.
- Abinusawa, A., and Tenjarla, S. (2015). Release of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) from mesalamine formulations at various pH levels. *Advances in Therapy*, 32, 477-484.
- Abinusawa, A., and Tenjarla, S. (2015). Release of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) from mesalamine formulations at various pH levels. *Advances in Therapy*, 32, 477-484.
- Acharjya, S. K., Sahu, A., Das, S., Sagar, P., and Annapurna, M. M. (2010). Spectrophotometric methods for the determination of mesalamine in bulk and pharmaceutical dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 1(1), 63.
- Adepu, S., and Ramakrishna, S. (2021). Controlled drug delivery systems: Current status and future directions. *Molecules*, 26(19), 5905.
- Adrover, A., Pedacchia, A., Petralito, S., and Spera, R. (2015). In vitro dissolution testing of oral thin films: A comparison between USP 1, USP 2 apparatuses and a new millifluidic flow-through device. *Chemical Engineering Research and Design*, 95, 173–178.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P. V., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K. and Mukherjee, S. K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 657-685.
- Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(2), 105-121.
- Ajisawa, A. (1998). Dissolution of silk fibroin with calciumchloride/ethanol aqueous solution studies on the dissolution of silk fibroin.(IX). *The Journal of Sericultural Science of Japan*, 67(2), 91-94.
- Ajji, Z., Mirjalili, G., Alkhatab, A., and Dada, H. (2008). Use of electron beam for the production of hydrogel dressings. *Radiation Physics and Chemistry*, 77(2), 200-202.

- Akhtar, S., and Benter, I. F. (2007). Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(12), 3623-3632.
- Alam, M. M., Tasneem, F., Kabir, A. L., and Rouf, A. S. S. (2019). Study of drug-drug and drug-food interactions of mesalazine through FTIR and DSC. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(2), 257-269.
- Albar, A., Chougan, M., Al-Kheetan, M. J., Swash, M. R., and Ghaffar, S. H. (2020). Effective extrusion-based 3D printing system design for cementitious-based materials. *Results in Engineering*, 6, 100135.
- Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., and Kaplan, D. L. (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, 24(3), 401-416.
- Alzoghaibi, M. A., Al Mofleh, I. A., and Al-Jebreen, A. M. (2007). Lipid peroxides in patients with inflammatory bowel disease. *Saudi Journal of Gastroenterology*, 13(4), 187-190.
- Amidon, S., Brown, J. E., and Dave, V. S. (2015). Colon-targeted oral drug delivery systems: design trends and approaches. *AAPS Pharmscitech*, 16, 731-741.
- Amor, D. (2001). Gene therapy: Principles and potential applications. *Australian Family Physician*, 30(10), 953-958.
- Amorim, P. A., d'Ávila, M. A., Anand, R., Moldenaers, P., Van Puyvelde, P., and Bloemen, V. (2021). Insights on shear rheology of inks for extrusion-based 3D bioprinting. *Bioprinting*, 22, e00129.
- Andus, T., Kocjan, A., Müser, M., Baranovsky, A., Mikhailova, T. L., Zvyagintseva, T. D., and International Salofalk Suppository OD Study Group. (2010). Clinical trial: a novel high-dose 1 g mesalamine suppository (Salofalk) once daily is as efficacious as a 500-mg suppository thrice daily in active ulcerative proctitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 16(11), 1947-1956.
- Aprodu, A., Mantaj, J., Raimi-Abraham, B., and Vllasaliu, D. (2019). Evaluation of a methylcellulose and hyaluronic acid hydrogel as a vehicle for rectal delivery of biologics. *Pharmaceutics*, 11(3), 127.
- Argollo, M., Fiorino, G., Hindryckx, P., Peyrin-Biroulet, L., and Danese, S. (2017). Novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease. *Journal of Autoimmunity*, 85, 103-116.
- Arnold, G.Y., Azarnoff, D., Barbuto, J. P., Branch, R.A., Canpbell, R.K., Coley, K.C., Connel, S., Gage, T.W., Graber, M.A., Hoffman, B.B., Holiman, T. D., Jellin, J. M. and Jeske, A. (2001). Mesalamine, *mosby's genrx: a comprehensive reference for generic and brand prescription drugs* (11th edition), New York: Mosby Inc., 85-93.

- Arnold, G.Y., Azarnoff, D., Barbuto, J. P., Branch, R.A., Canpbell, R.K., Coley, K.C., Connel, S., Gage, T.W., Graber, M.A., Hoffman, B.B., Holiman, T. D., Jellin, J. M., Jeske, A. (2001). *Mesalamine, Mosby's GenRx: A Comprehensive Reference for Generic and Brand Prescription Drugs* (11th edition), Mosby Inc., Unites States.
- Arora, S., Ali, J., Ahuja, A., Khar, R. K., and Baboota, S. (2005). Floating Drug Delivery Systems: A Review, *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 6(3), 372-390.
- Asha, D., Jeganath, S., Bupesh, G., Sahoo, U. K., Bhaskar, M., and Pandian, K. (2020). Controlled drug release for inflammatory bowel disease (IBD). *Bioinformation*, 16(7), 513.
- Aslam, M., Barkat, K., Malik, N. S., Alqahtani, M. S., Anjum, I., Khalid, I. and Raza, F. (2022). pH sensitive pluronic acid/agarose-hydrogels as controlled drug delivery carriers: design, characterization and toxicity evaluation. *Pharmaceutics*, 14(6), 1218.
- Aykac, A., Karanlik, B., and Sehirli, A. O. (2018). Protective effect of silk fibroin in burn injury in rat model. *Gene*, 641, 287-291.
- Bahram, M., Mohseni, N., and Moghtader, M. (2016). An introduction to hydrogels and some recent applications. In emerging concepts in analysis and applications of hydrogels. *IntechOpen*, 9-38.
- Bai, X. Y., Yan, Y., Wang, L., Zhao, L. G., and Wang, K. (2016). Novel pH-sensitive hydrogels for 5-aminosalicylic acid colon targeting delivery: in vivo study with ulcerative colitis targeting therapy in mice. *Drug Delivery*, 23(6), 1926-1932.
- Barnes, M. N., Deshane, J. S., Rosenfeld, M., Siegal, G. P., Curiel, D. T. and Alvarez, R. D. (1997). Gene therapy and ovarian cancer: a review. *Obstetrics & Gynecology*, 89(1), 145-155.
- Barron, J. A., Wu, P., Ladouceur, H. D., and Ringeisen, B. R. (2004). Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. *Biomedical Microdevices*, 6(2), 139-147.
- Bayraktar, O., Malay, Ö., Özgari, Y., and Batıgün, A. (2005). Silk fibroin as a novel coating material for controlled release of theophylline. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(3), 373-381.
- Berends, S. E., Strik, A. S., Löwenberg, M., D'Haens, G. R., and Mathôt, R. A. (2019). Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in the treatment of ulcerative colitis. *Clinical Pharmacokinetics*, 58, 15-37.
- Bernstein, C. N., Eliakim, A., Fedail, S., Fried, M., Gearry, R., Goh, K. L., and Ouyang, Q. (2016). World gastroenterology organisation global guidelines inflammatory bowel disease: Update August 2015. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 50(10), 803-818.

- Bhagyaraj, S., and Krupa, I. (2020). Alginate-mediated synthesis of hetero-shaped silver nanoparticles and their hydrogen peroxide sensing ability. *Molecules*, 25(3), 435.
- Bhatia, S. K., and Ramadurai, K. W. (2017). 3-Dimensional printing and rapid device prototyping. *3D Printing and Bio-Based Materials in Global Health*, 21-38.
- Bishop, E. S., Mostafa, S., Pakvasa, M., Luu, H. H., Lee, M. J., Wolf, J. M., and Reid, R. R. (2017). 3-D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends. *Genes & Diseases*, 4(4), 185-195.
- Bochicchio, S., Dapas, B., Russo, I., Ciacci, C., Piazza, O., De Smedt, S., and Grassi, G. (2017). In vitro and ex vivo delivery of tailored siRNA-nanoliposomes for E2F1 silencing as a potential therapy for colorectal cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 525(2), 377-387.
- Bonfiglio, R., Galli, F., Varani, M., Scimeca, M., Borri, F., Fazi, S., and Bonanno, E. (2021). Extensive histopathological characterization of inflamed bowel in the dextran sulfate sodium mouse model with emphasis on clinically relevant biomarkers and targets for drug development. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 2028.
- Bozkır, A., and Saka, O. M. (2004). Chitosan nanoparticles for plasmid DNA delivery: effect of chitosan molecular structure on formulation and release characteristics. *Drug Delivery*, 11(2), 107-112.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bray, L. J., George, K. A., Ainscough, S. L., Hutmacher, D. W., Chirila, T. V., and Harkin, D. G. (2011). Human corneal epithelial equivalents constructed on Bombyx mori silk fibroin membranes. *Biomaterials*, 32(22), 5086-5091.
- Brillinger, M., and Pendl, K. A. (2020). Non-newtonian material behaviour in extrusion-based 3D printing: Investigation of critical process parameters. *6th World Congress on Mechanical, Chemical, and Material Engineering*, 3, 1-10.
- Brittain, H. G. (1994). Meselamine. *Analytical profiles of drug substances and excipients* (Vol. 23). New York: Academic Press, 45-63.
- Brogden, R. N., and Sorkin, E. M. (1989). Mesalazine: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in chronic inflammatory bowel disease. *Drugs*, 38(4), 500-523.
- Cao, T. T., Wang, Y. J., and Zhang, Y. Q. (2013). Effect of strongly alkaline electrolyzed water on silk degumming and the physical properties of the fibroin fiber. *PLoS One*, 8(6), e65654.

- Cao, Y., Tan, Y. F., Wong, Y. S., Liew, M. W. J., and Venkatraman, S. (2019). Recent advances in chitosan-based carriers for gene delivery. *Marine Biopolymers and Drug Delivery*, 17(6), 381.
- Carmichael, J. C., and Mills, S. (2022). Anatomy and embryology of the colon, rectum, and anus. *The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery*, 3-27.
- Carmichael, J.C., Mills, S. (2019). Anatomy and embryology of the colon, rectum, and anus. Steele, S., Hull, T., Hyman, N., Maykel, J., Read, T., Whitlow, C. (Eds.) *The ASCRS Manual of Colon and Rectal Surgery*. New York: Springer, 85-93.
- Cassimjee, H., Kumar, P., Ubanako, P., and Choonara, Y. E. (2022). Genipin-crosslinked, proteosaccharide scaffolds for potential neural tissue engineering applications. *Pharmaceutics*, 14(2), 441.
- Catros, S., Fricain, J. C., Guillotin, B., Pippenger, B., Bareille, R., Remy, M., and Guillemot, F. (2011). Laser-assisted bioprinting for creating on-demand patterns of human osteoprogenitor cells and nano-hydroxyapatite. *Biofabrication*, 3(2), 025001.
- Chamanara, M., Rashidian, A., Mehr, S. E., Dehpour, A. R., Shirkohi, R., Akbarian, R., and Rezayat, S. M. (2019). Melatonin ameliorates TNBS-induced colitis in rats through the melatonin receptors: involvement of TLR4/MyD88/NF- κ B signalling pathway. *Inflammopharmacology*, 27, 361-371.
- Chang, G., Kim, H. J., Kaplan, D., Vunjak-Novakovic, G., and Kandel, R. A. (2007). Porous silk scaffolds can be used for tissue engineering annulus fibrosus. *European Spine Journal*, 16, 1848-1857.
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., and Vijay-Kumar, M. (2014). Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current Protocols in Immunology*, 104(1), 15-25.
- Chaturvedi, M., Kumar, M., and Pathak, K. (2011). A review on mucoadhesive polymer used in nasal drug delivery system. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(4), 215-222.
- Chebion, G., Bugni, E., Gerin, V., Daudon, M., and Castiglione, V. (2022). Drug-induced nephrolithiasis and crystalluria: the particular case of the sulfasalazinederivatives. *Comptes Rendus. Chimie*, 25(S1), 295-306.
- Chen, M., Gao, S., Dong, M., Song, J., Yang, C., Howard, K. A., and Besenbacher, F. (2012). Chitosan/siRNA nanoparticles encapsulated in PLGA nanofibers for siRNA delivery. *ACS Nano*, 6(6), 4835-4844.
- Chen, W. J. (2002). Functions of hyaluronan in wound repair. *Hyaluronan*, 147-156.
- Chen, W.Y.J., and Abatangelo, G. (1999). Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair and Regeneration*, 7, 79-89.

- Chen, X. B., Anvari-Yazdi, A. F., Duan, X., Zimmerling, A., Gharraei, R., Sharma, N. K., Sweliem, S., and Ning, L. (2023). Biomaterials/bioinks and extrusion bioprinting. *Bioactive Materials*, 28, 511-536.
- Chen, X., Zhao, X., Wang, H., Yang, Z., Li, J., and Suo, H. (2017). Prevent effects of *Lactobacillus fermentum* HY01 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Nutrients*, 9(6), 545.
- Chlapanidas, T., Faragò, S., Mingotto, F., Crovato, F., Tosca, M. C., Antonioli, B., and Torre, M. L. (2011). Regenerated silk fibroin scaffold and infrapatellar adipose stromal vascular fraction as feeder-layer: a new product for cartilage advanced therapy. *Tissue Engineering Part A*, 17(13-14), 1725-1733.
- Choi, J. Y., Park, C. H., and Lee, J. (2008). Effect of polymer molecular weight on nanocomminution of poorly soluble drug. *Drug Delivery*, 15(5), 347-353.
- Chou, S. T., Hom, K., Zhang, D., Leng, Q., Tricoli, L. J., Hustedt, J. M., and Mixson, A. J. (2014). Enhanced silencing and stabilization of siRNA polyplexes by histidine-mediated hydrogen bonds. *Biomaterials*, 35(2), 846-855.
- Chukwudi, C. U., and Good, L. (2016). Interaction of the tetracyclines with double-stranded RNAs of random base sequence: new perspectives on the target and mechanism of action. *The Journal of Antibiotics*, 69(8), 622-630.
- Chung, T. W., Chang, C. Y., Chang, C. N., Liao, C. H., Jan, Y. J., Chen, L. T., and Chen, W. P. (2020). Developing a silk fibroin composite film to scavenge and probe H₂O₂ associated with UV-excitable blue fluorescence. *Sensors*, 20(2), 366.
- Clemett, D., and Markham, A. (2000). Prolonged-release mesalazine: a review of its therapeutic potential in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Drugs*, 59, 929-956.
- Coates, J. P. (1996). The interpretation of infrared spectra: Published reference sources. *Applied Spectroscopy Reviews*, 31(1-2), 179-192.
- Compaan, A. M., Christensen, K., and Huang, Y. (2016). Inkjet bioprinting of 3D silk fibroin cellular constructs using sacrificial alginate. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3(8), 1519-1526.
- Connell, W. R., Kamm, M. A., Ritchie, J. K., Lennard-Jones, J. E., Dickson, M., and Balkwill, A. (1994). Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease. *The Lancet*, 343(8908), 1249-1252.
- Corrigan G, Stevens PE. (2000). Review article: interstitial nephritis associated with the use of mesalazine in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 14(1), 1-6.
- Coskun, M., Vermeire, S., and Nielsen, O. H. (2017). Novel targeted therapies for inflammatory bowel disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(2), 127-142.

- Costa, P. ve Sousa Lobo, J. M. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 123–133.
- Craig, C. L., and Riekel, C. (2002). Comparative architecture of silks, fibrous proteins and their encoding genes in insects and spiders. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 133(4), 493-507.
- Cubayachi, C., Lemos, C. N., Pereira, F., Dias, K., Herculano, R. D., de Freitas, O., and Lopez, R. F. (2019). Silk fibroin films stabilizes and releases bioactive insulin for the treatment of corneal wounds. *European Polymer Journal*, 118, 502-513.
- Dame, M. K., Bhagavathula, N., Mankey, C., DaSilva, M., Paruchuri, T., Aslam, M. N., and Varani, J. (2010). Human colon tissue in organ culture: preservation of normal and neoplastic characteristics. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 46, 114-122.
- Dana, H., Chalbatani, G. M., Mahmoodzadeh, H., Karimloo, R., Rezaiean, O., Moradzadeh, A., and Gharagouzlo, E. (2017). Molecular mechanisms and biological functions of siRNA. *International Journal of Biomedical Science*, 13(2), 48-57.
- Das, S., Pati, F., Choi, Y. J., Rijal, G., Shim, J. H., Kim, S. W., and Ghosh, S. (2015). Bioprintable, cell-laden silk fibroin–gelatin hydrogel supporting multilineage differentiation of stem cells for fabrication of three-dimensional tissue constructs. *Acta Biomaterialia*, 11, 233-246.
- Dash, A.K., Brittain, H.G. (1998). Mesalamine. *Analytical profiles of drug substances and excipients*. New York: Academic Press, 209-243.
- Dash, A.K., Brittain, H.G. (1998). Mesalamine. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, Florey, A.T (Ed.), (Vol.25), 209-243, Academic Press., United States.
- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., and Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 67(3), 217–223.
- Deguchi, Y., Andoh, A., Yagi, Y., Bamba, S., Inatomi, O., Tsujikawa, T., and Fujiyama, Y. (2006). The S1P receptor modulator FTY720 prevents the development of experimental colitis in mice. *Oncology Reports*, 16(4), 699-703.
- Delezuk, J. A., Pavinatto, A., Moraes, M. L., Shimizu, F. M., Rodrigues, V. C., Campana-Filho, S. P., and Oliveira Jr, O. N. (2017). Silk fibroin organization induced by chitosan in layer-by-layer films: Application as a matrix in a biosensor. *Carbohydrate Polymers*, 155, 146-151.
- Deltenre P, Berson A, Marcellin P, Degott C, Biour M, Pessayre D. (1999). Mesalazine (5-aminosalicylic acid) induced chronic hepatitis. *Gut*. 44, 886-888.

- Derakhshanfar, S., Mbeleck, R., Xu, K., Zhang, X., Zhong, W., and Xing, M. (2018). 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances. *Bioactive Materials*, 3(2), 144-156.
- Derby, B. (2012). Printing and prototyping of tissues and scaffolds. *Science*, 338(6109), 921-926.
- Dettmar P. W., Sykes J., Little S. L., Bryan J. (2006). Rapid onset of effect of sodium alginate on gastro-oesophageal reflux compared with ranitidine and omeprazole, and relationship between symptoms and reflux episodes. *International Journal of Clinical Practice*, 60(3), 275-283.
- Diab, T., Pritchard, E. M., Uhrig, B. A., Boerckel, J. D., Kaplan, D. L., and Guldberg, R. E. (2012). A silk hydrogel-based delivery system of bone morphogenetic protein for the treatment of large bone defects. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 11, 123-131.
- Dodero, A., Pianella, L., Vicini, S., Alloisio, M., Ottonelli, M., and Castellano, M. (2019). Alginate-based hydrogels prepared via ionic gelation: An experimental design approach to predict the crosslinking degree. *European Polymer Journal*, 118, 586-594.
- Dong, Y., Dong, P., Huang, D., Mei, L., Xia, Y., Wang, Z., and Wu, C. (2015). Fabrication and characterization of silk fibroin-coated liposomes for ocular drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 91, 82-90.
- Dormenval, C., Lokras, A., Cano-Garcia, G., Wadhwa, A., Thanki, K., Rose, F., and Foged, C. (2019). Identification of factors of importance for spray drying of small interfering RNA-loaded lipidoid-polymer hybrid nanoparticles for inhalation. *Pharmaceutical Research*, 36, 1-15.
- Dortunç B. (2002). *Oral sistemler. Kontrollü salım sistemleri*. İstanbul: Elma Bilgisayar Basım, 151-168.
- Dubey, P., Kumar, S., Ravindranathan, S., Vasudevan, S., Aswal, V. K., Rajamohanan, P. R., and Prabhune, A. (2018). pH dependent sophorolipid assemblies and their influence on gelation of silk fibroin protein. *Materials Chemistry and Physics*, 203, 9-16.
- El Moussaoui, S., Fernández-Campos, F., Alonso, C., Limón, D., Halbaut, L., Garduño-Ramírez, M. L., and Mallandrich, M. (2021). Topical mucoadhesive alginate-based hydrogel loading ketorolac for pain management after pharmacotherapy, ablation, or surgical removal in condyloma acuminata. *Gels*, 7(1), 8.
- El Samaligy, S. (2010). Floating systems for oral controlled release drug delivery. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 4(2), 1-13.
- Elakkiya, T., Malarvizhi, G., Rajiv, S., and Natarajan, T. S. (2014). Curcumin loaded electrospun Bombyx mori silk nanofibers for drug delivery. *Polymer International*, 63(1), 100-105.

- Enomoto, S., Sumi, M., Kajimoto, K., Nakazawa, Y., Takahashi, R., Takabayashi, C., and Sata, M. (2010). Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material. *Journal of Vascular Surgery*, 51(1), 155-164.
- Esiringü, F., Tuğcu-Demiröz, F., Acartürk, F., Coşkun Cevher, Ş., Bircan, F., and Sarı Kılıçaslan, S. M. (2016). Investigation of the effect of intracolonic melatonin gel formulation on acetic acid-induced colitis. *Drug delivery*, 23(7), 2318-2326.
- Fang, Q., Chen, D., Yang, Z., and Li, M. (2009). In vitro and in vivo research on using *Antheraea pernyi* silk fibroin as tissue engineering tendon scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 29(5), 1527-1534.
- Fang, Y., Frampton, J. P., Raghavan, S., Sabahi-Kaviani, R., Luker, G., Deng, C. X., and Takayama, S. (2012). Rapid generation of multiplexed cell cocultures using acoustic droplet ejection followed by aqueous two-phase exclusion patterning. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 18(9), 647-657.
- Fernandes, J. C., Qiu, X., Winnik, F. M., Benderdour, M., Zhang, X., Dai, K., and Shi, Q. (2012). Low molecular weight chitosan conjugated with folate for siRNA delivery in vitro: optimization studies. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5833-5845.
- Feyzmanesh, S., Halvaei, I., and Baheiraei, N. (2022). Alginate effects on human sperm parameters during freezing and thawing: a prospective study. *Cell Journal (Yakhteh)*, 24(7), 417-423.
- Fiocchi, C. (1998). Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*, 115(1), 182-205.
- Fliervoet, L. A., Zhang, H., van Groesen, E., Fortuin, K., Duin, N. J., Remaut, K., Schiffelers, R.M., Hennink, W.M., and Vermonden, T. (2020). Local release of siRNA using polyplex-loaded thermosensitive hydrogels. *Nanoscale*, 12(18), 10347-10360.
- Foyt, D. A., Norman, M. D., Yu, T. T., and Gentleman, E. (2018). Exploiting advanced hydrogel technologies to address key challenges in regenerative medicine. *Advanced Healthcare Materials*, 7(8), 1700939.
- Frede, A., Neuhaus, B., Klopffleisch, R., Walker, C., Buer, J., Müller, W., and Westendorf, A. M. (2016). Colonic gene silencing using siRNA-loaded calcium phosphate/PLGA nanoparticles ameliorates intestinal inflammation in vivo. *Journal of Controlled Release*, 222, 86-96.
- French, D. L., and Mauger, J. W. (1993). Evaluation of the physicochemical properties and dissolution characteristics of mesalamine: relevance to controlled intestinal drug delivery. *Pharmaceutical Research*, 10, 1285-1290.
- Friedman, A., Bar-Shira, E., and Sklan, D. (2003). Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. *World's Poultry Science Journal*, 59(2), 209-219.

- Friend, D. R. (2005). New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(2), 247-265.
- Fu, T., Wang, Y., Ma, M., Dai, W., Pan, L., Shang, Q., and Yu, G. (2023). Isolation of alginate-degrading bacteria from the human gut microbiota and discovery of *Bacteroides xylanisolvens* AY11-1 as a novel anti-colitis probiotic bacterium. *Nutrients*, 15(6), 1352.
- Gao, S., Dagnaes-Hansen, F., Nielsen, E. J. B., Wengel, J., Besenbacher, F., Howard, K. A., and Kjems, J. (2009). The effect of chemical modification and nanoparticle formulation on stability and biodistribution of siRNA in mice. *Molecular Therapy*, 17(7), 1225-1233.
- Gareb, B., Eissens, A. C., Kosterink, J. G., and Frijlink, H. W. (2016). Development of a zero-order sustained-release tablet containing mesalazine and budesonide intended to treat the distal gastrointestinal tract in inflammatory bowel disease. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 103, 32-42.
- Gaspar, R., Branco, C. C., and Macedo, G. (2021). Liver manifestations and complications in inflammatory bowel disease: A review. *World Journal of Hepatology*, 13(12), 1956.
- Gewirtz, A. M. (2007). On future's doorstep: RNA interference and the pharmacopeia of tomorrow. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(12), 3612-3614.
- Gianak, O., Pavlidou, E., Sarafidis, C., Karageorgiou, V., and Deliyanni, E. (2018). Silk fibroin nanoparticles for drug delivery: effect of bovine serum albumin and magnetic nanoparticles addition on drug encapsulation and release. *Separations*, 5(2), 25.
- Gibson, I., Rosen, D., Stucker, B., and Khorasani, M. (2015). Introduction and basic principles. *Additive Manufacturing Technologies*, 1-18.
- Gil, E. S., Spontak, R. J., and Hudson, S. M. (2005). Effect of β -Sheet Crystals on the Thermal and Rheological Behavior of Protein-Based Hydrogels Derived from Gelatin and Silk Fibroin. *Macromolecular Bioscience*, 5(8), 702-709.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Ferretti, M., Brignola, C., Miglioli, M., and Campieri, M. (1998). Comparison of oral with rectal mesalazine in the treatment of ulcerative proctitis. *Diseases of the Colon & Rectum*, 41, 93-97.
- Giovannitti, J. A., and Trapp, L. D. (1991). Adult sedation: oral, rectal, IM, IV. *Anesthesia Progress*, 38(4-5), 154-171.
- Girón-Hernández, J., Gentile, P., and Benlloch-Tinoco, M. (2021). Impact of heterogeneously crosslinked calcium alginate networks on the encapsulation of β -carotene-loaded beads. *Carbohydrate Polymers*, 271, 118429.

- Goldsmith, J. A., Randall, N., and Ross, S. D. (1978). On methods of expressing dissolution rate data. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 30(1), 347–349.
- Gomathi, T., Susi, S., Abirami, D., and Sudha, P. N. (2017). Size optimization and thermal studies on calcium alginate nanoparticles. *IOSR Journal of Pharmacy*, 48, 1-7.
- Gombotz W. R., Wee S. F. (1998). Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31(3), 267-285.
- Goole, J., and Amighi, K. (2016). 3D printing in pharmaceuticals: A new tool for designing customized drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 499(1-2), 376-394.
- Guarise, C., Acquasaliente, L., Pasut, G., Pavan, M., Soato, M., Garofolin, G., and Galesso, D. (2023). The role of high molecular weight hyaluronic acid in mucoadhesion on an ocular surface model. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 143, 105908.
- Gudapati, H., Yan, J., Huang, Y., and Chrisey, D. B. (2014). Alginate gelation-induced cell death during laser-assisted cell printing. *Biofabrication*, 6(3), 035022.
- Guillotin, B., Souquet, A., Catros, S., Duocastella, M., Pippenger, B., Bellance, S., and Guillemot, F. (2010). Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials*, 31(28), 7250-7256.
- Guo, J., Jiang, X., and Gui, S. (2016). RNA interference-based nanosystems for inflammatory bowel disease therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 5287.
- Gupta, P., Vermani, K., and Garg, S. (2002). Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discovery Today*, 7(10), 569-579.
- Guziewicz, N., Best, A., Perez-Ramirez, B., and Kaplan, D. L. (2011). Lyophilized silk fibroin hydrogels for the sustained local delivery of therapeutic monoclonal antibodies. *Biomaterials*, 32(10), 2642-2650.
- Gültekin, H. E., Tuğcu Demiröz, F., Tort, S., and Acartürk, F. (2022). Three-dimensional printed dosage forms based on disease-focussed perspectives. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 74(10), 1406-1426.
- Günter, E. A., Markov, P. A., Melekhin, A. K., Belozerov, V. S., Martinson, E. A., Litvinets, S. G., and Popov, S. V. (2018). Preparation and release characteristics of mesalazine loaded calcium pectin-silica gel beads based on callus cultures pectins for colon-targeted drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 2225-2233.
- Gürsoy, A. Z. (2002). *Kontrollü salım sistemleri*. İstanbul: Elma Bilgisayar Basım, 112-126.

- Hammond, S. M., Caudy, A. A. ve Hannon, G. J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Reviews Genetics*, 2(2), 110- 119
- Han, L., Zhao, Y., Yin, L., Li, R., Liang, Y., Huang, H., and Feng, M. (2012). Insulin-loaded pH-sensitive hyaluronic acid nanoparticles enhance transcellular delivery. *AAPS PharmSciTech*, 13, 836-845.
- Hanauer, S. B., and Strömberg, U. (2004). Oral Pentasa in the treatment of active Crohn's disease: a meta-analysis of double-blind, placebo-controlled trials. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2(5), 379-388.
- Hanauer, S., Schwartz, J., Robinson, M., Roufail, W., Arora, S., Cello, J., and Safdi, M. (1993). Mesalamine capsules for treatment of active ulcerative colitis: Results of a controlled trial. *American Journal of Gastroenterology*, 88(8), 1188-1197.
- Hanpanich, B. S., Oonkhanond, B., Srimuninnimit, V., Visuthikosol, V., and Sophon, P. (2011). De novo method of developing silk fibroin hydrogel aim for using as a dermal scaffold by gamma irradiation. *International Journal of Applied Biomedical Engineering*, 4, 15.
- Harini Chowdary, V., Prasanna Raju, Y., Rubia, Y. B., Vulava, J., and Vandana, K. R. (2014). In vitro characteristics of modified pulsincap formulation with mesalamine for ulcerative colitis treatment. *Indian Drugs*, 51(03), 35.
- Haznar-Garbacz, D., Garbacz, G., and Weitschies, W. (2019). Development of oral foams for topical treatment of inflammatory bowel disease. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 50, 287-292.
- He, C., Yin, L., Song, Y., Tang, C., and Yin, C. (2015). Optimization of multifunctional chitosan–siRNA nanoparticles for oral delivery applications, targeting TNF- α silencing in rats. *Acta Biomaterialia*, 17, 98-106.
- Henderson, L. M., Johnson, C. E., and Berardi, R. R. (1994). Stability of mesalamine in rectal suspension diluted with distilled water. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 51(23), 2955-2957.
- Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 18-23.
- Holzerny, P., Ajdini, B., Heusermann, W., Bruno, K., Schuleit, M., Meinel, L., and Keller, M. (2012). Biophysical properties of chitosan/siRNA polyplexes: profiling the polymer/siRNA interactions and bioactivity. *Journal of Controlled Release*, 157(2), 297-304.
- Hong, H., Lee, O. J., Lee, Y. J., Lee, J. S., Ajiteru, O., Lee, H., and Park, C. H. (2020). Cytocompatibility of modified silk fibroin with glycidyl methacrylate for tissue engineering and biomedical applications. *Biomolecules*, 11(1), 35.
- Hoti, G., Caldera, F., Ceccone, C., Rubin Pedrazzo, A., Anceschi, A., Appleton, S. L., and Trotta, F. (2021). Effect of the cross-linking density on the swelling and

- rheological behavior of ester-bridged β -cyclodextrin nanosponges. *Materials*, 14(3), 478.
- Hu, A., Zuo, B., Zhang, F., Zhang, H., and Lan, Q. (2013). Evaluation of electrospun silk fibroin-based transplants used for facial nerve repair. *Otology & Neurotology*, 34(2), 311-318.
- Hu, X., Kaplan, D., and Cebe, P. (2007). Effect of water on the thermal properties of silk fibroin. *Thermochimica Acta*, 461(1-2), 137-144.
- Hu, X., Lu, Q., Sun, L., Cebe, P., Wang, X., Zhang, X., and Kaplan, D. L. (2010). Biomaterials from ultrasonication-induced silk fibroin–hyaluronic acid hydrogels. *Biomacromolecules*, 11(11), 3178-3188.
- Hua, S., Marks, E., Schneider, J. J., and Keely, S. (2015). Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: selective targeting to diseased versus healthy tissue. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(5), 1117-1132.
- Huang, L., Du, X., Fan, S., Yang, G., Shao, H., Li, D., and Zhang, Y. (2019). Bacterial cellulose nanofibers promote stress and fidelity of 3D-printed silk based hydrogel scaffold with hierarchical pores. *Carbohydrate Polymers*, 221, 146-156.
- Iacucci, M., de Silva, S., and Ghosh, S. (2010). Mesalazine in inflammatory bowel disease: a trendy topic once again?. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24(2), 127-133.
- Intavisade, P., and Oonkhanond, B. (2010). A study of irradiated silk fibroin-poly vinyl alcohol hydrogel for artificial skin substitutes. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 20, 119-22.
- Iqbal, S., Du, X., Wang, J., Li, H., Yuan, Y., and Wang, J. (2018). Surface charge tunable nanoparticles for TNF- α siRNA oral delivery for treating ulcerative colitis. *Nano Research*, 11(5), 2872-2884.
- Iwamoto, M., Kurachi, M., Nakashima, T., Kim, D., Yamaguchi, K., Oda, T., and Muramatsu, T. (2005). Structure–activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW264.7 cells. *FEBS Letters*, 579(20), 4423-4429.
- Jain, S. K., Jain, A., Gupta, Y., Khare, P., and Kannadasan, M. (2008). Targeted delivery of 5-ASA to colon using chitosan hydrogel microspheres. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 18(5), 315-321.
- Jang, D. I., Lee, A. H., Shin, H. Y., Song, H. R., Park, J. H., Kang, T. B., and Yang, S. H. (2021). The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2719.

- Jia, B., Jia, L., and Zhu, J. (2022). Effect of PH on the conformational transition of silk fibroin in aqueous solution monitored by thioflavin-t fluorescence. *Journal of Fluorescence*, 32(1), 389-395.
- Jin H. J., Kaplan D. L. (2003). Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature* 424(6952), 1057-1061.
- Johnson, P., Ruffell, B. (2009) CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases. *Journal of Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 8, 208–220.
- Jose, R. R., Brown, J. E., Polido, K. E., Omenetto, F. G., and Kaplan, D. L. (2015). Polyol-silk bioink formulations as two-part room-temperature curable materials for 3D printing. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 1(9), 780-788.
- Joshi, A., Soni, A., and Acharya, S. (2022). In vitro models and ex vivo systems used in inflammatory bowel disease. *In vitro models*, 1(3), 213-227.
- Ju, H. K., Kim, S. Y., Kim, S. J., and Lee, Y. M. (2002). pH/temperature-responsive semi-IPN hydrogels composed of alginate and poly (N-isopropylacrylamide). *Journal of Applied Polymer Science*, 83(5), 1128-1139.
- Kanani, A. G., and Bahrami, S. H. (2010). Review on electrospun nanofibers scaffold and biomedical applications. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 24(2), 93-115.
- Kang, G. D., Lee, K. H., Ki, C. S., and Park, Y. H. (2004). Crosslinking reaction of phenolic side chains in silk fibroin by tyrosinase. *Fibers and Polymers*, 5(3), 234.
- Karadağ, E., Saraydın, D., and Güven, O. (2001). Radiation induced superabsorbent hydrogels. Acrylamide/itaconic acid copolymers. *Macromolecular Materials and Engineering*, 286(1), 34-42.
- Karagozian, R., and Burakoff, R. (2007). The role of mesalamine in the treatment of ulcerative colitis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 3(5), 893.
- Karnik, S., Jammalamadaka, U. M., Tappa, K. K., Giorno, R., and Mills, D. K. (2016). Performance evaluation of nanoclay enriched anti-microbial hydrogels for biomedical applications. *Heliyon*, 2(2), e00072.
- Kesavan, K., Nath, G., and Pandit, J. K. (2010). Sodium alginate based mucoadhesive system for gatifloxacin and its in vitro antibacterial activity. *Scientia Pharmaceutica*, 78(4), 941-958.
- Khor, H. L., Ng, K. W., Htay, A. S., Schantz, J. T., Teoh, S. H., and Hutmacher, D. W. (2003). Preliminary study of a polycaprolactone membrane utilized as epidermal substrate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 14, 113-120.
- Kiatkamjornwong, S. (2007). Superabsorbent polymers and superabsorbent polymer composites. *ScienceAsia*, 33(1), 39-43.

- Kim S.H., Jeong J.H., Lee S.H., Kim S.W., and Park T.G. (2006). PEG conjugated VEGF siRNA for anti-angiogenic gene therapy. *Journal of Controlled Release*, 1-7, 123-126.
- Kim, D. W., Hwang, H. S., Kim, D. S., Sheen, S. H., Heo, D. H., Hwang, G., and Lee, K. G. (2011). Effect of silk fibroin peptide derived from silkworm *Bombyx mori* on the anti-inflammatory effect of Tat-SOD in a mice edema model. *Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 44(12), 787-792.
- Kim, H. H., Song, D. W., Kim, M. J., Ryu, S. J., Um, I. C., Ki, C. S., and Park, Y. H. (2016). Effect of silk fibroin molecular weight on physical property of silk hydrogel. *Polymer*, 90, 26-33.
- Kim, J. M., Kim, D. H., Park, H. J., Ma, H. W., Park, I. S., Son, M., and Cheon, J. H. (2020). Nanocomposites-based targeted oral drug delivery systems with infliximab in a murine colitis model. *Journal of Nanobiotechnology*, 18, 1-13.
- Kimura, T., Yamada, H., Tsubouchi, K., and Doi, K. (2007). Accelerating effects of silk fibroin on wound healing in hairless descendants of Mexican hairless dogs. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(11), 1306-1314.
- Kodner I. J., Fry R. D., Fleshman J. W., Birnbaum E. H. (1993). Colon, rectum, and anus. Schwartz S.I. (Ed.), *Principles of Surgery*, 6th Edition. New York: McGraw-Hill Co., 1191-1306.
- Kojima, M., Ando, S., Kataoka, K., Hirota, T., Aoyagi, K., and Nakagami, H. (1998). Magnetic resonance imaging (MRI) study of swelling and water mobility in micronized low-substituted hydroxypropylcellulose matrix tablets. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 46(2), 324-328.
- Kojthung, A., Meesilpa, P., Sudatis, B., Treeratanapiboon, L., Udomsangpet, R., and Oonkhanond, B. (2008). Effects of gamma radiation on biodegradation of *Bombyx mori* silk fibroin. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(4), 487-490.
- Kopp, A., Smeets, R., Gosau, M., Friedrich, R. E., Fuest, S., Behbahani, M., and Henningsen, A. (2019). Production and characterization of porous fibroin scaffolds for regenerative medical application. *In vivo*, 33(3), 757-762.
- Koseoglu, Z., Satar, S., Kara, B., Sebe, A., and Kosenli, O. (2011). An unusual case of mesalazine intoxication: Oral and rectal overloading of the rectal suppository form. *Human & Experimental Toxicology*, 30(7), 772-776.
- Kovacs, M., Muller, K. E. (2012). Diagnostic yield of upper endoscopy in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 6(1), 86-94.
- Kriegel, C., and Amiji, M. (2011). Oral TNF- α gene silencing using a polymeric microsphere-based delivery system for the treatment of inflammatory bowel disease. *Journal of Controlled Release*, 150(1), 77-86.

- Kriegel, C., and Amiji, M. M. (2011). Dual TNF- α /Cyclin D1 gene silencing with an oral polymeric microparticle system as a novel strategy for the treatment of inflammatory bowel disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 2(3), e2.
- Król, Ż., Marycz, K., Kulig, D., Marędziak, M., and Jarmoluk, A. (2017). Cytotoxicity, bactericidal, and antioxidant activity of sodium alginate hydrosols treated with direct electric current. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 678.
- Kumar, S., and Koh, J. (2012). Physiochemical, optical and biological activity of chitosan-chromone derivative for biomedical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(5), 6102-6116.
- Kundu, B., Kurland, N. E., Bano, S., Patra, C., Engel, F. B., Yadavalli, V. K., and Kundu, S. C. (2014). Silk proteins for biomedical applications: Bioengineering perspectives. *Progress in Polymer Science*, 39(2), 251-267.
- Kutty, P. K., Raman, K. R. K., Hawken, K., and Barrowman, J. A. (1982). Hair loss and 5-aminosalicylic acid enemas. *Annals of Internal Medicine*, 97(5), 785-786.
- Kwon J. H., Peppercorn M. A., Farrell R. J. (2002). Diagnostic features of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology & Endoscopy News*, 53, 28-29.
- Laffleur, F. (2018). Comparative mucoadhesive study of hyaluronic acid-based conjugates on different mucosae. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(14), 46071.
- Larouche, J., Morais, J., Picard, M., Lambert, C., Spenard, J., Landriault, H., and Poitras, P. (1995). Release of 5-ASA from Pentasa in patients with Crohn's disease of the small intestine. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 9(3), 315-320.
- Laroui, H., Geem, D., Xiao, B., Viennois, E., Rakhya, P., Denning, T., and Merlin, D. (2014a). Targeting intestinal inflammation with CD98 siRNA/PEI-loaded nanoparticles. *Molecular Therapy*, 22(1), 69-80.
- Laroui, H., Theiss, A. L., Yan, Y., Dalmaso, G., Nguyen, H. T., Sitaraman, S. V., and Merlin, D. (2011). Functional TNF α gene silencing mediated by polyethyleneimine/TNF α siRNA nanocomplexes in inflamed colon. *Biomaterials*, 32(4), 1218-1228.
- Laroui, H., Viennois, E., Xiao, B., Canup, B. S., Geem, D., Denning, T. L., and Merlin, D. (2014b). Fab'-bearing siRNA TNF α -loaded nanoparticles targeted to colonic macrophages offer an effective therapy for experimental colitis. *Journal of Controlled Release*, 186, 41-53.
- Lee, J., Unnithan, A. R., Park, C. H., and Kim, C. S. (2019). 3D bioprinting for active drug delivery. *Biomimetic Nanoengineered Materials for Advanced Drug Delivery*, 61-72.

- Lee, K. H., Ki, C. S., Baek, D. H., Kang, G. D., Ihm, D. W., and Park, Y. H. (2005). Application of electrospun silk fibroin nanofibers as an immobilization support of enzyme. *Fibers and Polymers*, 6, 181-185.
- Lee, K. Y., and Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106-126.
- Lee, S. J., Seok, J. M., Lee, J. H., Lee, J., Kim, W. D., and Park, S. A. (2021). Three-dimensional printable hydrogel using a hyaluronic acid/sodium alginate bio-ink. *Polymers*, 13(5), 794.
- Lepowsky, E., and Tasoglu, S. (2018). 3D printing for drug manufacturing: A perspective on the future of pharmaceuticals. *International Journal of Bioprinting*, 4(1).
- Leung R.K.M., Whittaker P.A. (2005). RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 107(2), 222-239.
- Levin, B., Rajkhowa, R., Redmond, S. L., and Atlas, M. D. (2009). Grafts in myringoplasty: utilizing a silk fibroin scaffold as a novel device. *Expert Review of Medical Devices*, 6(6), 653-664.
- Levine, D. S., and Haggitt, R. C. (1989). Normal histology of the colon. *The American Journal of Surgical Pathology*, 13(11), 966-984.
- Li, C., Vepari, C., Jin, H. J., Kim, H. J., and Kaplan, D. L. (2006). Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(16), 3115-3124.
- Li, G., Zhou, P., Shao, Z., Xie, X., Chen, X., Wang, H., and Yu, T. (2001). The natural silk spinning process: A nucleation-dependent aggregation mechanism?. *European Journal of Biochemistry*, 268(24), 6600-6606.
- Li, L., Puhl, S., Meinel, L., and Gernershaus, O. (2014). Silk fibroin layer-by-layer microcapsules for localized gene delivery. *Biomaterials*, 35(27), 7929-7939.
- Li, R., Cheng, L., Wang, Q., and Zhou, L. (2021). Comparative transcriptomic analysis reveals the immunosuppressive targets of mesalazine in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis. *Frontiers in Genetics*, 12, 698983.
- Lim A. G., and Hine K. R. (1994). Fever, vasculitic rash, arthritis, pericarditis, and pericardial effusion after mesalazine. *British Medical Journal*, 308(6921), 113.
- Lim, S. H., Kathuria, H., Tan, J. J. Y., and Kang, L. (2018). 3D printed drug delivery and testing systems—a passing fad or the future?. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 132, 139-168.
- Liu X., Howard K.A., Dong M, Andersen M.Ø., Rahbek U.L., Johnsen M.G., Hansen O.C., Besenbacher F., and Kjems J. (2007). The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials*, 28(6): 1280-1288.

- Liu, J., Sun, L., Xu, W., Wang, Q., Yu, S., and Sun, J. (2019). Current advances and future perspectives of 3D printing natural-derived biopolymers. *Carbohydrate polymers*, 207, 297-316.
- Liu, P., De Wulf, O., Laru, J., Heikkilä, T., van Veen, B., Kiesvaara, J., Hirvonen, J., Peltonen, L., and Laaksonen, T. (2013). Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions. *AAPS PharmSciTech*, 14(2), 748-756.
- Lovett, M. L., Wang, X., Yucel, T., York, L., Keirstead, M., Haggerty, L., and Kaplan, D. L. (2015). Silk hydrogels for sustained ocular delivery of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) therapeutics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 95, 271-278.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Lozano-Pérez, A. A., Rodriguez-Nogales, A., Ortiz-Cullera, V., Algieri, F., Garrido-Mesa, J., Zorrilla, P., and de la Fuente, J. M. (2014). Silk fibroin nanoparticles constitute a vector for controlled release of resveratrol in an experimental model of inflammatory bowel disease in rats. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 4507-4520.
- Lu, E., Li, S., and Wang, Z. (2017). Biorelevant test for supersaturable formulation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(1), 9-20.
- Lu, S., Wang, X., Lu, Q., Zhang, X., Kluge, J. A., Uppal, N., and Kaplan, D. L. (2009). Insoluble and flexible silk films containing glycerol. *Biomacromolecules*, 11(1), 143-150.
- Lu, T. S., Yiao, S. Y., Lim, K., Jensen, R. V., and Hsiao, L. L. (2010). Interpretation of biological and mechanical variations between the Lowry versus Bradford method for protein quantification. *North American Journal of Medical Sciences*, 2(7), 325.
- Lv, Q., Hu, K., Feng, Q., Cui, F., and Cao, C. (2007). Preparation and characterization of PLA/fibroin composite and culture of HepG2 (human hepatocellular liver carcinoma cell line) cells. *Composites Science and Technology*, 67(14), 3023-3030.
- Macfarlane, G. T., and Macfarlane, S. (1997). Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32(sup222), 3-9.
- Maghdouri-White, Y., Bowlin, G. L., Lemmon, C. A., and Dréau, D. (2016). Bioengineered silk scaffolds in 3D tissue modeling with focus on mammary tissues. *Materials Science and Engineering: C*, 59, 1168-1180.
- Maitra, J., and Shukla, V. K. (2014). Cross-linking in hydrogels-a review. *American Journal of Polymer Science*, 4(2), 25-31.

- Makhlof, A., Tozuka, Y. and Takeuchi, H. (2009). pH-Sensitive nanospheres for colon-specific drug delivery in experimentally induced colitis rat model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(1), 1–8.
- Manju, S., and Sreenivasan, K. (2011). Conjugation of curcumin onto hyaluronic acid enhances its aqueous solubility and stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 359(1), 318-325.
- Mao, S., Sun, W., and Kissel, T. (2010). Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Advanced drug delivery reviews*, 62(1), 12-27.
- Masoodi, K. Z., Lone, S. M., and Rasool, R. S. (2021). A Practical Lab Manual. *Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology*. 1st Edition. New York: Academic Press, 86-93.
- McCarthy, J., O'Neill, M. J., Bourre, L., Walsh, D., Quinlan, A., Hurley, G., and O'Driscoll, C. M. (2013). Gene silencing of TNF-alpha in a murine model of acute colitis using a modified cyclodextrin delivery system. *Journal of Controlled Release*, 168(1), 28-34.
- McGill, M., Coburn, J. M., Partlow, B. P., Mu, X., and Kaplan, D. L. (2017). Molecular and macro-scale analysis of enzyme-crosslinked silk hydrogels for rational biomaterial design. *Acta Biomaterialia*, 63, 76-84.
- Melchels, F., Malda, J., Fedorovich, N., Alblas, J., and Woodfield, T. (2011). Organ printing. In *Comprehensive Biomaterials*. New York: Elsevier Science, 587-606.
- Melgar, S., and Shanahan, F. (2010). Inflammatory bowel disease—from mechanisms to treatment strategies. *Autoimmunity*, 43(7), 463-477.
- Min, B. M., Lee, G., Kim, S. H., Nam, Y. S., Lee, T. S., and Park, W. H. (2004). Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 25(7-8), 1289-1297.
- Ming, J., Li, M., Han, Y., Chen, Y., Li, H., Zuo, B., and Pan, F. (2016). Novel two-step method to form silk fibroin fibrous hydrogel. *Materials Science and Engineering: C*, 59, 185-192.
- Mirshafiey, A., Khodadadi, A., Rehm, B. H., Khorramizadeh, M. R., Eslami, M. B., Razavi, A., and Saadat, F. (2005). Sodium alginate as a novel therapeutic option in experimental colitis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 61(4), 316-321.
- Moharana, A. K., Banerjee, M., Panda, S., and Muduli, J. N. (2011). Development and validation of UV spectrophotometric method for the determination of mesalamine in bulk and tablet formulation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(2), 19-21.
- Moin, A., Wani, S. U. D., Osmani, R. A., Abu Lila, A. S., Khafagy, E. S., Arab, H. H., and Allam, A. N. (2021). Formulation, characterization, and cellular toxicity

- assessment of tamoxifen-loaded silk fibroin nanoparticles in breast cancer. *Drug Delivery*, 28(1), 1626-1636.
- Moody G. A., Eaden J. A., Helyes Z., Mayberry J. F. (1997). Oral or rectal administration of drugs in IBD? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 11(5), 999-1000.
- Mori, H., and Tsukada, M. (2000). New silk protein: modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 74(2), 95-103.
- Moyer, M. S. (2008). 5-aminosalicylate therapy. In *Pediatric Inflammatory Bowel Disease*. New York: Academic, 317-328.
- Mudter, J., and Neurath, M. F. (2007). Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflammatory Bowel Diseases*, 13(8), 1016-1023.
- Mulder, C. J., Tytgat, G. N., Weterman, I. T., Dekker, W., Blok, P., Schrijver, M., and Heide, H. V. (1988). Double-blind comparison of slow-release 5-aminosalicylate and sulfasalazine in remission maintenance in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 95(6), 1449-1453.
- Murch S. H., MacDonald T. T., Walker-Smith J. A., Levin M., Lionetti P., Klein N. J. (1993). Disruption of sulphated glycosaminoglycans in intestinal inflammation. *Lancet*, 341, 711-714.
- Murphy, S. V., and Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 32(8), 773-785.
- Mutlu-Ağardan, N. B., Sarisözen, C., and Torchilin, V. P. (2018). Redox-triggered intracellular siRNA delivery. *Chemical Communications*, 54(49), 6368-6371.
- Mutlu-Ağardan, N. B., Sarisözen, C., and Torchilin, V. P. (2020). Cytotoxicity of novel redox sensitive PEG 2000-SS-PTX micelles against drug-resistant ovarian and breast cancer cells. *Pharmaceutical Research*, 37, 1-8.
- Naghieh, S., and Chen, X. (2021). Printability—A key issue in extrusion-based bioprinting. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 11(5), 564-579.
- Nakamura, M., Iwanaga, S., Henmi, C., Arai, K., and Nishiyama, Y. (2010). Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication. *Biofabrication*, 2(1), 014110.
- Nazeer, M. A., Yilgor, E., and Yilgor, I. (2019). Electrospun polycaprolactone/silk fibroin nanofibrous bioactive scaffolds for tissue engineering applications. *Polymer*, 168, 86-94.
- Neuhaus, B., Frede, A., Westendorf, A. M., and Eppe, M. (2015). Gene silencing of the pro-inflammatory cytokine TNF- α with siRNA delivered by calcium phosphate nanoparticles, quantified by different methods. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(36), 7186-7193.

- Newton, A. M. J., Prabakaran, L., and Jayaveera, K. N. (2012). Formulation development, optimization and study on drug release kinetics of Eudragit® L100-HPMC E15 LV mixed film-coated colon-targeted Mesalamine tablets. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP)*, 6(3).
- Nguyễn, T. T., Ratanavaraporn, J., and Yodmuang, S., (2019, November). Alginate-silk fibroin Bioink: A printable hydrogel for tissue engineering, Paper presented at the 12th Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON), Ubon Ratchathani, Thailand,.
- Ni, Y., Zhao, X., Zhou, L., Shao, Z., Yan, W., Chen, X., and Jiang, J. J. (2008). Radiologic and histologic characterization of silk fibroin as scaffold coating for rabbit tracheal defect repair. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, 139(2), 256-261.
- Nikam, V. S., Punde, D. S., and Bhandari, R. S. (2020). Silk fibroin nanofibers enhance cell adhesion of blood-derived fibroblast-like cells: A potential application for wound healing. *Indian Journal of Pharmacology*, 52(4), 306-312.
- Nikolaus, S., and Schreiber, S. (2007). Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 133(5), 1670-1689.
- Nogueira, G. M., de Moraes, M. A., Rodas, A. C. D., Higa, O. Z., and Beppu, M. M. (2011). Hydrogels from silk fibroin metastable solution: Formation and characterization from a biomaterial perspective. *Materials Science and Engineering: C*, 31(5), 997-1001.
- Norman, J., Madurawe, R. D., Moore, C. M., Khan, M. A., and Khairuzzaman, A. (2017). A new chapter in pharmaceutical manufacturing: 3D-printed drug products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 108, 39-50.
- O'Connell, C. (2020). Characterizing Bioinks for Extrusion Bioprinting: Printability and Rheology. In: Crook, J.M. (eds) 3D Bioprinting. Methods in Molecular Biology, vol 2140. Humana, New York, NY, 111-133.
- O'Connor, D. M. and Boulis, N. M. (2016). Erratum to 'Gene therapy for neurodegenerative diseases' [Trends in Molecular Medicine 21 (2015) 504-512]. *Trends in Molecular Medicine*, 22(3), 266.
- Ogata, T., Nagayoshi, K., Nagasako, T., Kurihara, S., and Nonaka, T. (2006). Synthesis of hydrogel beads having phosphinic acid groups and its adsorption ability for lanthanide ions. *Reactive and Functional Polymers*, 66(6), 625-633.
- Oh, Y. K., and Park, T. G. (2009). siRNA delivery systems for cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(10), 850-862.
- Onur, T. S., Sitron, C. S., and Dang, A. (2013). Co-administration of hyaluronic acid with local anaesthetics shows lower cytotoxicity than local anaesthetic treatment alone in bovine articular chondrocytes. *Bone & Joint Research*, 2(12), 270-275.

- Paarakh, M. P., Jose, P. A., Setty, C. M., and Peter Christopher, G. V. (2019). Release kinetics – concepts and applications. *International Journal of Pharmacy Research & Technology*, 8(1), 12–20.
- Palma, E., Costa, N., Molinaro, R., Francardi, M., Paolino, D., Cosco, D., and Fresta, M. (2019). Improvement of the therapeutic treatment of inflammatory bowel diseases following rectal administration of mesalazine-loaded chitosan microparticles vs Asamax®. *Carbohydrate Polymers*, 212, 430-438.
- Palsmeier, R. K., Radzik, D. M., and Lunte, C. E. (1992). Investigation of the degradation mechanism of 5-aminosalicylic acid in aqueous solution. *Pharmaceutical Research*, 9, 933-938.
- Pan, N. C., Pereira, H. C. B., da Silva, M. D. L. C., Vasconcelos, A. F. D., and Celligoi, M. A. P. C. (2017). Improvement production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* in sugarcane molasses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182, 276-293.
- Park, C. H., Jeong, L., Cho, D., Kwon, O. H., and Park, W. H. (2013). Effect of methylcellulose on the formation and drug release behavior of silk fibroin hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 1179-1185.
- Park, H., Park, K., and Shalaby, W. S. (1993). *Biodegradable hydrogels for drug delivery*. New York: CRC Press, 93-103.
- Patel, H., Panchal D. R., Patel U, Brahmabhatt, T., Suthar, M. (2011). Matrix type drug delivery system: A Review. *Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research*, 1(3), 143-151.
- Patel, K. M., Patel, C. N., Panigrahi, B., Parikh, A. S., and Patel, H. N. (2010). Development and validation of spectrophotometric methods for the estimation of mesalamine in tablet dosage forms. *Journal of Young Pharmacists*, 2(3), 284-288.
- Patil, P. B., Hajare, A. A., and Awale, R. P. (2011). Development and Evaluation of Mesalamine Tablet Formulation for Colon Delivery. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 4(11), 1751-1756.
- Pavel, C. I., Mărghițaș, L. A., Bonta, V., Mihai, C. M., and Tomoș, L. I. (2013). Determination of total protein content in royal jelly: A comparison of the Kjeldahl, The Bradford and the Lowry methods. *Lucrări Științifice-Seria Zootehnie*, 59, 209-212.
- Pellens, L., Gamez Corrales, R., and Mewis, J. (2004). General nonlinear rheological behavior of associative polymers. *Journal of Rheology*, 48(2), 379-393.
- Peng, W., Datta, P., Ayan, B., Ozbolat, V., Sosnoski, D., and Ozbolat, I. T. (2017). 3D bioprinting for drug discovery and development in pharmaceuticals. *Acta Biomaterialia*, 57, 26-46.

- Peppas, N. A. (1991). Physiologically responsive hydrogels. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 6(3), 241-246.
- Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W. S., and Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 27-46.
- Pereira, F. M., Marques, C., Boncoraglio, T., Esteves, J., Silva, M., Braga, J., and Ribeiro, M. (2021). Mesalazine-induced hypersensitivity pneumonitis. *European Journal of Case Reports in Internal Medicine*, 8(1), 45-63.
- Petrova, N. S., Zenkova, M. A., and Chernolovskaya, E. L. (2013). Structure-functions relations in small interfering RNAs. *Practical Applications in Biomedical Engineering*. Croatia.
- Peyrin-Biroulet, L., Sandborn, W. J., Panaccione, R., Domènech, E., Pouillon, L., Siegmund, B., and Ghosh, S. (2021). Tumour necrosis factor inhibitors in inflammatory bowel disease: the story continues. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 14.
- Phang, Y. N., Chee, S. Y., Lee, C. O., and Teh, Y. L. (2011). Thermal and microbial degradation of alginate-based superabsorbent polymer. *Polymer degradation and stability*, 96(9), 1653-1661.
- Pi, Y., Zhang, X., Wu, Y., Wang, Z., Bai, Y., Liu, X., and Wang, J. (2022). Alginate Alleviates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis by Promoting Bifidobacterium animalis and Intestinal Hyodeoxycholic Acid Synthesis in Mice. *Microbiology Spectrum*, 10(6), e02979-22.
- Pithadia, A. B., and Jain, S. (2011). Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacological Reports*, 63(3), 629-642.
- Poynard, T., Vernisse, B., and Agostini, H. (1998). Randomized, multicentre comparison of sodium alginate and cisapride in the symptomatic treatment of uncomplicated gastro-oesophageal reflux. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 12, 159-165.
- Pratt, A. J., and MacRae, I. J. (2009). The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *Journal of Biological Chemistry*, 284(27), 17897-17901.
- Praveen, R., Verma, P. R. P., Singh, S. K., and George, J. K. (2015). Cross linked alginate gel beads as floating drug delivery system for cefdinir: optimization using Box–Behnken design. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 45, 187-199.
- Press, A. G., Hauptmann, I. A., Hauptmann, L., Fuchs, B., Fuchs, M., Ewe, K., Ramadori, G. (1998). Gastrointestinal pH profiles in patients with inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 12(7), 673-678.
- Pritchard, E. M., and Kaplan, D. L. (2011). Silk fibroin biomaterials for controlled release drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(6), 797-811.

- Purohit, T. J., Hanning, S. M., and Wu, Z. (2018). Advances in rectal drug delivery systems. *Pharmaceutical Development and Technology*, 23(10), 942-952.
- Qu, X., Wirsén, A., and Albertsson, A. C. (2000). Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behavior and states of water. *Polymer*, 41(12), 4589-4598.
- Queiroz, M. F., Teodosio Melo, K. R., Sabry, D. A., Sasaki, G. L., and Rocha, H. A. O. (2014). Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation?. *Marine Drugs*, 13(1), 141-158.
- Qunyi, T., and Ganwei, Z. (2005). Rapid synthesis of a superabsorbent from a saponified starch and acrylonitrile/AMPS graft copolymers. *Carbohydrate Polymers*, 62(1), 74-79.
- Rahmani, H., Fattahi, A., Sadrjavadi, K., Khaledian, S., and Shokoohinia, Y. (2019). Preparation and characterization of silk fibroin nanoparticles as a potential drug delivery system for 5-fluorouracil. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(4), 601.
- Raia, N. R., Partlow, B. P., McGill, M., Kimmerling, E. P., Ghezzi, C. E., and Kaplan, D. L. (2017). Enzymatically crosslinked silk-hyaluronic acid hydrogels. *Biomaterials*, 131, 58-67.
- Rand, T. A., Petersen, S., Du, F. ve Wang, X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 123(4), 621-629.
- Ratnaparkhi, M.P, Gupta, J.P. (2013). Sustained release drug delivery system- An overview. *International Journal of Pharma Research & Review.*, 2(3),11-21.
- Raval, N., Jogi, H., Gondaliya, P., Kalia, K., and Tekade, R. K. (2019). Method and its Composition for encapsulation, stabilization, and delivery of siRNA in Anionic polymeric nanoplex: An In vitro-In vivo Assessment. *Scientific Reports*, 9(1), 1-18.
- Reddy, M. S. B., Ponnamm, D., Choudhary, R., & Sadasivuni, K. K. (2021). A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds. *Polymers*, 13(7), 1105.
- Reddy, P. R. S., Rao, K. M., Rao, K. K., Shchipunov, Y., and Ha, C. S. (2014). Synthesis of alginate based silver nanocomposite hydrogels for biomedical applications. *Macromolecular Research*, 22, 832-842.
- Ribaldone, D. G., Brigo, S., Mangia, M., Saracco, G. M., Astegiano, M., and Pellicano, R. (2020). Oral manifestations of inflammatory bowel disease and the role of non-invasive surrogate markers of disease activity. *Medicines*, 7(6), 33.
- Ribeiro, M., de Moraes, M. A., Beppu, M. M., Monteiro, F. J., and Ferraz, M. P. (2014). The role of dialysis and freezing on structural conformation, thermal properties and morphology of silk fibroin hydrogels. *Biomatter*, 4(1), e28536.

- Riley, S. A., Mani, V., Goodman, M. J., Herd, M. E., Dutt, S., and Turnberg, L. A. (1988). Comparison of delayed release 5 aminosalicylic acid (mesalazine) and sulphasalazine in the treatment of mild to moderate ulcerative colitis relapse. *Gut*, 29(5), 669-674.
- Rockwood, D. N., Preda, R. C., Yücel, T., Wang, X., Lovett, M. L., and Kaplan, D. L. (2011). Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nature Protocols*, 6(10), 1612-1631.
- Rodriguez, M. J., Brown, J., Giordano, J., Lin, S. J., Omenetto, F. G., and Kaplan, D. L. (2017). Silk based bioinks for soft tissue reconstruction using 3-dimensional (3D) printing with in vitro and in vivo assessments. *Biomaterials*, 117, 105-115.
- Rodriguez-Nogales, A., Algieri, F., Laura de Matteis, A., Perez, J. G. M., Vezza, T., de la Fuente, J. M., and Rodriguez-Cabezas, M. E. (2016b). Intestinal anti-inflammatory effects of RGD-functionalized silk fibroin nanoparticles in trinitrobenzenesulfonic acid-induced experimental colitis in rats. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 5945.
- Rodriguez-Nogales, A., Lozano-Pérez, A. A., Aznar-Cervantes, S. D., Algieri, F., Garrido-Mesa, J., Garrido-Mesa, N., and Gálvez, J. (2016a). Effect of aqueous and particulate silk fibroin in a rat model of experimental colitis. *International Journal of Pharmaceutics*, 511(1), 1-9.
- Roh, D. H., Kang, S. Y., Kim, J. Y., Kwon, Y. B., Young Kweon, H., Lee, K. G., and Lee, J. H. (2006). Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17, 547-552.
- Rokutan, K., Kawahara, T., Kuwano, Y., Tominaga, K., Nishida, K., Teshima-Kondo, S. (2008). Nox enzymes and oxidative stress in the immunopathology of the gastrointestinal tract. *Seminars in Immunopathology*, 30(3), 315-327.
- Rujiravanit, R., Kruaykitanon, S., Jamieson, A. M., and Tokura, S. (2003). Preparation of crosslinked chitosan/silk fibroin blend films for drug delivery system. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), 604-611.
- Russo, I., Carrizzo, A., Bochicchio, S., Piazza, O., Lamberti, G., Barba, A. A., and Santonicola, A. (2017). siRNA Delivery for Control of Cyclin D1 and E2F1 Expression in Crohn's Disease. *Translational Medicine@ UniSa*, 17, 22-30.
- Saber-Samandari, S., Yilmaz, O., and Yilmaz, E. (2012). Photoinduced graft copolymerization onto chitosan under heterogeneous conditions. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 49(7), 591-598.
- Sah, M. K., and Pramanik, K. (2010). Regenerated silk fibroin from *B. mori* silkcocoon for tissue engineering applications. *International Journal of Environmental Science and Development*, 1(5), 404.

- Sah, M. K., and Pramanik, K. (2011). Preparation, characterization and in vitro study of biocompatible fibroin hydrogel. *African Journal of Biotechnology*, 10(40), 7878-7892.
- Samal, S. K., Dash, M., Chiellini, F., Kaplan, D. L., and Chiellini, E. (2013). Silk microgels formed by proteolytic enzyme activity. *Acta Biomaterialia*, 9(9), 8192-8199.
- Sanchez-Muñoz, F., Dominguez-Lopez, A., and Yamamoto-Furusho, J. K. (2008). Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 14(27), 4280-4288.
- Sandborn, W. J., Bosworth, B., Zakko, S., Gordon, G. L., Clemmons, D. R., Golden, P. L., Rollieri, R. L., Yu, J., Barrett A. C., Bortey, E., Patterson, C., and Forbes, W. P. (2015). Budesonide foam induces remission in patients with mild to moderate ulcerative proctitis and ulcerative proctosigmoiditis. *Gastroenterology*. 148(4),740–750. e2.
- Sandler, N., Määttänen, A., Ihalainen, P., Kronberg, L., Meierjohann, A., Viitala, T., and Peltonen, J. (2011). Inkjet printing of drug substances and use of porous substrates-towards individualized dosing. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(8), 3386-3395.
- Sands, B. E., and Kaplan, G. G. (2007). The role of TNF α in ulcerative colitis. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 47(8), 930-941.
- Sastry, S. V., Nyshadham, J. R., and Fix, J. A. (2000). Recent technological advances in oral drug delivery—a review. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 3(4), 138-145.
- Saunders, R. E., Gough, J. E., and Derby, B. (2008). Delivery of human fibroblast cells by piezoelectric drop-on-demand inkjet printing. *Biomaterials*, 29(2), 193-203.
- Saydam, M., and Takka, S. (2020). Improving the dissolution of a water-insoluble orphan drug through a fused deposition modelling 3-Dimensional printing technology approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 152, 105426.
- Sayed Aly, M. N. (2008). Intra-articular drug delivery: a fast growing approach. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 2(3), 231-237.
- Scharl, M. (2015). Pathophysiological role of TNF in inflammatory bowel disease: TNF and its effect on innate immune defense. *Anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease*, 34, 49-55.
- Schroeder, K. W., Tremaine, W. J., and Ilstrup, D. M. (1987). Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. *New England Journal of Medicine*, 317(26), 1625-1629.

- Seifirad, S., Karami, H., Shahsavari, S., Mirabasi, F., and Dorkoosh, F. (2016). Design and characterization of mesalamine loaded nanoparticles for controlled delivery system. *Nanomedicine Research Journal*, 1(2), 97-106.
- Seoane-Viaño, I., Gómez-Lado, N., Lázare-Iglesias, H., García-Otero, X., Antúnez-López, J. R., Ruibal, Á., and Fernández-Ferreiro, A. (2020). 3D printed tacrolimus rectal formulations ameliorate colitis in an experimental animal model of inflammatory bowel disease. *Biomedicines*, 8(12), 563.
- Serrano-Sevilla, I., Artiga, Á., Mitchell, S. G., De Matteis, L., and de la Fuente, J. M. (2019). Natural polysaccharides for siRNA delivery: Nanocarriers based on chitosan, hyaluronic acid, and their derivatives. *Molecules*, 24(14), 2570.
- Shaheen, N. J., Hansen, R. A., Morgan, D. R., Gangarosa, L. M., Ringel, Y., Thiny, M. T., and Sandler, R. S. (2006). The burden of gastrointestinal and liver diseases. *American Journal of Gastroenterology*, 101(9), 2128-2138.
- Shahini, A., and Shahini, A. (2023). Role of interleukin-6-mediated inflammation in the pathogenesis of inflammatory bowel disease: Focus on the available therapeutic approaches and gut microbiome. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 17(1), 55-74.
- Sharma, N., Sharma, A., Bhatnagar, A., Nishad, D., Karwasra, R., Khanna, K., and Jain, G. K. (2019). Novel gum acacia based macroparticles for colon delivery of Mesalazine: Development and gammascintigraphy study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 54, 101224.
- Sheikh, F. A., Ju, H. W., Lee, J. M., Moon, B. M., Park, H. J., Lee, O. J., and Park, C. H. (2015). 3D electrospun silk fibroin nanofibers for fabrication of artificial skin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(3), 681-691.
- Shen, Y., Qian, Y., Zhang, H., Zuo, B., Lu, Z., Fan, Z., and Zhou, C. (2010). Guidance of olfactory ensheathing cell growth and migration on electrospun silk fibroin scaffolds. *Cell Transplantation*, 19(2), 147-158.
- Shi, W., Sun, M., Hu, X., Ren, B., Cheng, J., Li, C., and Ao, Y. (2017). Structurally and functionally optimized silk-fibroin–gelatin scaffold using 3D printing to repair cartilage injury in vitro and in vivo. *Advanced Materials*, 29(29), 1701089.
- Siegel, C. A. (2011). explaining risks of inflammatory bowel disease therapy to patients. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 33(1), 23-32.
- Silva, S. S., Maniglio, D., Motta, A., Mano, J. F., Reis, R. L., and Migliaresi, C. (2008). Genipin-Modified Silk-Fibroin Nanometric Nets. *Macromolecular Bioscience*, 8(8), 766-774.
- Singleton, J. W., Hanauer, S. B., Gitnick, G. L., and Krawitt, E. L. (1993). Mesalamine capsules for the treatment of active Crohn's disease: results of a 16-week trial. *Gastroenterology*, 104, 1293–1301.

- Sinha, V. R., and Kumria, R. (2001). Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 224(1-2), 19-38.
- Sinna, J., Numpaisal, P. O., Ruksakulpiwat, C., and Ruksakulpiwat, Y. (2021). Extraction of silk fibroin and glycidyl methacrylate grafting on silk fibroin optimization of SF-g-GMA for meniscus tissue engineering. *Materials Today: Proceedings*, 47, 3476-3479.
- Siridamrong, P., Phrotjanatharee, P., and Thamronganaskul, N. (2016). Chemical crosslinking of silk fibroin, chitosan and gelatin blend nanofiber mats. *Key Engineering Materials*, 695, 273-277.
- Skardal, A., Devarasetty, M., Kang, H. W., Mead, I., Bishop, C., Shupe, T., and Atala, A. (2015). A hydrogel bioink toolkit for mimicking native tissue biochemical and mechanical properties in bioprinted tissue constructs. *Acta Biomaterialia*, 25, 24-34.
- Sobajo, C., Behzad, F., Yuan, X. F., and Bayat, A. (2008). Silk: a potential medium for tissue engineering. *Eplasty*, 8.
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., et al. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 432(7014), 173-178.
- Stalder, A. F., Melchior, T., Müller, M., Sage, D., Blu, T. and Unser, M. (2010). Low-bond axisymmetric drop shape analysis for surface tension and contact angle measurements of sessile drops. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 364(1-3), 72-81.
- Stenson, W.F. (2004). Inflammatory bowel disease. Goldman, L., Ausiello, D. (Eds.) *Cecil Textbook of Medicine*, 22nd Edition, New York:Academic, 861-868.
- Sun, W., Gregory, D. A., Tomeh, M. A., and Zhao, X. (2021). Silk fibroin as a functional biomaterial for tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1499.
- Sundarakrishnan, A., Acero, E. H., Coburn, J., Chwalek, K., Partlow, B., and Kaplan, D. L. (2016). Phenol red-silk tyrosine cross-linked hydrogels. *Acta Biomaterialia*, 42, 102-113.
- Suttenun, N., and Punyamonwongsa, P. (2015). A new crosslinker for the preparation of silk fibroin hydrogels. *Macromolecular Symposia*, 354(1), 273-279.
- Sviri, S., Gafanovich, I., Kramer, M. R., Tsvang, E., Ben-Chetrit, E. (1997). Mesalamine induced hypersensitivity pneumonitis. A case report and review of the literature. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 24(1), 34-36.
- Swastha, D., Varsha, N., Aravind, S., Samyuktha, K. B., Yokes, M. M., Balde, A., and Nazeer, R. A. (2023). Alginate-based drug carrier systems to target inflammatory bowel disease: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 244, 125472.

- Szweykowska-Kulinska, Z., Jarmolowski, A. ve Figlerowicz, M. (2003). RNA interference and its role in the regulation of eucaryotic gene expression. *Acta Biochimica Polonica*, 50(1), 217-229.
- Şalva, E. (2009). *siRNA için uygun taşıyıcı sistem geliştirilmesi: in vitro ve in vivo çalışmalar*, Doktora Tezi. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 85-93.
- Taha, M. O., Aiedeh, K. M., Al-Hiari, Y., and Al-Khatib, H. (2005). Synthesis of zinc-crosslinked thiolated alginic acid beads and their in vitro evaluation as potential enteric delivery system with folic acid as model drug. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(10), 736-742.
- Takedatsu, H., Mitsuyama, K., and Torimura, T. (2015). Nanomedicine and drug delivery strategies for treatment of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 21(40), 11343–11352.
- Talaat, H. A., Sorour, M. H., Aboulmour, A. G., Shaalan, H. F., Ahmed, E. M., Awad, A. M., and Ahmed, M. A. (2008). Development of a multi-component fertilizing hydrogel with relevant techno-economic indicators. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 3(5), 764-70.
- Taleuzzaman, M. (2018). Limit of Blank (LOB), Limit of Detection (LOD), and Limit of Quantification (LOQ). *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 7(5), 555722.
- Tapaswi, R. D., Verma, P. (2013). Matrix tablets: An approach towards oralextended release drug delivery. *International Journal of Pharma Research & Review*. 2(2):12-24.
- Taylor, K. D., Yang, H., and Rotter, J. I. (2001). Inflammatory bowel disease: II. Gene mapping. *Molecular Genetics and Metabolism*, 74(1-2), 22-44.
- Thanki, K., van Eetvelde, D., Geyer, A., Fraire, J., Hendrix, R., Van Eygen, H., and Foged, C. (2019). Mechanistic profiling of the release kinetics of siRNA from lipidoid-polymer hybrid nanoparticles in vitro and in vivo after pulmonary administration. *Journal of Controlled Release*, 310, 82-93.
- Thurber, A. E., Omenetto, F. G., and Kaplan, D. L. (2015). In vivo bioresponses to silk proteins. *Biomaterials*, 71, 145-157.
- Toews, P., and Bates, J. (2023). Influence of drug and polymer molecular weight on release kinetics from HEMA and HEMA hydrogels. *Scientific Reports*, 13(1), 16685.
- Tofan, T., Borodinas, S., Kačianauskas, R., and Jasevičius, R. (2022). Modeling 3D droplet movement using a drop-on-demand inkjet printhead model. *Processes*, 10(8), 1467.
- Tomita, M., Hayashi, M., Horie, T., Ishizawa, T., ve Awazu, S. (1988). Enhancement of colonic drug absorption by the transcellular permeation route. *Pharmaceutical Research*, 5, 786-789.

- Tuğcu Demiröz, and Acartürk, F. (2002). Kolona özgü ilaç taşıyıcı sistemler. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(2), 45-63.
- Tuğcu Demiröz, F. (2001). *Doğal polimerler kullanılarak kolona hedeflendirilmiş ilaç şekillerinin geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 112-126.
- Tuğcu Demiröz, F., ve Acartürk, F. (2002). Kolona özgü ilaç taşıyıcı sistemler. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(2).
- Tuğcu-Demiröz, F., Acartürk, F., and Takka, S. (2006). Investigation of colon-specific dosage forms of ondansetron prepared with natural polymers. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61(11), 916-919.
- Tuğcu-Demiröz, F., Acartürk, F., Takka, S., and Konuş-Boyunağa, Ö. (2004). In-vitro and in-vivo evaluation of mesalazine–guar gum matrix tablets for colonic drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 12(2), 105-112.
- Tuğcu-Demiröz, F., Acartürk, F., Takka, S., and Konuş-Boyunağa, Ö. (2007). Evaluation of alginate based mesalazine tablets for intestinal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67(2), 491-497.
- Tuğcu-Demiröz, F., Saar, S., Kara, A. A., Yıldız, A., Tunçel, E., and Acartürk, F. (2021). Development and characterization of chitosan nanoparticles loaded nanofiber hybrid system for vaginal controlled release of benzydamine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 161, 105801.
- Turanlı, Y. (2022). Kolona özgü nanolif ilaç taşıyıcı sistemler üzerine çalışmalar. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Udofia, E. N., and Zhou, W. (2019). A guiding framework for microextrusion additive manufacturing. *Journal of Manufacturing Science and Engineering*, 141(5), 050801.
- Vadlamidu, H.C., Prasanna Raju, Y., Rubia, Y. B., Vulava, J., and Vandana, K. R. (2014). In vitro characteristics of modified pulsincap formulation with mesalamine for ulcerative colitis treatment. *Indian Drugs*, 51(3), 35.
- Vaja, P. N., and Detroja, C. M. (2022). Formulation of mesalamine-loaded rectal mucoadhesive pellets for the treatment of inflammatory bowel disease using 32full factorial design. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 14(5), 88-94.
- Vakili, H., Kolakovic, R., Genina, N., Marmion, M., Salo, H., Ihalainen, P., and Sandler, N. (2015). Hyperspectral imaging in quality control of inkjet printed personalised dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2), 244-249.
- Valluzzi, R., Winkler, S., Wilson, D., and Kaplan, D. L. (2002). Silk: molecular organization and control of assembly. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1418), 165-167.

- Van den Mooter, G., and Kinget, R. (1995). Oral colon-specific drug delivery: A review. *Drug Delivery*, 2(2), 81-93.
- Van Tendeloo, V. F., Van Broeckhoven, C. ve Berneman, Z. N. (2001). Gene therapy: principles and applications to hematopoietic cells. *Leukemia*, 15(4), 523-544.
- Vepari, C., and Kaplan, D. L. (2007). Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science*, 32(8-9), 991-1007.
- Verstockt, B., Salas, A., Sands, B. E., Abraham, C., Leibovitzh, H., Neurath, M. F., and Vande Casteele, N. (2023). IL-12 and IL-23 pathway inhibition in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 20(7), 433-446.
- Volpi N., Schiller J., Stern R., Soltés L. (2009). Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1718-1745.
- Wallace, J. L., MacNaughton, W. K., Morris, G. P. and Beck, P. L. (1989). Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 96(1), 29-36.
- Wang, M. X., Yang, C. H., Liu, Z. Q., Zhou, J., Xu, F., Suo, Z., and Chen, Y. M. (2015). Tough photoluminescent hydrogels doped with lanthanide. *Macromolecular Rapid Communications*, 36(5), 465-471.
- Wang, Q. S., Wang, G. F., Zhou, J., Gao, L. N., and Cui, Y. L. (2016). Colon targeted oral drug delivery system based on alginate-chitosan microspheres loaded with icariin in the treatment of ulcerative colitis. *International Journal of Pharmaceutics*, 515(1-2), 176-185.
- Wang, T., Gu, Q., Zhao, J., Mei, J., Shao, M., Pan, Y., and Liu, F. (2015). Calcium alginate enhances wound healing by up-regulating the ratio of collagen types I/III in diabetic rats. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(6), 6636.
- Wang, X., Kluge, J. A., Leisk, G. G., and Kaplan, D. L. (2008). Sonication-induced gelation of silk fibroin for cell encapsulation. *Biomaterials*, 29(8), 1054-1064.
- Wang, X., Partlow, B., Liu, J., Zheng, Z., Su, B., Wang, Y., and Kaplan, D. L. (2015). Injectable silk-polyethylene glycol hydrogels. *Acta Biomaterialia*, 12, 51-61.
- Wang, Y., Blasioli, D. J., Kim, H. J., Kim, H. S., and Kaplan, D. L. (2006). Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials*, 27(25), 4434-4442.
- Watanabe, M., Nishino, H., Sameshima, Y., Ota, A., Nakamura, S., and Hibi, T. (2013). Randomised clinical trial: evaluation of the efficacy of mesalazine (mesalamine) suppositories in patients with ulcerative colitis and active rectal inflammation—a placebo-controlled study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 38(3), 264-273.

- Watts, P. J. and Illum, L. (1997). Colonic drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 23(9), 893–913.
- Weinberg, M. S., and Morris, K. V. (2016). Transcriptional gene silencing in humans. *Nucleic Acids Research*, 44(14), 6505-6517.
- Wen, H., and Park, K. (2010). Introduction and overview of oral controlled release formulation design. *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery: Theory to Practice*, 1-19.
- Whittaker, J. L., Choudhury, N. R., Dutta, N. K., and Zannettino, A. (2014). Facile and rapid ruthenium mediated photo-crosslinking of Bombyx mori silk fibroin. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(37), 6259-6270.
- Wiersma, H., Escher, J. C., Dilger, K., Trenk, D., Benninga, M. A., van Boxtel, C. J., and Taminiau, J. (2004). Pharmacokinetics of mesalazine pellets in children with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 10(5), 626-631.
- Wilson, D. S., Dalmasso, G., Wang, L., Sitaraman, S. V., Merlin, D., and Murthy, N. (2010). Orally delivered thioketal nanoparticles loaded with TNF- α -siRNA target inflammation and inhibit gene expression in the intestines. *Nature Materials*, 9(11), 923-928.
- Wirtz, S., Popp, V., Kindermann, M., Gerlach, K., Weigmann, B., Fichtner-Feigl, S., and Neurath, M. F. (2017). Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nature Protocols*, 12(7), 1295-1309.
- Wittig, B.M., Stallmach, A., Zeitz, M., Gunthert, U. (2002). Functional involvement of cd44 variant 7 in gut immune response. *Pathobiology*, 70, 184–189.
- Wójcik-Pastuszka, D., Potempa, A., and Musiał, W. (2020). Bipolymeric pectin millibeads doped with functional polymers as matrices for the controlled and targeted release of mesalazine. *Molecules*, 25(23), 5711.
- Wöltje, M., Kölbel, A., Aibibu, D., and Cherif, C. (2021). A fast and reliable process to fabricate regenerated silk fibroin solution from degummed silk in 4 hours. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10565.
- Wu, W., Zheng, Q., Guo, X., Sun, J., and Liu, Y. (2009). A programmed release multi-drug implant fabricated by three-dimensional printing technology for bone tuberculosis therapy. *Biomedical Materials*, 4(6), 065005.
- Wu, X., Hou, J., Li, M., Wang, J., Kaplan, D. L., and Lu, S. (2012). Sodium dodecyl sulfate-induced rapid gelation of silk fibroin. *Acta Biomaterialia*, 8(6), 2185-2192.
- Wu, Y., Li, S., Jin, M., Li, D., Zhou, Z., Hou, H., and Han, Y. (2021). Preparation of MSZ hydrogel and its treatment of colitis. *Frontiers in Pharmacology*, 2305.
- Xavier, R. J., and Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427.

- Xiao, B., and Merlin, D. (2012). Oral colon-specific therapeutic approaches toward treatment of inflammatory bowel disease. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(11), 1393-1407.
- Xiao, B., Laroui, H., Viennois, E., Ayyadurai, S., Charania, M. A., Zhang, Y., and Merlin, D. (2014). Nanoparticles with surface antibody against CD98 and carrying CD98 small interfering RNA reduce colitis in mice. *Gastroenterology*, 146(5), 1289-1300.
- Xiao, W., Liu, W., Sun, J., Dan, X., Wei, D., and Fan, H. (2012). Ultrasonication and genipin cross-linking to prepare novel silk fibroin–gelatin composite hydrogel. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 27(4), 327-341.
- Xiaorui, L., Fuyin, Z., Xudong, W., Xuezheng, G., Shudong, Z., Hui, L., Dandan, D., Yubing, L., Lizhen, W., and Yubo, F. (2023). Biomaterial inks for extrusion-based 3D bioprinting: Property, classification, modification, and selection. *International Journal of Bioprinting*, 9(2), 649.
- Xie, C., Quan, R., Hong, F., Zou, K., Yan, W., and Fu, Y. (2019). The culprit of mesalamine intolerance: case series and literature review. *BMC Gastroenterology*, 19, 1-5.
- Xu, X., Yang, W., Liang, Q., Shi, Y., Zhang, W., Wang, X., and Yin, L. (2019). Efficient and targeted drug/siRNA co-delivery mediated by reversibly crosslinked polymersomes toward anti-inflammatory treatment of ulcerative colitis (UC). *Nano Research*, 12, 659-667.
- Xu, Y., Zhang, Y., Shao, H., and Hu, X. (2005). Solubility and rheological behavior of silk fibroin (*Bombyx mori*) in N-methyl morpholine N-oxide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 35(3-4), 155-161.
- Yamamoto, A., Itoh, T., Nasu, R., and Nishida, R. (2013). Effect of sodium alginate on dextran sulfate sodium-and 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced experimental colitis in mice. *Pharmacology*, 92(1-2), 108-116.
- Yan, Q., Dong, H., Su, J., Han, J., Song, B., Wei, Q., and Shi, Y. (2018). A review of 3D printing technology for medical applications. *Engineering*, 4(5), 729-742.
- Yang, D., and Jones, K. S. (2009). Effect of alginate on innate immune activation of macrophages. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 90A(2), 411-418.
- Yang, W., Xu, H., Lan, Y., Zhu, Q., Liu, Y., Huang, S., and Guo, R. (2019). Preparation and characterisation of a novel silk fibroin/hyaluronic acid/sodium alginate scaffold for skin repair. *International Journal of Biological Macromolecules*, 130, 58-67.
- Yao, C., Xie, S., Li, W., Zou, A., Zhou, J., Huo, M. and Zhang, Y. (2010). DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *The AAPS Journal*, 12(3), 263–271.

- Yener, S. (2013). *İnflamatuvar barsak hastalığı modelinde nanopartiküler sistemlerin in vitro/in vivo değerlendirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 6-15.
- Yıldız, A., Ağardan, N. B., and Acartürk, F. (2023). Evaluation of the effect of process parameters on the protein content of silk fibroin. *Polymer Bulletin*, 80(12), 13181-13198.
- Yılmaz Usta, D., Demirtaş, Ö., Ökçelik, C., Uslu, A., and Teksin, Z. Ş. (2018). Evaluation of in vitro dissolution characteristics of flurbiprofen, a BCS class IIa drug. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43(2), 27–34.
- Yorulmaz, E., Yorulmaz, H., Gökmen, E. S., Altınay, S., Küçük, S. H., Zengi, O., and Şit, D. (2019). Therapeutic effectiveness of rectally administered fish oil and mesalazine in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109247.
- Youshia, J., and Lamprecht, A. (2016). Size-dependent nanoparticulate drug delivery in inflammatory bowel diseases. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(2), 281-294.
- Yucel, T., Cebe, P., and Kaplan, D. L. (2009). Vortex-induced injectable silk fibroin hydrogels. *Biophysical Journal*, 97(7), 2044-2050.
- Zambari, I. F., Muhamad, N. A., Rahma, S., and Hafid, A. (2021). A comparison of Bradford, Lowry and UV-280 methods to determine the protein content from green and red *Christia vespertilionis* leaves. *International Journal of Botany Studies*, 6, 508-510.
- Zeng, Y. ve Cullen, B. R. (2002). RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA*, 8(7), 855-860.
- Zhai, J., Mantaj, J., and Vllasaliu, D. (2018). Ascorbyl palmitate hydrogel for local, intestinal delivery of macromolecules. *Pharmaceutics*, 10(4), 188.
- Zhang, B., Gao, L., Ma, L., Luo, Y., Yang, H., and Cui, Z. (2019). 3D Bioprinting: A novel avenue for manufacturing tissues and organs. *Engineering*, 5, 777-794.
- Zhang, B., Luo, Y., Ma, L., Gao, L., Li, Y., Xue, Q., and Cui, Z. (2018). 3D bioprinting: an emerging technology full of opportunities and challenges. *Bio-Design and Manufacturing*, 1(1), 2-13.
- Zhang, S., Ermann, J., Succi, M. D., Zhou, A., Hamilton, M. J., Cao, B., and Traverso, G. (2015). An inflammation-targeting hydrogel for local drug delivery in inflammatory bowel disease. *Science Translational Medicine*, 7(300), 300ra128.
- Zhang, W., Wang, X., Wang, S., Zhao, J., Xu, L., Zhu, C., and Jiang, X. (2011). The use of injectable sonication-induced silk hydrogel for VEGF165 and BMP-2 delivery for elevation of the maxillary sinus floor. *Biomaterials*, 32(35), 9415-9424.

- Zhao, S., Chen, Y., Partlow, B. P., Golding, A. S., Tseng, P., Coburn, J., and Kaplan, D. L. (2016). Bio-functionalized silk hydrogel microfluidic systems. *Biomaterials*, 93, 60-70.
- Zheng, Z., Guo, S., Liu, Y., Wu, J., Li, G., Liu, M. and Kaplan, D. (2016). Lithium-free processing of silk fibroin. *Journal of Biomaterials Applications*, 31(3), 450-463.
- Zhong, J., Zhou, X., Ye, C., Yu, W., and Tang, Y. (2021). Using FTIR Imaging to Investigate Silk Fibroin-Based Materials. *Fibrous Proteins: Design, Synthesis, and Assembly*, 207-219.
- Zhou, S. Y., Fleisher, D., Pao, L. H., Li, C., Winward, B., and Zimmermann, E. M. (1999). Intestinal metabolism and transport of 5-aminosalicylate. *Drug Metabolism and Disposition*, 27(4), 479-485.
- Zhu, W., Ma, X., Gou, M., Mei, D., Zhang, K., and Chen, S. (2016). 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 40, 103-112.
- Zou, X. H., Zhi, Y. L., Chen, X., Jin, H. M., Wang, L. L., Jiang, Y. Z., and Ouyang, H. W. (2010). Mesenchymal stem cell seeded knitted silk sling for the treatment of stress urinary incontinence. *Biomaterials*, 31(18), 4872-4879.
- Zu, M., Ma, Y., Cannup, B., Xie, D., Jung, Y., Zhang, J., and Xiao, B. (2021). Oral delivery of natural active small molecules by polymeric nanoparticles for the treatment of inflammatory bowel diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 176, 113887.





EK-1. Etik Kurul Onay Belgesi-1

Evrak Tarih ve Sayısı: 09.07.2020-E.72418



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Füsün ACARTÜRK
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Füsün ACARTÜRK, Başaran Mutlu AĞARDAN, Ahmet CEYLAN, Ayşegül YILDIZ, Özge ÖZGENÇ'ten oluşan G.Ü.ET-20.031 kod numaralı ve "*İpek Fibroin Bazlı İlaç Yüklü Hidrojellerin İnflamatuvar Barsak Hastalığında Değerlendirilmesi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-20.031 and entitled "*Evaluation of Silk Fibroin Based Drug Loaded Hydrogels in Inflammatory Bowel Disease*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Hayvan Türü : Fare Balb/c
Hayvan Sayısı : 84

Ek: 1 Liste

EK-1. (Devam) Etik Kurul Onay Belgesi-1

GAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ :26/06/2020		TOPLANTI SAYISI : 04	
ADI-SOYADI			
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)			
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL			
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU			
Prof.Dr.Tuncay PEKER			
Prof.Dr.Fatma AKAR			
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK			
Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ			
Doç.Dr.Emre BARIŞ			
Doç.Dr.İpek SÜNTAR			
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR			
Öğr.Gör.Dr.Şeyda DİKER			
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM			
Vet.Hek.Burcu AVCI			
Osman İÇ			

EK-2. Etik Kurul Onay Belgesi-2

Evrak Tarih ve Sayısı: 27.10.2023-E.785782



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-66332047-604.01.02-785782
Konu : Değerlendirme ve Onay

27.10.2023

Sayın Prof. Dr. Füsün ACARTÜRK
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Daha önce 09.07.2020 tarih ve E.72418 sayılı yazımız ile onay alan G.Ü.ET-20.031 kod numaralı **"İpek Fibroin Bazlı İlaç Yüklü Hidrojellerin İnflamatuvar Barsak Hastalığında Değerlendirilmesi"** başlıklı çalışmanız ile ilgili Kurulumuza vermiş olduğunuz 31.08.2023 tarihli dilekçeniz Kurulumuzun **22.09.2023** tarih ve **09** sayılı toplantısında incelenmiş olup,

Dilekçede; deney prosedürü gereği farelerde kolit oluşturmak için konu ile ilgili literatürler göz önünde bulundurularak %3,5 a/a konsantrasyona (Kriegel ve Amiji, 2011) sahip dekstran sodyum sülfat (DSS) farelerin içme suyuna eklendiği ve farelere 6 gün boyunca (Floer vd., 2010) verildiği, ancak, kolitin hayvanlardaki bireysel farklılıkları nedeniyle, deney modelinin ağır seyretmesine bağlı kayıplar görüldüğü, bu nedenle çalışmada yer alan grupların tamamlanabilmesi için çalışmanıza 40 adet fare daha eklenmesi ile bu kayıpların önlenmesi için bundan sonraki çalışmalarda hayvanlara literatürde yer alan diğer bilgiler doğrultusunda (Hilel vd., 2018; Diez-Echave vd., 2021) DSS uygulamasının 5 güne düşürülmesi ile ilgili talebinizin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiş olup, karara ilişkin imza listesi ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Mustafa ARSLAN
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

EK-2. (Devam) Etik Kurul Onay Belgesi-2

Evrak Tarih ve Sayısı: 27.10.2023-E.785782

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 22/09/2023		TOPLANTI SAYISI : 09	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Mustafa ARSLAN (Başkan)			
Prof.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.İlker ŞEN			
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU			
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK			
Prof.Dr.İpek SÜNTAR			
Prof.Dr.Serkan YAVUZ			
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER			
Prof.Dr.Fatma Gökçe APAYDIN			
Prof.Dr.Elvan ANADOL			
Doç.Dr.Yeliz KILINÇ			
Doç.Dr.Zeliha Aycan ÖZDEMİRKAN			
Doç.Dr. Duygu AĞAGÜNDÜZ			
Dr.Öğr.Üyesi Şevki Mustafa DEMİRÖZ			
Dr.Öğr.Üyesi Sühan GÜRBÜZ			
Dr.Öğr.Üyesi Zeynep YIĞMAN			
Dr.Öğr.Üyesi Nur Banu BAL			
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM			
Öğr.Gör.Dr. Beyza AYDOĞAN			
Vet.Hek.Burcu AVCI			
Osman İÇ			

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Ayşegül YILDIZ

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri

Medeni hali

Telefon

E-mail

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı	
Lisans	Ankara Üniversitesi / Eczacılık Fakültesi	
Lise	Nevşehir Anadolu Öğretmen Lisesi	

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2023-Halen	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Tort, S., Yıldız, A., Tuğcu-Demiröz, F., Akca, G., Kuzukıran, Ö., Acartürk, F. (2019). Development and Characterization of Rapid Dissolving Ornidazole Loaded PVP Electrospun Fibers, *Pharmaceutical Development and Technology*, 24(7):864-873,2019.
2. İnçeçayır,T., Olğaç, S., Yıldız, A., Saar,S., Kodan,E. (2019). pH-Dependent Dissolution Behavior of a Weakly Basic BCS Class II Drug, Clopidogrel. *Latin American Journal of Pharmacy* 38 (10): 1921-8
3. Tuğcu-Demiröz, F., Saar, S., Kara, A. A., Yıldız, A., Tunçel, E., & Acartürk, F. (2021). Development and characterization of chitosan nanoparticles loaded

- nanofiber hybrid system for vaginal controlled release of benzydamine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 161, 105801. (Q2)
4. Yıldız, A., Kara, A.A., Acartürk, F., (2020). Peptide-protein based nanofibers in pharmaceutical and biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 1084-1097
 5. Koçak, E., Yıldız, A., Acartürk, F. (2020). Three dimensional bioprinting technology: Applications in pharmaceutical and biomedical area. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111396
 6. Tort, S., Akça, E. K., Olğaç, S., Saar, S., Yıldız, A., Ünal, İ.S., Özdağ, Z.D., Tuğcu-Demiröz, F. (2021). Development and Evaluation of Sustained Release Tablet Formulations of Venlafaxine Hydrochloride Sağlık Bilimlerinde Değer, 12 (1): 28-35.
 7. Yıldız, A., Mutlu Ağardan, N.B. & Acartürk, F. (2023) Evaluation of the effect of process parameters on the protein content of silk fibroin. *Polymer Bulletin*, 80(12), 13181-13198. <https://doi.org/10.1007/s00289-023-04697-6>.
 8. Yıldız A., Birer M., Turgut Birer Y., Uyar R., Yurdakök-Dikmen B., Acartürk F. (2023). Silk fibroin nanoparticles and β -tricalcium phosphate loaded tissue engineered gelatin bone scaffolds: A Nature-based, low-cost solution. *Journal of Biomaterials Applications*, 38(5):646-661.

Bildiriler

Sözlü Bildiriler

1. Tuğcu-Demiröz, F., Yıldız, A., Kara, AA., Tunçel, E., Saar, S., Acartürk, F. (2019). *Development of Benzydamine Loaded Nanofiber Formulations For Vaginal Controlled Drug Release*, 8th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, Çeşme, İzmir, Turkey.
2. Saar S., Yıldız A., Tort S., Tuğcu-Demiröz, F., Acartürk, F. (2020). *A different approach to nanofiber drug delivery systems: Nanofiber based tablet formulations*, International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry, Ankara, Turkey.
3. Birer, M., Yıldız, A., Acartürk, F. (2021). *Preparation of silk fibroin nanoparticles from bombyx mori cocoons by doe approach*, 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, Turkey.
4. Yıldız, A., Turanlı, Y., Birer, M., Saar, S., Tuğcu-Demiröz, F., Acartürk, F. (2021). *Fabrication and Characterization of Methylprednisolone-Loaded Colon-Specific 3D-Printed Drug Delivery Systems*. 3rd International Gazi Pharma Symposium Series, Ankara, Turkey.
5. Yıldız, A., Mutlu-Ağardan, B., Acartürk, F. (2022). *Development of Mesalazine Loaded Hydrogel Formulations by 3D Printing Technology*. 20th International Pharmaceutical Technology Symposium, Ankara, Turkey.

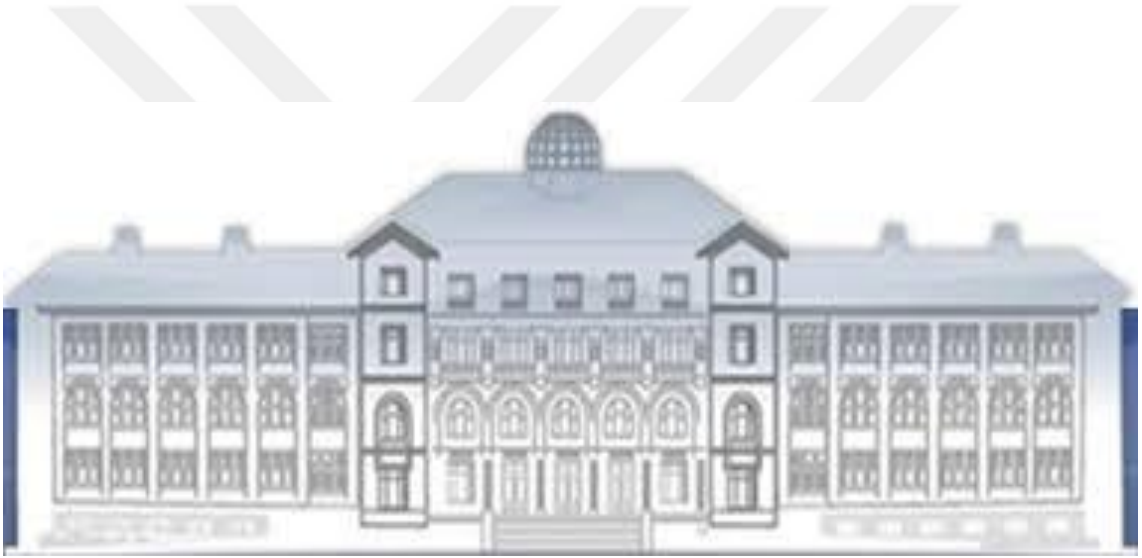
6. Saar, S., Yıldız, A., Yıldırım, E., Uyar, R., Turgut, Y., Yurdakok-Dikmen, B., Tuğcu-Demiröz, F., Acartürk, F. (2022). *In-vitro, Ex-vivo And Cytotoxicity Evaluation of Hydrocortisone-loaded Nanofiber for Colon Targeting*. FIGON DMD & EUFEPS Annual Meeting, Leiden, Hollanda
7. Tekin, T., Yıldız A., Tuğcu-Demiröz, F., Acartürk, F. (2022). *Development of 3D Printed Bovine Serum Albumin Loaded Alginate-Based Hydrogel Dressing for Wound-Healing Application*. 5th International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry, 23-25 Kasım 2022.

Poster Bildirileri

1. Saar, S., Yıldız, A., Ünal, İ. S., Özdal, Z. D., Olgaç, S., Kodan, E., Duran, C., Tort, S., & Tuğcu Demiröz, F. (2018). Development and evaluation of extended release tablet formulations of venlafaxine hydrochloride. In *Proceedings of the 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences* (p. 342). Ankara, Turkey.
2. Tort, S., Yıldız, A., Tuğcu Demiröz, F., Tunçel, E., & Acartürk, F. (2018). Preparation and characterization of nanofibers containing ornidazole for buccal application. In *Proceedings of the 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences* (p. 342). Ankara, Turkey.
3. Olgaç, S., Yıldız, A., Saar, S., Kodan, E., & Incecayir, T. (2018). pH-dependent dissolution behavior of a weakly basic BCS class II drug, clopidogrel. In *Proceedings of the 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences* (p. 342). Ankara, Turkey.
4. Tuğcu Demiröz, F., Tort, S., Yıldız, A., Saar, S., & Acartürk, F. (2018). Permeability studies of nitroimidazole derivative antibiotic loaded nanofibers. In *Proceedings of the 19th International Pharmaceutical Technology Symposium* (p. 342). Antalya, Turkey.
5. Yıldız, A., Mutlu-Ağardan, B., & Acartürk, F. (2021). Studies on modifications of established silk fibroin production methods to enhance protein content. In *Proceedings of the 12th World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology* (p. 342). Vienna, Austria.
6. Yıldırım, E., Yıldız, A., Saar, S., Tuğcu Demiröz, F., & Acartürk, F. (2021). The evaluation of the potential eudragit-based delayed release nanofibers for colon targeting. In *Proceedings of the 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences* (p. 342). Ankara, Turkey.
7. Yıldız, A., Mutlu-Ağardan, B., & Acartürk, F. (2021). Optimization and validation of silk fibroin production process. In *Proceedings of the 3rd International Gazi Pharma Symposium Series* (p. 342). Ankara, Turkey.
8. Tuğcu Demiröz, F., Yıldırım, E., Saar, S., Yıldız, A., & Acartürk, F. (2021). Development and characterization studies of hydrocortisone loaded eudragit-based colon targeted nanofibers. In *Proceedings of the 3rd International Gazi Pharma Symposium Series* (p. 342). Ankara, Turkey.

9. Yıldız, A., Saar, S., Yıldırım, E., Uyar, R., Yurdakök Dikmen, B., Tuğcu Demiröz, F. N., & Acartürk, F. (2022). Evaluation of the effect of nanofiber formulations on the expression of IBD marker TNF- α by cell culture studies. In *Proceedings of the 16th Nanoscience & Nanotechnology Conference (NANOTR-16)* (p. 342). Ankara, Turkey.
10. Yıldız, A., Mutlu-Ağardan, B., & Acartürk, F. (2022). Preparation and in vitro release studies of mesalazine loaded silk fibroin based nanoparticles. In *Proceedings of the 16th Nanoscience & Nanotechnology Conference (NANOTR-16)* (p. 342). Ankara, Turkey.





GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

