



**ORAL YOLLA VERİLMEK ÜZERE
PROBİYOTİK İÇEREN TAŞIYICI
SİSTEMİN GELİŞTİRİLMESİ ve
İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Ömer Faruk KARACA

Eskişehir 2024

**ORAL YOLLA VERİLMEK ÜZERE PROBİYOTİK İÇEREN TAŞIYICI
SİSTEMİN GELİŞTİRİLMESİ ve İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ömer Faruk KARACA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Gülay BÜYÜKÖROĞLU**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Temmuz 2024**

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No TYL-2023-117)

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ömer Faruk KARACA'nın "Oral Yolla Verilmek Üzere Probiyotik İçeren Taşıyıcı Sistemin Geliştirilmesi ve İn Vitro Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 26/07/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye(Tez Danışmanı)	:	
Üye	:	
Üye	:	
		
		Enstitü Müdürü

ÖZET

ORAL YOLLA VERİLMEK ÜZERE PROBİYOTİK İÇEREN TAŞIYICI SİSTEMİN GELİŞTİRİLMESİ ve İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Ömer Faruk KARACA

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Temmuz 2024

Danışman: Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

Bu tez kapsamında, kolondan rektuma kadar olan bölgeyi etkileyen ve kronik bir inflamatuvar bağırsak hastalığı olan Ülseratif Kolit'in tedavisine yönelik, güncel bir teknoloji olan mikroakışkan sistemler kullanılarak, kolona hedefli bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmeye çalışılmıştır.

Bu amaçla, son yıllarda ülseratif kolitli hastalarının semptomlarını etkili bir şekilde hafiflettiği gösterilmiş Probiyotiklerden biri olan *Lactobacillus casei* ve hafif ya da orta şiddetli ülseratif kolit rahatsızlığında birinci basamak tedavi olarak kullanılan Mesalazin'in ayrı ayrı ve kombine olarak kakao yağı içinde enkapsüle edildiği s/y emülsiyonları hazırlanmıştır. Canlı bakteri kaybını en aza indirmek amacıyla tercih edilen mikroakışkan çipler ile elde edilen bu emülsiyonların, hem oral alınabilmesi hem de kolona hedeflendirilebilmesi için enterik kapsüllere dolumu gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan emülsiyon sistem içeriğindeki ki probiyotik için canlılık testleri, mesalazin için ise UPLC kullanılarak analitik yöntem geliştirme ve validasyon çalışmaları yürütülmüştür. Enterik kapsül için içerdiği probiyotik ve mesalazin miktarının optimizasyonu, salım profilinin belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiş ve mesalazin içeren kapsüllerin sitotoksitesi HUVEC hücreleri üzerinde araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ülseratif Kolit, Mesalazin, Probiyotik, Mikroakışkanlar, Katı Lipit Nanopartiküller

ABSTRACT

**DEVELOPMENT AND IN VITRO EVALUATION OF A CARRIER SYSTEM
CONTAINING PROBIOTICS FOR ORAL DELIVERY**

Ömer Faruk KARACA

Department of Pharmaceutical Technology
Anadolu University, Graduate School, July 2024
Advisor: Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

Within the scope of this thesis, an attempt was made to develop a drug delivery system targeted to the colon, using microfluidic systems, which is a current technology, for the treatment of Ulcerative Colitis, a chronic inflammatory bowel disease that affects the region from the colon to the rectum.

For this purpose, w/o emulsions were prepared in which *Lactobacillus casei*, one of the probiotics that has been shown to effectively alleviate the symptoms of ulcerative colitis patients in recent years, and Mesalazine, used as a first-line treatment for mild or moderate ulcerative colitis, were encapsulated in cocoa butter, separately and in combination. These emulsions, obtained with microfluidic chips preferred to minimize the loss of live bacteria, were filled into enteric capsules so that they can be taken orally and targeted to the colon.

In the prepared emulsion system, viability tests for probiotics and analytical method development and validation studies were carried out using UPLC for mesalazine. For the enteric capsule, studies were carried out to optimize the amount of probiotic and mesalazine it contained, to determine the release profile, and the cytotoxicity of mesalazine-containing capsules was investigated on HUVEC cells.

Keywords: Ulcerative Colitis, Mesalazine, Probiotic, Microfluidics, Solid Lipid Nanoparticles

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyuncaengin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, çalışma sürecim boyunca desteğini esirgemeyen ve süreç boyunca maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ailem kadar yanımda olan sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na,

Tez çalışmalarımdayücre kültürü ve çalışma prensipleri konularında yardımcı olan ayrıca desteği ve bilgisiyle destek olan hocam Doç. Dr. Behiye ŞENEL'e,

Çalışmalarım sırasında bilgilerinden ve desteklerinden faydalandığım Eczacılık Teknolojisi Bölümü hocalarıma, Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL'e, Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na, Prof. Dr. Ebru BAŞARAN'a, Prof. Dr. Evrim AKYIL'a, Prof. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK'a, Doç. Dr. Behiye ŞENEL'e, Doç. Dr. Ahmet Alper ÖZTÜRK'e,

Çalışmalarım sürecinde bakteri kültürü çalışmalarımdayardımda ve desteklerini esirgemeyen Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı mensubu Öğr.Gör. Pervin SOYER'e

Çalışmalarım sürecinde yardımda ve desteklerini esirgemeyen Eczacılık Teknolojisi hocalarına ve lisansüstü öğrencilerine

Laboratuvar çalışmalarım esnasında benimle iyi ve uyumlu bir çalışma arkadaşı olan Ceyda KÖROĞLU ÖZMEN'e,

Doğduğum günden beri her zaman yanımda olan sevgili annem Zübeyde KARACA'ya, babam İbrahim KARACA'ya ve abim İsmail Hakkı KARACA'ya,

Gerek eğitim hayatımda gerekse sosyal hayatımda sabırla bana destek olan, beni hep ileriye taşıyan ve en umutsuz anımda elimden tutup ayağa kaldıran en büyük destekçim olan eşim Sakine ATİLA KARACA'ya

Ve hayatıma girdiği günden beri hayatıma büyük anlam katan ve çalışmalarım sırasında verdiği enerjiyle gücümün artmasına sebep olan oğlum Ozan KARACA'ya

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan ‘bilimsel intihal tespit programı’ ile tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Ömer Faruk KARACA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Ülseratif Kolit.....	5
2.2. Ülseratif Kolit Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar	6
2.2.1. Biyolojik olmayan tedaviler.....	7
2.2.1.1. Aminosalisilatlar	7
2.2.1.2. Kortikosteroidler	7
2.2.1.3. Kalsinörin inhibitörleri	8
2.2.1.4. İmmünomodülatörler	8
2.2.1.5. Antimikrobiyal ajanlar.....	9
2.2.2. Biyolojik tedaviler	9
2.2.2.1. TNF- α inhibitörleri.....	9
2.2.2.2. Anti-İntegrinler	9
2.2.2.3. İnterlökin-23 inhibitörleri.....	10
2.2.2.4. Janus kinaz inhibitörleri	10

2.2.3. Diğer tedaviler	11
2.2.3.1. Cerrahi işlemler	11
2.2.3.2. Farmakolojik olmayan tedaviler	11
2.2.3.2.1. Probiyotikler	11
2.2.3.2.2. Probiyotiklerin ülseratif kolit tedavisinde kullanımı	13
2.2.3.2.3. Lactobacillus casei	14
2.3. Ülseratif Kolit Tedavisinde Mesalazin/Probiyotik Kombine Tedavi Yaklaşımı	15
2.4. Ülseratif Kolit Tedavisi İçin Kullanılan İlaç Taşıyıcı Sistemler	18
2.5. Nanopartikül İlaç Taşıyıcı Sistemler	19
2.5.1. Lipozomlar	20
2.5.2. Karbon nanomateryaller	21
2.5.3. Dendrimerler	22
2.5.4. Silika nanopartiküller	23
2.5.5. Metalik nanopartiküller	24
2.5.6. Manyetik nanopartiküller	24
2.5.7. Polimerik nanopartiküller	25
2.5.8. Katı lipit nanopartiküller	26
2.5.8.1. Katı lipit nanopartiküllerin yapısı	27
2.5.8.2. Katı lipit nanopartiküllerin oluşum mekanizmaları	29
2.5.8.2.1. Yüksek basınçlı homojenizasyon	29
2.5.8.2.2. Yüksek kesmeli homojenizasyon/ ultrasonikasyon yöntemi	30
2.5.8.2.3. Mikroemülsiyon metodu	30
2.5.8.2.4. Faz değişmesi sıcaklık yöntemi	30
2.5.8.2.5. Membran kontaktör yöntemi	30

2.5.8.2.6.Emülsifikasyon solventi difüzyon yöntemi.....	31
2.5.8.2.7.Koaservasyon yöntemi	31
2.5.8.2.8.Çift emülsiyon yöntemi	31
2.5.8.2.9.Emülsiyondan çözücü buharlaştırma yöntemi	31
2.5.8.2.10.Solvent enjeksiyon yöntemi	32
2.5.8.2.11.Mikroemülsiyon soğutma yöntemi.....	32
2.5.8.2.12.Süper kritik akışkan yöntemi.....	32
2.5.8.2.13.Elektrosprey yöntemi	32
2.5.8.2.14.Yarı katı lipid nanopartiküllerin hazırlanması.....	32
2.5.8.2.15.Mikroakışkan yöntemi	33
2.6. Mikroemülsiyonlar	33
2.6.1. Mikroemülsiyonların yapısı	33
2.6.2. Mikroemülsiyonların oluşum mekanizmaları	35
2.7. Ülseratif Kolit Tedavisinde Enterik Formülasyonların Kullanımı.....	36
2.8. Mikroakışkan Sistemi ve Hücre Enkapsülasyonu	39
3. GEREÇLER.....	41
3.1. Kullanılan Maddeler.....	41
3.2. Kullanılan Cihazlar	42
4. YÖNTEM	43
4.1. Probiyotik Bakterisi Elde Etme ve Koloni Sayımı.....	43
4.1.1. Probiyotik bakterisi elde etme	43
4.1.2. Probiyotik bakterisi koloni sayımı.....	43
4.2. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları.....	44
4.2.1. Probiyotik bakterilerinin kapsüllenmesi/probiyotik içeren s/y Emülsiyonunun hazırlanması	44

4.2.2. Mesalazin içeren s/y emülsiyonunun hazırlanması.....	46
4.3. İki Emülsiyonun Birleştirilmesi ve Kombine Formülün Oluşturulması.....	47
4.4. Formülasyonların Karakterizasyonu.....	47
4.4.1. Damlacıkların morfolojik özelliklerinin ve partikül boyutlarının belirlenmesi.....	47
4.4.2. Kapsüllenen bakterilerin canlı koloni sayısının hesaplanması .	47
4.4.3. Kapsüllenen mesalazin miktar tayini	48
4.4.3.1. Standart çözeltilerin hazırlanması	48
4.4.3.2. Kromatografik koşullar	48
4.4.3.3. Mesalazin miktar tayini için kromatografik yöntem geliştirilmesi	48
4.4.3.4. Analitik yöntem validasyonu	49
4.4.3.4.1. Seçicilik.....	49
4.4.3.4.2. Doğrusallık.....	49
4.4.3.4.3. Doğruluk	49
4.4.3.4.4. Kesinlik.....	49
4.4.3.4.5. Tespit ve tayin sınırları.....	50
4.4.4. Formüle yüklenmiş mesalazin miktar tayini ve in vitro salım testleri	50
4.4.4.1. Formüle yüklenmiş mesalazin miktar tayini.....	51
4.4.4.2. In vitro etkin madde salım çalışması.....	51
4.4.5. Sitotoksikite testleri	52
5. BULGULAR.....	54
5.1. Probiyotik Bakterisi Elde Etme ve Koloni Sayımı.....	54
5.1.1. Probiyotik bakterisi elde etme	54
5.1.2. Probiyotik bakterisi koloni sayımı.....	54

5.2. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları.....	55
5.2.1. Kullanılacak mikroakışkan çipin seçimi ve akış hızı tayini	55
5.2.2. Probiyotik bakterilerinin kapsüllenmesi/probiyotik	
içeren s/y emülsiyonunun hazırlanması	56
5.2.3. Mesalazin içeren s/y emülsiyonunun hazırlanması	59
5.2.4. İki formülasyonun birleştirilmesi ve son formülün	
oluşturulması	62
5.3. Formülasyonların Karakterizasyonu.....	64
5.3.1. Kapsüllenen bakterilerin canlı koloni sayısının hesaplanması .	64
5.3.2. Kapsüllenen mesalazin miktar tayini	66
5.3.2.1. Mesalazin miktar tayini için kromatografik yöntem	
geliştirilmesi	66
5.3.2.2. Analitik yöntem validasyonu	67
5.3.2.2.1. Seçicilik.....	67
5.3.2.2.2. Doğrusallık.....	68
5.3.2.2.3. Doğruluk	69
5.3.2.2.4. Kesinlik.....	69
5.3.2.2.5. Tespit ve tayin sınırları.....	70
5.3.3. Damlacıkların morfolojik özelliklerinin ve partikül	
boyutlarının belirlenmesi.....	71
5.3.4. Formüle yüklenmiş mesalazin miktar tayini ve in	
vitro salım testleri.....	71
5.3.4.1. Formüle yüklenmiş mesalazin miktar tayini.....	71
5.3.4.2. In vitro etkin madde salım çalışmaları	72
5.3.6. Mesalazin içeren formülasyonların sitotoksitesinin belirlenmesi	74
6. TARTIŞMA.....	76
6.1. Kapsüllenen Bakterilerin Canlı Koloni Sayısı	76
6.2. Kombine Formülde Kapsüllenen Bakterilerin Canlı Koloni Sayısı....	77

6.3. Kapsüllenen Mesalazin Miktarı	77
6.4. In Vitro Etkin Madde Salımı	78
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	80
KAYNAKÇA	81



TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Katı lipit nanopartiküllerde kullanılan yapısal elemanlar	28
Tablo 2.2. 5-ASA içeren ve enterik kaplı piyasa ürünlerine ait örnekler.....	38
Tablo 4.1. Kromatografik koşullar	48
Tablo 4.2. Dissolüsyon ortamları	50
Tablo 5.1. <i>Lactobacillus casei</i> yüklü formülasyonların ağırlıkları	59
Tablo 5.2. Mesalazin yüklü formülasyonların ağırlıkları	62
Tablo 5.3. Canlı koloni sayıları	66
Tablo 5.4. Doğruluk çalışmaları verileri.....	69
Tablo 5.5. Kesinlik çalışmaları verileri	70
Tablo 5.6. Kesinlik çalışmasına ait sonuçlar	70
Tablo 5.7. Mesalazin yükleme yüzdeleri.....	71
Tablo 5.8. Dissolüsyon ortamına geçen mesalazinin zamana karşı % kümülatif miktarları	72
Tablo 5.9. Matematik Modellerin Kıyaslama Tablosu.....	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Semptomlar ve risk faktörleri	5
Şekil 2.2. Probiyotiklerin insan vücudundaki etki mekanizması	11
Şekil 2.3. Ülseratif kolitte ilaç taşıyıcı sistemler.....	18
Şekil 2.4. Lipozomun yapısı.....	20
Şekil 2.5. Karbon nanomateryallerin yapısı	21
Şekil 2.6. Dendrimerlerin yapısı	22
Şekil 2.7. Silika nanopartiküllerin yapısı	23
Şekil 2.8. Metalik nanopartiküllerin yapısı	24
Şekil 2.9. Manyetik nanopartiküllerin yapısı	25
Şekil 2.10. Polimerik nanopartiküllerin yapısı.....	26
Şekil 2.11. Katı lipit nanopartiküllerin yapısı	27
Şekil 2.12. Katı lipit nanopartiküllerde etkin madde konumları.....	29
Şekil 2.13. Mikroemülsiyonların yapısal formu	34
Şekil 4.1. Formülasyon çalışmasında kullanılan mikroakışkan çipi	45
Şekil 4.2. Sirkülasyonlu su ısıtıcı aparatı-1	45
Şekil 4.3. Sirkülasyonlu su ısıtıcı aparatı-2.....	46
Şekil 5.1. Mikroakışkan çipleri	55
Şekil 5.2. S/Y emülsiyonunun çip içinde oluşumu ve toplama alanındaki görünümü.	56
Şekil 5.3. Probiyotik bakterisi yüklü partiküllerin görüntüsü	57
Şekil 5.4. Probiyotik duyarlılık testi	58
Şekil 5.5. Formülasyonun liyofilizasyon işlemi sonrası tam ve kesit görüntüsü	60
Şekil 5.6. Mesalazin yüklü partiküllerin mikroskopik görüntüsü	60
Şekil 5.7. Mesalazin içeren formülasyonun liyofilizasyon sonrası ışık mikroskobu görüntüsü	60
Şekil 5.8. Karboksimetil selülozun % 2'lik çözeltisi ile hazırlanan formülasyonun mikroskopik görüntüsü	61
Şekil 5.9. Lesitin düşük konsantrasyonlarda kullanıldığı formülasyonunun mikroskopik görüntüsü.....	62

Şekil 5.10. Mesalazin ve probiyotik bakterisi içeren formülasyonun mikroskop görüntüsü.....	63
Şekil 5.11. İki formülasyon birleşim tubingi	63
Şekil 5.12. Formülasyon üretim düzeneği.....	64
Şekil 5.13. 10^1 , 10^2 ve 10^3 koloni sayım dilüsyon petrileri.....	65
Şekil 5.14. 10^3 dilüsyonu sayım petrisi.....	65
Şekil 5.15. Formülasyon bileşikleri ve mesalazinin kromatografik görüntüleri	68
Şekil 5.16. Mesalazin doğrusallık grafiği	68
Şekil 5.17. Mikroskobik boyut ölçümleri	71
Şekil 5.18. Dissolüsyon ortamına geçen mesalazinin zamana karşı % kümülatif salım profili.....	73
Şekil 5.19. HUVEC 24 Saat % canlılık grafiği.....	74
Şekil 5.20. HUVEC 48 Saat % canlılık grafiği.....	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

5-ASA	: 5-aminosalisilik asit
AIC	: Akaike information criterion (Akaike bilgi kriteri)
CMC	: Karboksimetil selüloz
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
EBV	: Epstein-Barr virüsü
HDL	: High Density Lipoprotein (Yüksek yoğunluklu lipoprotein)
HPMA	: N-(2-hidroksipropil)metakrilamid
HUVEC	: Human umbilical vein endothelial cell (İnsan göbek damarı endotel hücreleri)
LDL	: Low Density Lipoprotein (Düşük yoğunluklu lipoprotein)
LOD	: Limit of Detection (Tespit limiti)
LOQ	: Limit of Quantification (Tayin limiti)
LPS	: Lipopolisakkarit
MRS	: De Man – Rogosa – Sharpe
MSC	: Mode select criterion (Model seçim kriteri)
MSE	: Mean squared error (Ortalama kare hatası)
NO	: Nitrik oksit
PBS	: Phosphate buffered saline (Fosfat tamponlu salin)
PDMS	: Polidimetilsiloksan
PMMA	: Polimetil metakrilat
PVA	: Polivinil alkol
PVP	: Polivinil proliden
RMSD	: Root mean square deviation (Kök ortalama kare hatası)
TNF- α	: Tümör nektöz faktörü alfa
UPLC	: Ultra Performans Sıvı Kromatografisi
USP	: United States Pharmacopeia (Amerikan Farmakopesi)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ülseratif kolit (ÜK), inflamatuvar bağırsak hastalığının bir çeşididir ve öncelikle kolon mukozasını etkileyen kronik ve tekrarlayan bir hastalıktır. Erken yaşlarda ortaya çıkma eğilimi gösterir. Sıklıkla 15 ile 30 yaş arasında teşhis edilir ve hastalıktan etkilenenlerin yaşamlarını olumsuz etkiler (Haiou vd., 2024). Son yıllarda sağlıksız yaşam tarzı alışkanlıkları, yoğun zihinsel stres ve genetik gibi çeşitli faktörler nedeniyle hastalığın görülme sıklığı artmıştır (Liu vd., 2024). ÜK pürülan kanlı dışkılama ile karakterize edilmektedir. Hastaların çoğunda karın ağrısı, rektal lezyonlar, dışkılamada aciliyet hissi, dışkılama anında ağrı hissetme ve genellikle de buna bağlı olarak da bağırsakları boşaltamama durumu gözlenmektedir. Semptomlar sürekli devamlılık gösterme eğilimindedir ve hastalığın alevlenmesi haftalarca sürebilmektedir. Altı haftadan uzun süren semptomlar, ülseratif koliti enfeksiyöz kolitten ayırmaya yardımcı olur (Elghobashy ve Steed, 2024; Haiou vd., 2024). Bağırsak bariyerinin mekanik, kimyasal, immünolojik ve biyolojik olarak hasar görmesi ülseratif kolitin karakteristik özelliğidir (Liu vd., 2024). Hastalığa sahip bireylerin tipik olarak mukus katmanları incedir. Bu durum hastaların patojenlere karşı daha duyarlı olmalarına sebep olur (Chauhan ve Harwansh, 2024). Eğer kontrol altına alınmaz ise hastalarda anemi oluşumu gözlenebilmektedir. Bununla birlikte hipoproteinemiye ve elektrolit dengesizliklerine neden olabilmektedir. Ülseratif kolitli bireylerin birincil ölüm nedeni kolorektal kanser olmakla beraber bu hastalığa yakalanma olasılıkları da evrensel popülasyona göre 2-5 kat daha fazladır. Barındırdığı riskleri göz önünde bulundurulunca, ÜK hastalığının insan yaşam kalitesini ve yaşam süresini etkileyebilen önemli bir rahatsızlık olduğu ortaya çıkmaktadır (Haiou vd., 2024).

Ülseratif kolitin klinik tanısı, belirli semptomlara, endoskopik işlemlere ve histolojik parametrelere göre yapılmaktadır. Hastalığın teşhisi için endoskopik işlemler ana standart olarak görülmektedir. Bunlara ek olarak, son çalışmalarda bağırsak florasının ÜK tanısı için potansiyel bir belirteç olabileceği öne sürülmüştür (Haiou vd., 2024).

Gastrointestinal hastalıkların ilaçlarla tedavisinde çeşitli zorluklar yaşanmaktadır (Chauhan ve Harwansh, 2024). Hastalığa yönelik güncel tedavilerde antiinflamatuvar ilaçlar, immünosüpresif ilaçlar ve biyolojik ilaçlar lokal veya sistemik olarak kullanılmaktadır. Bu tedavilerin etkinliği, ilaçların tolere edilememesi ve ilaçların ciddi

yan etkilerinin ortaya çıkma olasılıkları nedeniyle sekteye uğrayabilmektedir (Wu vd., 2023).

Mesalazin (mesalamin, 5-aminosalisilik asit, 5-ASA) hafif ve orta dereceli ülseratif kolitli hastaların tedavisinde birinci basamak tedavi olarak önerilmektedir. Ancak hastalığın remisyonunun sağlanabilmesi ve iyi halin devam ettirilebilmesi adına yüksek dozlarda kullanılması gerekmektedir. Tedavide her gün birden fazla mesalazin içeren oral tablet alınması gerekmektedir. Bu da hastanın tedaviye uyumunu negatif yönde etkilemektedir. Hastanın tedaviye uyumunun sağlanamaması hastalığın tekrarlamasına bağlı olarak yaşam kalitesinin azalmasına, ilacın potansiyel fayda kaybına ve hasta bakım maliyetlerinin artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle daha uygun dozlamaya izin veren güçlü mesalazin preparatlarının geliştirilmesine ihtiyaç vardır ve bunların ÜK hastalarının ilaçlı tedavi programlarına bağlı kalmalarına yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Varum vd., 2022).

Mevcut ÜK tedavi yaklaşımları, bağışıklık sistemini baskılar ve hastalığın patogeneğinde mikrobiyal katılımı büyük ölçüde azaltır. Bu da tedavinin başarıya ulaşmasını engellemektedir. Hastalarının belirli bir kısmında işe yarayan immünosupresan ilaçların ve biyolojik ilaçların intolerans, alerji, ciddi enfeksiyonlar ve artan malignite riski gibi önemli yan etkileri bulunmaktadır (Zhou vd., 2024). Son zamanlarda yapılan birçok araştırma ÜK tedavisinde, probiyotik bakterilerinin bağırsağın bariyer fonksiyonunu iyileştirerek hastalığın tedavisinde önemli bir rol oynayabileceğini ortaya koymuştur (Liu vd., 2024). Bu bilgiler, bağırsak mikrobiyal kompozisyonunu düzenleyen probiyotikler, prebiyotikler ve sinbiyotiklerin önemli birer seçenek olabileceklerini düşündürmektedir. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi probiyotik bakteriler, faydalı canlı mikrobiyotik olarak tanımlanmaktadır. Hastalığın tedavisi ve iyi olma halinin devamlılığı açısından, stabil bir bağırsak mikrobiyotasını yeniden sağlayan uygulamaların, geleneksel tedavileri tamamlayıcı veya bunları güvenli ve etkili terapötik ajana dönüştürülmesinde alternatif yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır (Zhou vd., 2024).

Probiyotiklerin geniş potansiyel uygulamaları olmasına rağmen, pratik kullanımda birçok zorlukla karşı karşıya kalınmaktadır. En önemli sorunlardan biri, özellikle mide asidi ve safra gibi zorlu ortamlarda hayatta kalma oranlarının düşmesidir. Bu koşullar altında, çok sayıda probiyotik bağırsaklara ulaşmadan önce ölebilir ve bu da etkinliklerini önemli ölçüde azaltabilir. Ek olarak, probiyotiklerin hayatta kalması, sıcaklık ve nem gibi

depolama ve taşıma koşullarından etkilenir ve bu da kullanım aralıklarını ve faydalarını daha da sınırlar (Tripathi ve Giri, 2014). Bu sınırlamaların üstesinden gelmek ve probiyotiklerin stabilitesini ve bağırsak canlılığını iyileştirmek için etkili probiyotik koruma stratejilerinin geliştirilmesi özellikle önemlidir. Özellikle probiyotikleri koruyucu sistemlere yerleştirerek kapsülleme teknikleri, bu sorunu çözmek için uygulanabilir bir yol sunar (Frakolaki vd., 2021). Probiyotik kapsülleme alanında konvansiyonel yöntemler arasında öncelikle sprey kurutma, dondurarak kurutma ve jelleştirme teknikleri yer almaktadır. Bu teknikler koruyucu bir tabaka oluşturarak probiyotiklerin stabilitesini ve canlılık oranını artırmayı sağlamak amacıyla kullanılmıştır. Sprey kurutma, nemi hızla uzaklaştırarak aktif bileşenleri korurken, dondurarak kurutma, dondurma işleminden sonra ikincil bir kurutma işlemi ile ısıya duyarlı maddelere verilen zararı azaltır. Aljinat jel boncuklarının oluşumu gibi jelleştirme teknikleri, fiziksel izolasyon yoluyla probiyotikleri olumsuz dış koşullardan korur. Bu geleneksel kapsülleme teknikleri probiyotik ürünlerin stabilitesini iyileştirmede bir miktar başarı elde etmiş olsa da, sprey ve dondurarak kurutma işlemleri sırasında yüksek sıcaklıklar veya aşırı soğuk koşulların uygulanması, probiyotiklerin canlılığına zarar verebilir ve nihai üründeki canlı bakteri sayısını azaltabilir. Dahası, karmaşık gastrointestinal ortamlara karşı karşıya kaldıklarında, özellikle probiyotiklerin güçlü asidik mide ortamından sorunsuz bir şekilde geçmesini ve belirli bağırsak bölgelerinde etkili bir şekilde salınmasını sağlamakta zorlukla karşılaşılır. Önemli bir diğer sorun ise bu tekniklerin genellikle taşıyıcının boyutunu ve şeklini tam olarak kontrol edememesidir. Probiyotiklerin stabil taşınması ve hedeflenen salım için bu kriterler taşıyıcı sistemin dizaynı açısından önemlidir. Taşıyıcı sistemlerin tutarsızlığı, gastrointestinal sistemde probiyotiklerin dengesiz salınmasına yol açabilir ve böylece biyoyararlanımlarını ve nihai sağlık yararlarını etkileyebilir (Rajam ve Subramanian, 2022; K. Wang vd., 2024). Bu nedenle, geleneksel kapsülleme yöntemleri probiyotiklerin uygulanması için temel oluştururken, bu yöntemlerin sınırlamaları, probiyotik canlılığını koruma, salım verimliliğini artırma ve hassas kontrol etme konusunda iyileştirmeler sağlayabilen yeni kapsülleme teknolojilerine olan ihtiyacı ortaya çıkmaktadır (K. Wang vd., 2024).

Mikrokanallar içindeki sıvıları manipüle etmeye yönelik ileri bir bilim olan mikroakışkan teknolojisi, son yıllarda probiyotik kapsülleme alanında da kullanılmaya başlanmıştır. Bu sistemle, hassas kapsülleme, mikroakışkan teknolojinin probiyotik taşıyıcıların boyutunu ve şeklini benzeri görülmemiş bir doğrulukla kontrol etmesini

sağlayarak taşıyıcıların tutarlılığını ve tekrarlanabilirliğini sağlamıştır ve böylece probiyotik taşıyıcı sisteminin verimliliğini ve etkinliğinin artmasında etkili olmuştur. Ayrıca, mikroakışkan kapsülleme işleminde formülasyonun oluşturulmasında yüksek sıcaklıkların veya kimyasal katkı maddelerinin kullanımı gibi stres koşullarının düşük olması, probiyotik canlılığın korunmasını en üst düzeye çıkarmaktadır (K. Wang vd., 2024).

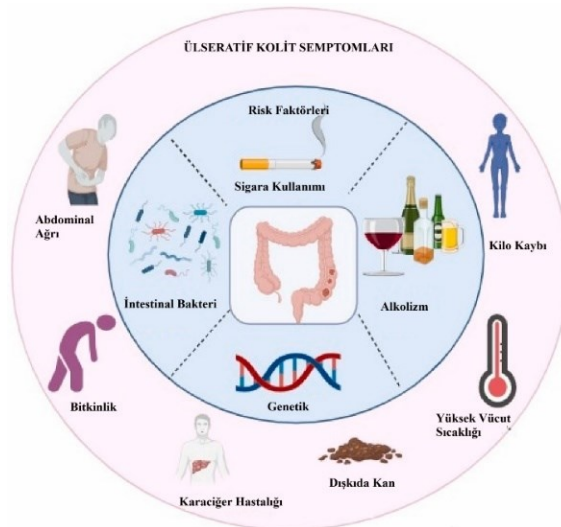
Bu çalışmada ÜK tedavisinde remisyonun sağlanması ve sürdürülmesi için bağırsak mikrobiyotasının desteklenmesi amacıyla kullanılabilecek bir probiyotik takviyesinin, etkin madde/probiyotik bakterisi kombinasyonu şeklinde gastrointestinal sistemin ortamından etkilenmeden oral olarak verilebilmesi için ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda etkin madde olarak ÜK için geleneksel tedavide kullanılan aminosalisilik asit grubundan bir etkin madde olan mesalazin ve probiyotik bakterisi olarak mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak üretilen *Lactobacillus casei* kullanılmıştır. Tedavi amaçla kullanılacak her iki ajanın ayrı ayrı ve kombine bir şekilde enkapsülasyonu için damlacık tabanlı mikroakışkan çip sistemi ile yağ içinde su (S/Y) emülsiyonu kakao yağı ile oluşturulmuştur. Hazırlanan sistemin kolona ulaşması için ise enterik kapsüle dolum gerçekleştirilmiş ve elde edilen bu sistemin in vitro olarak değerlendirilmesi yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ülseratif Kolit

ÜK, proksimal kolondan rektuma uzanan, mukozal inflamasyona neden olan kronik idiyopatik bağırsak hastalığıdır (Miyake vd., 2022). Kolonun mukozal ve submukozal tabakalarında oluşan inflamasyon ve ülserasyonlar ile karakterize olur. Esas olarak daha çok rektumu etkiler, ancak kalın bağırsağı da etkileyebilmektedir. Hastalığın tüm kolonda görülmesi (pankolit) ÜK hastalarının % 20-30'unda görülmektedir. Hastalığa sahip olanların % 20-30'u sol taraflı pankolite sahipken, kalan % 40-60'ında ise sadece rektosigmoid alanda inflamasyon görülmektedir. Bununla birlikte, yapılan bir araştırmada ÜK hastaların % 62'sinde pankolit, % 27'sinde sol taraflı kolit ve % 11'inde proktit bulunduğu ve bu dağılımın tüm ırk gruplarında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Fakat dikkat çekici bir şekilde, kadınların erkeklerden önemli ölçüde daha yüksek sol taraflı kolit riskine sahip olduğu gözlenmiştir (S. Kumar ve Kumar, 2022; Sobczak vd., 2014)

Hastalığın etiyojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, bugüne kadar yapılan araştırmalar, inflamatuvar bağırsak hastalığı patogeneğinde genetik, immünolojik, mikrobiyal, çevresel maruziyetler (sigara, stres, uyku vb.) ve mikrobiyal faktörlerin önemli rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca, kentsel yaşamın inflamatuvar bağırsak hastalığı riskini arttırdığına dair bazı hipotezler de mevcuttur (S. Kumar ve Kumar, 2022; Sobczak vd., 2014). Bütün bu faktörler çok önemli görünmekle birlikte hepsi hastalığın oluşmasında bir yere kadar etkisini göstermektedir. Hastalıkta görülen semptomlar ve olabilecek sebepleri Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Semptomlar ve risk faktörleri (Chauhan ve Harwansh, 2024)

Çok sayıda araştırma, genetik faktörler, çevresel faktörler, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve bağırsak mikrobiyotasındaki dengesizlikler gibi çeşitli faktörlerin ÜK patogeneziye katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçların elde edilmesine rağmen, ülseratif kolitin kesin patogenezi hala belirsizdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla bağırsak mikrobiyotasındaki disbiyozun hastalığın oluşmasına katkıda bulunan potansiyel bir faktör olduğuna dikkat çekilmiştir. Disbiyoz, probiyotik bakterilerinde azalma ve patojenik bakterilerde artış gibi bağırsak mikrobiyotasının bileşimi ve çeşitliliğindeki dengesizlik ile karakterize edilmektedir. Oluşan bu dengesizlik, bağırsak epitel hücre bariyerinin yapısını olumsuz yönde etkileyerek geçirgenliğin artmasına ve inflamasyonun şiddetlenmesine neden olabilmektedir (Haiou vd., 2024).

Kronik inflamasyon, ülseratif kolitin gelişimi ile yakından ilişkilidir. Kronik inflamasyon ek komplikasyonlara neden olmakla birlikte kolonorektal kanser riskinde artışa da sebep olmaktadır. Sağlıklı bir bağırsak mikrobiyotası, bağırsak epitel hücre bariyerinin onarımına katkıda bulunarak, bağışıklık sistemini modüle ederek ve önemli metabolik aktiviteleri (safra asitleri, amino asitler ve kısa zincirli yağ asitleri dahil) düzenleyerek bağırsak homeostazisinde önemli roller üstlenmektedir (Haiou vd., 2024).

2.2. Ülseratif Kolit Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar

ÜK tedavisinin birincil hedefleri hastaların yaşam kalitesini arttırmak, hastalığın remisyonunu sağlamak, ilişkili komplikasyonları ve tümörleri önlemektir. Ancak mevcut tedaviler hastaların sadece % 40'ında klinik remisyon sağlamaktadır. Diğer hastalarda ise cerrahi müdahale gerekmektedir. Bu nedenle yeni tedavi yaklaşımlarına ve ilaçlara ihtiyaç vardır (Haiou vd., 2024).

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında güncel tedaviler şu şekilde sıralanabilir:

- 1) Biyolojik olmayan tedaviler
 - a) Aminosalisilatlar
 - b) Kortikosteroidler
 - c) Kalsinörin İnhibitörleri
 - d) İmmünomodülatörler
 - e) Antimikrobiyal ajanlar
- 2) Biyolojik tedaviler
 - a) TNF- α İnhibitörleri
 - b) Anti-İntegrinler

- c) İnterlökin-23 İnhibitörleri
- d) Janus Kinaz İnhibitörleri
- 3) Diğer tedaviler
 - a) Cerrahi İşlemler
 - b) Farmakolojik Olmayan Tedaviler (Probiyotik Tedavisi) (Ferretti vd., 2022; Nidhi vd., 2016)

2.2.1. Biyolojik olmayan tedaviler

2.2.1.1. Aminosalisilatlar

Mesalazin, sulfasalazin, olsalazin ve balsalazid hafif ve orta dereceli ÜK tedavisi için ana seçenek olan aminosalisilat ilaç sınıfını oluştururlar. Aminosalisilatların geliştirilmiş olan çeşitli oral ve topikal formülasyonları, etkin maddeyi gastrointestinal sistemin farklı bölgelerine iletmek için geliştirilmiştir (Bozkır ve Koçyiğit, 1995). Proktit veya sol taraflı kolit durumunda, mesalazinin rektal uygulaması tavsiye edilmekte olup, kolonda yaygın kolit durumunda ise oral tedavi önerilmektedir. Oral tedavide etkinliği arttırmak için ilacın inflamasyon bölgesine seçici olarak verilmesine olanak sağlayan formülasyonlar geliştirilmeye çalışılmaktadır (Ferretti vd., 2022).

Aminosalisilatlar verildikten sonra mide bulantısı, kusma, anoreksiya, baş ağrısı vb. yan etkiler ortaya çıkar. Bu advers reaksiyonlar doza bağımlıdır ve ilacın kesilmesinden sonra hafiflemektedir (C. Li vd., 2022). Ağır koşullar için daha yüksek mesalazin dozları düşük dozlardan daha etkili olmasına rağmen, yüksek doz hastalarda toksisite riski oluşturmaktadır (Niu vd., 2021). Çoklu günlük dozları nedeniyle tedaviye düşük uyum bildirilmiştir. Bu durum, sonuçta tıbbi maliyetleri artıran ve hasta yaşam kalitesini olumsuz etkileyen sık kolit alevlenmelerine neden olmaktadır. Bu nedenle ilaca uygun taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve mevcut sistemlerin iyileştirme stratejileri çok fazla ilgi görmektedir (Mohanta vd., 2019).

2.2.1.2. Kortikosteroidler

Mesalazin ile yanıt alınamayan hafif ve orta ÜK hastalarında remisyonun indüksiyonunda kortikosteroidlerle tedavi önerilmektedir. Kortikosteroidlerin, topikal (fitiller, köpükler, lavmanlar) ve sistemik (oral, intravenöz veya intramüsküler) formülasyonları bulunmaktadır. Topikal formülasyonlar, aktif distal kolitte topikal mesalazini tolere edemeyen hastalarda tek başına veya mesalazine yeterli miktarda yanıt alınamayan hastalarda mesalazin ile kombine olarak kullanılmaktadır (Ferretti vd., 2022).

Ayrıca oral ve rektal mesalazın tedavisine yanıt vermeyen hastalar için oral prednizon veya budesonid multi-matriks sistemi ile tedavi sağlanmaktadır (Bozkır ve Koçyiğit, 1995).

Sistemik kortikosteroidler ciddi enfeksiyon riski, duygu durum bozuklukları, stria, diyabet, uykusuzluk, duygu durum bozuklukları, kilo alımı, hirsutizm, yüksek tansiyon, anormal yağ birikimi ve metabolik kemik hastalığı riski gibi bir dizi yan etkiye sebep olmaktadır. Sistemik kortikosteroidlerin, etkinlik eksikliği ve uzun süreli kullanımlarında önemli yan etkiler oluşturmaları sebebiyle hastalığın remisyonunun sürdürülmesi için önerilmemektedir (Bozkır ve Koçyiğit, 1995).

2.2.1.3. Kalsinörin inhibitörleri

Siklosporin A ve takrolimus kalsinörin inhibitörleri ilaç sınıfını oluşturmaktadır. Yüksek etkinliğe sahip olmalarına olası yan etkilerinin fazla olması sebebiyle kullanımları akut ciddi steroide dirençli ÜK, orta-şiddetli kortikosteroid ve tedaviye dirençli tiyopurin kullanmamış hastalarda remisyonun sürdürülmesi ile sınırlıdır (Ferretti vd., 2022). Bu tip hastalarda cerrahi tedaviye geçilmeden önce, kalsinörin inhibitörleri (siklosporin A, takrolimus) ve TNF- α inhibitörleri (infliksimab) gibi tedaviler uygulanmaktadır (Meier ve Sturm, 2011).

Olası yan etkileri nefrotoksisite, hipertansiyon ve nörotoksisitedir. Ayrıca siklosporin A tedavisinin enfeksiyon oluşturma riski bulunmaktadır (Ferretti vd., 2022).

2.2.1.4. İmmünomodülatörler

Ülseratif kolitin remisyonundan sonra idame tedavisi için kullanılan aminosalisilatlara yanıt vermeyen kortikosteroidlere bağımlı olan hastalarda kullanılmaktadırlar. Bu grupta azatiyoprin ve 6-merkapopürin yer almaktadır. Etkilerini düzenli olarak bağışıklık sisteminin tepkisinin baskılanmasıyla gerçekleştiren bu ilaçların etki etmesi uzun zaman almaktadır. Uzun süreli immünosupresan kullanımı hepatorenal hasara neden olabilmektedir (C. Li vd., 2022). İmmünomodülatörlerin ÜK remisyonunun sürdürülmesindeki başarısına rağmen, olası yan etkileri uzun süreli kullanımları için sınırlayıcı faktörlerden biridir. Özellikle, primer Epstein-Barr virüsü (EBV) enfeksiyonu olan 30 yaş altı veya 50 yaş üstü erkek hastalarda lenfoma gelişmesine sebep olabileceği kanıtlanmıştır (Ferretti vd., 2022).

2.2.1.5. Antimikrobiyal ajanlar

Clostridium difficile enfeksiyonu gibi durumlarda spesifik antimikrobiyal veya antiviral tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Enfeksiyon tespiti yok ise kullanımları önerilmemektedir. Bu grupta metronidazol, siprofloksasin vb. yer almaktadır (Gisbert ve Chaparro, 2018; Meier ve Sturm, 2011).

2.2.2. Biyolojik tedaviler

Moleküler biyolojide yaşanan gelişmelerle birlikte ÜK hastalığının tedavisi için yeni yöntemler ortaya çıkmaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalar sonucunda, gen terapisi, rekombinant peptitler ve TNF- α inhibitörleri olan monoklonal antikolar (infliksimab, adalimumab, sertolizumab vb.) gibi antikor bazlı terapileri içeren biyolojik tedaviler ortaya çıkmıştır (Nidhi vd., 2016). Ancak bu biyoteknolojik ürünlere ciddi enfeksiyonlar ve bazı lenfoma türleri için artan risk gibi önemli komorbiditeler de eşlik etmektedir (Rosenstiel vd., 2009).

2.2.2.1. TNF- α inhibitörleri

Aminosalisilatlarla, kortikosteroidlere ve immünomodülatörlere dirençli veya intoleranslı ÜK hastaların çoğunda biyolojik ürünlerle tedavide ilk seçenek TNF- α inhibitörleridir. İnfliksimab, adalimumab ve golimumab TNF- α inhibitörlerine örnek olarak verilebilir. Bu grupta infliksimab tedavide sıklıkla tercih edilmektedir (Hupé vd., 2024).

Bu tip ilaçların ana yan etkileri infüzyonla verilmelerinden kaynaklıdır (Ferretti vd., 2022). İnfüzyondan kaynaklı yan etkilerinin çoğu hafif ile orta şiddettedir. Kızarıklık, baş ağrısı, baş dönmesi, göğüs ağrısı, nefes darlığı, ateş veya kaşıntıdan oluşur. Yan etkilerin oluşmaması için kortikosteroidlerle birlikte kombine olarak kullanılması önerilmektedir (Meier ve Sturm, 2011).

2.2.2.2. Anti-İntegrinler

Orta ve şiddetli ülseratif kolitli hastalarda kortikosteroidlere tam yanıt alınamadığında tedavi seçenekleri sınırlıdır. Bu durumda ikinci basamak olarak TNF- α inhibitörleri (infliksimab) ve kalsinörin inhibitörleri (siklosporin A) kullanılmaktadır. Ancak sınırlı kanıtlara dayansa da bu tedavilere ek olarak yeni tedavi yöntemleri ortaya çıkmaktadır. Bunlardan birisi de orta ve şiddetli ülseratif kolitte etkili olduğu kanıtlanmış, integrin $\alpha 4\beta 7$ 'ye karşı monoklonal antikor olan vedolizumab'tır. Vedolizumabın

antiinflamatuvar etkisi geç başlar. Bu nedenle tedavi sırasında genellikle kortikosteroidlerle kombine olarak kullanılmaktadır (Suárez Ferrer vd., 2024).

2.2.2.3. İnterlökin-23 inhibitörleri

İnterlökin-23 inhibitörü olan ustekinumab geleneksel tedaviye yanıt vermeyen orta ve şiddetli ülseratif kolitli hastalarda kullanılabilir. Plaseboya kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bir klinik remisyon oranına sahip olduğu bilinmektedir. İndüksiyon ve idame tedavisinde yan etki bakımından plasebo ile arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Ancak uzun süreli retrospektif bir çalışmada, bir ciddi yan etki (anal adenokarsinom) görüldüğü bildirilmiştir (Ferretti vd., 2022).

2.2.2.4. Janus kinaz inhibitörleri

Janus kinaz inhibitörleri, romatoid artrit ve sedef hastalığı da dahil olmak üzere immün sistem aracılı inflamatuvar hastalıkların gelişiminde rol oynayan çok sayıda proinflamatuvar sitokinler üzerinde hücre içi etkiye sahip molekül sınıfıdır. Bir janus kinaz 1/3 reseptör inhibitörü olan tofasitinibin orta ve şiddetli ÜK tedavisi için onaylanmıştır. Tofasitinibin yan etki bakımından güvenli bir profil çizse de LDL ve HDL düzeylerinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca tedavide doza bağlı olarak Herpes zoster enfeksiyonu geliştiği görülmüştür. Ayrıca tofasitinibinin etkinliği ve güvenliğine ilişkin veriler hala yeterli değildir (Ferretti vd., 2022).

Tedavide kullanılan ilaçların uzun süreli kullanımı, birçok yan etkiye sebep olmaktadır. Bu durum ÜK hastalarının yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Kullanılan ilacın sistemik olarak neden olacağı yan etkilerin bertaraf edilmesi gerekmekte olup, bu amaçla kolona özgü ilaç iletimi sağlayan formülasyonların geliştirilmesine ihtiyaç vardır (Nidhi vd., 2016).

Bununla birlikte, mevcut bu tedaviler mide bulantısı, ateş, iştahsızlık gibi olumsuz etkilere sahip olmakla beraber böbrek disfonksiyonu, damar rahatsızlıkları ve hepatotoksisite gibi uzun vadeli komplikasyonlara da neden oldukları bilinmektedir. Ayrıca bu tedavilerin oldukça fazla değişkenlik gösteren nüks oranları sebebiyle hastaların uyumu düşüktür (Elkholy vd., 2023).

2.2.3. Diğer tedaviler

2.2.3.1. Cerrahi işlemler

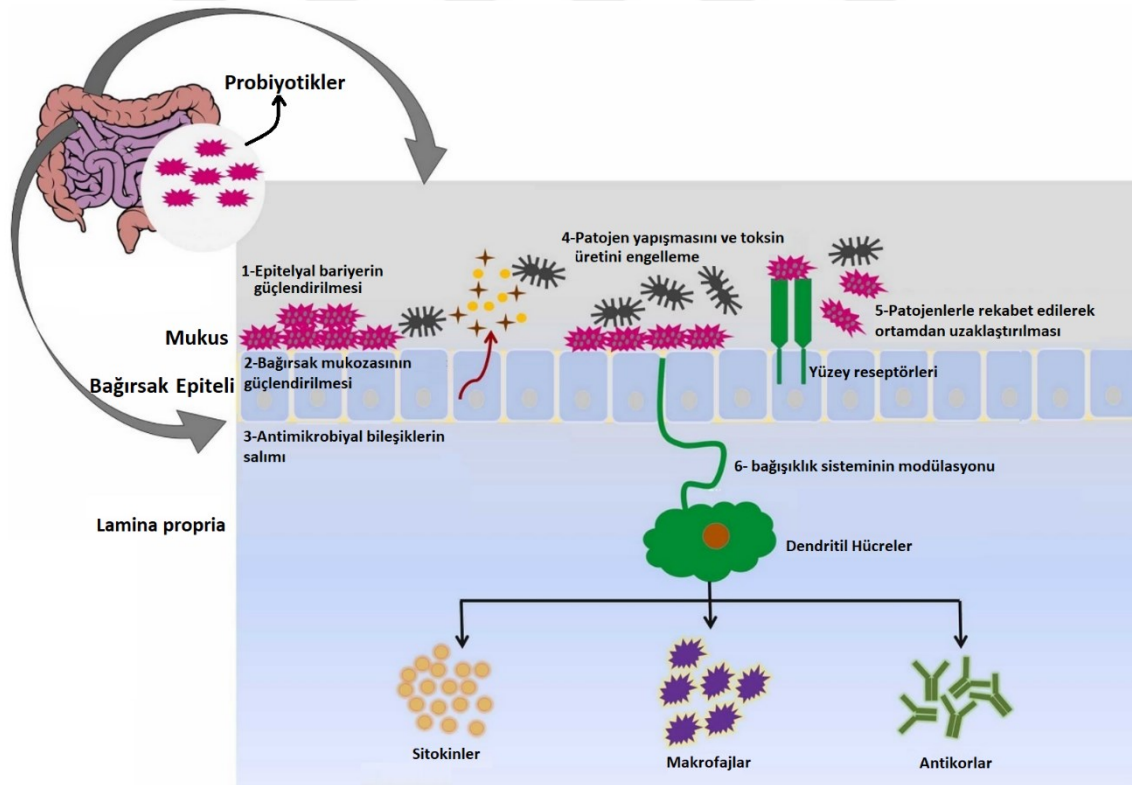
ÜK hastalarının % 10-15'i hastalığın doğal seyri sırasında cerrahi müdahaleye maruz kalmaktadır. Cerrahi işlemlerle tedavide genellikle total proktokolektomi ve ileal poş anal anastomoz işlemleri yapılmaktadır (Ferretti vd., 2022).

Bu tip tedavi yöntemleri, özellikle dirençli şiddetli ülseratif kolitte yalnızca son çare olarak ve aynı zamanda spesifik risk faktörleri olan hastalarda (neoplastik gelişim riski olan hastalarda) bir seçenek olarak düşünülmelidir (Øresland vd., 2015).

2.2.3.2. Farmakolojik olmayan tedaviler

2.2.3.2.1. Probiyotikler

Dünya Sağlık Örgütü probiyotikleri, bağırsak mikroekolojik dengesini iyileştirerek konakçılara fayda sağlayan mikroorganizmalar olarak tanımlamaktadır. Probiyotikler, bu yararlarını çeşitli mekanizmalar yoluyla sergileyebilir (He vd., 2024). Probiyotiklerin bağırsak ortamındaki etki mekanizması Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Probiyotiklerin insan vücudundaki etki mekanizması (Meenu vd., 2024)

Probiyotikler yeterli sayıda uygulandığında konak sağığına fayda sağılayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Probiyotikler, bu yararlarını çeşitli mekanizmalar yoluyla sergileyebilir.

1. Bakterisidal maddelerin üretimi ve salınımı ile bağırsakta patojenik bakterilerin kolonizasyonunu azaltarak bağırsak florasını düzenleyebilirler.
2. İnflamatuvar sitokinlerin salınımı azaltarak, immün sistem stimülasyonu indükleyerek ve bağırsakla ilişkili gen ekspresyonunu modüle ederek konak bağıışıklığını destekleyebilirler.
3. Lipit ve glukoz metabolizmasını düzenleyerek obeziteyi ve obeziteye bağı kronik hastalıkları önleyebilirler.
4. Reaktif oksijen türlerini temizleyebilir, enzim ve enzim dışı antioksidan aktiviteleri regüle edebilir ve böylece lipit peroksidasyonunu azaltabilirler.
5. Antimikrobiyal etkileri olan metabolitleri sentezleyerek, toksinleri değıştirerek ve patojenlere karşı spesifik ve spesifik olmayan bağıışıklık sistemi tepkilerini aktive ederek enfeksiyonlara karşı korunmaya yardımcı olurlar.
6. Bağırsak mukozasını güçlendirerek bağırsak bariyer bütünlüğünü artırır (Gu vd., 2022; S. Yang vd., 2024).

Küresel probiyotik pazarının 2021 yılında yaklaşık 61,1 milyar ABD doları değıerinde olduğı, 2026 yılında ise 91,1 milyar ABD dolarına kadar ulaşması beklenmektedir. Bu veriler ışığında probiyotik ürünlerinin güçlü bir pazar potansiyeline sahip olduğı görölmektedir (He vd., 2024).

Probiyotikler üzerine araştırmalar 1857 yılında, Louis Pasteur'un sütün ekşime sürecini incelerken ilk kez laktik asit bakterilerini gözlemlemesiyle başlamıştır. Son yıllarda, yeni probiyotikleri keşfetmek, biyolojik aktivitelerini karakterize etmek ve potansiyel pozitif sağılık etkilerini belirlemek için endüstriyel ve bilimsel araştırmalar yapılmaktadır (He vd., 2024).

Probiyotikler, geleneksel (çoğunlukla insan örneklerinden izole edilen çeşitli *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri), yeni nesil (yeni kültür teknikleri, genom ve metagenom uyarlamaları sayesinde ihtiyaçlara göre geliştirilmiş probiyotikler) ve tasarlanmış (bakteri biyolojisinin yapay olarak değıştirilerek elde edilerek doğrudan veya dolaylı olarak kullanılan probiyotikler) olarak sınıflandırılabilirler (S. Yang vd., 2024).

Çok sayıda çalışma, probiyotik içeren gıdaların potansiyel sağılık yararlarının bulunduğunu kanıtlamıştır. Örneğin, 8 hafta boyunca probiyotik yoğıurtlarla

(*Lactobacillus acidophilus* La5 ve *Bifidobacterium lactis* BB12 içeren) beslenen alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı bulunan hastaların, serum alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, toplam kolesterol ve LDL gibi sağlık biyobelitelerinde pozitif gelişmelere sebep olduğu görülmüştür (He vd., 2024). Ayrıca probiyotiklerin, antibiyotiklerin bağırsak mikrobiyomu üzerindeki negatif etkisini hafifleterek ve antibiyotiğe dirençli bakterilerin oluşmasını engelleyerek *Helicobacter pylori* hastalarına faydalar sağlar. Böylece *Helicobacter pylori*'ye karşı yapılan tedavinin başarı oranını artırır (S. Yang vd., 2024).

Bir başka çalışmada biyolojik olarak tasarlanmış *Escherichia coli* suşunun, patojenik *Pseudomonas aeruginosa*'yı öldürebilen bir metabolit olan piyosinin üretmesi sağlanmıştır. Bu sayede bahse konu patojene karşı etkinlik sağlanmıştır (S. Yang vd., 2024).

Gelecekte, daha spesifik işlevlere ve hedeflenen sağlık yararlarına sahip probiyotik ürünlerinin geliştirilmesine yönelik bir eğilim bulunmaktadır. Özellikle gelecekteki belirli sağlık sorunlarının giderilmesi amacıyla probiyotik ürün formülasyonlarının geliştirilebileceği düşünülmektedir (He vd., 2024).

2.2.3.2.2. Probiyotiklerin ülseratif kolit tedavisinde kullanımı

Başta biyolojik ajanlar olmak üzere, inflamatuvar bağırsak hastalığını için halihazırda mevcut olan tedaviler, antienflamatuvar etkileriyle hastalığın tedavisini sağlarken inflamasyonun oluşmasına neden olan veya katkıda bulunan bağırsak mikrobiyotasını hedef almazlar. Bu da hastalığın tekrarlamasına ve yüksek yan etki oluşumuna neden olur. Bağırsak mikrobiyotasını normalleştirmek için mikrobiyotaya dayalı beslenme stratejilerinin umut verici terapötik hedefler olabileceği görülmüştür (Xia vd., 2023). Ayrıca bağırsak mikrobiyotasının, ÜK etiyolojisinde etkin rol oynadığı düşünülmektedir (Derikx vd., 2016).

Bağırsak florasını düzenlemek için probiyotikler, prebiyotikler ve sinbiyotikler kullanılmaktadır. Probiyotikler canlı mikroorganizmalar olup, konakçı epiteline bağlanırlar, bağırsaktaki mikrobiyotayı ayarlar ve düzenlerler.

Son yıllarda artan sayıdaki klinik çalışmalarda probiyotikler ülseratif kolitli hastalarının semptomlarını etkili bir şekilde hafifletebilmektedir. Bu nedenle ilerleyen zamanlarda bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesi ülseratif kolitin tedavisinde yüksek etkiye sahip tedavi yaklaşımı olarak değerlendirilebilecektir (Haiou vd., 2024). Bu sebeple bağırsak mikrobiyotasının probiyotikler ve prebiyotiklerle manipülasyonu ÜK

tedavisinde önemli bir tedavi yaklaşımı olarak görülmektedir. ÜK hastalarında iyileşmenin hem başlatılması hem de sürdürülmesi için çeşitli tedavi çalışmaları yapılmıştır (Derikx vd., 2016).

Bahse konu çalışmalarda *Escherichia coli nissle* 1917, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus fermentum*, *Bacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* bakterilerinin yanı sıra Renata Vesely vd. tarafından geliştirilen *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei* *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium breve* içeren VSL#3 isimli probiyotik karışımı denenmiştir (Derikx vd., 2016; Dhillon ve Singh, 2020).

Escherichia coli nissle 1917 ile yapılan çalışmada remisyonu sürdürmedeki etkinliğin mesalazine eşdeğer olduğu gözlenmiştir. *Bacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* ve fekal streptokoklar içeren probiyotik desteğinin kullanıldığı bir başka çalışmada ise interlökin-10 ve immunoglobulin-A ekspresyonunun artmasıyla birlikte klinik semptom oluşumunda azalma olduğu gözlenmiştir (Dhillon ve Singh, 2020).

Bağırsak mikrobiyotasını manipüle etme yetenekleri göz önüne alındığında, *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* cinsleri gibi probiyotiklerin, inflamasyonla ilgili çeşitli hastalıklarda potansiyel faydalarının olduğu kabul edilmektedir. Hastalarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalar, probiyotiklerin özellikle mikrobiyotayı yöneterek inflamatuvar bağırsak hastalığını hafifletebileceğini göstermiştir. 2019'da yayınlanan bir meta-analizde araştırmacılar, probiyotik bakterilerinin, özellikle de *Bifidobacterium* spp.'nin ülseratif koliti iyileştirdiğini belirtmişlerdir (Xia vd., 2023).

Ma vd. (2020) yapmış oldukları bir çalışmada *Lactobacillus pentosus*'un dekstran sülfat sodyum (DSS) ile indüklenen ülseratif kolon enflamasyonunu bağırsak florasını destekleyerek hafiflettiğini gözlemlemiştir (Ma vd., 2020). Bir başka çalışmada Jeong vd. (2015) *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* C29 suşunun yaşa bağımlı ülseratif kolitin baskılanmasında başarılı olabileceğini gözlemlemiştir (Jeong vd., 2015).

Bunun sonucunda hastaların genel olarak probiyotik bakteri preparatlarını iyi tolere edebilmesi ve hasta uyumlarının yüksek olması sebebiyle ÜK hastalığında terapötik bir alternatif seçenek olarak ortaya çıkmaktadır.

2.2.3.2.3. *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei gram pozitif, spor oluşturmeyen, katalaz negatif ve fakültatif heterofermentatif laktobasillerdir (Cui ve Qu, 2021; Yörük ve Güner, 2011). Fermente süt, sebze ve tahıl ürünlerinin yanı sıra insan ve hayvanların gastrointestinal sistemi gibi çeşitli habitatlarda bulunurlar. *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus paracasei* üzerinde endüstriyel değerleri ve sağlığı geliştirici potansiyelleri nedeniyle çok fazla çalışma yapılmaktadır (Deng vd., 2021).

Laktik asit bakterileri (özellikle *Lactobacillus* cinsinin türleri), antienflamatuvar, antikanser ve immünomodülatör etkinlikleri sebebiyle dikkat çekmektedir (Zhu vd., 2023). Günümüzde yapılan birçok çalışma sonucunda, *Lactobacillus casei* probiyotik bakterisinin bağırsak mikrobiyotasını düzenleyerek immünomodülatör etki gösterdiğini bu sebeple inflamatuvar bağırsak hastalığında kullanılabileceğini göstermektedir (Deng vd., 2021).

Zhu vd. (2023) çalışmalarında *Lactobacillus casei* ATCC393 suşunun bağırsak bariyeri işlev bozukluğunun giderilmesine yardımcı olduğunu gözlemlediler (Zhu vd., 2023).

2.3. Ülseratif Kolit Tedavisinde Mesalazin/Probiyotik Kombine Tedavi Yaklaşımı

Günümüzde mesalazin, ÜK için birinci basamak ilaçtır. Mesalazin için çeşitli kolon hedefli ilaç dağıtım sistemleri daha önce rapor edilmiştir. Guar sakızı ile Eudragit S100 kaplı tabletleri, hidroksi propil metil selüloz E-15 ile Eudragit S100 kaplı tabletleri ve kitosan/Eudragit S100 bazlı mesalazin mikroküreleri bunlardan bazılarıdır. Ancak söz konusu hastalık sebebiyle gastrointestinal sistem ortamının pH'sı değişkenlik göstermektedir. Bu durum formülasyonlardan erken ilaç salımı gibi bazı problemlere sebep olmaktadır. Bu nedenle son yıllarda araştırmacılar başarılı bir tedavi elde etmek için diğer ilaçlar/probiyotikler/prebiyotiklerle birlikte mesalazinin oral formülasyonunu geliştirmek için çalışmalar yapmaktadırlar (Kaur vd., 2020). Örneğin Mohanda vd. (2019) gerçekleştirdiği bir çalışmada guar sakızı-eudragit S100 kaplı mesalazin tabletlerinin modifiye elma polisakkariti (prebiyotik) tableti ve probiyotiklerle kombine kullanımı sonucunda tedavi potansiyelinin maksimum seviyede gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Bu çalışma modifiye elma polisakkariti tabletinin prebiyotik etkisi göstererek probiyotikle beraber bağırsak florasını düzenlemek suretiyle mesalazin ile yapılan tedaviye yardımcı olduğunu göstermiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında mesalazinin modifiye elma polisakkariti (prebiyotik) ve probiyotiklerle kombine edilerek kullanımının ülseratif

kolitin etkili bir şekilde tedavi edilmesinde büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (Mohanta vd., 2019).

Bununla birlikte probiyotiklerin faydalı etkilerini gösterebilmeleri için bağırsak ortamında yeteri miktarda kolonize olmaları gerekmektedir (Rodrigues vd., 2020). Probiyotikler, ısıya, oksijene, su aktivitesine, pH'ya, enzimlere, safra tuzlarına ve diğer stresli koşullara karşı oldukça hassas olmalarının yanı sıra insan gastrointestinal sisteminden geçişleri sırasında canlılıklarını kaybetme eğilimindedir. İyi tasarlanmış bir probiyotik kapsülleme sistemi, probiyotiklerin gastrointestinal sistemdeki canlılığını artırabilir, böylece daha fazla canlı bakterinin kolona aktif bir biçimde ulaşmasını sağlayabilir (Gu vd., 2022).

Birçok çalışma *Lactobacillus casei* suşlarının insanlarda bağırsak mikroflorasını stabilize ederek, patojenik mikroorganizmaların gelişimini engelleyerek, laktoz intoleransı semptomlarını ortadan kaldırarak veya en aza indirerek, antibiyotik sonrası diyarenin oluşumunu engelleyerek ve bağırsak peristaltik hareket bozukluklarını düzenleyerek etki edebileceğini göstermiştir. Ayrıca, probiyotik bakterileri takviyesinin insan bağışıklık sistemini destekleyebileceği ve kan kolesterolünün düzenlenmesini sağlayabileceği gösterilmiştir (Jarocki vd., 2020).

Probiyotikleri enkapsüle etmek için ekstrüzyon, emülsiyon, sprey kurutma, sprey soğutma ve akışkan yatak vb. farklı kapsülleme teknikleri kullanılmaktadır. Uygun kapsülleme malzemelerinin seçimi üretilen partiküllerin stabilitesi için önemlidir. Bu malzemeler toksik olmamalı ve kapsüllenmiş mikrobiyal hücreleri çevresel faktörlerden korumalıdır. Ayrıca bağırsak yolunda salımı kontrol etmelidirler (Rodrigues vd., 2020). Püskürterek kurutma ile probiyotik mikrokapsüllerin hazırlanması sırasında probiyotikler ısı ve dehidrasyon stresine maruz kalır, bu da canlı probiyotik organizmaların sayısında azalmaya neden olur. Ayrıca püskürterek kurutma uygulaması uzun ve maliyetli bir yöntemdir. Püskürterek kurutma yöntemine göre, dondurarak kurutma yönteminin koşulları nispeten yumuşaktır, ancak dondurarak kurutma işlemi sırasında buz kristalleri probiyotik hücre zarına zarar vererek canlı probiyotik organizmaların sayısında azalmaya neden olabilmektedir. Probiyotik hücrelerinin canlılığı açısından ekstrüzyon yöntemi diğer iki yöntemle göre ılımlı koşullara sahiptir, ancak ekstrüzyon ile hazırlanan mikrokapsüllerin boyutu nispeten daha büyüktür. Bu durum da sistemin uygulanabilirliğini sınırlar. Emülsifikasyon yöntemi ile hazırlanan mikrokapsüllerin boyutları 25 µm ile 2 mm arasında değişmektedir ve şekillerini kontrol etmek zordur (Xu

vd., 2022). Genel olarak hücre kapsülleme için çok sayıda yöntem mevcut olmasına rağmen, tekrarlanabilirlik, üretim kolaylığı, değişken boyut dağılımı ve üniform olmayan morfoloji açısından sınırlamaları mevcuttur (Alkayyali vd., 2019). Probiyotikleri enkapsüle etmek için seçilen tekniğin, kapsüllenmiş hücrelerin yeterli canlılığına zarar vermemesi ve uygulama amacına uygun mekanik stabiliteye sahip olması son derece önemlidir (Rodrigues vd., 2020).

Tursi vd. (2004) hafif ve orta derece ÜK tedavisinde düşük doz balsalazid ile VSL#3 içeren kombinasyonunu, yalın balsalazid ve yalın mesalazin ile karşılaştırmıştır. Çalışmanın sonucunda probiyotik kombinasyonunun, yalın tedavilere oranla daha yüksek remisyon oranına ve daha hızlı remisyon başarısına sahip olduğunu kanıtlamışlardır (Derikx vd., 2016).

Palumbo vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada mesalazin ve üç suşun (*Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidus*'un BGN4 suşu) probiyotik karışımından oluşan kombine tedavi, orta ile şiddetli ÜK hastalarında araştırılmıştır. Bu çalışmada, hastaların bir kısmına günde tek doz mesalazin tedavisi ve diğer kısmına ise mesalazin ve probiyotik kombinasyon tedavisi iki yıl boyunca uygulanmıştır. Çalışma sonucunda, tek başına mesalazine kıyasla kombinasyon tedavisinde klinik durumda, hastalık indeksinde, dışkılama sıklığında, endoskopik görüntülemelerde ve rektal kanamada daha yüksek iyileşme gözlemlendiği bildirilmiştir (Dhillon ve Singh, 2020).

Diğer bir çalışmada Pilarczyk Zurek vd. (2017) tarafından üç probiyotik suş (*Lactobacillus plantarum* PL02, *Lactobacillus rhamnosus* KL53A ve *Bifidobacterium longum* PL03) ve mesalazin içeren kombine tedavinin ÜK hastalarında remisyonu başlatma ve sürdürmede terapötik olarak etkin olduğu bildirilmiştir (Pilarczyk Zurek vd., 2017).

Lactobacillus casei, bağırsak mikrobiyotasında önemli bir yerinin olmasının yanı sıra, konağın bağışıklık sistemini düzenleme gibi yararlı bir işleve sahip olması ve yapılan çalışmalarda ülseratif kolitte yararlı etkilerinin gözlenmesi sebebiyle bu çalışmamızda mesalazinle birlikte kombine enterik formülasyonunun hazırlanması planlanmıştır.

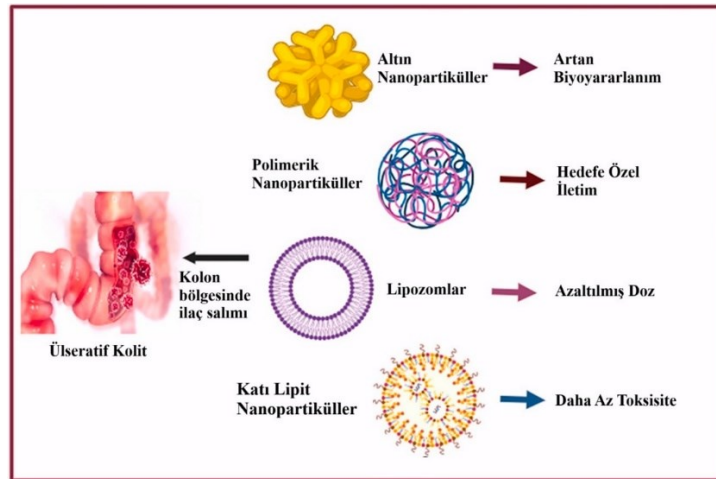
Bununla birlikte kolona hedefli ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi daha çok üç ana sebepten kaynaklanmaktadır. Bunlar:

1. Kolonda yapılacak olan lokal tedavilere olanak sağlamak.

2. Protein yapılı gastrointestinal sistemden etkilenen ilaçların oral yollar verilebilmesini sağlamak.
3. Uzatılmış etkili preparatların geliştirilmesidir (Tuğcu-Demiröz F ve Acartürk F, 2002).

2.4. Ülseratif Kolit Tedavisi İçin Kullanılan İlaç Taşıyıcı Sistemler

ÜK tedavisinde en önemli zorluk etkin maddeye uygun kolona özgü hedeflenmenin sağlanmasıdır. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında geleneksel tedavi stratejileri direkt olarak inflamasyon bölgelerini hedef almadığı için yalnızca sınırlı bir etkinlik gösterirler. Ayrıca, geleneksel ilaç formülasyonları kullanıldığında etkin maddenin sistemik olarak dağıtımından kaynaklı ciddi yan etkilerin ortaya çıkma ihtimali de artmaktadır. Bu nedenle, ÜK tedavisinde doğrudan hastalık bölgesine hedefli bir ilaç taşıyıcı sistemin oluşturulması tercih edilmektedir. Etkin maddenin kolonda lokalizasyonu için iyi tasarlanmış bir ilaç dağıtım sisteminin geliştirilmesi, terapötik etkinliğin artmasını sağlar. Kolon hedefli oral ilaç dağıtım sistemleri pH, mikroflora, geçiş süresi, basınç ve ozmotik potansiyel gibi kolonun karakteristik fizyolojik koşullarından yararlanmaktadır. Kolona hedefleme için ön ilaç tasarlanması, zaman kontrollü salım sistemi, pH kontrollü salım sistemi, çoklu partikül sistemi, mikropartikül sistemi, nanopartikül sistemi, probiyotik yaklaşımı gibi birçok yaklaşım vardır. Mikropartikül sistemi, inflamasyon bölgesine spresifik kontrollü etkin madde taşınması için en ideal yaklaşımlardan biridir. Mikropartiküller, partikül çapı 1 ila 1000 µm arasında değişen, doğal veya sentetik polimerlerden oluşan küçük partiküllerdir (X. Li vd., 2020; Nidhi vd., 2016). Şekil 2.3'te ÜK için hedefe yönelik ilaç taşıma sistemleri ve faydaları gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Ülseratif kolitte ilaç taşıyıcı sistemler (Chauhan ve Harwansh, 2024)

pH'ya duyarlı sistemler, ilacın ortama salınması için gastrointestinal kanalın pH değişimlerine duyarlı yardımcı maddelerin kullanımı ile hazırlanırlar. Ön ilaç tasarlanmasında, kolon mikrobiyotasında yer alan bakterilerin enzimatik aktivitesiyle ön ilacın etkin maddelere ve taşıyıcı moleküllere dönüşmesi sağlanır böylece etki sağlanır. Zamana bağlı dağıtım sistemlerinde, etkin maddeyi önceden belirlenmiş zaman aralığında gastrointestinal kanalının istenilen bir bölgesine taşımak için kanaldan geçiş sürelerinin ayarlanması sağlanmaktadır. Basınç kontrollü dağıtım sistemlerinde, peristaltik hareketin neden olduğu yüksek kolonik basınç yardımıyla etkin madde salımı sağlanır. Osmotik kontrollü dağıtım sistemlerinde ise yarı geçirgen bir zar, etkin maddenin salınmasını kontrol eder (X. Li vd., 2020).

2.5. Nanopartikül İlaç Taşıyıcı Sistemler

Kontrollü ilaç taşıma sistemleri, geleneksel ilaç formlarına kıyasla birçok avantaja sahiptir. Bu sistemler ile etkin maddenin sadece etki yerinde etki göstermesi sağlanır. Dolayısıyla diğer dokular üzerindeki etkisi ve istenmeyen yan etkileri en aza indirilebilir. Etkin maddenin sadece hedef bölgedeki miktarı artar. Sonuç olarak kullanılan etkin madde dozu daha düşük olur (Wilczewska vd., 2012).

Ulusal Nanoteknoloji Girişiminin tanımlamasına göre, nanopartiküller 1 ila 100 nm arasında değişen boyutlardaki yapılardır. Ayrıca, nanopartikül kelimesindeki “nano” ön eki genellikle birkaç yüz nanometreye kadar olan partiküller için kullanılmaktadır (Wilczewska vd., 2012).

Nanopartiküller, lipozomlar, nanoemülsiyonlar ve mikroemülsiyonlar gibi nanoteknoloji bazlı taşıyıcılar, enkapsüle edilmiş etkin madde için koruyucu bir yapı ve daha yüksek çözünürlük sağlayan, hasta uyumuna yardımcı olan, bununla birlikte biyoaktif ürünlerin taşınması için başarılı bir şekilde kullanılan ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Mitsou vd., 2020). Nanopartiküller, sudaki çözünürlüğü az olan etkin maddelerin daha verimli bir şekilde verilmesini, kan dolaşımına daha iyi geçmesini sağlayarak ya da bölgeye özgü bir şekilde hedeflendirilerek etkilerini sağlar. Ayrıca boyut olarak küçük olan nanopartiküller, çok önemli fizikokimyasal ve biyolojik özellikler sergiler. Örneğin, etkin maddenin hücre veya doku bariyerlerini geçebilme özelliklerini artırır. (B. Kumar vd., 2017).

Etkin madde için uygun bir taşıyıcı tasarlanırken; stabilite, raf ömrü, biyoyoumluluk, biyolojik dağıtım, hedefleme, işlevsellik, etkin madde yükleme

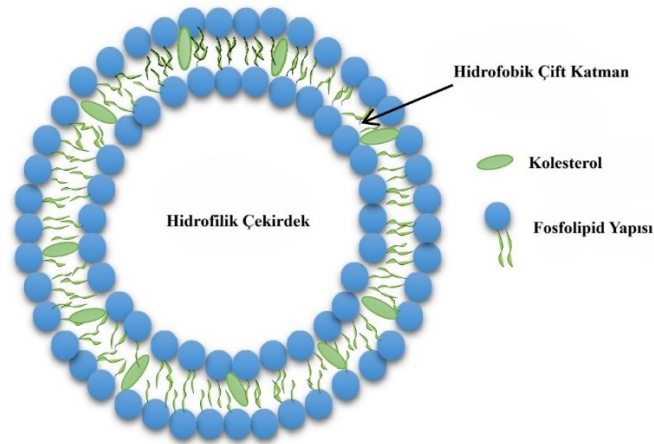
kapasitesi ve etkin maddenin serbest bırakılması gibi çeşitli parametrelerin değerlendirilmesi gerekmektedir (B. Kumar vd., 2017). Tıbbi uygulamalarda nanopartiküllerin etkili ve güvenli bir şekilde kullanılmasını sağlamak için, bir nanopartiküler sistemi oluşturan materyal ile ilgilenilen biyolojik sistem arasındaki ilişki iyi araştırılmalı ve karakterize edilmelidir. Kullanılacak materyalin biyouyumluluk çalışmaları, taşıyıcı sistemin etki edeceği ortama uygun olarak gerçekleştirilmelidir (Naahidi vd., 2013).

Bir etkin madde ilaç taşıyıcı sistemin yüzeyine adsorbe edilebilir, kovalent olarak tutturulabilir veya başka şekilde kapsüllenebilir (Wilczewska vd., 2012).

Lipozomlar, katı lipit nanopartiküller, dendrimerler, polimerik nanopartiküller, silikon veya karbon nanopartiküller ve manyetik nanopartiküller, ilaç taşıyıcı sistemleri olarak test edilmiş nano taşıyıcı örnekleridir (Wilczewska vd., 2012).

2.5.1. Lipozomlar

Lipozomlar ilk ilaç taşıyıcı sistem olarak ortaya çıkmış olup, 80–300 nm boyut aralığında olan nano/mikro-partiküler veya kolloidal taşıyıcılardır (Kreuter, 2001). Yapısal olarak sulu faz, lipitler, fosfolipitler ve steroidler veya diğer surfaktanlardan oluşan biyolojik zarlara benzeyen küresel veziküllerdir (Bozkır ve Koçyiğit, 1995; Kreuter, 2001). Lipozomların yapısı Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4. Lipozomun yapısı (Nsairat vd., 2022)

Lipozomların, etkin maddelerin çözünürlüğünü arttırdığı, kemoterapötik ajanların terapötik endeksi gibi farmakokinetik özelliklerini geliştirdiği, hızlı metabolize olma ve

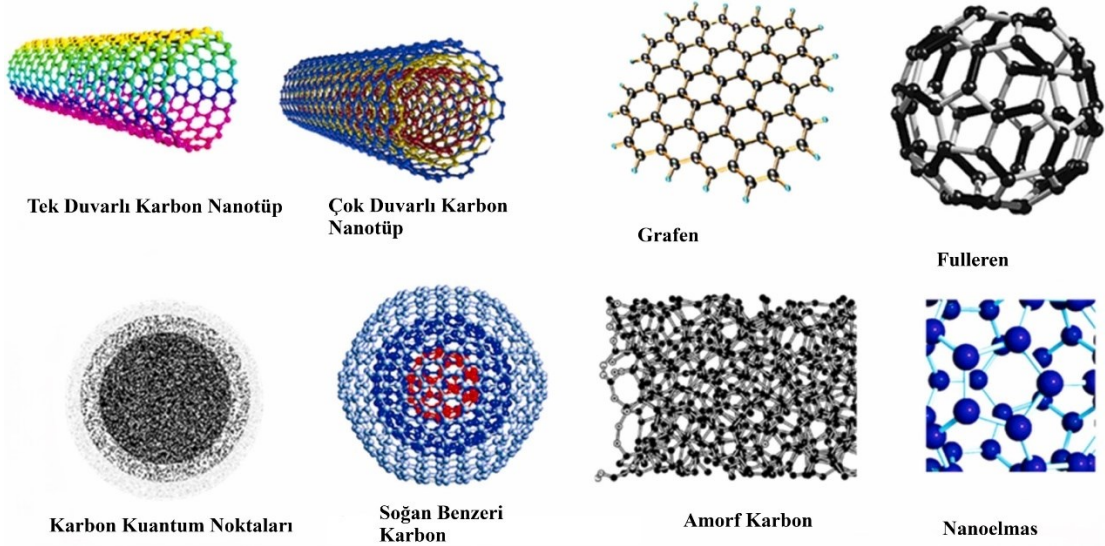
zararlı yan etki oluşumunu gibi olumsuz durumlarını azalttığı, bununla birlikte in vitro/in vivo antikanser aktivitelerini arttırdığı rapor edilmiştir (Kreuter, 2001).

Etkin maddenin lipozomlardan salınması, lipozomun bileşimine, pH'a, ozmotik gradyana ve salım ortamına bağlıdır. Lipozomların hücrelerle etkileşimi, adsorpsiyon, füzyon, endositoz ve lipit transferi ile gerçekleştirilebilir (Kreuter, 2001).

2.5.2. Karbon nanomateriyaller

Fullerenler, nano-elmaslar ve nanoköpükler gibi karbon bazlı polimerler de nanopartikül araştırmalarının önde gelen alanlarını temsil etmektedir. Fullerenler, C_{60} atomlarından meydana gelen tek duvarlı veya çok duvarlı nanotüplerden oluşmuştur (Naahidi vd., 2013).

Karbon nanomateriyallere üç farklı şekilde etkin madde taşıma yöntemi vardır. Bunlar: karbon nanotüpünde etkin maddenin kapsüllenmesi, yüzeyde kimyasal adsorpsiyon ve nanotüpler arasındaki boşluklarda etkin maddenin aktifleştirilmiş karbon nanotüplere bağlanmasıdır (Kreuter, 2001). Karbon nanomateriyallerin yapıları Şekil 2.5'te verilmiştir.



Şekil 2.5. Karbon nanomateriyallerin yapısı (Brindhadevi vd., 2023)

Karbon nano materyallerin biyoyumlulukları ile ilgili olarak, karbon nanotüplerin bazı durumlarda kompleman sistemini aşırı uyarak iltihaplanma ve granülom oluşumuna neden olabileceği bildirilmiştir. İnsanlarda karbon nanotüplerin oksidatif stres, apoptoz, nanotüp sentezindeki metal kalıntılarına bağlı toksisite, lipit peroksidasyonu, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, hücre morfolojisindeki

değişiklikler ve trombosit agregasyonu gibi dezavantajları bulunmaktadır. Ancak, bazı çalışmalar karbon nanotüplerinin saflaştırıldığında inflamatuvar bir yanıtın ortaya çıkmadığını göstermektedir. Her ne kadar karbon nanotüp toksisitesinin ve geniş çeşitlilikteki toksikolojik tepkilerin belirsizliği sebebiyle dikkatli olunması gerekse de, karbon nanotüplerin toksik etkileri hakkındaki çelişkili veriler bulunması sebebiyle daha geniş araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, karbon nanotüp bazlı biyomalzemelerin modifikasyonu ve/veya kaplanması, ilaç verme gibi uygulamalar için uygun taşıyıcılar olarak yeteneklerini arttıracasına inanılmaktadır (Aqel vd., 2012).

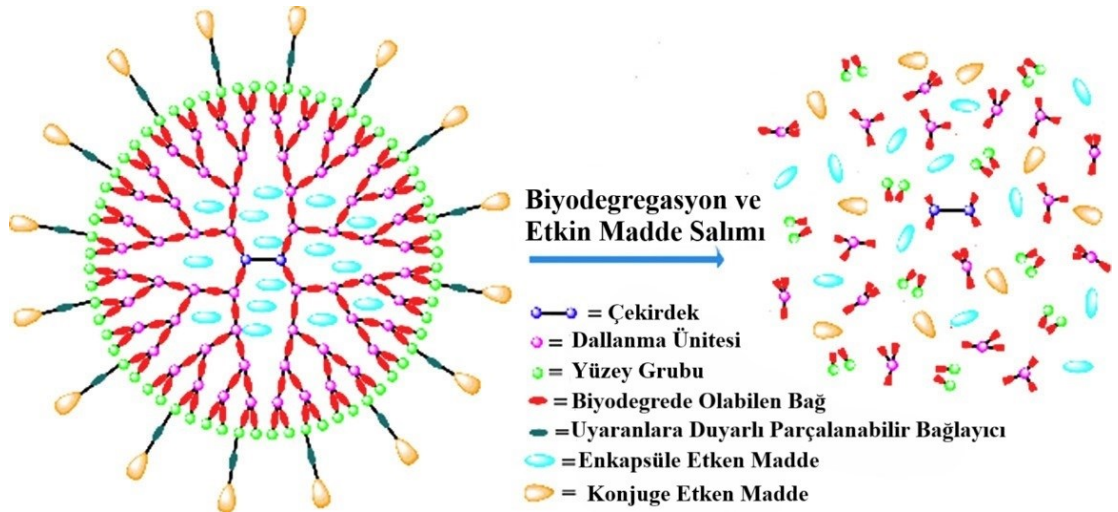
2.5.3. Dendrimerler

Dendrimerler, üç boyutlu ve çok dallı yapıya sahip sentetik polimer ailesidir. Dendrimer terimi, dendrimerlerin kendine özgü “ağaç benzeri” dallanmış yapılara sahip olması sebebiyle Yunancada “ağaç” anlamına gelen “dendron” kelimesinden türetilmiştir (Huang ve Wu, 2018).

Tipik bir dendrimer üç bölümden oluşur:

- İki veya daha fazla reaktif grubu olan merkezi bir çekirdek,
- Çekirdeğe kovalent olarak bağlanmış tekrarlanan dallanma birimlerinden oluşan iç tabakalar,
- Dış yüzeydeki terminal fonksiyonel grupları (Huang ve Wu, 2018).

Tipik bir dendrimerin yapısal şekli Şekil 2.6’da verilmiştir.

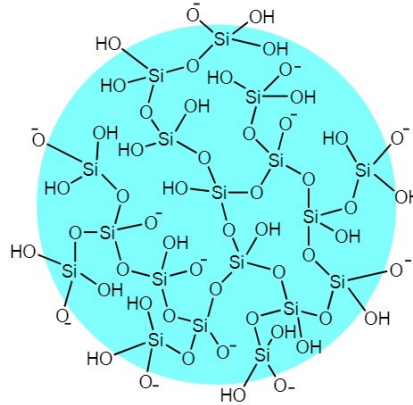


Şekil 2.6. Dendrimerlerin yapısı (Huang ve Wu, 2018)

Farklı fonksiyonel grupların yapıya eklenmesiyle dendrimerlerde çeşitlilik sağlanabilmektedir. Dallanma birimleri sayesinde dendrimerlerin boyut olarak büyümesi sağlanabilmektedir(Karabulut vd., 2015). Etkin maddenin dendrimer formülasyonuna ilavesi iç bölgesinde bulunan boşlukta enkapsülasyon şeklinde ve dallarda yer alan fonksiyonel gruplara konjuge bağlayarak sağlanabilmektedir(Huang ve Wu, 2018; Karabulut vd., 2015). Yapısal olarak dallanmış olarak çok fazla sayıda fonksiyonel grup barındırması sebebiyle birbirinden farklı etkin madde moleküllerinin aynı anda bağlanabilmesine imkân verir. Dendrimerler etkin maddelerin hedeflendirilmesi, taşınması, biyoyararlanımının artırılması ve çözünürlüğün artırılmasına katkıda bulunmaktadır (Karabulut vd., 2015).

2.5.4. Silika nanopartiküller

Biyouyumluluklarının yüksek oluşu, çok fazla gözenekli yapıları ve işlevsel olmaları sebebiyle birçok avantajı birlikte sunarlar. İnorganik nanopartiküller arasında silika nanopartikülleri en sık seçilen taşıyıcılardan birdir. Fenitoin, doksorubisin, sisplatin, metronidazol, nifedipin, diklofenak ve heparin bir silika nanopartikül ilaç taşıyıcı sistem olan kserojele yüklenmiş ilaçlardır (Wilczewska vd., 2012). Silika nanopartiküllerin yapısı Şekil 2.7’de verilmiştir.



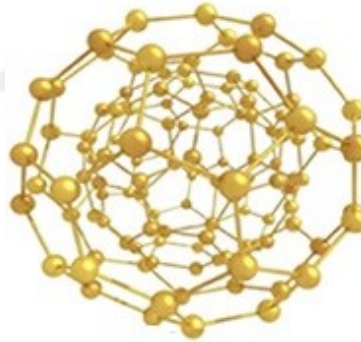
Şekil 2.7. Silika nanopartiküllerin yapısı (M. Ways vd., 2020)

Silika kserojeller, gözenekli ve geniş yüzey alanlı amorf bir yapıdadır. Gözenekli yapıları (şekil ve gözenek boyutları) sentez parametrelerine bağlıdır. Sentezde kullanılan reaktiflerin oranı, katalizörün konsantrasyonu, sıcaklık ve kurutma basıncı gibi parametrelerin modifikasyonu, hazırlanan kserojelin özelliklerini değiştirmeye izin verir (Wilczewska vd., 2012).

Yapılan araştırmalar bazılarında silika nanopartiküllerin biyolojik olarak uyumlu olduğunu, teşhis ve tedavi uygulamaları için büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Ancak, son zamanlarda yapılan araştırmalar silika nanopartiküllerinin kullanımının bazı tehlikelerini ortaya çıkarmıştır. Silika nanopartiküllerinin, reaktif oksijen türlerinin oluşumu, malondialdehid üretiminin artması, glutatyon seviyesinin azalması ve süperoksit dismutaz ve hem oksijenaz 1 dahil olmak üzere antioksidan enzimlerin indüksiyonu yoluyla hücrelerde oksidatif stres oluşumu üzerinde etkiye neden olduğunu göstermiştir (Wilczewska vd., 2012).

2.5.5. Metalik nanopartiküller

Metalik nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemler hem tanısal görüntülemeye hem de ilaç hedeflemeye kullanım potansiyeline sahiptir. Bu nanopartiküller sıklıkla katı kolloidal formdadır. Antikanser ilaçların terapötik endekslerini pasif veya aktif hedefleme yoluyla artırırken, ilacın sağlıklı hücrelere ve dokulara verdiği zararları azaltır (Naahidi vd., 2013). Metalik nanopartiküllerin yapısı şekil 2.8’de verilmiştir.



şekil 2.8. *Metalik nanopartiküllerin yapısı* (Yaqoob vd., 2020)

Kolloidal altının tıpta kullanımı, tüberküloz tedavisi için 1920'lere kadar uzanabilir. O zamandan beri kolloidal altın nanopartikülleri etkin madde ve gen taşıma aracı olarak geniş çapta araştırılmıştır. Çeşitli formlarda sentezlenebilirler. Mikromolar konsantrasyonlarda kolayca tespit edilmeleri sebebiyle tanısal görüntülemeye sistemlerinde rahatlıkla kullanılabilirler. Biyouyumlulukları ile ilgili olarak, hücrelere sitotoksik etki yaratmadıkları bilinmektedir (Naahidi vd., 2013).

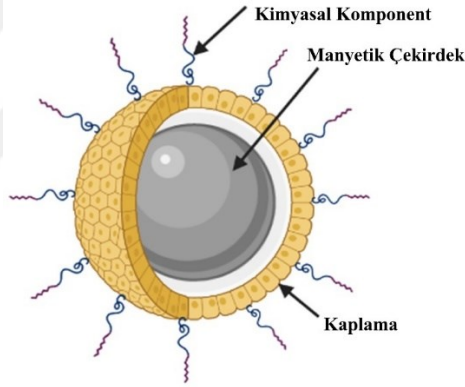
2.5.6. Manyetik nanopartiküller

Manyetik nanopartiküller, etkin madde taşınması için oldukça avantajlıdırlar. Dışarıdan uygulanan manyetik alan yardımı ile kolay hedefleme yapılmaktadır. Ancak

manyetik nanopartiküller, küçük boyutlarıyla ilgili spesifik özellikleri kaybedip, kullanımı zorlaştıran daha büyük kümeler halinde toplanma eğilimi gösterirler (Wilczewska vd., 2012).

Manyetik nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemler tasarlanırken partiküllerin boyutu, manyetik özellikleri, manyetik alanın gücü, ilaç yükleme kapasitesi, hedef dokunun erişilebilirlik alanı ve kan akış hızı gibi birçok faktör göz önünde bulundurulmalıdır (Wilczewska vd., 2012).

Manyetik nanopartiküllerinin insan vücudu üzerindeki olumsuz etkileri sebebiyle kullanımları kısıtlıdır. Demir oksit nanopartikülleri, sergiledikleri olumlu özellikler nedeniyle, FDA tarafından klinik kullanım için onaylanan tek manyetik nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemdir (Wilczewska vd., 2012). Manyetik nanopartiküllerin yapısı Şekil 2.9'da verilmiştir.



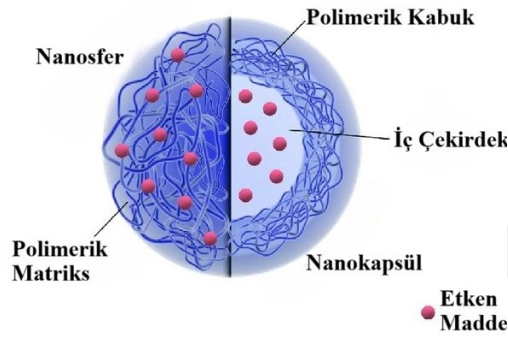
Şekil 2.9. Manyetik nanopartiküllerin yapısı (Dasari vd., 2022)

Bir ilacın manyetik nanopartiküle bağlanması kovalent bağlanma, elektrostatik etkileşimler, adsorpsiyon veya kapsülleme işlemleri ile sağlanabilir (Wilczewska vd., 2012).

2.5.7. Polimerik nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, poli-ε-kaprolakton, poliakrilamid ve poliakrilat gibi sentetik polimerlerden veya albümin, DNA, kitosan, jelatin gibi doğal polimerlerden elde edilir. İn vivo davranışlarına dayanarak, polimerik nanopartiküller, biyolojik olarak parçalanmayanlar ve biyolojik olarak parçalanmayanlar olarak sınıflandırılabilir (Wilczewska vd., 2012).

Polimerik nanopartiküller, immünojik etkileşimleri ve partiküller arasındaki etkileşimleri azaltmak için genellikle iyonik olmayan surfaktanlarla kaplanır. Etkin madde bir polimerizasyon reaksiyonundan sonra polimerik nanopartikül yüzeyinde bağlanabilir veya bir polimerizasyon aşaması sırasında polimerik nanopartiküle enkapsüle olabilir (Wilczewska vd., 2012). Polimerik nanopartiküllerin yapısı Şekil 2.10'da verilmiştir.

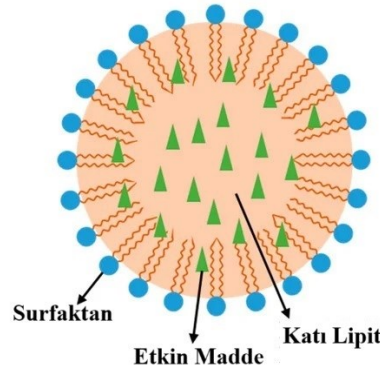


Şekil 2.10. Polimerik nanopartiküllerin yapısı (Gagliardi vd., 2021)

Polimerik nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemlerin etkin maddelerin sürekli salımını sağlayabildiği, kanser dokularının pasif biriktirme eğiliminden dolayı etkin maddeleri hedeflenen dokuya taşıya bildiği ve etkin maddeleri vücudun dejeneratif koşullarından koruyabildiği bilinmektedir. Örneğin N-(2-hidroksipropil)metakrilamid'den (HPMA) yapılan nanopartiküllerin, popüler anti-kanser ilacı doksorubisinin toksik etkilerini azalttığı görülmüştür. Tüm bu avantajlara rağmen, polimerik nanopartiküller, immün sistem hücreleri tarafından sıklıkla alınır ve bu nedenle bu malzemelerin biyoyumluluğu kontrol edilmelidir (Wilczewska vd., 2012).

2.5.8. Katı lipid nanopartiküller

Katı lipid nanopartikülleri, yaklaşık 50 ila 1000 nm arasında bir ortalama çapa sahip bir katı lipid çekirdeğinden oluşan nanosferdir. Bu lipidik malzemeler hem oda sıcaklığında hem de insan vücudunda katı olan saflaştırılmış trigliseritler, kompleks gliserit karışımları veya balmumları içerebilmektedir. Formülasyonları uygun bir surfaktanlar ile stabilize edilirler (Ganesan ve Narayanasamy, 2017). Katı lipid nanopartiküllerin yapısı Şekil 2.11'da verilmiştir.



Şekil 2.11. Katı lipit nanopartiküllerin yapısı (Nguyen ve Duong, 2022)

Lipozomların, emülsiyonların ve polimerik nanopartiküllerin avantajlarını aynı anda sunarlar. Hem katı matrisin stabilitesini hem de lipit taşıyıcıların biyolojik uyumluluğunu bünyelerinde barındırırlar. Bu durum da ilaç dağıtım sistemleriyle ilgili sınırlamaları ortadan kaldırmalarına yardımcı olur. Ayrıca diğer formülasyonların bazı önemli dezavantajlarından kaçınırlar. Küçük boyutlarından ve geniş yüzey alanlarından dolayı fonksiyonel ligandlarla kaplanmaya uygundur (Akanda vd., 2023; Rostami vd., 2014). Katı lipit nanopartiküllerin avantajları arasında iyi bir fiziksel stabilite, etkin maddenin bozulmaya karşı korunması, kontrollü ilaç salımı ve iyi tolere edilebilirlik bulunur. Ancak düşük yükleme kapasitesi (etkin maddenin lipit içindeki çözünürlüğü ve lipit matrisinin yapısı ve polimorfik durumu ile sınırlıdır), kristalizasyondan sonra etkin maddenin sistemden atılması ve dispersiyonların nispeten yüksek su içeriği gibi bazı dezavantajları mevcuttur (Wilczewska vd., 2012)

2.5.8.1. Katı lipit nanopartiküllerin yapısı

Katı lipit nanopartiküller biyolojik olarak parçalanabilen katı lipit/lipit karışımı (matriks olarak), surfaktan, ko-surfaktan, solvent/ortak çözücüler, yük değiştiriciler, kriyoprotektanlar ve gizli ajanlar (uzun dolaşım süresini arttırmak için) gibi birimlerden oluşur (Harish vd., 2023). Yapılarında yaygın olarak lesitin, safra tuzları (sodyum taurokolat gibi), etilen oksit/propilen oksit kopolimerleri, sorbitan esterler, yağ asidi gibi surfaktanlar kullanılmaktadır. Surfactanlar aynı veya farklı fiziksel durumda bulunan iki veya daha fazla fazın temas yüzeyleri arasındaki yüzey gerilimini azaltır. Surfactanlar katı lipit nanopartiküllerin ilaç yükleme kapasitesini ve stabilitesini artırır (Duan vd., 2020). Katı lipit nanopartiküllerin yapısal bileşenleri Tablo 2.1’de verilmiştir.

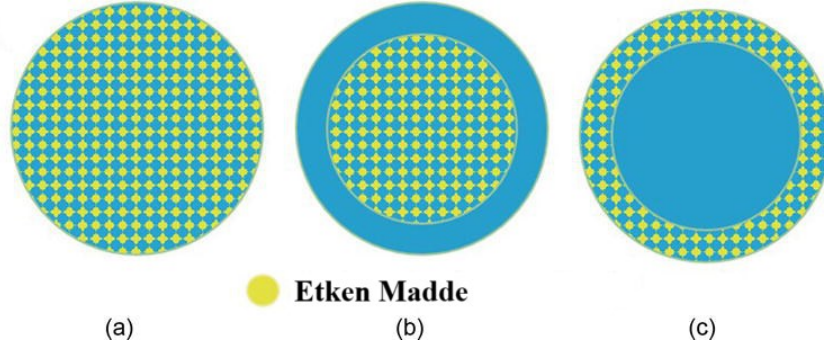
Tablo 2.1. Katı lipit nanopartiküllerde kullanılan yapısal elemanlar

Bileşen	Örnekler
Lipitler	Asidan N12 (Monostearat monositrat gliserol), Behenik asit, Balmumu, Kolesterol, Setilpalmitat, Kaprik/kaprilik trigliserit (Miglyol 812), Compritol ATO 888 (Gliseril behenat), Kompritol E ATO, Karnauba mumu, Dynsan 116 (Gliseril tripalmitat), Dynsan 118 (Gliseril tristearat), Dynsan 114 (Gliseril trimiristat), Dynsan 112 (Gliseril trilaurat), Gliseril monostearat, Gliseril Monosteate (Invitor 900), Monogycol (Propilen glikol palmitik stearat), Presirol ATO 5, Softisan 142/Setil alkol (75:25) , Siftisan 142, Stearik asit, Katı parafin, Synrowax, HRSC (Gliserol Tribehenat ve Kalsiyum behenat karışımı), Süperpolistat, Witepsol E 85 (Sertleştirilmiş yağ), Witepsol W 35, Witepsol H 5, Witepsol E 85/Cetil alkol (75 :25).
Surfaktanlar	Epikuron 200, Lipoid S75, Lipoid S100, Lipoid E 80, Poloksamer 188, Poloksamer 407, Poloksamin 908, Polisorbitat 80, Kremofor EL, Solutol HS15, Tween 80
Ko-surfaktanlar	Tylocopol, Taurodeoksikolik asit sodyum tuzu, Taurokolat sodyum tuzu, Sodyum glikokolat, Sodyum dodesil sülfat, Sodyum oleat, Kolesterol hemisüksinat, Butanol
Kriyoprotektanlar	Glikoz, Trehaloz, Mannoz, Laktoz, Maltoz, Mannitol, Sorbitol, Glisin, PVP, PVA, Jelatin
Yük değiştiriciler	Disetilfosfat, Dipalmitoil fosfatidil kolin, Dimiristoil fosfatidil gliserol, Stearil amin
Gizli ajanlar	Poloksamer, Polietilen glikol

İlaç maddesinin konumuna göre katı lipit nanopartiküller üç ana kategoriye ayrılır:

- İlaç etkin maddesinin lipit matris içinde eşit şekilde dağıtıldığı homojen matris modeli
- İlaç etkin maddesiyle zenginleştirilmiş çekirdek modeli
- İlaç etkin maddesi açısından zenginleştirilmiş dış kabuk modeli (Arabestani vd., 2024).

Etkin maddelerinin konumları şematik olarak Şekil 2.12’de verilmiştir.



Şekil 2.12. Katı lipid nanopartiküllerde etkin madde konumları (Nguyen ve Duong, 2022)

2.5.8.2. Katı lipid nanopartiküllerin oluşum mekanizmaları

Kolloidal nanopartiküllerin oluşumu iki faz arasındaki arayüzey gerilimine ve fazların kendilerine ait yüzey gerilimine bağlıdır. Dolayısıyla katı lipid nanoparçacıklarının oluşumunun temel prensibi, iki faz arasındaki adhezyon kuvvetine bağlıdır. Arayüzeydeki moleküler karışım çalkalandığında yüzey serbest enerjisini en aza indirmek için küresel bir sistem oluştururken, arayüzey geriliminin yüzey serbest enerjisini ortaya çıkarır (Duan vd., 2020).

Disperse edilmiş olan parçacıkların yüzeyini arttırmak için yapılması gereken iş miktarı aşağıdaki gibidir:

$$W = \gamma \times \Delta A \quad (2.1)$$

W : işi,

γ : yüzey gerilimini,

ΔA : yüzey alanındaki artışı ifade eder (Duan vd., 2020).

Katı lipid nanopartiküllerin üretimi için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Her yöntemin kendine has mekanizması bulunmaktadır (Harish vd., 2023).

2.5.8.2.1. Yüksek basınçlı homojenizasyon

Katı lipid nanopartikül üretiminde en yaygın kullanılan yöntemdir. Uygulaması kolay bir yöntemdir. Bu yöntemde, dispersiyon üzerine uygulanan yüksek basınçtan dolayı yüksek bir kesme gerilimi ve kavitasyon kuvveti ortaya çıkar. Bunun sonucunda mikron altı boyutta parçacıklar üretilir. Bunun için öncelikle ilacın lipid eriyiğine dispersiyonunun sağlanması gerekir. Daha sonra bu dispersiyon sulu faza eklenir (Harish vd., 2023). Bu yöntemde parçacık boyutunun kontrol edilebilir bir şekilde küçültülmesi sağlanabilmektedir. Ancak ilaç etkin maddesinin bozulması, aşırı soğutulmuş eriyiklerin oluşması ve jelleşme gibi dezavantajları vardır (Akanda vd., 2023).

2.5.8.2.2. Yüksek kesmeli homojenizasyon/ultrasonikasyon yöntemi

Bu yöntemde öncelikle lipit eriyiği içerisinde etkin madde disperse edilir. Hazırlanan dispersiyon, yüksek kesme homojenizasyonu yoluyla denge sıcaklığında surfaktan içeren sulu faz ile karıştırılır. Oluşan karışım daha sonra partikül boyutunun küçültülmesi için ultrasonikasyona tabi tutulur. Sıcak emülsiyonun soğutulması üzerine katı lipit nanopartikülleri içeren dispersiyon elde edilir (Harish vd., 2023). Bu yöntemin uygulanabilmesi için yüksek miktarda surfaktan kullanılması gerekmektedir. Ayrıca oluşan parçacıkların fiziksel olarak kararsızlık halinde oluşu ve sadece mikro boyutlu parçacık aralığında üretime yapılabilmesi bu yöntemin dezavantajlarından bazılarıdır (Akanda vd., 2023).

2.5.8.2.3. Mikroemülsiyon metodu

Bu yöntemde mikroemülsiyon oluşumu için, lipit/surfaktan oranının yüksek olması gerekmektedir. İlk aşamada ilaç etkin maddesini içeren lipit eriyiği, mikroemülsiyon oluşana kadar sürekli karıştırılarak sıcak sulu faza eklenir. Daha sonra oluşturulan sıcak mikroemülsiyon, yavaş yavaş karıştırılarak soğutulur (Harish vd., 2023). Mikroemülsiyon metodu çeşitli dezavantajlara sahiptir. Elde edilen son ürün ilaç etkin maddesi konsantrasyonu çok seyreltiktir. Bu sebeple, diğer yöntemlere kıyasla daha fazla ilaç etkin maddesi konsantrasyonu gerektirir. Ayrıca bu yöntemde kullanılan surfaktan ve ko-surfaktanların yüksek konsantrasyonda kullanılması bu tekniğin bir diğer önemli dezavantajıdır (Ganesan ve Narayanasamy, 2017).

2.5.8.2.4. Faz değişmesi sıcaklık yöntemi

Bazı surfaktanların sıcaklığın değişmesiyle hidrofilik-lipofilik dengesi değişmektedir. Başlangıçta hidrofilik yapıya daha yakın olan surfaktan lipofilik bir yapıya bürünür. Katı lipit nanopartiküller ise yağ/su tipi emülsiyonunda yer alan surfaktanın sıcaklığın değiştirilmesiyle emülsiyonun bir su/yağ tipi emülsiyonuna dönüştürmesi sonucunda oluşur (Harish vd., 2023). Bu yöntemin en önemli dezavantajı oluşan emülsiyonun kararsızlığıdır (Ganesan ve Narayanasamy, 2017).

2.5.8.2.5. Membran kontaktör yöntemi

Bu yöntemde ilaç etkin maddesi dispersiyonu yapılmış lipit eriyiğinin, gözenekler içeren silindirik membrandan preslenerek geçirilir. Ardından surfaktan içeren sulu faz, membranın iç kanalında dolaştırılır. Bunun sonucunda küçük damlacıklar oluşur. Damlacıkların soğumasıyla katı lipit nanopartiküller oluşur (Harish vd., 2023). Kullanılan

membranın tıkanması gibi bir dezavantajı bulunmaktadır (Ganesan ve Narayanasamy, 2017).

2.5.8.2.6. Emülsifikasyon solventi difüzyon yöntemi

Bu işlemde, formülasyonundaki lipitler izovalerik asit, izobütirik asit, tetrahidrofuran benzil alkol ve bütillaktat gibi suyla orta derecede karışabilen çözücülerde doymuş çözeltileri hazırlanır. Hazırlanan lipit çözeltisi surfaktan içeren suya sürekli karıştırılarak eklenir. Dağılan lipit katılaşır. Bunun sonucuna katı lipit nanopartiküller oluşur (Harish vd., 2023). Bu yöntemin düşük dispersiyon derecesi, emülsiyonun kararsızlığı, ek solvent giderme prosedürü gerektirmesi, toksik etki oluşumu (artık solvent) gibi dezavantajları bulunmaktadır (Ganesan ve Narayanasamy, 2017)

2.5.8.2.7. Koaservasyon yöntemi

Bu yöntemde, yağ asidi alkali tuzlarının misel çözeltisi asitleştirilir. Daha sonra surfaktan-su çözeltisi sıcak suda ısıtılarak hazırlanır. Düzgün bir dağılım elde etmek için sürekli karıştırarak bu çözeltiye yağ asidinin sodyum tuzunu eklenir. Berrak bir çözelti elde edilene kadar sürekli karıştırılır. Öte yandan, ilaç çözeltisini etanol kullanarak hazırlanıp, sürekli karıştırarak tek bir faz oluşması sağlanır. Daha sonra koaservasyon çözeltisi karışıma kademeli olarak eklenerek bir süspansiyon oluşturulur. Süspansiyon, su banyosunda çalkalanarak hızla soğutulur. Soğutma işleminin sonucunda katı lipit nanopartiküller elde edilir (Harish vd., 2023). Bu yöntemin pH'ya duyarlı ilaçlar için uygun olmaması en önemli dezavantajıdır (Ganesan ve Narayanasamy, 2017).

2.5.8.2.8. Çift emülsiyon yöntemi

Bu yöntemde öncelikle ilaç sulu çözeltisinin erimiş lipitlerden oluşan bir karışımla karıştırılarak su/yağ tipi bir emülsiyon elde edilip stabilizör yardımıyla stabil hale getirilir. Daha sonra su/yağ/su tipi emülsiyon elde etmek için hidrofilik surfaktan içeren çözeltiye hazırlanan su/yağ tipi emülsiyon eklenerek dağıtılır. Karışım filtrelenerek katı lipit nanopartiküller elde edilir (Harish vd., 2023). Bu yöntemin dezavantajı partiküllerin fazlar arası kararsızlıklarının fazla oluşudur (Akanda vd., 2023).

2.5.8.2.9. Emülsiyondan çözücü buharlaştırma yöntemi

Bu yöntemde ilk olarak lipit organik çözücüde çözündürülür. Ön emülsiyon oluşturmak için, organik çözücüde çözünen lipit yüksek hızda belirli bir miktar sulu fazda dağıtılır. Karışım yüksek basınçlı homojenizatöre yerleştirilir. Karışım karıştırılarak organik solventin ortamdan uzaklaştırılması sağlanır. Elde edilen ürün sinterlenmiş bir cam filtreden süzülerek katı lipit nanopartiküller elde edilir (Harish vd., 2023). Bu

yöntemin düşük dispersiyon derecesi, emülsiyonun kararsızlığı, ek solvent giderme prosedürü gerektirmesi, toksik etki oluşumu (artık solvent) gibi dezavantajları bulunmaktadır (Ganesan ve Narayanasamy, 2017).

2.5.8.2.10. Solvent enjeksiyon yöntemi

Bu yöntemde lipit, izopropanol, aseton ve metanol gibi suda çözünür çözücüler kullanılarak çözündürülür. Bu karışım bir şırınga yardımıyla hızlı bir şekilde surfaktan içeren su fazına enjekte edilir. Bunun sonucunda katı lipit nanopartiküller elde edilir.

2.5.8.2.11. Mikroemülsiyon soğutma yöntemi

Bu yöntemde, 37-55 °C'de eritilen ve emülsifiye edici bir balmumu içeren yağ/su tipi emülsiyonuna aynı sıcaklıkta ısıtılan polimerik surfaktan içeren su karıştırılır. Bunun sonucunda sıvı matris formunda stabil ve berrak bir yağ/su mikroemülsiyonu elde edilir. Bu yağ/su mikroemülsiyonundan katı lipit nanopartiküllerin çökeltilmesi için oda sıcaklığında veya 4 °C'ye kadar soğutulur (Ganesan ve Narayanasamy, 2017; Harish vd., 2023)

2.5.8.2.12. Süper kritik akışkan yöntemi

Yağ fazının hazırlanması için öncelikle kloroform gibi organik bir çözücü içerisinde ilaç etkin maddesi, lipit ve surfaktan çözündürülür. Ko-surfaktan çözündürülmüş sulu faz yağ fazına eklenir. Karışım yüksek basınçlı homojenizasyon işlemine tabi tutulur. Emülsiyondan organik solventin ekstraksiyonu sonrasında katı lipit nanopartikül dispersiyonları oluşur (Harish vd., 2023).

2.5.8.2.13. Elektrosprey yöntemi

Bu yöntemde elektrodinamik atomizasyon işlemi kullanılarak 1 µm'den küçük küresel şekilli katı lipit nanopartiküller oluşturulabilir (Harish vd., 2023). Sistemde uç kısmı yüksek voltajlı elektrottan oluşan formülasyon karışımı dolu şırınga ve şırıngaya zıt olarak yerleştirilmiş partikül toplayıcı olarak topraklama elektrodu bulunmaktadır. Belirli bir akış hızı ve uygulanan yüksek voltaj ile şırınga ucundan püskürtülen formülasyon karışımı yüzey gerilimi ve elektrik alanı sebebiyle konik bir dağılım oluşturarak yüklü damlacıklara dönüşür. Bu yüklü damlacıklar zıt taraftaki plakta toplanmaya başlar. Son durumda katı lipit nanopartiküller ortamdan çözücünün buharlaştırılmasıyla elde edilirler. Elektrosprey yöntemi nanopartiküllerin üretimi için benzer teknolojiyi kullanan elektrospininge benzer bir teknik olarak ortaya çıkmıştır (Sridhar ve Ramakrishna, 2013).

2.5.8.2.14. Yarı katı lipit nanopartiküllerin hazırlanması

Lipitin erime noktasının yaklaşık 10 °C üzerinde denge sıcaklığında olan erimiş lipit ve surfaktan dispersiyonu, 1 dakika boyunca 9500 rpm'de döndürülür. Daha sonra dispersiyon işlemi 85 °C'de ve 500 bar basınçta üç kez tekrarlanır. Dispersiyon, ilk döngü tamamlandıktan sonra viskoz hale gelir ve sonraki iki döngü tamamlanır. Son olarak sıcak viskoz emülsiyon oda sıcaklığına soğutulur. Lipit damlacıkları yeniden kristalleşmeye uğrar ve katı lipit nanopartiküllerinin yarı katı hale gelmesini sağlayan bir jel ağı oluşturulur (Harish vd., 2023).

2.5.8.2.15. Mikroakışkan yöntemi

Mikroakışkanlar, diğer mevcut üretim tekniklerine göre avantajları nedeniyle son yıllarda katı lipit nanopartikül üretiminde daha fazla ilgi kazanmıştır. Bu yöntemin temel prensibi çok az miktarda (mikro veya piko litre aralığında) lipit ve surfaktanın karıştırılmasına dayanmaktadır. Katı lipit nanopartiküllerin parçacık boyutu ve homojenlikleri üzerinde hassas kontrol sağlayan umut verici bir yöntemdir. Birbiriyle karışmayan yağ ve su fazının, mikroakışkan çipine sabit akış hızlarında ayrı ayrı enjekte edilmesi sonucunda çipin çıkış kısmından katı lipit nano partikülleri elde edilir (Harish vd., 2023).

2.6. Mikroemülsiyonlar

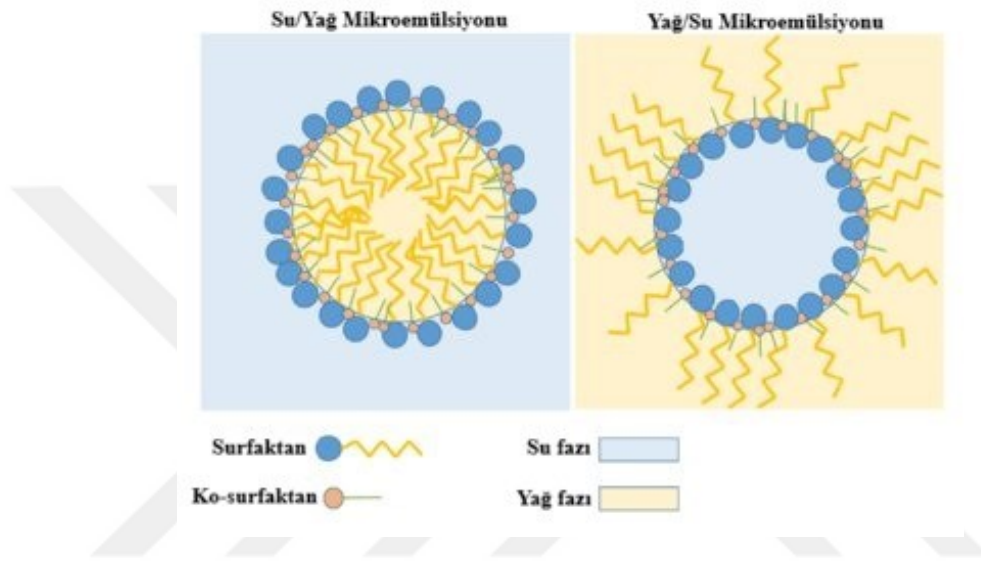
Mikroemülsiyonlar, birbiriyle karışmayan iki sıvının (su ve yağ) genellikle surfaktanlar yardımıyla oluşturduğu termodinamik olarak kararlı, izotropik bir dispersiyonlardır. İlaç formülasyonu geliştirilmesinde uzun yıllardır kullanılmaktadır (Yongmin Zhang vd., 2023).

Mikroemülsiyonlar klasik emülsiyonlara benzer şekilde su/yağ veya yağ/su şeklinde olabilmekle birlikte geçişli yapıda olmak üzere üç tipte olabilirler (Çilek A vd., 2002). Klasik emülsiyonlar ve mikroemülsiyonlar arasındaki temel fark, emülsiyonların mükemmel kinetik stabilite sergilemesine rağmen temelde termodinamik olarak kararsız olması ve sonunda faz ayrılmasıdır. Bir diğer önemli farklılık ise görünüşleriyle ilgilidir; emülsiyonlar bulanık, mikroemülsiyonlar ise berrak veya yarı saydamdır. Ek olarak, emülsiyonlar büyük miktarda enerji girdisi gerektirirken mikroemülsiyonlar gerektirmediklerinden, hazırlanma yöntemlerinde belirgin farklılıklar vardır (Lawrence ve Rees, 2012).

2.6.1. Mikroemülsiyonların yapısı

Dış fazın su olduğu y/s mikroemülsiyonlarda amfifilik moleküllerin hidrofobik kısımları iç faza (yağ fazı) doğru yönelmiş halde bulunmakla birlikte dış fazın yağ olduğu

s/y mikroemülsiyonlarda ise dış faza doğru yönelirler. Su ve yağ fazlarının yüksek olduğu durumlarda geçişli (bicontinuous) mikroemülsiyon yapısı oluşmaktadır. Bu model yapısında çok köşeli poligonlar bulunmakta olup, yağ ve su fazları amfifilce zengin bir tabaka tarafından ayrılmış durumdadır. Formülde yağ içeriği yüksek ise s/y tipinde, düşük yağ fazı olursa y/s tipinde geçişli mikroemülsiyonlar oluşmaktadır (Çilek A vd., 2002). Mikroemülsiyonların yapısı Şekil 2.13’de verilmiştir.



Şekil 2.13. Mikroemülsiyonların yapısal formu (Dantas vd., 2019)

Mikroemülsiyonları oluşturan yapı taşları formülasyonun kullanılış şekline göre seçilmelidir. Formülasyonda kullanılan maddeler yağ fazı, su fazı, surfaktanlar ve ko-surfaktanlar olmak üzere dört ana başlıkta ele alınmaktadır (Lawrence ve Rees, 2012).

Mikroemülsiyonların yapı taşları olan yağ fazına; bitkisel yağlar, sentetik yağlar, trigliseritler, yağ asitlerinin esterleri, su fazına; su, izotonik sodyum klorür çözeltisi, tamponlar, propilenglikol, polietilen glikol veya bunların kombinasyonları, surfaktanlara; lesitin, poligliserol, yağ asidi esterleri, ko-surfaktanlara; alkoller, glikollerin türevleri, poligliseroller ve propilen glikoller örnek verilebilir (Çilek A vd., 2002).

Doğal yollardan biyolojik olarak elde edilen lesitin, biyolojik olarak inert yapıda olması ve biyolojik membran lipidlerinin başlıca bileşenlerinden biri olması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Hidrofobik yapıda olan lesitin, iki uzun hidrokarbon zinciri içerir. Ayrıca yapısında polar gruplar da barındırmaktadır (Çilek A vd., 2002).

2.6.2. Mikroemülsiyonların oluşum mekanizmaları

Mikroemülsiyonlarda yağ damlacıkları su fazı içinde ya da su damlacıkları yağ fazı içerisinde disperse olabilmektedir. Mikroemülsiyonların içerdiği damlacıkların boyutunun çok küçük olması sebebiyle fazlar arasında çok geniş arayüzey alanına sahiptirler (Çilek A vd., 2002).

Mikroemülsiyon oluşumunu ve stabilitesini açıklamak için üç yaklaşım bulunmaktadır. Bunlar:

- a) Arayüzey veya karışık film teorileri
- b) Çözünürlük teorileri
- c) Termodinamik işlemler (Lawrence ve Rees, 2012).

Mikroemülsiyonları oluşturan her bir faz yüzeyler arasında kendine ait bir film tabakasına sahip olduğu varsayılmaktadır. Fazlar arasında yer alan surfaktanın yüzey basıncı:

$$\pi_f = (\gamma_{y/s})_o - (\gamma_{y/s})_f \quad (2.2)$$

formülü ile hesaplanır.

$(\gamma_{y/s})_o$: formülde surfaktan bulunmadığı zamanki yüzeyler arası gerilimi,

$(\gamma_{y/s})_f$: formülde surfaktan bulunduğu zamanki yüzeyler arası gerilimi,

π_f : ara yüzey basıncını ifade eder.

Formüle göre yüzeyler arası alan mikroemülsiyonlarda arttığı için π_f değeri artacaktır. Bunun sonucunda mikroemülsiyon sisteminde çok düşük yüzeyler arası gerilim oluşmaktadır. Yüzeyler arası gerilimin düşük değerde olması iki nedenle olur. Bunlardan birincisi karışık surfaktan eklenmesi, ikincisi ise sisteme orta zincir uzunluğunda alkollerin eklenmesidir (Çilek A vd., 2002).

Termodinamik açıdan stabil bir mikroemülsiyonun oluşabilmesi için sistemdeki serbest enerjinin negatif olması gerekmektedir. Sistemin serbest enerjisi:

$$\Delta G = V \times \Delta A \quad (2.3)$$

formülü ile hesaplanır.

ΔG : serbest enerjiyi,

V : yüzeyler arası gerilimi,

ΔA : yüzey alanındaki değişimi ifade eder.

Mikroemülsiyonların oluşumunda serbest enerji:

$$\Delta G_m(r) = \Delta G_1 + \Delta G_2 - T\Delta S_m \quad (2.4)$$

formülü ile hesaplanır.

ΔG_m : serbest enerjideki değişimini,

(r) : damlacıkların çapını,

ΔG_1 ve ΔG_2 : yüzeyler arası serbest enerji ve damlacıklar arasındaki etkileşmenin enerjisini,

T : sıcaklığı,

ΔS_m : karışımın entropisini ifade eder.

Termodinamik açıdan stabil mikroemülsiyonların oluşması için serbest enerjinin negatif olması gerekmektedir (Çilek A vd., 2002).

2.7. Ülseratif Kolit Tedavisinde Enterik Formülasyonların Kullanımı

Kolona etkin madde taşıyan sistemlerin kullanımı tedavi etkinliğinin artmasını sağlarken etkin maddeden kaynaklı olası yan etkilerin ortaya çıkmasını engelleyebilmektedir. Ayrıca etkin maddenin biyoyararlanımını da iyileştirmektedir. İnflamatuar bağırsak hastalığı ve kolorektal kanser gibi kolonda lokalize olan hastalıklarda kolona etkin madde taşıyan sistemler kullanılmaktadır. Son yıllarda kolon ve rektal ortamları hakkında verilerin artması, mikrobiyom, enterik bağışıklık sistemi ve lenf sistemi gibi yeni lokal hedeflerin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Bu hedefler yalnızca kolon patolojilerinin tedavisine izin vermekle kalmamakla birlikte, aynı zamanda sistemik hastalıklar ve distal organları etkileyen hastalıkların tedavisini de kolaylaştırmaktadır (McCoubrey vd., 2023).

Enterik kaplama, oral farmasötik dozaj formlarında kullanılabilen bir dış kaplama şeklidir. Enterik kaplamanın kullanılması için çok sayıda sebep vardır. Bunlar arasında ilacın kokusunu veya tadını değiştirmek, çevre koşullarına (özellikle pH) karşı koruma sağlamak, mide mukozasını bazı ilaçların tahriş edici etkisine karşı korumak ve bölgeye/zamana özgü ilaç salınımına izin vermek gibi sebepler yer almaktadır. Bu yöntemde kaplama materyali olarak sentetik polimerler veya doğal polimerler kullanılmaktadır. Enterik kaplamaların elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan polimerler, diğerlerinin yanı sıra, selüloz asetat ftalat, metakrilik asit kopolimerleri ve hidroksipropil metilselüloz ftalattır (Maderuelo vd., 2019). Oral yolla kolona hedefli ilaç iletimini sağlayan ilk formülasyon 1982'de hazırlanmıştır. Bu formülasyon Eudragit S (Evonik) olarak biline pH'ya duyarlı bir metakrilat polimeridir. Eudragit S, pH 7,0'ı

aştığında çözünen, poli(metakrilik asit, metilmetakrilat) içeren sentetik bir kopolimerdir. Bu nedenle, Eudragit S, oral dozaj formları için enterik kaplama olarak kullanılmaktadır (McCoubrey vd., 2023).

Enterik kaplı dozaj formları arasında piyasa preparatları olarak yayın olarak kullanılan tablet ve kapsül formlardır. Kullanılan etkin maddeye göre bu kaplama şekilleri ya da kaplama polimerleri değişkenlik göstermektedir ve etkin maddeye göre dizayn edilebilmektedir. Bu geleneksel formların haricinde granülerler, pelletler, mikrokapsüller, mikropartiküller ve nanopartiküller gibi çok parçacıklı taşıyıcı sistemelerde yer almaktadır. Granülerler genellikle enteral beslenme tüpleri aracılığıyla ilaç verilmesi, yutma güçlüğü çeken yetişkin hastalara yiyecek ve ilaç verilmesine olanak sağlayan bir yaklaşımdır. Pelletler, ilacın pH'a bağlı bir çözünürlük gösterdiğinde, özellikle midede yüksek çözünürlüğe ve bağırsakta düşük çözünürlüğe sahip ilaçlar için tercih edilmektedir (Maderuelo vd., 2019). Peletler gibi çoklu ünite dozaj formları, birçok ilacın biyofarmasötik davranışını iyileştirmek için iyi bir stratejidir. Bu, tek ünite dozaj formlarının mide boşalması ve bağırsak geçiş süresindeki bireyler arası değişkenlik göstermesinden kaynaklanabilmektedir. Ek olarak, çok parçacıklı sistemlerin her dozunun çoklu alt birimleri nedeniyle ilaç salınımında daha az değişkenlik göstermesi ve ilk doz yükselmesini azaltması avantajları vardır (Maderuelo vd., 2019; Zhang vd., 205). Enterik mikrokapsülleme ayrıca asit hidrolizini en aza indirmek ve oral ilaç iletimini artırmak için bir araç olarak da kullanılmıştır (Al-Ghananeem vd., 2010).

Ahmad vd. (2021) yapmış oldukları çalışmalarında ülseratif kolit tedavisi için kolona hedefli aminosalisilat verilmesi amacıyla Eudragit-S100 kaplı jelatin nanopartikülleri tasarladılar. Hazırlanan formülasyon tedavisi sonucunda kolondaki mast hücreleri infiltrasyonunu önemli ölçüde azaldığı, koruyucu mukus tabakasının onarıldığı, kolon histomimarisini önemli ölçüde yeniden sağlandığı, TNF- α , IL1- β , COX-2, iNOS, miyeloperoksidaz ve nitrit seviyeleri gibi inflamatuvar biyobelirteçlerin önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Ahmad vd., 2021).

Barakat vd. yapmış oldukları çalışmalarında teofilin yüklü enterik kaplı nanoveziküllerin, proinflamatuvar sitokin düzeylerinde ve miyeloperoksidaz aktivitesinde azalmaya sebep olduğunu belirtmişlerdir. Bunun sonucunda asetik asit kaynaklı ülseratif kolitin tedavisinde iyi sonuçlar ortaya çıktığını göstermişlerdir (Barakat vd., 2023).

Ülseratif kolitte kullanılan 5-ASA'nın salınımının, kolondaki etkilenen bölgelere mümkün olduğunca lokalize edilmesi arzu edilir. İnce bağırsaktan emilimi ve buna bağlı

ilaç israfını ve sistemik yan etkileri önlemek için ilacın proksimal GI kanalında salınımından kaçınılmalıdır. İnce bağırsaktan emilen herhangi bir ilaç tüm vücuda dağılacak ve sadece küçük bir kısmı kolondaki iltihaplı dokuya ulaşacaktır. 5-ASA'nın geleneksel formülasyonlarının uygulanmasından sonra, salınımın ilk olarak ince bağırsağın distal kısmında veya kolonda meydana geldiği zamana göre çok daha yüksek serum seviyesine ulaştığı görülmüştür. Bu yüksek serum zirvelerinin, 5-ASA'nın daha ciddi yan etkilerinden biri olan bağırsak nefriti ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bu nedenle, uygun bir salım profilinin sağlanması, bu uzun süreli -genellikle yaşam boyu- bakım tedavisinde minimal yan etkilerle etkili bir tedavi sağlamanın anahtarı gibi görünmektedir. Poli(met)akrilatlar (PMMA), pH'a bağlı ilaç salımlı dozaj formlarının formülasyonunda ve geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Aslında, pH'a duyarlı akrilat bazlı polimerlerin kullanımı, inflamatuvar bağırsak hastalıklarının oral tedavisine yönelik önde gelen formülasyon yaklaşımını temsil etmektedir ve pazarındaki dört üründen üçünün, 5-ASA'nın salım profilini değiştirmek için PMMA'yı kullandığını göstermektedir. Dördüncü ürün, 5-ASA'nın etilselüloz mikrokürelerine kapsüllendiği yavaşlatılmış salımlı bir preparattır (Tablo 2.2.) (Rudolph vd., 2001).

Tablo 2.2. 5-ASA içeren ve enterik kaplı piyasa ürünlerine ait örnekler

Ürün	Dozaj formu	Polimer tipi ^A	Ticari isim	pH'sı
Salofalk®	Kaplamalı tabletler	MA:MM (1:1)	Eudragit® L	>pH 6
Klaversal®	Kaplamalı tabletler	MA:MM (1:1)	Eudragit® L	>pH 6
Asakolitin®	Kaplamalı tabletler	MA:MM (1:2)	Eudragit® S	>pH 7
Pentasa®	Kaplamalı peletler	Etilselüloz	Surelease®	Mikrogranül difüzyonu yoluyla salınım
^A MA, metakrilik asit; MM, metakrilat.				

Rudolph ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, Eudragit® FS 30D ile kaplanmış 5-ASA peletlerinin bu ürünlerle karşılaştırmalı sonuçlarında, ülseratif kolit tedavisi için ümit verici bir in vitro çözünme profili sergilediği gösterilmiştir. Şu anda piyasada bulunan ürünlerle karşılaştırıldığında, pelletlerin salım profili ülseratif kolitli hastalarda gözlemlenen GI pH profiline daha uygun görünmektedir (Rudolph vd., 2001).

2.8. Mikroakışkan Sistemi ve Hücre Enkapsülasyonu

Mikroakışkanlar, mikro kanallarda (onlarca ve yüzlerce mikron boyutunda) küçük hacimli sıvıları işlemek ve manipüle etmek için kullanılan bir teknolojidir (Shao vd., 2022). Diğer enkapsülasyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında, mikroakışkan sistem, kararlı verim, gelişmiş tekrarlanabilirlik, kontrollü boyut ve morfoloji gibi önemli avantajlara sahiptir. Ayrıca tek düze parçacıkların hazırlanmasına ve kontrol edilebilir bir ilaç salım profiline sahip mikro/nanopartiküller elde edilmesine olanak sağlar. Bu özellikleri sebebiyle ilaç taşıyıcıları için popüler bir üretim yöntemi haline gelmiştir (Feng vd., 2023; Luo vd., 2024).

Damlacık tabanlı mikroakışkanlar, mikroakışkanların önemli bir dalıdır. Mikroakışkan çipin kanallarında karşılıklı akan ve birbiriyle karışmayan iki sıvı birbiriyle temas ettiğinde ara yüzey gerilimi sebebiyle mikrodamlacıkların oluşumu gerçekleşir. Bu sistem ile damlacık üretmek için birçok yöntem var olmakla beraber bu yöntemleri aktif ve pasif yöntem olarak iki ana başlıkta toplayabiliriz. Aktif yöntemler; valf, robot destekli pipet, elektrik alanı, manyetik alan, akustik dalga gibi damlacıkları yönlendirmek için harici kuvvetlere dayanır. Pasif yöntemler ise itici güç olarak şırınga pompalarını veya yerçekimini kullanır ve damlacıkların boyutu büyük ölçüde çipin kanal yapısı ve sıvı akış hızı tarafından kontrol edilir (Shao vd., 2022).

Mikroakışkan sistem ile, tek katmanlı emülsiyonlar ve çok katmanlı emülsiyonlar elde edilebilir. Tek katmanlı emülsiyon damlacıklar, dağılmış ve sürekli faz sıvılarının özelliğine göre dörde ayrılır: su içinde yağ, yağ içinde su, su içinde su ve yağ içinde yağ. Çoklu emülsiyon damlacığı içerisinde bir veya daha fazla yavru damlacık kapsüllenir. Kısacası, çoklu emülsiyonlar, çoklu karışmaz sıvı fazlarının sıralı emülsifikasyonu ile elde edilir. Mikroakışkanlar tarafından hazırlanan çoklu emülsiyon damlacıkları boyutlarına ve yapılarına göre uyarlanabilir ve damlacığın içine sarılmış daha küçük damlacıkların boyutu ve sayısı da hassas bir şekilde kontrol edilebilir (Shao vd., 2022).

Mikroakışkan çipler, polidimetilsiloksan (PDMS) veya cam kılcal tüplerden oluşmaktadır. Ayrıca, silikon, cam, fiberglas dolgulu epoksi, polidimetilsiloksan ve polimetil metakrilat (PMMA) çip malzemeleri olarak kullanılmaktadır (Açıkgöz vd., 2023). Genel olarak, damlacık üretimi için üç tür kanal geometrisi vardır: T-kavşağı, akış odaklama ve ortak akış. T-kavşak geometrisi, iki kanalın kesiştiği noktada dağılmış fazlı çözeltinin sürekli fazlı çözelti tarafından kesildiği ve mikroakışkanlar için önerilen en eski yöntemidir. Akış odaklamada; dağılmış faz akışı, her iki taraftan akan iki sürekli faz akışı

boyunca akar. Orta akışta, sürekli faz dağılmış fazı çevreler ve eş merkezli iki fazlı bir akış kullanılır (Shao vd., 2022).

Damlacık tabanlı mikroakışkanlar kullanılarak üretilen ilaç taşıyıcılarına örnek olarak lipozomlar, mikropartiküller, mikrokapsüller, mikrokabarcıklar ve mikrojel gibi taşıyıcılar verilebilir (Feng vd., 2023). Damlacık tabanlı mikroakışkan sistemler, kullanılan malzeme ve yöntemlerin çok çeşitli olması nedeniyle, ilaç taşıyıcı sistemlerde salım profillerini ve absorpsiyon oranlarını değiştirmek, bölgeye özel hedeflemeyi iyileştirmek ve bunun gibi birçok amaç için kullanılabilir (Sohrabi vd., 2020).

Son yıllarda, hücre enkapsülasyonunda damlacık tabanlı mikroakışkanlar önemli uygulamalardan birisi haline gelmiştir. Damlacık bazlı mikroakışkan sistemler kullanılarak hücreleri üç boyutlu bir ekstrasellüler matrikse entegre etmek, böylece in vivo ortamları taklit etmek ve elde edilen mikropartikülleri hedeflenmiş bölgelere göndermek mümkündür (Chen vd., 2019).

Quintana vd. (2021) tarafından *Lactobacillus plantarum*'un enkapsüle edebilmek için mikroakışkan sistemi kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmada dış fazda kullanılan pluronik ve akrilik asitten oluşan blok kopolimerin, hücrelerin gastrointestinal sistem tarafından etkilenmelerini engellediği ve hazırlanan formülasyon ile kontrollü salım sağlandığı gözlenmiştir (Quintana vd., 2021).

Yamashita vd. (2015) tarafından mikroakışkan sistemi kullanılarak tek katmanlı (s/y) *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerini içeren mikrodamlacıklar elde edilmiş ve bu mikrodamlacıklardaki bakteri hücrelerinin % 87'lik kısmının canlılığının devam ettiği gözlemlenmiştir (Yamashita vd., 2015).

Wang vd. (2022) tarafından *Lactobacillus paracasei*'yi nanoselüloz/kalsiyum aljinat bazlı mikrokapsüllerini oluşturmak için mikroakışkan sistemi kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda mikroakışkan bazlı pH duyarlı nanoselüloz/aljinat mikrokapsüllerin probiyotiklerin bağırsak hedefli iletimi için umut verici olduğu belirtilmiştir (K. Wang vd., 2022).

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

Madde Adı	Firma Adı
Metanol	Sigma-Aldrich, Almanya
% 85 Fosforik Asit	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum Hidroksit	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum Nitrit	Merck, Almanya
Monobazik Potasyum Fosfat	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum Klorür	Sigma-Aldrich, Almanya
Hidroklorik Asit	Merck, Almanya
%99,9 Etanol	İsolab, Türkiye
Lesitin	ThermoFisher, Almanya
Kakao Yağı	Doğa İlaç, Türkiye
<i>Lactobacillus casei</i>	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı, Türkiye
Nutrient Agar	
Nutrient MRS Broth	
Potasyum Klorür	Sigma-Aldrich, Almanya
MTT Boyası	Applichem, Almanya
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	BiologicalInd, İsrail
Mesalazin	
Karboksimetil Selüloz	Sigma-Aldrich, Almanya
D-Sukroz	Fluka, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Firma Adı
Ultra Performans Sıvı Kromatografisi	Agilent, ABD
Termometre	Ebro, Almanya
Mikrosantrifüj	Eppendorf, Almanya
Büyük Kapasiteli Santrifüj	Eppendorf 5810, Almanya
Manyetik Karıştırıcı	IKA, Almanya
Floresan Mikroskop	Leica DMIL, Almanya
Otomatik Mikropipetler	Eppendorf, Almanya
Dondurucu (-20)	Liebherr, Almanya
Dondurucu (-80)	New Brunswick Sci., ABD
Buzdolabı	Liebherr, Almanya
Hassas Terazı	Mettler Toledo, ABD
Otoklav	Hiyarama, Japonya
CO ₂ 'li Etüv	Binder, Almanya
Plaka Okuyucu	BioTek, ABD
Enjektör Pompası	Inovenso, Türkiye
Su Devir Daimli Isıtıcı	Lab. Companion, Güney Kore
Laminar Akış Kabini	Kojair, Force Çin
Liyoflizatör	Operon, Güney Kore
pH-metre	Ohaus, ABD
UV Spektrofotometre	Shimadzu, Japonya
Distile Su Cihazı	Millipore, Amerika
Vorteks Karıştırıcı	Jeio Tech Co., Çin
Ultrasonik İşlemci	Sonics, ABD
Hücre Densitometresi	McFarland, Letonya
Cytation 5 plaka okuyucu	BioTek, ABD

4. YÖNTEM

4.1. Probiyotik Bakterisi Elde Etme ve Koloni Sayımı

4.1.1. Probiyotik bakterisi elde etme

Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarından temin edilmiş olan *Lactobacillus casei* probiyotik bakteri suşu MRS Broth (*Lactobacillus* Broth acc. to. De Man, Rogosa and Sharpe) besiyeri kullanılarak çoğaltılmıştır.

Bunun için öncelikle besiyeri içeriği litrede 52.2 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra ısıtılarak homojen hale getirilmiştir. pH değeri 5.7 ± 0.5 şeklinde ayarlanıp, otoklavda 121°C’de 15 dk steril edilmiştir. Daha sonra *Lactobacillus casei* probiyotik bakteri suşu 250 mL’lik steril MRS broth besiyerine inoküle edilip 37° C’de 48 saat çalkalayıcılı inkübatöre gelişmesi için bırakılmıştır (E. Yang vd., 2018).

İnkübasyonu tamamlanan bakteri ve besiyeri içeren çözelti 50 mL’lik falkon tüplere 25’er mL olmak üzere porsiyonlara ayrılmıştır. Falkonlardaki çözelti santrifüj cihazında +4 °C’de 10 dakika 4000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant döküldükten sonra % 10 sukroz içeren PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem 2 defa tekrarlanmıştır. Son durumda falkonlarda bulunan besiyerinden saflaştırılmış pelletler % 10 sukroz içeren PBS’de disperse edilmiştir. Dispersiyonun optik dansitesi spektrofotometrede 600nm’de ölçülerek 1’e ayarlanmıştır. Optik dansitesi 1’e ayarlanan dispersiyon 5’er mL’lik porsiyonlara bölünerek +4 °C’de 2 saat, -20 °C’de 4 saat bekletildikten sonra -67 °C’de liyofilizatör cihazı ile 48 saat liyofilize edilmiştir.

4.1.2. Probiyotik bakterisi koloni sayımı

Probiyotik bakterisinin kapsüllerde miktar tayini için yayma plak yöntemi (katı besiyerinde yayma yöntemi) kullanılarak mL’de bakteri sayısı hesaplanmıştır. Bunun için öncelikle steril agarlı MRS Broth besiyeri petri kaplarına yaklaşık 5 mm olacak şekilde 45-50 °C aralığında yaklaşık 15-20 mL olacak şekilde yayılmıştır. Besiyeri petri kaplarında donması beklenmiştir. Probiyotik bakterisinin 600 nm’de optik dansitesi 1’e ayarlanmış dispersiyonundan 1 mL alınarak seri dilüsyonların (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}) hazırlanmıştır. Seri dilüsyonlardan 100’er µL petri kaplarına aktarılmış ve steril drigalski spatulası yardımıyla sabit besiyeri yüzeyine yayılmıştır. Yayma işleminden sonra agarlı besiyerinin inokulumu absorblaması için 10 dakika beklenmiştir. Daha sonra petri kutuları 37 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda 30-300 aralığında koloni gelişimi olan petri kutularından sayımı yapılmıştır (Gürgün V. ve Halkman A.K., 1990; Halkman A.K., 2005; Halkman A.K. ve Ayhan K., 2000). Hangi dilüsyona ait oldukları tespit edilerek aşağıda verilen denklem yardımıyla koloni oluşturan birim (kob) sayısı hesaplanır.

Bunun için öncelikle dilüe numunedeki hücrelerin konsantrasyonunu hesaplanır:

$$\text{Dilüe numunedeki } \left(\text{kob}/\text{mL} \right) = \frac{(\text{petri plakasında sayılan kolonilerin sayısı})}{(\text{petri plakasına eklenen seyreltilmiş numune miktarı})} \quad (4.1)$$

Daha sonra esas numunedeki hücrelerin konsantrasyonu hesaplanır.

$$\text{Orijinal numunedeki } \left(\text{kob}/\text{mL} \right) = \frac{(\text{seyreltilmiş numunedeki kob})}{(\text{petri plakasının seyreltilmesi})} \quad (4.2)$$

Daha sonra elde edilen veriler 10 tabanında logaritması alınarak hesaplanır.

4.2. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

Ülseratif kolitin tedavisinde, etkin maddenin bağırsak ortamına yeterli miktarda ulaştırılamaması ve hastaların çoğunluğunda bağırsak mikrobiyota dzensizliğinin bulunması sebebiyle, yaşanan hastalık tedavisindeki olumsuzlukların giderilmesi amacıyla etkin madde ve probiyotik bakterisi kombine içeren formülasyon geliştirilmesi çalışmaları yürütülmüştür. Bu amaçla, kolona hedeflemenin sağlanabilmesi için enterik kaplı kapsüller seçilmiş ve içerisine mikroakışkan çip kullanılarak oluşturulmuş yağ içinde su (s/y) emülsiyonları doldurulmuştur. Yağ olarak, oda sıcaklığında donma özelliği gösteren katı lipid olan kakao yağı seçilmiştir. s/y emülsiyonlarının hazırlanmasında, sulu faz olarak probiyotik bakterilerin disperse edildiği PBS ve etkin maddemiz olan mesalazini içeren sulu karboksimetil selüloz (CMC) süspansiyonları kullanılmıştır. Probiyotik ve mesalazin içeren kombine kapsüllerin hazırlanması için öncelikli olarak, probiyotik içeren kararlı s/y yağ emülsiyonları ile mesalazin içeren kararlı s/y emülsiyonları ayrı ayrı hazırlanmıştır.

4.2.1. Probiyotik bakterilerinin kapsüllenmesi/probiyotik içeren s/y Emülsiyonunun hazırlanması

Kakao yağı 50 °C’de eritilmiştir. Eritilen kakao yağı içerisine % 4 soya lesitini ilave edilmiş ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 30 dakika boyunca karıştırılarak lesitin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözelti 10 mL’lik enjektöre doldurulmuştur.

İnkübasyon işleminin sonucunda elde edilen *Lactobacillus casei* bakterileri % 10 sükroz içeren PBS içerisinde disperse edilerek 10 mL’lik enjektöre doldurulmuştur.

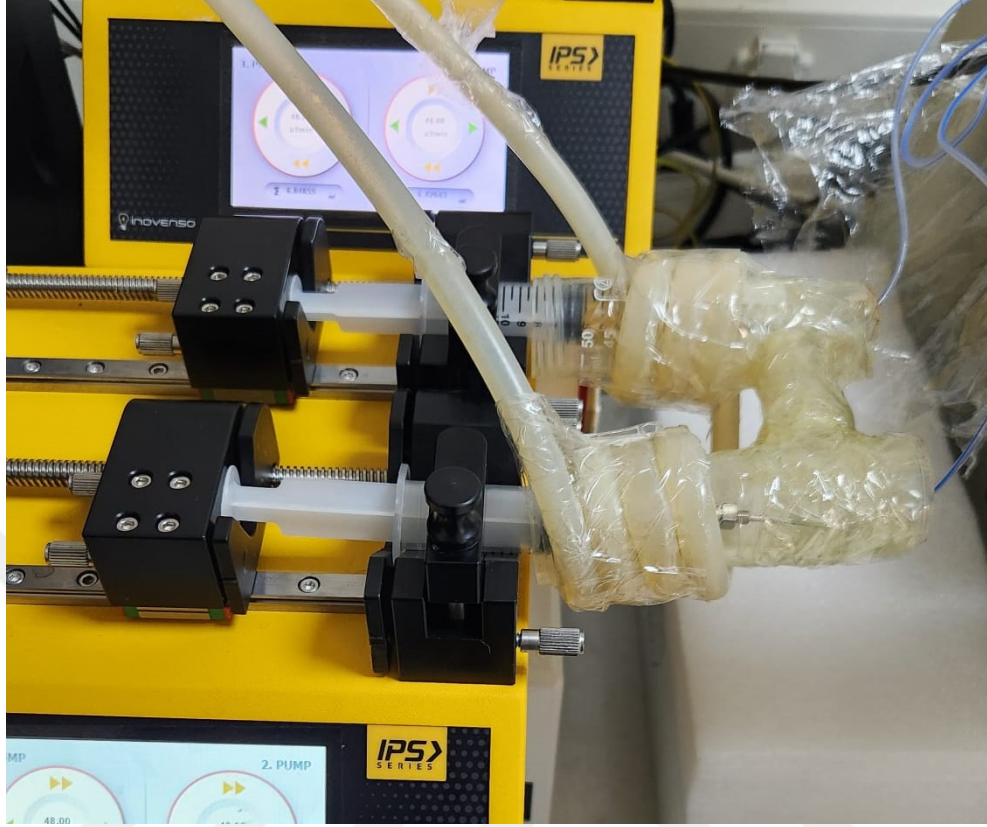
Doldurulan enjektörler daha sonra enjektör ucu bağlantılarla Şekil 4.1’de gösterilen, iç çapı 1,5 mm olan MBE-t Silicon Microfluidic Tubing ile Ufluidic’e ait BM5-Z500 cam üstünde PDMS çipine bağlanmıştır. Mikro akışkan çipine bakteri içeren su fazı iç, lesitinli kakao yağı dış faz olarak bağlanmıştır. Enjektörler sirkülasyonlu sulu ısıtıcı yardımı ile enjektör pompasına bağlanmıştır. Sirkülasyonlu sulu ısıtıcı aparatı laboratuvar imkanlarımız kullanılarak Şekil 4.2’de gösterildiği şekilde düzenlenmiştir. Sirkülasyonlu sulu ısıtıcı aparatı Şekil 4.3’te verildiği şekilde enjektörlere bağlanmıştır. İki fazın akış hızı 48 µL/dakika olarak ayarlanmıştır. Çıkış portundan silikon tubing sayesinde oluşan yağ içinde su emülsiyonu enterik kaplı kapsüllerin içinde toplanmıştır. Kapsüllerde toplanan emülsiyon +4 °C’de 2 saat, -20 °C’de 4 saat bekletildikten sonra -67 °C’de liyofilizatör cihazı ile 48 saat liyofilize edilmiştir.



Şekil 4.1. Formülasyon çalışmasında kullanılan mikroakışkan çipi



Şekil 4.2. Sirkülasyonlu su ısıtıcı aparatı-1



Şekil 4.3. Sirkülasyonlu su ısıtıcı aparatı-2

4.2.2. Mesalazin içeren s/y emülsiyonunun hazırlanması

Mesalazin çözünürlüğünün iyi olmamasından dolayı ve pompa enjektörü içerisinde çökme gerçekleşmemesi için % 2.5'luk CMC çözeltisi içerisinde % 2.5'luk mesalazin süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyon 10 mL'lik enjektöre doldurulmuştur. Kakao yağı 50°C'de eritilmiştir. Eritilen kakao yağı içerisine % 4 soya lesitin ilave edilmiş ve ısıtıcı manyetik karıştırıcıda 30 dakika boyunca karıştırılarak lesitin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözelti bir diğer 10 mL'lik enjektöre doldurulmuştur. Doldurulan enjektörler daha sonra enjektör ucu bağlantılarla iç çapı 1.5 mm olan MBE-t Silicon Microfluidic Tubing ile Ufluidic'e ait BM5-Z500 cam üstünde PDMS çipine bağlanmıştır. Mikro akışkan çipine bakteri içeren su fazı iç, lesitinli kakao yağı dış faz olarak bağlanmıştır. Enjektörler sirkülasyonlu sulu ısıtıcı yardımı ile şekil 4.3'de belirtildiği gibi enjektörün etrafına geçirilmiş, kakao yağının enjektör içinde donması önlenmiştir. İki fazın akış hızı 48 μ L/dakika olarak ayarlanmıştır. Çıkış portundan silikon tubing sayesinde oluşan yağ içinde su emülsiyonu proje kapsamında kapsüllerin içinde toplanmıştır. Kapsüllerde toplanan emülsiyon +4 °C'de 2 saat, -20

°C’de 4 saat bekletildikten sonra -67 °C’de liyofilizatör cihazı ile 48 saat liyofilize olmaları için bırakılmıştır.

4.3. İki Emülsiyonun Birleştirilmesi ve Kombine Formülün Oluşturulması

Mesalazin ve bakteri içeren formülasyonların oluşturulduğu iki farklı mikroakışkan çipinin çıkış portları silikon tubing yardımıyla birleştirilmiştir. Silikon tubing yardımıyla karışım halindeki formülasyonun kapsüllere dolumu gerçekleştirilmiştir. Dolu kapsüller +4 °C’de 2 saat, -20 °C’de 4 saat bekletildikten sonra -67 °C’de liyofilizatör cihazı ile 48 saat liyofilize edilmiştir.

4.4. Formülasyonların Karakterizasyonu

4.4.1. Damlacıkların morfolojik özelliklerinin ve partikül boyutlarının belirlenmesi

Partikül boyutlarının belirlenmesi için Floresan Ataçmanlı Araştırma Mikroskobu (LEICA DM2500) ve cihazın yazılımı kullanılarak boyut ölçümü ve boyut dağılımı gözlenmiştir. Ayrıca oluşan emülsiyon liyofilize edildikten sonra kesitler alınarak, kesitlerden mikroskop altında partiküller gözlenmiştir.

4.4.2. Kapsüllenen bakterilerin canlı koloni sayısının hesaplanması

Hazırlanan ve liyofilize edilen bakteri içeren s/y emülsiyonu kapsül içerisinden çıkartılıp tartım alınarak, 37° C’ye ayarlanmış 5 mL bağırsak ortamını taklit eden çözelti içerisinde tamamen dağılması beklenmiştir. Elde edilen dispersiyonundan 1 mL alınarak seri dilüsyonların (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}) hazırlanmıştır. Seri dilüsyonlardan 100’er µL bölüm 4.1.2. anlatıldığı şekilde hazırlanan petri kaplarına aktarılmış ve steril drigalski spatülü yardımıyla sabit besiyeri yüzeyine yayılmıştır. Yayma işleminden sonra agarlı besiyerinin inokulumu absorplaması için 10 dakika beklenmiştir. Daha sonra petri kutuları 37 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 30-300 aralığında koloni gelişimi olan petri kutularından sayımı yapılmıştır. Daha sonra koloni hesaplamaları için denklem 4.1 ve denklem 4.2 kullanılır.

Mikroakışkan sistem kullanılarak her bir enjektörden dakikada 48’er µL akışla yağ ve su fazı ile kapsüller 4 dakika 25 saniyede dolmuştur. Bunun sonucunda her bir kapsülde teorik olarak 212 µL probiyotik bakterisi dispersiyonu bulunduğu hesaplanmıştır. Kapsüllere doldurulan formülasyondaki kob sayısı hesaplanırken bu miktar üzerinden hesaplama yapılmıştır.

$$m_1 \times v_1 = m_2 \times v_2 \quad (4.3)$$

Denklemi kullanılarak kapsülde enkapsüle olan bakteri sayısı hesaplanır. Daha sonra elde edilen veriler 10 tabanında logaritması alınarak hesaplanır.

4.4.3. Kapsüllenen mesalazin miktar tayini

Kapsül içerisine en kapsüle edilen mesalazin miktarını belirlemek için öncelikle mesalazinin Ultra Performans Sıvı Kromatografisi (UPLC) (Agilent Technologies, Waldbronn, Almanya) ile analitik tayin yöntemi geliştirme çalışmaları yürütülmüştür.

4.4.3.1. Standart çözeltilerin hazırlanması

Mesalazin standardının, % 0.2'lik fosforik asit çözeltisinde çözünmesi ile 1 mg/mL derişimdeki stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti -20 °C'de saklanmıştır. Farklı derişimlerde standart çözeltiler bu stok çözeltinin % 0.2'lik fosforik asit çözeltisi ile seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

4.4.3.2. Kromatografik koşullar

Mesalazinin miktar tayini için bir UPLC kullanılmıştır. Analizler C18 kolonu (4.6 x 100 mm, 3.5 µm partikül boyutu) üzerinde, hareketli faz olarak pH 3.15 20 mM fosfat tamponu: metanol (90:10) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 0.600 mL/dk., kolon sıcaklığı 20 °C, enjeksiyon hacmi 20 µL ve dedektör dalga boyu 300 nm olarak belirlenmiştir. Kromatografik koşullar Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Kromatografik koşullar

Cihaz:	Agilent Technologies 1290 Infinity LC Systems
Kolon:	CNW Athena C18-WP, 4.6 x 250 mm, 3.5 µm
Kolon Sıcaklığı:	20 °C
Mobil Faz:	Ultra Saf Su : Methanol (90:10)
Dedektör:	Max-Light Cartridge Cell – DAD Dedektör
Dalga Boyu:	300 nm
Akış Hızı:	0.600 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi:	20 µL

4.4.3.3. Mesalazin miktar tayini için kromatografik yöntem geliştirilmesi

Yöntem geliştirilirken hareketli faz, akış hızı, kolon sıcaklığı gibi kromatografik parametreler değiştirilerek optimum koşullar belirlenmiştir. Formülasyonlara yüklenen ve salınan mesalazin miktarının hesaplanması için validasyon çalışmalarında elde edilen kalibrasyon denklemi kullanılmıştır.

4.4.3.4. Analitik yöntem validasyonu

Belirlediğimiz analitik yöntemin doğruluk ve güvenilirliğinin kanıtlanması amacıyla analitik yöntem validasyonu yapılmıştır. Geliştirilen yöntemin validasyon çalışmaları sırasında ICH Q2(R1) kılavuzuna uygun olarak seçicilik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, saptama ve tayin sınırları parametreleri araştırılmıştır.

4.4.3.4.1. Seçicilik

Analitik yöntemin seçiciliği, analiz ortamında olması beklenen safsızlık, bozunma ürünü, matriks gibi bileşenlerin varlığında analiti doğru tayin etme yeteneğidir. Bu çalışmada çalışma matriksi olan hazırladığımız ilaç taşıyıcı sistem formülasyonundan (kakao yağı, lesitin ve karboksi metil selüloz vb.) gelmesi olası bileşenlerin kromatogramlarda mesalazine ait pik ile girişim yapmadıkları boş kapsüllerin ve bileşenlerin analizleri ile değerlendirilmiştir.

4.4.3.4.2. Doğrusallık

Analitik yöntemin doğrusallığı, belirli bir konsantrasyon aralığında, analiz sonuçlarının numunedeki analitin konsantrasyonu ile doğrudan orantılı olduğunu ifade eder (ICH, 2005). Bu amaçla 0.5-10.0 µg/mL derişim aralığında, on farklı derişime (0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 6.0, 9.0, 10.0 µg/mL) sahip mesalazin çözeltisinden oluşan doğrusallık setleri farklı günlerde hazırlanmış ve her noktada 3 tekrarlı analizler gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda hesaplanan pik alanları ile konsantrasyonlar arasında lineer regresyon analizi yapılarak yöntem doğrusallığı değerlendirilmiştir.

4.4.3.4.3. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğu, bulunan değerin bulunması gereken değere (geleneksel bir gerçek değer ya da kabul edilen bir referans değer) yakınlığını ifade eder. Elde edilen sonuçlar % verim ve her serinin bağıl standart sapması hesaplanarak değerlendirilir (ICH, 2005).

Geliştirilen yöntemin doğruluğu üç farklı konsantrasyonda (0.8 µg/mL, 4.6 µg/mL, 9.6 µg/mL) mesalazin içeren standart çözeltilerin 3 tekrarlı analizleri sonucunda geri kazanımlar değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir.

4.4.3.4.4. Kesinlik

Analitik bir yöntemin kesinliği, numunenin birden fazla analizinden elde edilen ölçümler arasındaki uyumun yakınlığını ifade eder (ICH, 2005). Yöntemin kesinliği üç farklı konsantrasyonda (0.8 µg/mL, 4.6 µg/mL, 9.6 µg/mL) mesalazin içeren standart

çözeltilerin üç farklı günde 3 kez tekrarlı analizleri sonucunda bağıl standart sapmalar hesaplanarak değerlendirilmiştir.

4.4.3.4.5. Tespit ve tayin sınırları

Tespit limiti (LOD), bir numunedeki tespit edilebilecek ancak kesin bir değer olarak ölçülmesi gerekmeyen en düşük analit miktarıdır. Tayin sınırı (LOQ) ise numunedeki uygun hassasiyet ve doğrulukla niceliksel olarak belirlenebilen en düşük analit miktarıdır.

LOD, değeri belirlenirken çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar; görsel değerlendirme, sinyal-gürültü oranı ve elde edilen cevap ile eğimin standart sapması gibi yöntemlerdir.

LOD değerinin hesabında ICH kılavuzunda yer alan;

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{S} \quad (4.4)$$

denklemini kullanılmıştır.

LOQ değerinin hesabında ICH kılavuzunda yer alan;

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S} \quad (4.5)$$

denklemini kullanılmıştır. Denklemlerde yer alan σ , y ekseninde kesim noktasının standart sapmasını ifade etmektedir.

4.4.4. Formüle yüklenmiş mesalazin miktar tayini ve in vitro salım testleri

Hazırlanan formülasyon ÜK hastalarında kullanılmak üzere geliştirildiği için salım ortamları buna göre hazırlanmıştır. Bu sebeple USP'ye göre aşağıda yer alan Tablo 4.2'deki dissolüsyon ortamları hazırlanmıştır.

Tablo 4.2. Dissolüsyon ortamları

	Taklit Ettiği Ortam	İçeriği	Süre (Dakika)	pH	Karıştırma Hızı (RPM)
Asitli Ortam	Mide	2 g NaCl, 80 mL 1 M HCl, Distile su km 1000 mL	120	1.2	100
Tampon-I	Duedenum	43,35 g KH ₂ PO ₄ , 1,65 g NaOH, Distile su km 2000 mL	60	6	100
Tampon-II	İleum	Tampon-I, NaOH çözeltisi (Solüsyon-B, 133,6 g NaOH Distile su km 2000 mL) pH 7,2 olana kadar.	90	7.2	50
Tampon-III	Kolon	Tampon-II Fosforik Asit pH 6,5 olana kadar	1170	6.5	50

4.4.4.1. Formüle yüklenmiş mesalazin miktar tayini

Formülasyona yüklenen toplam mesalazin miktarını tespit edebilmek için formülasyon kapsülü bağırsak ortamını taklit eden 100 mL tampon-I solüsyonu içerisinde 24 saat 37 ± 0.5 °C’de dağılması sağlanmış ve bunun sonucunda açığa çıkan mesalazinin çözünmesi sağlanmıştır. Çözündürme işleminin sonunda ortamdan mikrotüpler içine 2 mL’lik numuneler alınmıştır. Alınan numuneler 10 dakika 4 °C’de 16000 rpm’de santrifüj edilerek numunede bulunan kakao yağı gibi suda çözünmeyen maddelerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Süpernatant alınıp 0.2 µm por çaplı fitreden geçirilerek UPLC yardımıyla analiz edilmiştir. UPLC ile elde edilen veriler analitik validasyon çalışması sonrasında elde edilen doğru denklemi kullanılarak mesalazin miktarı hesaplanmıştır.

Formülasyona yüklenen etkin madde yüzdesi aşağıda yer alan denklem ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ E. M. Miktarı} = \frac{\text{Çözündürme Ortamındaki Toplam E.M. Miktarı}}{\text{Formülasyon Ağırlığı}} \times 100 \quad (4.6)$$

Teorik olarak enkapsüle mesalazin miktarı aşağıda yer alan denklem ile hesaplanmıştır.

$$\text{Kapsüldeki su fazı miktarı } (\mu\text{L}) = (\text{kapsül dolum süresi}) \times (\text{su fazı akış hızı}) \quad (4.7)$$

$$\text{E. M. miktarı (mg)} = \text{su fazı konsantrasyonu} \times \text{kapsüldeki su fazı miktarı (mL)} \quad (4.8)$$

Formülasyon enkapsülasyon %’si aşağıda yer alan formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Formülasyon enkapsülasyon \%’si} = \frac{(\text{tespit edilen ortalama mesalazin miktarı})(\text{mg})}{(\text{teorik mesalazin miktarı})(\text{mg})} \times 100 \quad (4.9)$$

4.4.4.2. In vitro etkin madde salım çalışması

Etkin madde salım profilini gözlemlemek için USP’ye uygun olarak dört aşamalı bir etkin madde salım testi gerçekleştirilmiştir. Tüm aşamalarda ortam sıcaklığı 37 ± 0.5 °C’ye sabitlenmiştir. Birinci aşamada mide ortamını taklit etmek için hazırlanan pH 1.2’ye ayarlanmış 150 mL çözelti kullanılmıştır. Bu aşamada kapsüller manyetik karıştırıcı yardımıyla 100 rpm’de karıştırılan çözeltiye daldırılarak 120 dakika bekletilmiştir. 120 dakikanın sonunda çözünme ortamlarından 2’şer mL numune alınmış ve kapsüller çıkarılmış ve kâğıt havlu yardımıyla kapsüller kurutulmuştur. İkinci aşamada duodenum ortamını taklit etmek amacıyla hazırlanmış olduğumuz pH 6.0’a ayarlanmış

olan 150 mL tampon-I çözeltisi kullanılmıştır. Bu aşamada kurutulan kapsüller manyetik karıştırıcı yardımıyla 100 rpm’de karıştırılan tampon-I çözeltisine daldırılarak 60 dakika bekletilmiştir. 30. ve 60. dakikada 2’şer mL numune alınmıştır. Sink koşulu sağlamak amacıyla ortama, alınan numuneler kadar tampon-I çözeltisi eklenmiştir. Üçüncü aşamada ileum ortamını taklit eden ortam oluşturmak ve çözünme ortamını pH 7.2’ye ayarlamak için çözelti-b eklenmiştir. Kapsüller bu aşamada 90 dakika bekletilmiştir. Manyetik karıştırıcı hızı 50 rpm’e ayarlanmıştır. 30., 60. ve 90. dakikada 2’şer mL numune alınmıştır. Sink koşulu sağlamak amacıyla ortama, alınan numuneler kadar pH’ı 7.2’ye ayarlanmış tampon-II çözeltisinden eklenmiştir. Dördüncü aşamada kolon ortamını taklit eden ortam oluşturmak ve çözünme ortamının pH’ını 6.5’e ayarlamak için fosforik asit eklenmiştir. Kapsüller bu aşamada 1170 dakika bekletilmiştir. Manyetik karıştırıcı hızı 50 rpm’de sabit bırakılmıştır. 30., 60., 90., 120., 240., 360., 450., 630. ve 1170. dakikada 2’şer mL numune alınmıştır. Sink koşulu sağlamak amacıyla ortama, alınan numuneler kadar pH’ı 6.5’e ayarlanmış tampon-III çözeltisinden eklenmiştir.

Elde edilen numuneler 0.2 µm por çaplı fitreden geçirilerek UPLC yardımıyla analiz edilmiştir. Analiz sonucunda kalibrasyon denklemi ile formülasyonlara yüklenen ve salınan mesalazin miktarı hesaplanmıştır.

4.4.5. Sitotoksikite testleri

Hazırladığımız formülasyonun sitotoksik etkilerini belirleyebilmek adına in vitro sitotoksikite testleri içerisinde kolorimetrik yöntemlerden birisi olan ve en sık kullanılan testler içerisinde yer alan 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) testi kullanılmıştır.

Bu yöntemde ölü hücreler ve doku kültürü ortamı tarafından bozunmayan, sadece canlı hücreler tarafından renkli bir ürüne dönüştürülen renksiz bir substrat olan MTT kullanılır. Tetrazolyum tuzu olan MTT, sadece canlı hücrelerin mitokondrisinde parçalanır ve renkli bir bileşik ortaya çıkar. Oluşan renkli bileşiğin renk absorbansı mikropilaya okuyucusu yardımı ile ölçülür (Mosmann, 1983).

MTT testi için HUVEC hücreleri % 10 fetal sığır serumu ve % 1 antibiyotik içeren DMEM besiyerinde 37 °C’de % 5 CO₂ varlığında geliştirilmiştir. Daha sonra hücreler 2 defa PBS ile yıkanması sonrasında Thoma lamı üzerinde hücre sayımı yapılmıştır. Sayımı tamamlanan hücreler 96 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 2×10^4 (200-10⁶ aralığında duyarlıdır) hücre olacak şekilde 24 saat etüvde inkübasyonda bırakılmıştır. Kuyucuklardaki besiyeri ve non-adheran hücreler dikkatlice ortamdan uzaklaştırıldıktan

sonra üç kuyucuğa kontrol grubu olarak sadece besiyeri ilavesi yapılmıştır. 2 ayrı plaka kuyucuklarına 100'er µL (1 µg/100 µL, 2,5 µg/100 µL, 5 µg/100 µL, 10 µg/100 µL ve 20 µg/100 µL konsantrasyonlarda) mesalazin içeren besiyeri, 100'er µL mesalazin yüklenmiş formül, 100'er µL plasebo formül içeren besiyeri eklenmiştir. Eşit koşullar oluşması için sadece mesalazin çözündürülmüş besiyerinde bulunan son konsantrasyonlarıyla aynı miktarda mesalazin konsantrasyonlarda formülasyon içeren ve mesalazin içeren formülasyon kadar plasebo formül içeren besiyeri numuneleri hazırlanmıştır. Hazırlanan plakaların biri 24 saat diğeri 48 saat 37 °C'de % 5 CO₂ varlığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve kuyucuklar nazikçe PBS ile yıkanmıştır. Kuyucuklara PBS içerisinde 5 mg/mL konsantrasyonda MTT içeren çözeltilerden koyularak 4 saat 37 °C'de % 5 CO₂ varlığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklardan MTT çözeltisi uzaklaştırılmıştır ve 200'er µL DMSO koyulup 30 dakika 37 °C'de % 5 CO₂ varlığında inkübasyona bırakılmıştır. Plakaların absorbansı mikroparka okuyucusu ile 570 nm'de okunmuştur.

Her bir durum için 3 kuyucuk kullanılmıştır. % 100 canlılık olarak kabul edilen kontrol grubunun absorbans değeri ile formülasyon uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri oranlanarak % canlılık değerleri bulunmuştur.

5. BULGULAR

5.1. Probiyotik Bakterisi Elde Etme ve Koloni Sayımı

5.1.1. Probiyotik bakterisi elde etme

Lactobacillus casei suşu enkapsülasyon işlemi öncesinde öncelikle bölüm 4.1.1’de belirtildiği gibi inkübasyon işlemleri yapılmış ve probiyotik bakterisinin üretimi gerçekleştirilmiştir. % 10 sukroz içeren PBS de disperse edilerek optik dansiteleri 600 nm’de ölçülerek 1’e ayarlanmış olan probiyotik bakteri 5’er mL’lik dispersiyonları +4 °C’de 2 saat, -20 °C’de 4 saat bekletildikten sonra -67 °C’de liyofilizatör cihazı ile 48 saat liyofilize edilmiştir.

5.1.2. Probiyotik bakterisi koloni sayımı

Elde edilen *Lactobacillus casei* suşlarının koloni sayımı bölüm 4.1.2’de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Yayma plak yöntemiyle yapılan koloni sayımında 10^{-8} dilüsyonunda (n=3) ortalama 272 adet koloni sayımı yapılmıştır. Elde edilen değerler sonucunda, Denklem 4.1 ve denklem 4.2 yardımıyla ortalama kob sayısı hesaplanmıştır.

Bunun için öncelikle dilüe numunedeki hücrelerin konsantrasyonunu hesaplanır:

$$\begin{aligned} \text{Dilüe numunedeki } (k_{ob}/mL) &= \frac{(\text{petri plakasında sayılan kolonilerin sayısı})}{(\text{petri plakasına eklenen seyreltilmiş numune miktarı})} \\ &= \frac{(272)}{(10^{-8})} \end{aligned}$$

$$\text{Dilüe numunedeki } (k_{ob}/mL) = 2.72 \times 10^{10}$$

Daha sonra esas numunedeki hücrelerin konsantrasyonu hesaplanır.

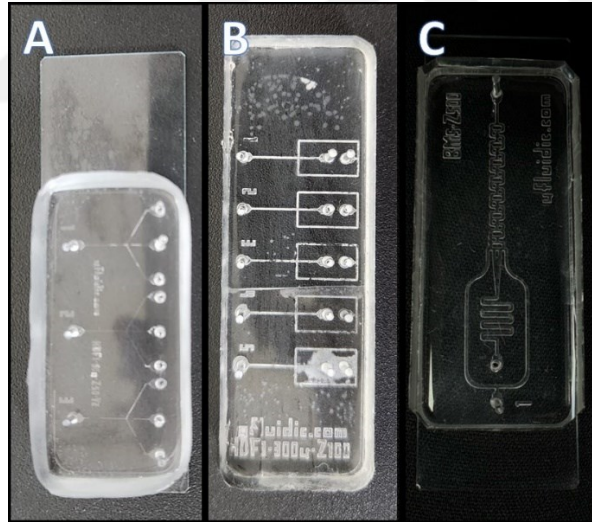
$$\begin{aligned} \text{Orijinal numunedeki } (k_{ob}/mL) &= \frac{(\text{seyreltilmiş numunedeki } k_{ob})}{(\text{petri plakasının seyreltilmesi})} \\ &= \frac{2.72 \times 10^{10}}{0.1} \\ &= 2.72 \times 10^{11} (k_{ob}/mL) \end{aligned}$$

Bunun sonucunda optik dansite değeri 1 olarak elde edilen probiyotik bakteri dispersiyonunda 2.72×10^{11} kob/mL sayıda bakteri bulunduğu tespit edilmiştir. 10 tabanında logaritması alındığında 11.43 log kob/mL bulunur.

5.2. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

5.2.1. Kullanılacak mikroakışkan çipin seçimi ve akış hızı tayini

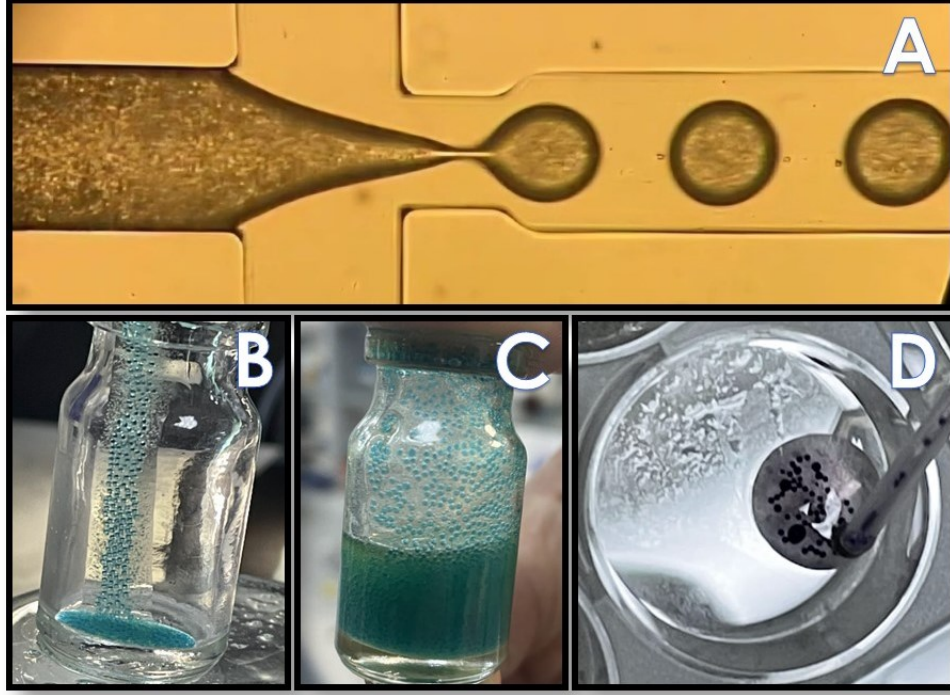
Formülasyon geliştirmesi sırasında farklı tiplerde ve özelliklerde mikroakışkan çipi kullanılmıştır. Bunun için uFluidic HDF1-50u-Z50-v2, HDF3-300u-Z100, ve BM5-Z500 mikroakışkan çipleri test edilmiştir. Kullanılan mikroakışkan çipleri Şekil 5.1’de verilmiştir. HDF1-50u-Z50-v2 mikroakışkan çipinde kakao yağının akış hızının istenilen seviyede uygulanamadığı ve viskozitesi sebebiyle mikroakışkan kanaldan geçerken yüksek basınç oluşturduğu ve ayrıca kakao yağının yer yer donarak kanalı tıkadığı görülmüştür. HDF3-300u-Z100 mikroakışkan çipinde elde edilen düşük çaplı partiküllerin agregasyon eğiliminde olduğu ayrıca mikroakışkan kanalında mesalazinin çöktüğü görülmüştür. Son olarak test edilen BM5-Z500 mikroakışkan çipinin yüksek akış hızlarına izin vermesi ve oluşan damlacıkların mikroakışkan kanalında akış sırasında küçülerek daha stabil bir hal alması sebebiyle formülasyon geliştirmesinde kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 5.1. Mikroakışkan çipleri (A- HDF1-50u-Z50-v2, B- HDF3-300u-Z100, C- BM5-Z500)

Su ve yağ fazının akış hızlarında 1-100 $\mu\text{L}/\text{dakika}$ aralığında değişiklikler yapılarak optimum akış hızına ulaşılmaya çalışılmıştır. Yüksek hızlarda çok küçük ve agregasyona meyilli damlacıklar oluşmuş, düşük akışlarda çok büyük çapta agregasyona meyilli damlacıklar elde edilmiştir. Su ve yağ fazının farklı oranlarda yapılan akışlarında yağ fazının akış hızının yüksek olduğu durumlarda formülasyonun enkapsülasyon yükleme kapasitesi düşmüştür. Su fazının akış hızının yüksek olduğu durumlarda yağ fazının su

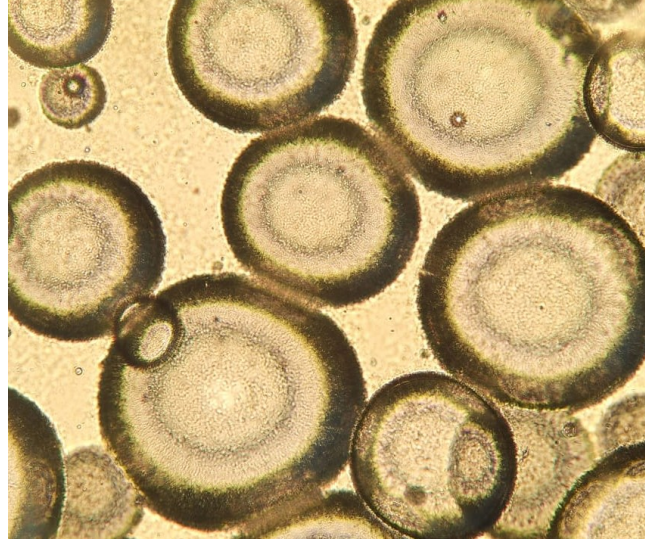
fazını damlacıklara ayırmada zorlandığı görülmüştür. Yapılan çalışmanın sonucunda yağ ve su fazının optimum akış hızının 48:48 µL/dakika olması gerektiğine karar verilmiştir. Akış hızı değişimi ile elde edilen ve elde edilen damlacıkların görüntüleri Şekil 5.2’de verilmiştir.



Şekil 5.2. S/Y emülsitonunun çip içinde oluşumu ve toplama alanındaki görünümü. A- Damlacıkların mikroakışkan kanaldaki görüntüsü, B/C- Flakon dolumu görüntüsü, D-Damlacıkların toplama tubinginden çıkışı

5.2.2. Probiyotik bakterilerinin kapsüllenmesi/probiyotik içeren s/y emülsiyonunun hazırlanması

Probiyotik bakteri dispersiyonunun enkapsülasyon işlemi bölüm 4.2.1’de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Elde edilen formülasyon liyofilizasyon işlemi ile kurutulmuştur. Oluşturulan probiyotik bakteri enkapsülasyonu sonucunda elde edilen formülasyonun mikroskobik görüntüsü Şekil 5.3’te verilmiştir.



Şekil 5.3. Probiyotik bakterisi yüklü partiküllerin görüntüsü

Dondurularak kurutulma işlemi sırasında ve sonrasında depolama sırasında probiyotik bakterilerinin canlılığını korumak için taşıyıcı sistem olarak yağların kullanılması faydalı seçenekler sunmaktadır (Endo vd., 2014). Lipit bazlı mikrokapsüllerin polisakkarit bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerine göre bir avantajı, mide ortamında lipaz bulunmaması sebebiyle probiyotikleri mide ortamından daha iyi koruyabilmeleridir (Tenorio-Garcia vd., 2023). Ayrıca yapılan çalışmalarda kakao yağı bazlı lipit ilaç etkin maddesi enkapsülasyonunun etkin maddenin kontrollü salınmasını sağladığı gözlemlenmiştir (Khosh manzar vd., 2020).

Bu sebeple formülasyon geliştirme aşamasında probiyotik bakterisi enkapsülasyonuna ve etkin madde enkapsülasyonuna izin vermesi sebebiyle lipit bazlı taşıyıcı sistem geliştirilmesine karar verilmiştir.

Formülasyon çalışması sırasında sabit yağ olarak kakao yağı ve hindistan cevizi yağı, surfaktan olarak twen 80, span 80 ve lesitin denenmiştir. Kakao yağının ve lesitin inert olması, enkapsülasyon işlemi sonrasında oluşan mikrodamlacıkların stabilitesinin daha iyi olması, enkapsüle edilecek etkin madde ve özellikle probiyotik bakterisine olumsuz etkilerinin bulunmaması sebebiyle tercih edilmiştir. Ayrıca petri kutularında mikrobiyolojik duyarlılık testi yapılmıştır. Yapılan testte lesitin ve kakao yağı içeren kuyuların çevresinde *Lactobacillus casei*'nin zon çapı oluşturmadığı görülmüştür. Bu sonucunda probiyotik bakterisinin formülasyonda kullanılan maddelere duyarlı olmadığı görülmüştür. Yapılan test kapsamında agar yüzeyindeki probiyotik bakterisinin üremesi Şekil 5.4'te gösterilmiştir.



Şekil 5.4. Probiyotik duyarlılık testi (K-) Kakao yağı kuyusu, L-) Lesitin kuyusu)

Possemiers vd. (2010) yaptıkları çalışmalarında enkapsüle *Lactobacillus helveticus* CNCM I-1722 ve *Bifidobacterium longum* CNCM I-3470 probiyotik bakterilerinin çikolata içerisinde verildiğinde kolona ulaşma miktarlarının arttığını ve çikolatanın probiyotik bakterilerini çevresel stres koşullarından koruduğunu göstermişlerdir. Başka bir çalışmada Maillard ve Landuyt enkapsüle probiyotik bakterilerini çikolataya ekleyerek yaptıkları çalışmada, ince bağırsağa ulaşan canlı probiyotik bakterisi sayısının süt ürününe göre üç kat daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir (Konar vd., 2016).

Liyofilizasyon işlemi kuru bakteri tozları üretmek için sıklıkla kullanılan yöntemdir. Çünkü kurutma işlemi düşük sıcaklıklarda gerçekleşir ve böylece sıcaklıktan kaynaklı hücre kayıpları gözlenmez. Ancak bu yöntem uygulanması sırasında biyolojik materyaller geri dönülemeyecek kadar zarar görebilir. Dondurma işlemi buz kristallerinin oluşmasına, hücre içi tuz konsantrasyonunun artmasına, suyun hücrelerden dışarı sızmasına ve hücre dışı buz kristallerinin oluşmasına neden olur. Bunun sonucunda oluşan ozmotik şok, hücre canlılığı kaybının ana nedenidir (Stefanello vd., 2019). Bu nedenle, hücre hasarını en aza indirmek ve yüksek hücre canlılığı verimi elde etmek için, kriyoprotektanlar kullanılmaktadır. Hücresel canlılığı artırmak için doğru kriyoprotektanın belirlenmesi gerekmektedir. Yaygın olarak disakkaritler (sukroz, laktoz, trehaloz), polioller (mannitol, sorbitol) ve polisakkaritler (maltodekstrin, dekstran, inülin) kriyoprotektan olarak kullanılmaktadır. Disakkaritler ve oligosakkaritler, sadece kolayca vitrifikasyona uğramaları sebebiyle değil, aynı zamanda kurutma sırasında uzaklaştırılan su moleküllerinin yerini kolaylıkla alabilecek ve böylece hücre bütünlüğünü koruyabilecek küçük moleküler yapılar oldukları için kriyoprotektan olarak tercih

edilmektedir. Şekerler kriyoprotektan özelliklerini, çeşitli mekanizmalarla gerçekleştirmektedir. Bunlardan biri, şeker moleküllerinin hücre zarlarından nüfuz ederek, başlangıçta hücre içindeki fosfolipit katmanları arasında mevcut olan uzaklaştırılmış su moleküllerinin yerini alarak gerçekleştirir. Bu durumun sonucunda, dehidrasyon sırasında su moleküllerinin yerini alan şeker molekülleri, dondurarak kurutma işleminden sonra hücre zarlarının doğal sağlam yapısının korunmasına yardımcı olur. Ayrıca şekerler prebiyotik aktivite de göstermektedirler (Oluwatosin vd., 2022). Bu nedenle probiyotik bakterilerin liyofilizasyon esansında hücresel bütünlüğünü korumak amacıyla kriyoprotektan olarak sukroz kullanılmıştır. Sukrozun yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektan aktivitesinin iyi olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Broeckx vd., 2016; Oluwatosin vd., 2022). Bunun için sukrozun PBS içerisindeki % 6, % 8 ve % 10'luk çözeltileri denenmiştir. Mikroakışkan çip içerisinde istenilen partikül boyutu ve stabilitesinin % 10 sukroz içeren çözelti ile sağlandığı görülmüştür. % 6 ve % 8'lik çözeltilerle hazırlanan formülasyonlarda damlacıkların birleşme ve dağılma eğilimi gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca bu konsantrasyonlarda su fazının yağ fazını mikro akışkan kanalda keskin bir şekilde kesemediği gözlenmiştir.

Oluşturulan formülasyon +4 °C'de 2 saat, -20 °C'de 4 saat bekletildikten sonra -67 °C'de liyofilizatör cihazı ile 48 saat liyofilize edilmiştir.

Son olarak elde edilen *Lactobacillus casei* yüklü formülasyonların ağırlıkları Tablo 5.1'de verilmiştir.

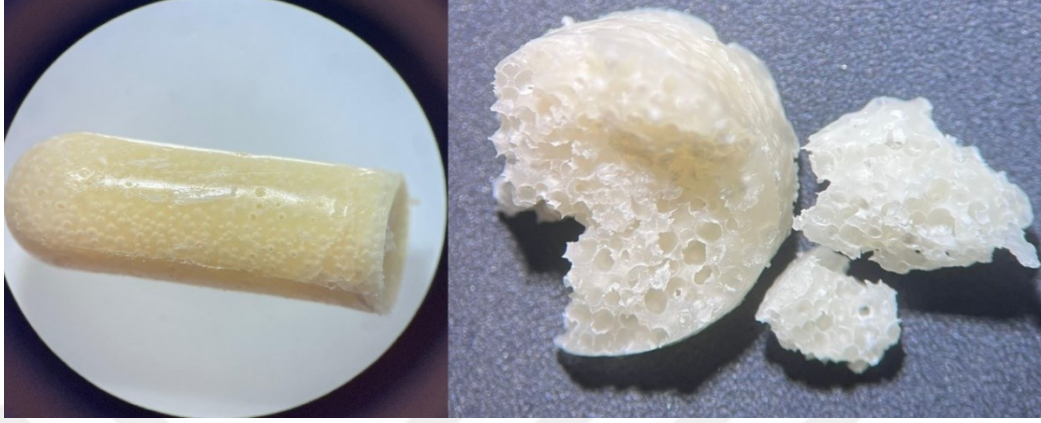
Tablo 5.1. *Lactobacillus casei* yüklü formülasyonların ağırlıkları

Kapsül	Kapsül Ağırlığı
Kapsül-1	327,36 g
Kapsül-2	328,40 g
Kapsül-3	327,28 g
Kapsül-4	328,57 g
Kapsül-5	336,96 g
Kapsül-6	335,17 g
Ortalama	330,62 g
Standart Sapma	± 4,2851
Standart Hata	± 1,296

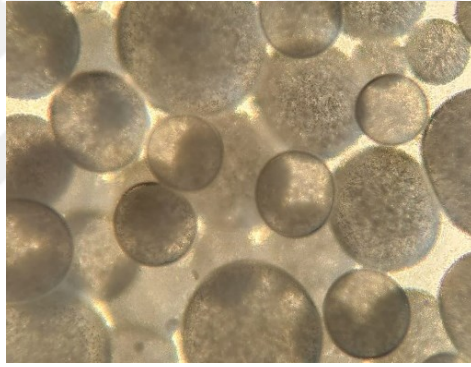
5.2.3. Mesalazin içeren s/y emülsiyonunun hazırlanması

Mesalazinin içeren süspansiyon kakao yağı içerisindeki emülsiyonu bölüm 4.2.2.'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Liyofilizasyon işlemi sonrası kapsüle doldurulan

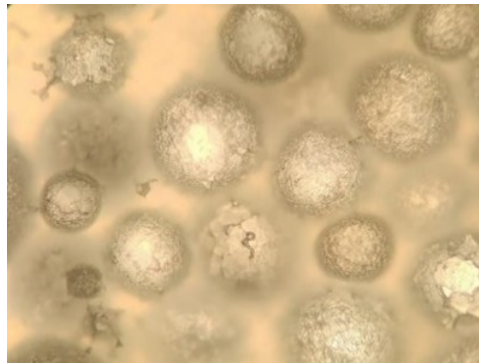
formülün kapsül soyulduktan sonraki mikroskopik (ışık mikroskobu) görüntüleri Şekil 5.5, Şekil 5.6 ve Şekil 5.7’de verilmiştir.



Şekil 5.5. *Formülasyonun liyofilizasyon işlemi sonrası tam ve kesit görüntüsü*



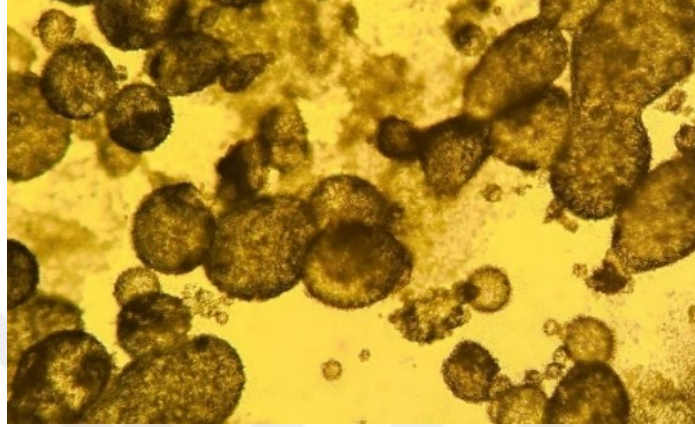
Şekil 5.6. *Mesalazin yüklü partiküllerin mikroskopik görüntüsü*



Şekil 5.7. *Mesalazin içeren formülasyonun liyofilizasyon sonrası ışık mikroskobu görüntüsü*

Mesalazinin sudaki çözünürlüğünün iyi olmaması sebebiyle karboksimetil selüloz ile sulu dispersiyonları hazırlanmıştır. CMC'nin % 1, % 2, % 2.5 ve % 3'lük konsantrasyonları denenmiştir. Dispersiyonun en uzun süre homojen kaldığı % 2, % 2.5

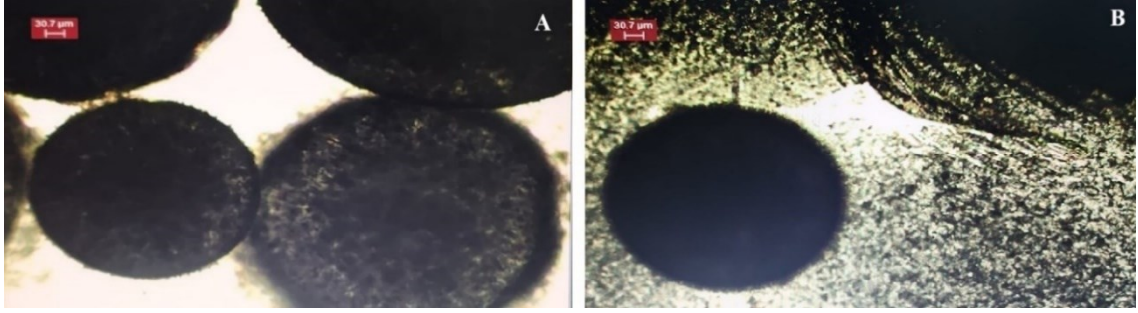
ve % 3'lük CMC çözeltileri ile mikroakışkan çipte formülasyon çalışmaları yapılmıştır. % 3'lük konsantrasyonun mikroakışkan kanalda yağ fazı ile damlacıklar oluşturmadığı, % 2'lik CMC çözeltisinin ise oluşturduğu damlacıkların dağıldığı belirlenmiştir. Parçalanmış damlacıklar Şekil 5.8'de gösterilmiştir.



Şekil 5.8. Karboksimetil selülozun % 2'lik çözeltisi ile hazırlanan formülasyonun mikroskopik görüntüsü

Kakao yağının içerisinde lesitin çözündürülebilmesi ve mikroakışkan kanaldan geçirilebilmesi için kakao yağının eritilmesi gerekmektedir. Bunun için 45-50 °C'den düşük sıcaklıklarda eritilmiş kakao yağının mikroakışkan kanalda donduğu ve kanalı tıkadığı, 45-50 °C'den yüksek sıcaklıklarda ise kakao yağının kristal yapısının büyük oranda bozulması sebebiyle oluşturulan damlacıkların stabilitesini koruyamayarak dağıldığı ve kakao yağının son formülasyon aşamasında donmadığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle kakao yağı ile çalışma sıcaklığı 50 °C olarak belirlenmiştir. Ayrıca akış sırasında sıcaklığın sabit kalabilmesi için sirkülasyonlu su ısıtıcısı ile yağ içeren enjektörlerin bu sıcaklıkta kalması sağlanmıştır.

Kakao yağı içerisinde lesitin konsantrasyonu için % 2, % 3 ve % 4'lük konsantrasyonlar denenmiştir. % 2 ve % 3'lük konsantrasyonlarda oluşturulan damlacıkların kakao yağı donma noktasına geldiği sırada dağıldıkları gözlemlenmiştir. Lesitin düşük konsantrasyonlardaki formülasyonun mikroskopik görüntüsü Şekil 5.9'da verilmiştir.



Şekil 5.9. Lesitinin düşük konsantrasyonlarda kullanıldığı formülasyonunun mikroskopik görüntüsü (A-Formülasyonun ilk hali, B-Formülasyonun zamanla uğradığı şekil değişikliği)

Son olarak elde edilen mesalazin yüklü formülasyonların ağırlıkları Tablo 5.2’de verilmiştir.

Sonuç olarak, 5 mL % 2.5 CMC çözeltisi içinde 125 mg mesalazin dispers edilmiş sulu faz ile % 4 lesitin içeren kakao yağının, 48 µL/dk akış hızı ile 50 °C’de mikroçipe verilerek hazırlanan s/y emülsiyonunun en kararlı emülsiyon olduğu belirlenmiştir. Oluşan emülsiyon direkt olarak enterik kaplı kapsüllere doldurulmuş, kapsüllerin eş miktarda formül ile doldurulabilmesi için dolum esnasında süre tutulmuştur. Eş sürede doldurulan kapsüller -20 °C’de 4 saat bırakılarak dondurulmuş ve 9.4 mBar basınç altında -67 °C’de 36 saat liyofilize edilmiş ve tartılmıştır.

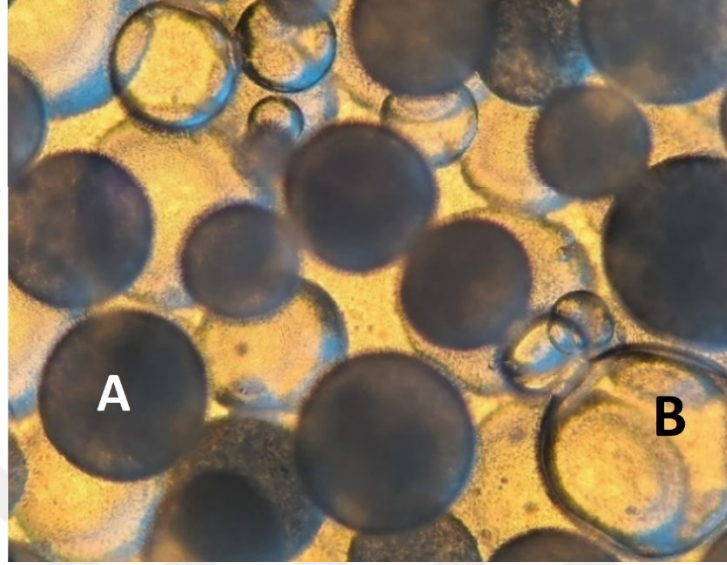
Tablo 5.2. Mesalazin yüklü formülasyonların ağırlıkları

Kapsül	Kapsül Ağırlığı
Kapsül-1	226,41 g
Kapsül-2	223,31 g
Kapsül-3	226,30 g
Kapsül-4	222,34 g
Kapsül-5	221,59 g
Kapsül-6	228,81 g
Ortalama	224,79 g
Standart Sapma	± 2,81
Standart Hata	± 1,25

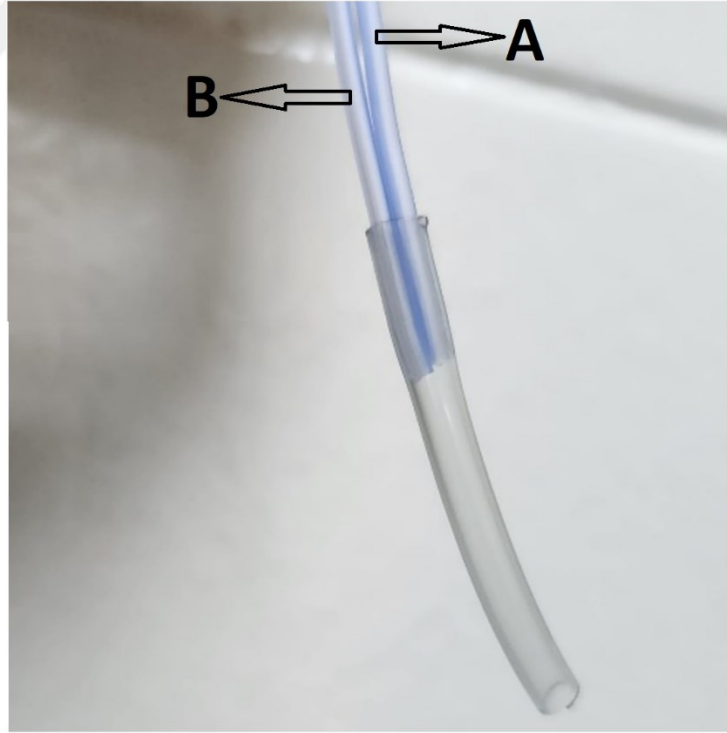
5.2.4. İki formülasyonun birleştirilmesi ve son formülün oluşturulması

İki formülasyonun birleştirilme işlemi silikon tubing yardımıyla bölüm 4.3.’te belirtildiği şekilde yapılmıştır. Karışım halindeki formülasyonun mikroskopik görüntüsü,

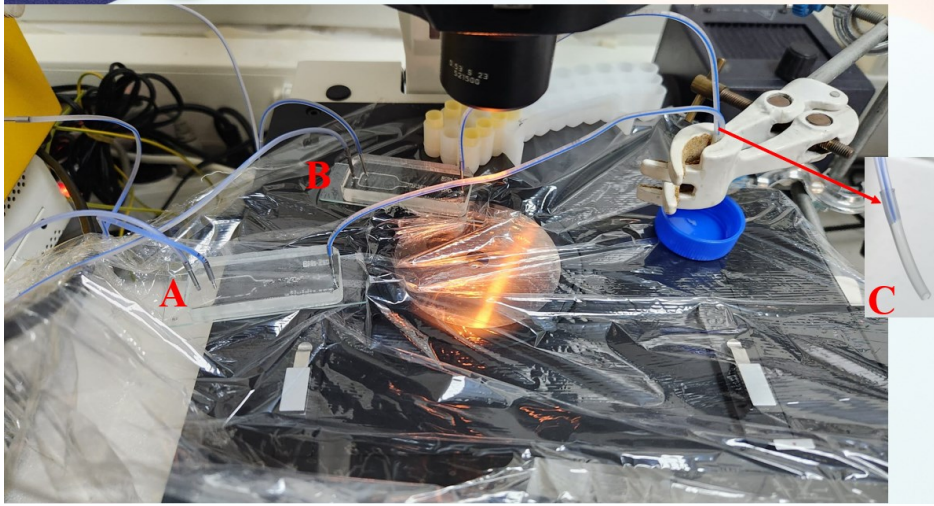
oluşturulan birleştirme tubingi ve formülasyon üretim düzeneği Şekil 5.10, Şekil 5.11 ve Şekil 5.12’de verilmiştir.



Şekil 5.10. Mesalazin (A) ve probiyotik bakterisi (B) içeren formülasyonun mikroskop görüntüsü



Şekil 5.11. İki formülasyon birleşim tubingi A: Mesalazin s/y emülsiyonunu taşıyan B:Probiyotik s/y emülsiyonunu taşıya tüp



Şekil 5.12. Formülasyon üretim düzeneği A- Probiyotik çip B- Mesalazin çip C-Kombin formülasyonun çıkış portu

5.3. Formülasyonların Karakterizasyonu

5.3.1. Kapsüllenen bakterilerin canlı koloni sayısının hesaplanması

Liyofilize edilen kapsüllerin ağırlıkları ölçülmüştür. Daha sonra kapsüllere yüklenen canlı koloni sayısı bölüm 4.4.2.'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Sadece probiyotik yüklenen formülasyonun ve kombine mesalazin-probiyotik yüklenen formülasyonun probiyotik bakteri sayısı hesaplanmıştır. Yayma plak yöntemiyle yapılan koloni sayımında liyofilizasyon sonrasında 10^{-3} dilüsyonunda (n=3) ortalama yalın probiyotikli formülasyonda 154 adet ve kombine formülasyonda 120 adet kob sayımı yapılmıştır (Şekil 5.13 ve Şekil 5.1a). Elde edilen değerler sonucunda, Denklem 4.1, denklem 4.2 ve denklem 4.3 yardımıyla kapsüllenen ortalama kob sayısı hesaplanmıştır;

Bunun için öncelikle dilüe numunedeki kob sayısı hesaplanır:

$$\text{Dilüe numunedeki } \left(\text{kob}/\text{mL} \right) = \frac{(\text{petri plakasında sayılan kolonilerin sayısı})}{(\text{petri plakasına eklenen seyreltilmiş numune miktarı})}$$

$$= \frac{(154)}{(10^{-3})}$$

$$\text{Dilüe numunedeki } \left(\text{kob}/\text{mL} \right) = 1.54 \times 10^5$$

Daha sonra esas numunedeki hücrelerin konsantrasyonu hesaplanır.

$$5 \text{ mL'lik Dispersiyonun Koloni Sayısı } \left(\text{kob}/\text{mL} \right) = \frac{(\text{seyreltilmiş numunedeki kob})}{(\text{petri plakasının seyreltilmesi})}$$

$$= \frac{1.54 \times 10^5}{0.1}$$

5 mL'lik Dispersiyonun Koloni Sayısı = 1.54×10^6 (kob/mL)

$$m_1 \times v_1 = m_2 \times v_2$$

$$m_1 \times 0.212 = 1.54 \times 10^6 \times 5$$

$$\text{Kapsülün Koloni Sayısı} = 3.6 \times 10^7 \text{ (kob/mL)}$$

Bunun sonucunda liyofilizasyon sonrasında kapsüle doldurulmuş formülasyona yüklenmiş probiyotik bakteri miktarının ortalama 3.6×10^7 kob/mL sayıda olduğu tespit edilmiştir. 10 tabanında logaritması alındığında 7.56 log kob/mL bulunur.



Şekil 5.13. 10^1 , 10^2 ve 10^3 koloni sayım dilüsyon petrileri



Şekil 5.14. 10^3 dilüsyonu sayım petrisi

Kombine kapsüllere yüklenen canlı koloni sayısının hesaplanması için önce dilüe numunedeki kob sayısı hesaplanır:

$$\text{Dilüe numunedeki } \left(\text{kob}/\text{mL} \right) = \frac{(\text{petri plakasında sayılan kolonilerin sayısı})}{(\text{petri plakasına eklenen seyreltilmiş numune miktarı})}$$

$$= \frac{(120)}{(10^{-3})}$$

$$\text{Dilüe numunedeki } \left(\text{kob}/\text{mL} \right) = 1.2 \times 10^5$$

Daha sonra esas numunedeki hücrelerin konsantrasyonu hesaplanır.

$$5 \text{ mL'lik Dispersiyonun Koloni Sayısı } \left(\text{kob}/\text{mL} \right) = \frac{(\text{seyreltilmiş numunedeki kob})}{(\text{petri plakasının seyreltilmesi})}$$

$$= \frac{1.2 \times 10^5}{0.1}$$

$$5 \text{ mL'lik Dispersiyonun Koloni Sayısı} = 1.2 \times 10^6 (\text{kob}/\text{mL})$$

$$m_1 \times v_1 = m_2 \times v_2$$

$$m_1 \times 0.212 = 1.2 \times 10^6 \times 5$$

$$\text{Kapsülün Koloni Sayısı} = 3.6 \times 10^7 (\text{kob}/\text{mL})$$

Bunun sonucunda liyofilizasyon sonrasında kapsüle doldurulmuş formülasyona yüklenmiş probiyotik bakteri miktarının ortalama 2.83×10^7 kob/mL sayıda olduğu tespit edilmiştir. 10 tabanında logaritması alındığında 7.45 log kob/mL bulunur. Hesaplanan canlı koloni sayıları Tablo 5.3'te verilmiştir.

Tablo 5.3. Canlı koloni sayıları

	Su Fazı-1 Liyofilizasyon Sonrası	Sadece <i>Lactobacillus casei</i> İçeren Formül	Kombine Formül
Dilüsyon	10^{-8}	10^{-3}	10^{-3}
Ortalama Koloni Oluşturan Birim (kob)	136	154	120
Toplam Probiyotik Sayısı (kob/mL)	1.36×10^{11}	3.6×10^7	2.83×10^7
Log₁₀ Probiyotik Sayısı	11,13	7,56	7,45

5.3.2. Kapsüllenen mesalazın miktar tayini

5.3.2.1. Mesalazın miktar tayini için kromatografik yöntem geliştirilmesi

Mesalazının miktar tayini için bir UPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bunun için akış hızı, hareketli faz, kolon, enjeksiyon hacmi vb. gibi parametrelerin varyasyonları uygulanarak doğru pik morfolojisi elde edilerek stabil seçiciliğe sahip yöntem elde

edilmiştir. Validasyon parametreleri değerlendirilirken yapılan istatistik hesaplamaları Microsoft Office Excel 2023 programı yardımıyla yapılmıştır.

Yöntemin optimizasyonu için 5 µg/mL mesalazin çözeltisi kullanılmıştır. Çalışmaya öncelikle uygun kolonun seçimi ile başlanmıştır. Bunun için GraceSmart RP 18 150 mm x 4.6 mm ve Athena C18-WP 250 mm x 4.6 mm kolonları kıyaslanmıştır. Mesalazinin alıkonma zamanının daha iyi olduğu Athena C18-WP 250 mm x 4.6 mm kolonu ile çalışmalara devam edilmiştir.

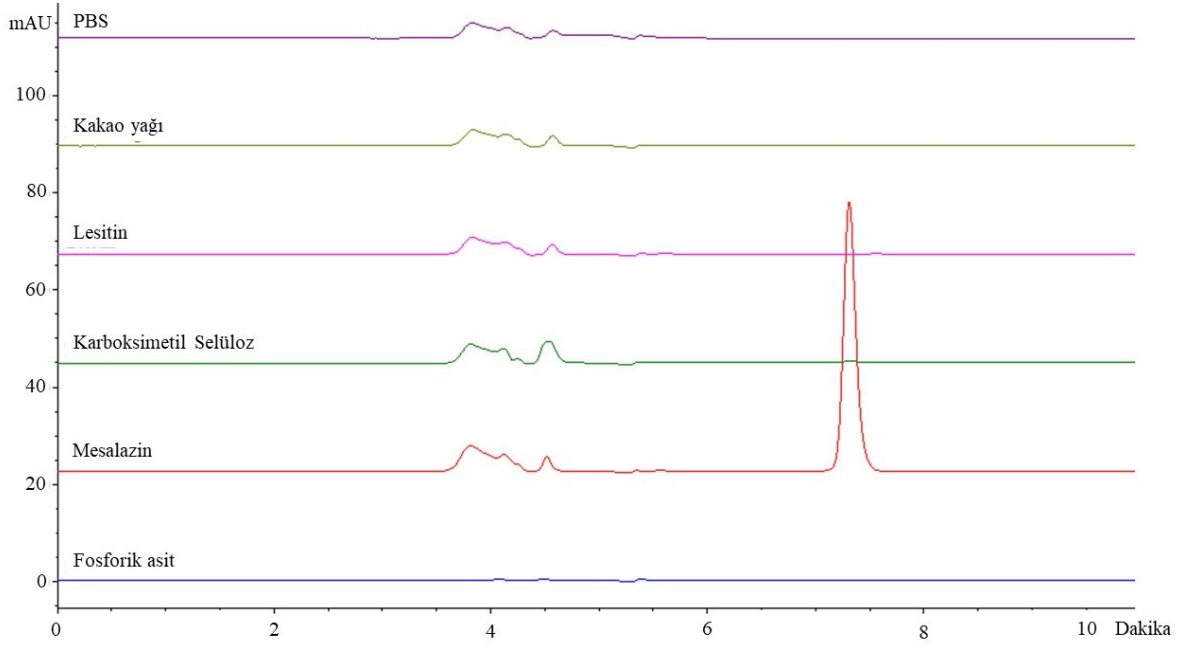
Hareketli faz olarak farklı oranlarda % 0.1 Fosforik Asit-Metanol, % 0.1 Fosforik Asit-Asetonitril, Fosfat Tamponu-Metanol, Asetat Tamponu-Metanol denenmiştir. Pik morfolojisinin ve alıkonma zamanının daha iyi olduğu görülen tampon ve metanol karışımları seçilmiştir. Tampon oranı 90:10 oranında ayarlandığında pik morfolojisinin kısmen düzeldiği tespit edilmiştir. Daha sonra tampon-metanol karışımları farklı akış hızlarında (0.5, 0.6, 0.7 ve 0.8 mL/dk), farklı pH'larda (3, 4 ve 5) ve molar konsantrasyonlarda (10, 20, 30 ve 40) denenmiştir. Yapılan değerlendirmelerde en uygun hareketli faz karışımının 20 mM pH:3 Fosfat Tamponu içermesi gerektiği ve akış hızının 0,6 mL/dk olması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Son olarak kolon sıcaklığı olarak 20 ve 30 °C denenmiş ve anlamlı bir fark oluşturmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle kolon sıcaklığı 20 °C olarak ayarlanmıştır.

5.3.2.2. Analitik yöntem validasyonu

5.3.2.2.1. Seçicilik

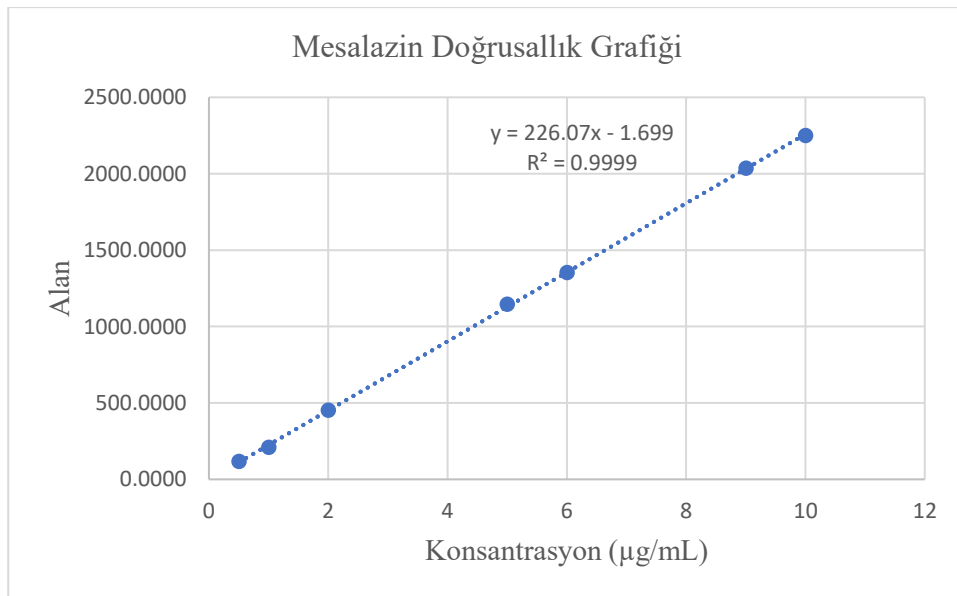
Analitik yöntemin seçiciliği, ilaç taşıyıcı sistem formülasyonundan kakao yağı, lesitin ve karboksi metil selüloz vb. gelmesi olası bileşenlerin kromatogramlarda mesalazine ait pik ile girişim yapmadıkları görülmüştür. Şekil 5.15'de bu bileşenlerin mesalazin piki ile ortak görüntüsü görülmektedir.



Şekil 5.15. Formülasyon bileşikleri ve mesalazinin kromatografik görüntüleri

5.3.2.2.2. Doğrusallık

Mesalazinin 0.5-10.0 derişim aralığında, her bir derişime (0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 6.0, 9.0, 10.0 $\mu\text{g/mL}$) karşılık gelen eğri altında kalan alan değeri kullanılarak lineer regresyon analizi yapılmıştır. Bunun sonucunda kalibrasyon eğrisi, kalibrasyona ait doğru denklemi ve R^2 değeri hesaplanmıştır. Elde edilen R^2 değerinin 1'e çok yakın olması yöntemin doğrusallığını göstermektedir. Kalibrasyon denklemi ve grafik Şekil 5.16'da verilmiştir.



Şekil 5.16. Mesalazin doğrusallık grafiği

5.3.2.2.3. Doğruluk

Analiz yönteminin doğruluğunun değerlendirilmesi amacıyla mesalazinin 0.8, 4.6 ve 9.6 µg/mL konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyon için 3'er defa analiz edilmiştir. Sonuçlar elde edilen eşitlikte yerine konularak teorik derişim ile % geri kazanım oranları değerlendirilmiştir. Yöntemin doğruluk çalışmasına ait tablo aşağıda Tablo 5.4'te sunulmuştur.

Tablo 5.4. Doğruluk çalışmaları verileri

Derişim (µg/mL)	0,8	4,6	9,6
Elde Edilen Derişim	0,8101	4,6396	9,5253
	0,8033	4,6596	9,5069
	0,8051	4,6556	9,5397
% Geri Kazanım	101,27	100,87	99,22
	100,41	101,30	99,03
	100,63	101,21	99,37
Ortalama	100,77	101,12	99,21
Standart Sapma (±)	0,4419	0,2267	0,1715
Standart Hata (±)	0,2551	0,1309	0,099

Geri kazanım değerlerinin % 100'e yakın olması (% 98-102 arasında) analitik yöntemin doğruluğunu göstermektedir.

5.3.2.2.4. Kesinlik

Analiz yönteminin kesinliğinin değerlendirilmesi amacıyla mesalazinin 0.8, 4.6 ve 9.6 µg/mL konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyon için üçer defa analiz edilmiştir. Sonuçlar elde edilen eşitlikte yerine konularak pratik derişimleri hesaplanmıştır. Hesaplanan konsantrasyon verilerinin ortalamaları, standart sapmaları ve varyasyon katsayıları değerlendirilmiştir. Yöntemin kesinlik çalışmasına ait veriler aşağıda Tablo 5.5'te sunulmuştur.

Elde edilen veriler sonucunda elde edilen varyasyon katsayılarının % 2'den düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum yöntemin kesinliğini kanıtlamaktadır.

Tablo 5.5. Kesinlik çalışmaları verileri

	1. Gün	2. Gün	3. Gün
0,8 µg/mL	0,8002	0,8014	0,8101
	0,8076	0,8033	0,8033
	0,8070	0,8042	0,8051
Ortalama	0,8050	0,8030	0,8062
Standart Sapma (±)	0,0441	0,0014	0,0035
Varyasyon Katsayısı	0,5138	0,1752	0,4386
4,6 µg/mL	4,6100	4,6641	4,6399
	4,6340	4,6561	4,6596
	4,6817	4,6309	4,6556
Ortalama	4,6419	4,6504	4,6517
Standart Sapma (±)	0,0365	0,0173	0,0104
Varyasyon Katsayısı	0,7863	0,3724	0,2243
9,6 µg/mL	9,4912	9,5042	9,5253
	9,4432	9,5069	9,5069
	9,5838	9,4529	9,5397
Ortalama	9,5060	9,4880	9,5239
Standart Sapma (±)	0,0715	0,0304	0,0165
Varyasyon Katsayısı	0,7519	0,3206	0,1730

5.3.2.2.5. Tespit ve tayin sınırları

Geliştirilen analitik yöntemin tespit limiti (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) bölüm 4.4.3.4.5'te belirtildiği şekilde Denklem 4.4 ve Denklem 4.5 yardımıyla hesaplanmıştır. Yöntemin kesinlik çalışmasına ait sonuçlar aşağıda yer alan Tablo 5.6'da gösterilmiştir.

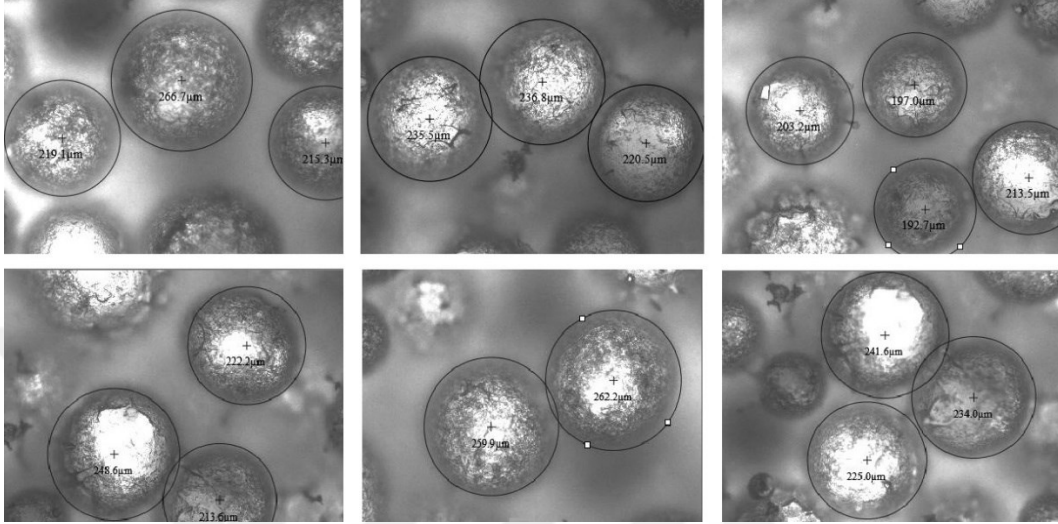
Tablo 5.6. Kesinlik çalışmasına ait sonuçlar

Denklem	Kesim Noktası	Eğim (m)
1	9,3925	225,8419
2	-14,82	226,4651
3	0,3305	225,8980
Ortalama	-1,699	226,0683
Standart Sapma (±)	12,23316	0,34478
LOD µg/mL	0,3147	
LOQ µg/mL	0,1038	

Analitik yöntemin validasyonu için kullanılan en düşük mesalazin çözeltisinin derişimi 0.5 µg/mL olması ve hesaplanan LOD ve LOQ değerlerinin bu derişimden daha küçük olması analitik yöntemin duyarlılığını göstermektedir.

5.3.3. Damlacıkların morfolojik özelliklerinin ve partikül boyutlarının belirlenmesi

Partikül boyutlarının belirlenmesi için floresan mikroskobu ve cihazın yazılımı kullanılarak boyut ölçümü yapılmıştır. Ölçümlere ait mikroskopik görüntüler Şekil 5.17’de verilmiştir.



Şekil 5.17. Mikroskopik boyut ölçümleri

Yapılan ölçümde 192.70-266.70 μm aralığında ve ortalama 228.19 μm çapında küre partiküller elde edildiği görülmüştür.

5.3.4. Formüle yüklenmiş mesalazin miktar tayini ve in vitro salım testleri

5.3.4.1. Formüle yüklenmiş mesalazin miktar tayini

Analitik validasyon sonrasında elde edilen doğru denklemi ve Denklem 4.6 kullanılarak hesaplanmıştır. Formüle yüklenen mesalazin yükleme yüzdeleri Tablo 5.7’de verilmiştir.

Tablo 5.7. Mesalazin yükleme yüzdeleri

	Kapsül-1	Kapsül-2	Kapsül-3	Ortalama
Formülasyon Ağırlığı (mg)	328,57	336,96	335,17	333,57
Tespit Edilen Mesalazin Miktarı (mg)	5,67	5,62	5,83	5,71
Formülasyondaki Mesalazin Yüzdesi	1,72	1,67	1,74	1,71

Her kapsül 4 dakika 25 saniyede doldurulmuştur. Formülasyona dakikada 48 μL /dakika hızla 25 mg/mL konsantrasyonda mesalazin içeren su fazı verilmiştir. Son durumda teorik olarak enkapsüle mesalazin miktarı ve formülasyon enkapsülasyon %’si Denklem 4.7, denklem 4.8 ve denklem 4.9 ile hesaplanmıştır.

$$\begin{aligned} \text{Kapsüldeki su fazı miktarı } (\mu\text{L}) &= (\text{kapsül dolum süresi}) \times (\text{su fazı akış hızı}) \\ &= (4.416) \times (48) \end{aligned}$$

$$\text{Kapsüldeki su fazı miktarı } (\mu\text{L}) = 211.968 \mu\text{L}$$

$$\begin{aligned} E.M. \text{ miktarı } (\text{mg}) &= \text{su fazı konsantrasyonu} \times \text{kapsüldeki su fazı miktarı } (\text{mL}) \\ &= 25 \times 0.212 (\text{mL}) \end{aligned}$$

$$E.M. \text{ miktarı } (\text{mg}) = 5.3 \text{ mg}$$

Formülasyon enkapsülasyon %'si aşağıda yer alan formül ile hesaplanmıştır.

$$\begin{aligned} \text{Formülasyon enkapsülasyon \% 'si} &= \frac{(\text{tespit edilen ortalama mesalazin miktarı})(\text{mg})}{(\text{teorik mesalazin miktarı})(\text{mg})} \times 100 \\ &= \frac{5.71}{5.3} \times 100 \end{aligned}$$

Formülasyon enkapsülasyon verimliliği % 107.73 olduğu tespit edilmiştir.

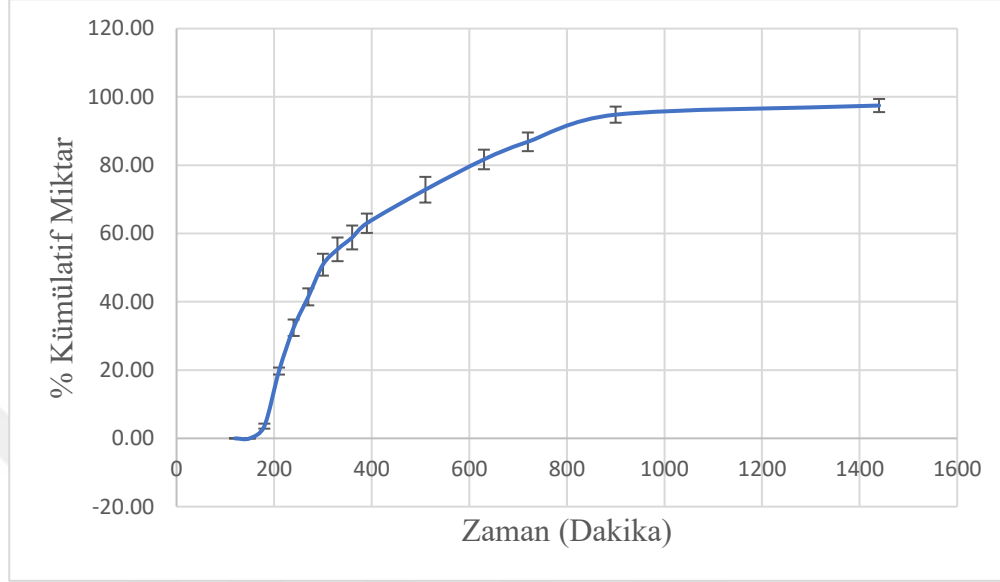
5.3.4.2. *In vitro* etkin madde salım çalışmaları

Formülasyondan salınan mesalazin miktar tayini formülasyonun geçen süre zarfında feçesle atılmış olacağı düşünüldüğü için 1440. dakikada sonlandırılmıştır. Dissolüsyon ortamına salınan etkin madde miktarı analitik validasyon sonrasında elde edilen doğru denklemi yardımıyla hesaplanmıştır. Hesaplanan konsantrasyon verilerine karşılık gelen dissolüsyon ortamına geçen mesalazinin zamana karşı % kümülatif miktarları Tablo 5.8'de verilmiştir.

Tablo 5.8. Dissolüsyon ortamına geçen mesalazinin zamana karşı % kümülatif miktarları

Ortam	Zaman (Dakika)	% Kümülatif Miktar
Mide Ortamı	120	0
Tampon-I	150	0
	180	3,58
Tampon-II	210	19,72
	240	32,40
	270	41,44
Tampon-III	300	50,86
	330	55,36
	360	58,84
	390	63,00
	510	72,82
	630	81,68
	720	86,85
	900	94,80
	1440	97,47

Dissolüsyon ortamına geçen mesalazinin zamana karşı % kümülatif miktarları verilerinin zamana karşı grafiksel görüntüsü Şekil 5.18’de verilmiştir.



Şekil 5.18. Dissolüsyon ortamına geçen mesalazinin zamana karşı % kümülatif salım profili (n=6)

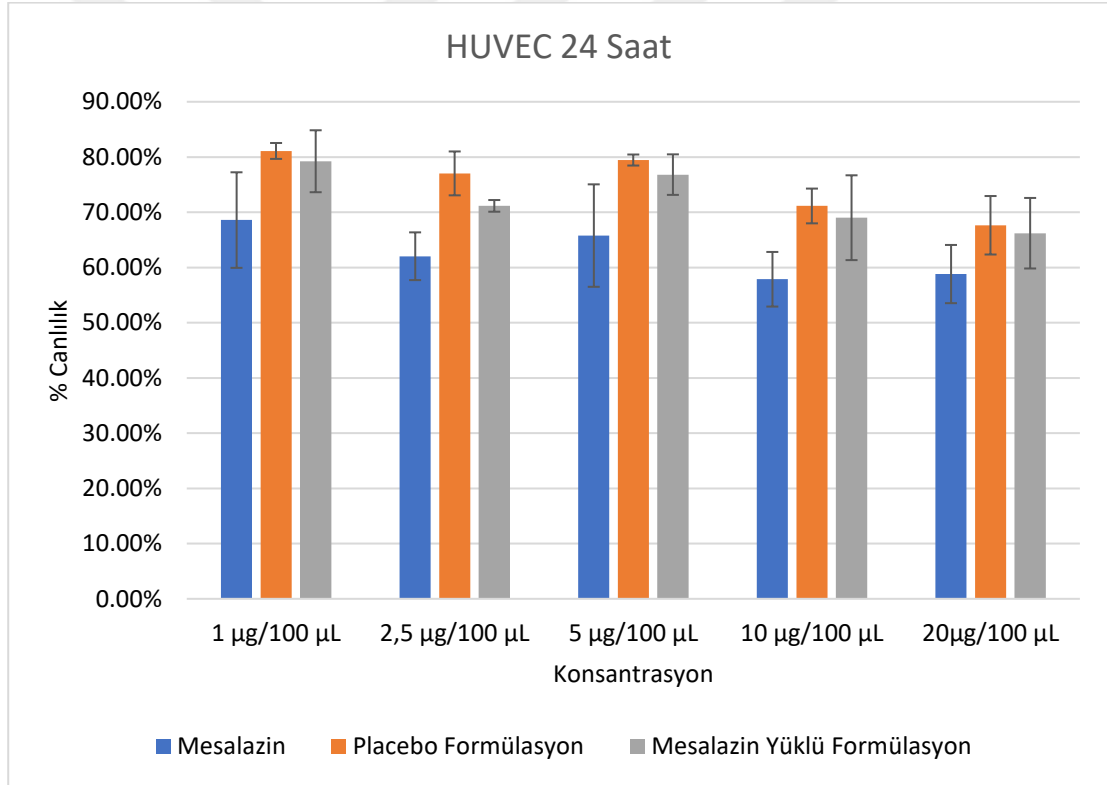
Elde edilen konsantrasyonların % kümülatif miktarlarının zamana karşı matematiksel modellere uyumları R-Kare ve akaike bilgi kriteri (AIC) yardımıyla incelenmiştir. Veriler DDSolver ile hesaplanmıştır. Dissolüsyon profillerinin karşılaştırılması, modelleme ve hesaplamaların basitleştirilmesi amacıyla Microsoft Office Excel Programı eklentisi olarak geliştirilmiş bir programdır. Dissolüsyon profillerinin matematiksel modeller yardımıyla kıyaslanabilmesi için çözünme hızı verilerine uyan veri kütüphanesi oluşturulabilmesini sağlamaktadır. Bir modelin uyum iyiliğini değerlendirmek için korelasyon katsayısı, R-Kare (belirleme katsayısı), düzeltilmiş R-Kare (düzeltilmiş belirleme katsayısı), ortalama kare hatası (MSE), artıkların standart sapması (RMSD, Kök-Ortalama-Kare Hatası), AIC ve Model Seçim Kriteri (MSC) gibi kriterler kullanılmaktadır. Dissolüsyon verilerinin hangi matematik modele uygunluğunun değerlendirilmesi amacıyla çoğunlukla düzeltilmiş R-Kare, AIC ve MSC verileri kullanılmaktadır (Yong Zhang vd., 2010). DDSolver yardımıyla hesaplanan veriler Tablo 5.9’da gösterilmektedir.

Tablo 5.9. Matematik Modellerin Kıyaslama Tablosu

Model	Değerlendirme Kriteri		
	Düzeltilmiş R-Kare	AIC	MSC
Sıfırıncı Derece Kinetik	0,6648	141,5180	0,5070
Birinci Derece Kinetik	0,8508	128,5665	1,3164
Hixson-Crowell	0,8804	125,0277	1,5376
Weibull	0,9982	59,3771	5,6408
Higuchi	0,7553	136,4850	0,8215

5.3.5. Mesalazin içeren formülasyonların sitotoksitesinin belirlenmesi

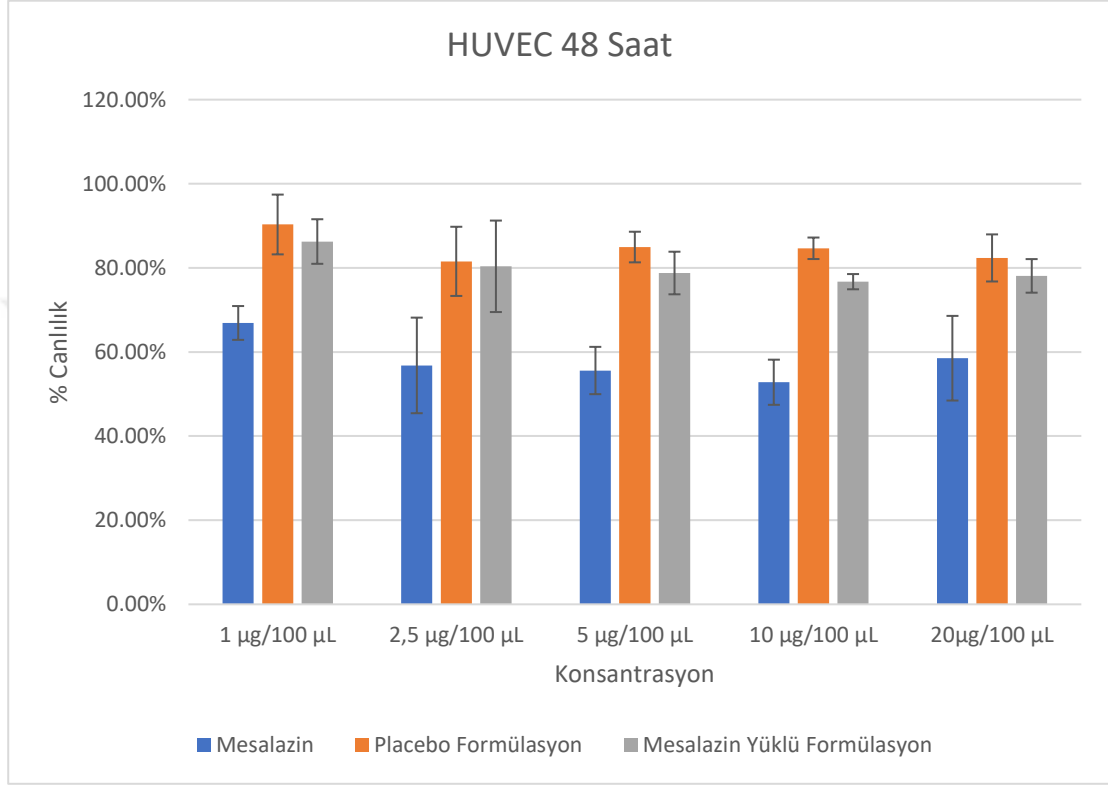
Hazırlanan formülasyonun farklı konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik MTT testleri HUVEC hücreleri üzerinde yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara ait grafikler Şekil 5.19 ve Şekil 5.20’de verilmiştir.



Şekil 5.19. HUVEC 24 Saat % canlılık grafiği

24 saatlik inkübasyonun ardından saf mesalazinin oluşturabileceği sitotoksik etkinin değerlendirildiği kuyucuklarda düşük konsantrasyonlarda sitotoksik etkinin daha az olduğu bu nedenle hücre canlılığının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. En düşük sitotoksik etkinin gözlemlendiği en düşük konsantrasyonda % 68.58 hücre canlılığı tespit edilmiştir. Etkin madde içermeyen boş formülün ise saf mesalazin ve mesalazin yüklü

formülasyona oranla daha düşük sitotoksik etki gözlemlendiği görülmüştür. Bu kuyucuklarda en düşük konsantrasyonda % 81.10 hücre canlılığı tespit edilmiştir. Mesalazin yüklü formülasyonun en düşük konsantrasyon içeren kuyucuğunda % 79.23 hücre canlılığı tespit edilmiştir.



Şekil 5.20. HUVEC 48 Saat % canlılık grafiği

48 saatlik inkübasyonun ardından elde edilen verilerde saf mesalazinin canlılığı zamana bağlı olarak hücre canlılığını % 70'in altına düşürdüğü ve toksik özellik gösterdiği belirlenmiştir. Etkin madde içermeyen boş formülün ve Mesalazin yüklü formülasyonun uygulandığı kuyucuklarda en yüksek konsantrasyonda bile hücre canlılığını % 70'in altına düşürmediği belirlenmiştir ve hem boş formülün hem de mesalazin yüklü formülün toksik özellikte olmadığı belirlenmiştir.

6. TARTIŞMA

6.1. Kapsüllenen Bakterilerin Canlı Koloni Sayısı

Probiyotik destek ürünlerinin içeriğinde minimum etkili probiyotik bakteri miktarlarına ilişkin veriler henüz yetersiz olsa da genellikle minimum gramında veya mililitresinde 10^6 - 10^7 kob sayıda probiyotik bakteri sayısına sahip olması ve günlük olarak toplam 10^8 - 10^9 kadar probiyotik bakterisini alınması önerilmektedir (Kanimozhi ve Sukumar, 2023; Kechagia vd., 2013). Probiyotik destek ürünlerinin hazırlanması ve depolanması sırasında canlı bakteri sayısının istenilen seviye olmasının sağlanması bu tür ürünler için sorun teşkil etmektedir.

Silva vd.'nin yapmış oldukları çalışmada *Lactobacillus acidophilus*'un spray soğutma sistemi kullanılarak hazırlanan katı lipit mikropartiküllerine ortalama 10.2 log kob/g sayıda bakteri içeren dispersiyondan enkapsülasyon yapılmış, sonuç üründe liyofilizasyon sonrası ortalama 7.57 log kob/g sayıda probiyotik bakterisi tespit edilmiştir (Silva vd., 2018). Okuro vd.'nin yapmış oldukları çalışmada *Lactobacillus acidophilus*'un spray soğutma sistemi kullanılarak hazırlanan polidekstrozlu katı lipit mikropartiküllerine ortalama 10.46 log kob/g sayıda bakteri içeren dispersiyondan enkapsülasyon yapılmış, sonuç üründe liyofilizasyon sonrası ortalama 8.32 log kob/g sayıda probiyotik bakterisi tespit edilmiştir (Okuro vd., 2013). Pedroso vd. (2013) çalışmalarında spray soğutma sistemi kullanarak kakao yağında *Lactobacillus acidophilus* probiyotik bakterisi mikroenkapsülasyonunu sağladığı bildirilmiştir. Çalışma sonucunda ortalama 9.50 log kob/g sayıda bakteri içeren dispersiyondan kakao yağı ile enkapsülasyon yapılmış, liyofilizasyon sonrasında 8.20 log kob/g sayıda bakteri tespit edilmiştir (Pedroso vd., 2013). Tez çalışmaları kapsamında hazırlanan formülasyonda ise başlangıçta 11.43 log kob/mL sayıda bakteri bulunduğu bilinen dispersiyondan enkapsülasyon işlemi yapılmıştır. Son durumda kapsüllerde liyofilizasyon sonrası 7.56 log kob/mL sayıda probiyotik bakterisi tespit edilmiştir. Elde edilen formülasyonun sahip olduğu bakteri içeriği önerilen literatürle uyumlu olduğu ve probiyotik destek ürünleri için önerilen minimum miktardan fazla olduğu görülmüştür. Hazırlanmış olduğumuz sistem içerisine dolum sırasında probiyotik bakteri konsantrasyonunun artırılarak konulabileceği ve bağırsağa ulaşabilecek istenilen nihai bakteri sayısının böylelikle düzenlenebileceği sonucu elde edilmiştir. Bu durum, daha önce yapılmış olan çalışmalara daha üstün bir sistemin geliştirildiğini de ifade etmektedir.

6.2. Kombine Formülde Kapsüllenen Bakterilerin Canlı Koloni Sayısı

Mesalazın ve sülfasalazinin bağırsak mikrobiyomunda bakteri bolluğunu azaltılabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır. McCoubrey vd. (2024) yapmış oldukları çalışmada aminosalisilat grubu ilaçların bağırsak mikrobiyotasının büyümesini önemli ölçüde azalttığını ve ülseratif kolitte kullanılmak üzere onay almış ilaçların kolon mikrobiyotasının büyümesini ve işlevini farklı şekilde etkileyebileceğini göstermiştir (McCoubrey vd., 2024). Sadece probiyotik bakterisi içeren formülasyon ile kombine olarak mesalazın ve probiyotik içeren formülasyonun probiyotik içeriğinin logaritmik olarak kıyaslaması yapıldığında % 1.5’luk bir değişim olduğu belirlenmiştir. Bu durumda hazırlanan formülasyonun mesalazinin olası antibakteriyel etkisini azaltılabileceğini göstermektedir. Ayrıca, bağırsağa ulaşan mesalazın ve probiyotiklerin ulaştıkları noktada kendi işlevleri -birbirlerinden etkilenmeden- gerçekleştirebileceği sonucu çıkarılmıştır. Bağırsak ortamında mesalazinin ulaştığı bölgedeki mikrobiyotaya olumsuz etkisi olsa dahi, geliştirdiğimiz sistemle mesalazın ile birlikte taşınan probiyotığın bu bölgede işlevsel hale geçmesi ve bu olumsuz etkinin ekarte edilmesi ya da nötrlenebilebilmesi mümkün görünmektedir.

6.3. Kapsüllenen Mesalazın Miktarı

Mesalazın yüklenen katı lipit nanopartiküllerin, yüzey özelliklerini, kolon hedeflenebilirliğini ve ilaç salımını belirlemek için yapılan in vivo bir çalışmada enkapsülasyon verimliliğinin % 56-72 aralığında olduğu tespit edilmiştir (M. Wang vd., 2021). Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan nano yapıli lipit taşıyıcılarına % 99.2 verimlilikle mesalazın enkapsüle edilmiştir (Awasthi vd., 2022). Solvent uzaklaştırma yöntemi ve ardından püskürtmeli kurutma yöntemi ile % 45 enkapsülasyon verimliliği ile zein nanopartiküllerine yüklenmiştir (Lima vd., 2022). Tez kapsamında geliştirilen formülasyonun enkapsülasyon verimliliği % 107.73 olduğu tespit edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde geliştirilen formülasyonun enkapsülasyon verimliliğinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Sistem içerisine yüklenen mesalazın miktarı piyasa preparatlarından oldukça düşüktür ancak yapılan çalışma ile taşıyıcı sistemimizin şu anki boyutu içerisine en yüksek dozu yüklememin mümkün olduğu gösterilmiştir. Hazırlanan sistemin kolondaki salım profili dikkate alındığında, yüklenen mesalazın miktarının ülseratif kolit lezyonu olan bölge için yeterli olabileceği de söz konusudur.

6.4. In Vitro Etkin Madde Salımı

Düzeltilmiş R-Kare değerine göre yapılan değerlendirmede en yüksek R-Kare değerine sahip olan Weibull modelinin uygun olduğu görülmektedir. AIC değerine göre yapılan değerlendirmede AIC değeri daha düşük olan modelin daha uyumlu model olduğu düşünülebilir. Bu durumda AIC verisine göre dissolüsyon verilerinin karmaşıklığına en uygun olanın Weibull modeli olduğu görülmektedir. MSC verisine göre yapılacak değerlendirmeye göre ise farklı modelleri karşılaştırırken en büyük MSC'ye sahip olan modelin en uygun model olacağı düşünülmelidir. Bu nedenle formülasyonun dissolüsyon profilinin Weibull modeli uyumlu olduğu görülmüştür.

Weibull tarafından 1951'de açıklanan ampirik bir denklemdir, 45 yıldan daha uzun bir süre önce dissolüsyon profillerinin değerlendirilmesinde kullanılmaya başlanmıştır (Dokoumetzidis vd., 2006). Weibull modeli, çoğu dissolüsyon türlerini tanımlamakla birlikte özellikle üssel ve sigmoid formu iyi bir şekilde tanımlar (Langenbucher, 2011). Weibull modelinde ilaç salınım mekanizması fick difüzyon yasasına uygun olarak gerçekleşmektedir (Papadopoulou vd., 2006).

Goyanes vd. (2015) yapmış oldukları çalışmada Pentasa® 500 mg (yavaş salım tableti), Salofalk® 500 mg (mide ortamına dayanıklı uzun süreli salımlı granüller) Asacol® 800 mg (değiştirilmiş salım tableti), Mezavant® 1200 mg (mide ortamına dayanıklı uzun süreli salımlı tablet) ve Octasa® 800 mg (değiştirilmiş salım tableti) adlı piyasa formülasyonlarının etkin madde salım profillerini değerlendirmiştir. Pentasa®'nın diğer formülasyonlara kıyasla etkin salımında belirgin şekilde farklı bir davranış gösterdiği ve salıma asit basamağında yani mide ortamında başlayıp % 50'sinden fazlasının salımını burada gerçekleştirdiği belirtilmiştir. Diğer formülasyonlar (enterik kaplı) ilaç salımına ince bağırsak fazında başlar ve kolon bölmesinde devam eder. Bu formülasyonlar etkin madde salımına sırasıyla 195., 240., 290., 330. dakikada başladıkları gösterilmiştir (Goyanes vd., 2015). Hazırlanan formülasyonun etkin madde salımına 180. dakikada yani piyasa formülleri gibi ince bağırsakta başladığı ve etkin maddenin en az 50'sini (~ 53.52) kolona ulaştırabildiği belirlenmiştir.

6.5. Sitotoksiste

Formülasyona yüklü mesalazinin, saf mesalazin ile kıyaslandığında nispeten daha az sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. Bu durum hazırlanan formülasyonun etkin maddenin olası sitotoksik etkilerinin azalttığını göstermektedir. 48 saatlik % canlılık oranları incelendiğinde formülasyonun toksisitesinin zamana bağlı artmadığını

göstermektedir. Ancak saf mesalazinin sitotoksik etkisinin arttığı bununla beraber mesalazin yüklü formülasyonun nispeten daha az sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durumda formülasyonun mesalazinin olası sitotoksik etkilerini azalttığını göstermektedir ve ÜK hastalarında kullanılmak üzere tasarlanan bu formülün ÜK sebebiyle tahribata uğramış kolon yüzeyinde iritasyona neden olma durumunu azaltabileceğini düşünülmektedir.



7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmanın sonucunda ÜK tedavisinde kullanılmak üzere etkin madde ve probiyotik bakterisi kombine tedavisi sağlayabilecek katı lipit içeren enterik taşıyıcı sisteminin oluşturulması amaçlanmıştır.

Bu doğrultuda gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda ÜK tedavisinde birinci basamak tedavi olarak kullanılan mesalazin etkin maddesini ve *Lactobacillus casei* probiyotik bakterisini kombin olarak içeren ilaç taşıyıcı sistemi geliştirildiği, formülasyonun mesalazinin salımını bağırsak ortamında gerçekleştirdiğini, mesalazinin UPLC ile hassas bir şekilde kantitatif tayini sağlayabilecek analitik yöntemin geliştirildiği ve formülasyonun toksik özellik göstermediği saptanmıştır.

Formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerine probiyotik bakterisinin duyarlı olmadığı, formülasyon hazırlamak için kullanılan mikroakışkan sisteminin etkin bir hücre ve etkin madde enkapsülasyonu sağladığı tespit edilmiş olup, ÜK tedavisinde kullanılan etkin maddelerin ve bağırsak mikrobiyotasını düzenlenmesine yardımcı olacak probiyotik bakterilerinin bağırsak ortamına ulaşmasını sağlayacak katı lipit ilaç taşıyıcı sistemlerinin oluşturulabileceği kanaatine varılmıştır. Ayrıca hazırlanan formülasyonun önerilen miktarda probiyotik bakterisini canlı olarak taşıyabildiği gözlenmiştir.

Hazırlanan formülasyona hastalığın seyrini daha olumlu bir şekilde etkileyebilecek farklı bir etkin madde ve probiyotik bakterisinin kombine olarak eklenerek yeni ve etkin tedavilerin oluşturulabileceği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasının ardından in vivo hayvan testleri ile formülasyonun etkin madde taşıma ve tedavi etkinliğinin değerlendirmesinin yapılması planlanmaktadır. Ayrıca probiyotiklerin enterik kapsül içerisindeki kararlılığının araştırılmasına yönelik başlatılan ve hazırlanan s/y emülsiyon sistemin mikroorganizmaların saklanması ne derece koruyucu olabileceğinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçlandırılması hedeflenmektedir.

KAYNAKÇA

- Açıkgöz, H. N., Karaman, A., Şahin, M. A., Çaylan, Ö. R., Büke, G. C., Yıldırım, E., ... Özer, M. B. 2023. "Assessment of silicon, glass, FR4, PDMS and PMMA as a chip material for acoustic particle/cell manipulation in microfluidics". *Ultrasonics*, 129, 106911.
- Ahmad, A., Ansari, Md. M., Mishra, R. K., Kumar, A., Vyawahare, A., Verma, R. K., ... Khan, R. 2021. "Enteric-coated gelatin nanoparticles mediated oral delivery of 5-aminosalicylic acid alleviates severity of DSS-induced ulcerative colitis". *Materials Science and Engineering: C*, 119, 111582.
- Akanda, M., Mithu, M. S. H., Douroumis, D. 2023. "Solid lipid nanoparticles: An effective lipid-based technology for cancer treatment". *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 86, 104709.
- Alkayyali, T., Cameron, T., Haltli, B., Kerr, R. G., Ahmadi, A. 2019. "Microfluidic and cross-linking methods for encapsulation of living cells and bacteria - A review". *Analytica Chimica Acta*, 1053, 1-21.
- Aqel, A., El-Nour, K. M. M. A., Ammar, R. A. A., Al-Warthan, A. 2012. "Carbon nanotubes, science and technology part (I) structure, synthesis and characterisation". *Arabian Journal of Chemistry*, 5(1), 1-23.
- Arabestani, M. R., Bigham, A., Kamarehei, F., Dini, M., Gorjikhah, F., Shariati, A., Hosseini, S. M. 2024. "Solid lipid nanoparticles and their application in the treatment of bacterial infectious diseases". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 174, 116433.
- Awasthi, A., Kumar, B., Gulati, M., Vishwas, S., Corrie, L., Kaur, J., ... Singh, S. K. 2022. "Novel Nanostructured Lipid Carriers Co-Loaded with Mesalamine and Curcumin: Formulation, Optimization and In Vitro Evaluation". *Pharmaceutical Research*, 39(11), 2817-2829.
- Barakat, E. H., Akl, M. A., Ibrahim, M. F., Mohamed Dawaba, H., Afouna, M. I. 2023. "Formulation and optimization of theophylline-loaded enteric-coated spanlastic nanovesicles for colon delivery; Ameliorate acetic acid-induced ulcerative colitis". *International Journal of Pharmaceutics*, 643, 123253.
- Bozkır, A., Koçyiğit, S. 1995. "Lipozomların Fiziksel ve Kimyasal Stabilitelerinin İncelenmesi : An Investigation of Physical and Chemical Stabilities on Liposomes". *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 042-052.

- Brindhadevi, K., Garalleh, H. AL, Alalawi, A., Al-Sarayreh, E., Pugazhendhi, A. 2023. "Carbon nanomaterials: Types, synthesis strategies and their application as drug delivery system for cancer therapy". *Biochemical Engineering Journal*, 192, 108828.
- Broeckx, G., Vandenheuvel, D., Claes, I. J. J., Lebeer, S., Kiekens, F. 2016. "Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics". *International Journal of Pharmaceutics*, 505(1-2), 303-318.
- Chauhan, S., Harwansh, R. K. 2024. "Recent advances in nanocarrier systems for ulcerative colitis: A new era of targeted therapy and biomarker integration". *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 93, 105466.
- Chen, R., Sun, Z., Chen, D. 2019. "Droplet-based microfluidics for cell encapsulation and delivery". *İçinde Microfluidics for Pharmaceutical Applications* (ss. 307-335). Elsevier.
- Cui, Y., Qu, X. 2021. "Genetic mechanisms of prebiotic carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria: Emphasis on *Lactocaseibacillus casei* and *Lactocaseibacillus paracasei* as flexible, diverse and outstanding prebiotic carbohydrate starters". *Trends in Food Science & Technology*, 115, 486-499.
- Çilek A, Türkyılmaz A, Çelebi N. 2002. "Mikroemülsiyonlar: Genel Özellikleri ve Farmasötik Amaçla Kullanımları". *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27, 27-41.
- Dantas, T. N. C., Santanna, V. C., Souza, T. T. C., Lucas, C. R. S., Dantas Neto, A. A., Aum, P. T. P. 2019. "Microemulsions and nanoemulsions applied to well stimulation and enhanced oil recovery (EOR)". *Brazilian Journal of Petroleum and Gas*, 12(4), 251-265.
- Dasari, A., Xue, J., Deb, S. 2022. "Magnetic Nanoparticles in Bone Tissue Engineering". *Nanomaterials*, 12(5), 757.
- Deng, Z., Han, D., Wang, Y., Wang, Q., Yan, X., Wang, S., ... Ma, Y. 2021. "Lactobacillus casei protects intestinal mucosa from damage in chicks caused by *Salmonella pullorum* via regulating immunity and the Wnt signaling pathway and maintaining the abundance of gut microbiota". *Poultry Science*, 100(8), 101283.
- Derikx, L. A. A. P., Dieleman, L. A., Hoentjen, F. 2016. "Probiotics and prebiotics in ulcerative colitis". *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(1), 55-71.

- Dhillon, P., Singh, K. 2020. "Therapeutic applications of probiotics in ulcerative colitis: An updated review". *PharmaNutrition*, 13, 100194.
- Dokoumetzidis, A., Papadopoulou, V., Macheras, P. 2006. "Analysis of Dissolution Data Using Modified Versions of Noyes–Whitney Equation and the Weibull Function". *Pharmaceutical Research*, 23(2), 256-261.
- Duan, Y., Dhar, A., Patel, C., Khimani, M., Neogi, S., Sharma, P., ... Vekariya, R. L. 2020. "A brief review on solid lipid nanoparticles: part and parcel of contemporary drug delivery systems". *RSC Advances*, 10(45), 26777-26791.
- Elghobashy, M., Steed, H. 2024. "Ulcerative colitis". *Medicine*, 52(4), 232-237.
- Elkholy, S. E., Maher, S. A., Abd el-hamid, N. R., Elsayed, H. A., Hassan, W. A., Abdelmaogood, A. K. K., ... Imbaby, S. 2023. "The immunomodulatory effects of probiotics and azithromycin in dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in rats via TLR4-NF- κ B and p38-MAPK pathway". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 165, 115005.
- Endo, A., Teräsjarvi, J., Salminen, S. 2014. "Food matrices and cell conditions influence survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG under heat stresses and during storage". *International Journal of Food Microbiology*, 174, 110-112.
- Feng, J., Neuzil, J., Manz, A., Iliescu, C., Neuzil, P. 2023. "Microfluidic trends in drug screening and drug delivery". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 158, 116821.
- Ferretti, F., Cannatelli, R., Monico, M. C., Maconi, G., Ardizzone, S. 2022. "An Update on Current Pharmacotherapeutic Options for the Treatment of Ulcerative Colitis". *Journal of Clinical Medicine*, 11(9), 2302.
- Frakolaki, G., Giannou, V., Kekos, D., Tzia, C. 2021. "A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(9), 1515-1536.
- Gagliardi, A., Giuliano, E., Venkateswararao, E., Fresta, M., Bulotta, S., Awasthi, V., Cosco, D. 2021. "Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors". *Frontiers in Pharmacology*, 12.
- Ganesan, P., Narayanasamy, D. 2017. "Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery". *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 6, 37-56.

- Al-Ghananeem, A. M., Abbassi, M., Shrestha, S., Raman, G., Wulff, H., Pereira, L., & Ansari, A. 2010. Formulation-based approach to support early drug discovery and development efforts: a case study with enteric microencapsulation dosage form development for a triarylmethane derivative TRAM-34; a novel potential immunosuppressant. *Drug development and industrial pharmacy*, 36(5), 563-569.
- Gisbert, J. P., Chaparro, M. 2018. "Acute severe ulcerative colitis: State of the art treatment". *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 32-33, 59-69.
- Goyanes, A., Hatton, G. B., Merchant, H. A., Basit, A. W. 2015. "Gastrointestinal release behaviour of modified-release drug products: Dynamic dissolution testing of mesalazine formulations". *International Journal of Pharmaceutics*, 484(1-2), 103-108.
- Gu, Q., Yin, Y., Yan, X., Liu, X., Liu, F., McClements, D. J. 2022. "Encapsulation of multiple probiotics, synbiotics, or nutrabiobiotics for improved health effects: A review". *Advances in Colloid and Interface Science*, 309, 102781.
- Gürgün V., Halkman A.K. 1990. "Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler". İçinde *Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri* (2. bs). Ankara.
- Haiou, W., Jinyou, L., Wenkang, H., Yiping, Y., Lijuan, G. 2024. "The regulation of intestinal microbiota and the intervention of Chinese herbal medicine in the treatment of ulcerative colitis". *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 10, 100356.
- Halkman A.K. 2005. "Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler". İçinde *Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*. Ankara: Başak Matbaacılık Ltd. Şti.
- Halkman A.K., Ayhan K. 2000. "Koloni Sayımı". İçinde *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları* (2. bs, s. 522). Ankara: Sim Matbaası.
- Harish, V., Mohd, S., Tewari, D., Pandey, N. K., Vishwas, S., Babu, M. R., ... Singh, S. K. 2023. "Unravelling the role of solid lipid nanoparticles in drug delivery: Journey from laboratory to clinical trial". *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 85, 104616.
- He, K., Cheng, H., McClements, D. J., Xu, Z., Meng, M., Zou, Y., ... Chen, L. 2024. "Utilization of diverse probiotics to create human health promoting fatty acids: A review". *Food Chemistry*, 140180.
- Huang, D., Wu, D. 2018. "Biodegradable dendrimers for drug delivery". *Materials Science and Engineering: C*, 90, 713-727.

- Hupé, M., Streichenberger, A., Wils, P., Arab, N., Serrero, M., Amiot, A., ... Buisson, A. 2024. "Infliximab is an effective option in patients with ulcerative colitis previously exposed to full subcutaneous anti-TNF agent: Results from a real-world multicenter study". *Digestive and Liver Disease*.
- Jarocki, P., Komoń-Janczara, E., Glibowska, A., Dworniczak, M., Pytka, M., Korzeniowska-Kowal, A., ... Kordowska-Wiater, M. 2020. "Molecular Routes to Specific Identification of the *Lactobacillus Casei* Group at the Species, Subspecies and Strain Level". *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2694.
- Jeong, J.-J., Kim, K.-A., Jang, S.-E., Woo, J.-Y., Han, M. J., Kim, D.-H. 2015. "Orally Administrated *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* C29 Ameliorates Age-Dependent Colitis by Inhibiting the Nuclear Factor-Kappa B Signaling Pathway via the Regulation of Lipopolysaccharide Production by Gut Microbiota". *PLOS ONE*, 10(2), e0116533.
- Kanimozhi, N. V., Sukumar, M. 2023. "Effect of different cryoprotectants on the stability and survivability of freeze dried probiotics". *Food Chemistry Advances*, 3, 100428.
- Karabulut, B., Kerimoglu, O., Ugurlu, T. 2015. "Dendrimers-Drug delivery systems". *Journal of Marmara University Institute of Health Sciences*, 1.
- Kaur, G., Singh, S. K., Kumar, R., Kumar, B., Kumari, Y., Gulati, M., ... Porwal, O. 2020. "Development of modified apple polysaccharide capped silver nanoparticles loaded with mesalamine for effective treatment of ulcerative colitis". *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60, 101980.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., Fakiri, E. M. 2013. "Health Benefits of Probiotics: A Review". *ISR Nutrition*, 2013, 1-7.
- Khosh manzar, M., Pirouzifard, M. K., Hamishehkar, H., Pirs, S. 2020. "Cocoa butter and cocoa butter substitute as a lipid carrier of *Cuminum cyminum* L. essential oil; physicochemical properties, physical stability and controlled release study". *Journal of Molecular Liquids*, 314, 113638.
- Konar, N., Toker, O. S., Oba, S., Sagdic, O. 2016. "Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics". *Trends in Food Science & Technology*, 49, 35-44.
- Kreuter, J. 2001. "Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(1), 65-81.

- Kumar, B., Jalodia, K., Kumar, P., Gautam, H. K. 2017. "Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery". *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 41, 260-268.
- Kumar, S., Kumar, A. 2022. "Microbial pathogenesis in inflammatory bowel diseases". *Microbial Pathogenesis*, 163, 105383.
- Langenbucher, F. 2011. "Letters to the Editor: Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution". *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 24(12), 979-981.
- Lawrence, M. J., Rees, G. D. 2012. "Microemulsion-based media as novel drug delivery systems". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 175-193.
- Lebeloane, M. M., Famuyide, I. M., Kgosana, K. G., Elgorashi, E., Ndivhuwo, K. K., Maharaj, V., McGaw, L. J. 2024. "Anti-inflammatory activity of seven plant species with potential use as livestock feed additives". *South African Journal of Botany*, 167, 322-332.
- Li, C., Wang, J., Ma, R., Li, L., Wu, W., Cai, D., Lu, Q. 2022. "Natural-derived alkaloids exhibit great potential in the treatment of ulcerative colitis". *Pharmacological Research*, 175, 105972.
- Li, X., Lu, C., Yang, Y., Yu, C., Rao, Y. 2020. "Site-specific targeted drug delivery systems for the treatment of inflammatory bowel disease". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, 110486.
- Lima, I. B. C., Moreno, L. C. G. A. I., Peres, A. V., Santana, A. C. G., Carvalho, A., Chaves, M. H., ... Nunes, L. C. C. 2022. "Nanoparticles Obtained from Zein for Encapsulation of Mesalazine". *Pharmaceutics*, 14(12), 2830.
- Liu, Y., Liu, G., Fang, J. 2024. "Progress on the mechanisms of *Lactobacillus plantarum* to improve intestinal barrier function in ulcerative colitis". *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 124, 109505.
- Luo, Y., Ma, Z., De Souza, C., Wang, S., Qiao, F., Yi, H., ... Lin, K. 2024. "Microfluidic fabrication of encapsulated probiotic microspheres using cysteine-modified chitosan with dual functions of bacterial adhesion and intestinal mucosal adhesion". *Food Hydrocolloids*, 149, 109602.
- M. Ways, T. M., Ng, K. W., Lau, W. M., Khutoryanskiy, V. V. 2020. "Silica Nanoparticles in Transmucosal Drug Delivery". *Pharmaceutics*, 12(8), 751.
- Ma, Y., Hu, C., Yan, W., Jiang, H., Liu, G. 2020. "*Lactobacillus pentosus* Increases the Abundance of *Akkermansia* and Affects the Serum Metabolome to Alleviate DSS-

- Induced Colitis in a Murine Model". *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8.
- Maderuelo, C., Lanao, J. M., Zarzuelo, A. 2019. "Enteric coating of oral solid dosage forms as a tool to improve drug bioavailability". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 138, 105019.
- McCoubrey, L. E., Favaron, A., Awad, A., Orlu, M., Gaisford, S., Basit, A. W. 2023. "Colonic drug delivery: Formulating the next generation of colon-targeted therapeutics". *Journal of Controlled Release*, 353, 1107-1126.
- McCoubrey, L. E., Seegobin, N., Sangfuang, N., Moens, F., Duyvejonck, H., Declerck, E., ... Basit, A. W. 2024. "The colon targeting efficacies of mesalazine medications and their impacts on the gut microbiome". *Journal of Controlled Release*, 369, 630-641.
- Meenu, M., Kaur, S., Kaur, M., Mradula, M., Khandare, K., Xu, B., Pati, P. K. 2024. "The golden era of fruit juices-based probiotic beverages: Recent advancements and future possibilities". *Process Biochemistry*, 142, 113-135.
- Meier, J., Sturm, A. 2011. "Current treatment of ulcerative colitis.". *World journal of gastroenterology*, 17(27), 3204-3212.
- Mitsou, E., Pletsa, V., Sotiroudis, G. T., Panine, P., Zoumpanioti, M., Xenakis, A. 2020. "Development of a microemulsion for encapsulation and delivery of gallic acid. The role of chitosan". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 190, 110974.
- Miyake, Y., Tanaka, K., Nagata, C., Furukawa, S., Andoh, A., Yokoyama, T., ... Hiasa, Y. 2022. "IL12B rs6887695 polymorphism and interaction with alcohol intake in the risk of ulcerative colitis in Japan". *Cytokine*, 155, 155901.
- Mohanta, S., Singh, S. K., Kumar, B., Gulati, M., Kumar, R., Yadav, A. K., ... Pandey, N. K. 2019. "Efficacy of co-administration of modified apple polysaccharide and probiotics in guar gum-Eudragit S100 based mesalamine mini tablets: A novel approach in treating ulcerative colitis". *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 427-435.
- Mosmann, T. 1983. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.

- Naahidi, S., Jafari, M., Edalat, F., Raymond, K., Khademhosseini, A., Chen, P. 2013. "Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery". *Journal of Controlled Release*, 166(2), 182-194.
- Nguyen, T.-T.-L., Duong, V.-A. 2022. "Solid Lipid Nanoparticles". *Encyclopedia*, 2(2), 952-973.
- Nidhi, Rashid, M., Kaur, V., Hallan, S. S., Sharma, S., Mishra, N. 2016. "Microparticles as controlled drug delivery carrier for the treatment of ulcerative colitis: A brief review". *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(4), 458-472.
- Niu, W., Chen, X., Xu, R., Dong, H., Yang, F., Wang, Y., ... Ju, J. 2021. "Polysaccharides from natural resources exhibit great potential in the treatment of ulcerative colitis: A review". *Carbohydrate Polymers*, 254, 117189.
- Nsairat, H., Khater, D., Sayed, U., Odeh, F., Al Bawab, A., Alshaer, W. 2022. "Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications". *Heliyon*, 8(5), e09394.
- Okuro, P. K., Thomazini, M., Balieiro, J. C. C., Liberal, R. D. C. O., Fávaro-Trindade, C. S. 2013. "Co- encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability". *Food Research International*, 53(1), 96-103.
- Oluwatosin, S. O., Tai, S. L., Fagan-Endres, M. A. 2022. "Sucrose, maltodextrin and inulin efficacy as cryoprotectant, preservative and prebiotic – towards a freeze dried *Lactobacillus plantarum* topical probiotic". *Biotechnology Reports*, 33, e00696.
- Øresland, T., Bemelman, W. A., Sampietro, G. M., Spinelli, A., Windsor, A., Ferrante, M., ... D'Hoore, A. 2015. "European evidence based consensus on surgery for ulcerative colitis". *Journal of Crohn's and Colitis*, 9(1), 4-25.
- Papadopoulou, V., Kosmidis, K., Vlachou, M., Macheras, P. 2006. "On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms". *International Journal of Pharmaceutics*, 309(1-2), 44-50.
- Pedroso, D. L., Dogenski, M., Thomazini, M., Heinemann, R. J. B., Favaro-Trindade, C. S. 2013. "Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in cocoa butter using spray chilling technology". *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 777-783.
- Pilarczyk Zurek, M., Zwolinska Wcisło, M., Mach, T., Okon, K., Adamski, P., Heczko, P. B., ... Strus, M. 2017. "Influence of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*

- Combination on the Gut Microbiota, Clinical Course, and Local Gut Inflammation in Patients with Ulcerative Colitis: A Preliminary, Single-center, Open-label Study". *Journal of Probiotics & Health*, 05(01).
- Quintana, G., Gerbino, E., Alves, P., Simões, P. N., Rúa, M. L., Fuciños, C., Gomez-Zavaglia, A. 2021. "Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* in W/O emulsions of okara oil and block-copolymers of poly(acrylic acid) and pluronic using microfluidic devices". *Food Research International*, 140, 110053.
- Rajam, R., Subramanian, P. 2022. "Encapsulation of probiotics: past, present and future". *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(1), 46.
- Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Bicas, J. L., Sato, H. H. 2020. "Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications – A narrative review". *Food Research International*, 137, 109682.
- Rosenstiel, P., Sina, C., Franke, A., Schreiber, S. 2009. "Towards a molecular risk map—Recent advances on the etiology of inflammatory bowel disease". *Seminars in Immunology*, 21(6), 334-345.
- Rostami, E., Kashanian, S., Azandaryani, A. H., Faramarzi, H., Dolatabadi, J. E. N., Omidfar, K. 2014. "Drug targeting using solid lipid nanoparticles". *Chemistry and Physics of Lipids*, 181, 56-61.
- Rudolph, M. W., Klein, S., Beckert, T. E., Petereit, H. U., & Dressman, J. B. (2001). A new 5-aminosalicylic acid multi-unit dosage form for the therapy of ulcerative colitis. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 51(3), 183-190.
- Shao, C., Chi, J., Shang, L., Fan, Q., Ye, F. 2022. "Droplet microfluidics-based biomedical microcarriers". *Acta Biomaterialia*, 138, 21-33.
- Silva, M. P., Tulini, F. L., Matos-Jr, F. E., Oliveira, M. G., Thomazini, M., Fávaro-Trindade, C. S. 2018. "Application of spray chilling and electrostatic interaction to produce lipid microparticles loaded with probiotics as an alternative to improve resistance under stress conditions". *Food Hydrocolloids*, 83, 109-117.
- Sobczak, M., Fabisiak, A., Murawska, N., Wesołowska, E., Wierzbicka, P., Wlazłowski, M., ... Fichna, J. 2014. "Current overview of extrinsic and intrinsic factors in etiology and progression of inflammatory bowel diseases". *Pharmacological Reports*, 66(5), 766-775.
- Sohrabi, S., kassir, N., Keshavarz Moraveji, M. 2020. "Droplet microfluidics: fundamentals and its advanced applications". *RSC Advances*, 10(46), 27560-27574.

- Sridhar, R., Ramakrishna, S. 2013. "Electrosprayed nanoparticles for drug delivery and pharmaceutical applications". *Biomatter*, 3(3).
- Stefanello, R. F., Nabeshima, E. H., Iamanaka, B. T., Ludwig, A., Fries, L. L. M., Bernardi, A. O., Copetti, M. V. 2019. "Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents". *Food Research International*, 115, 90-94.
- Suárez Ferrer, C., Martin-Arranz, E., Martín-Arranz, M. D. 2024. "Selective granulocyte–monocyte apheresis during induction with vedolizumab in moderate–severe ulcerative colitis: Experience in a tertiary hospital". *Gastroenterología y Hepatología*.
- Tenorio-Garcia, E., Araiza-Calahorra, A., Rappolt, M., Simone, E., Sarkar, A. 2023. "Pickering Water-in-Oil Emulsions Stabilized Solely by Fat Crystals". *Advanced Materials Interfaces*, 10(31).
- Tripathi, M. K., Giri, S. K. 2014. "Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage". *Journal of Functional Foods*, 9, 225-241.
- Tuğcu-Demiröz F, Acartürk F. 2002. "Kolona Özgü İlaç Taşıyıcı Sistemler". *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27, 117-134.
- Varum, F., Thorne, H., Bravo, R., Gilgen, D., Hartig, C., Nicolas, G. P., ... Haschke, M. 2022. "Targeted colonic release formulations of mesalazine – A clinical pharmacoscintigraphic proof-of-concept study in healthy subjects and patients with mildly active ulcerative colitis". *International Journal of Pharmaceutics*, 625, 122055.
- Wang, K., Huang, K., Wang, L., Lin, X., Tan, M., Su, W. 2024. "Microfluidic Strategies for Encapsulation, Protection, and Controlled Delivery of Probiotics". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(27), 15092-15105.
- Wang, K., Ni, J., Li, H., Tian, X., Tan, M., Su, W. 2022. "Survivability of probiotics encapsulated in kelp nanocellulose/alginate microcapsules on microfluidic device". *Food Research International*, 160, 111723.
- Wang, M., Hao, W., Zhang, L., Zhu, Y., Chen, K., Ma, S., ... Zhao, J. 2021. "Lipid-polymer nano core-shell type hybrid system for colon specific drug delivery". *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63, 102540.
- Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., Car, H. 2012. "Nanoparticles as drug delivery systems". *Pharmacological Reports*, 64(5), 1020-1037.

- Wu, C., Lu, N., Peng, L., Lin, M., Bai, Y., Lu, M., ... Wang, J. 2023. "Regulation of inflammatory macrophages by oral mineralized metal-organic framework nanoparticles for the synergistic treatment of ulcerative colitis and liver injury". *Chemical Engineering Journal*, 468, 143655.
- Xia, B., Liu, X., Li, Z., Ren, J., Liu, X. 2023. "The effects of microbiota-targeted approaches in inflammatory bowel disease: probiotics, probiotic foods, and prebiotics". *Current Opinion in Food Science*, 49, 100956.
- Xu, C., Ban, Q., Wang, W., Hou, J., Jiang, Z. 2022. "Novel nano-encapsulated probiotic agents: Encapsulate materials, delivery, and encapsulation systems". *Journal of Controlled Release*, 349, 184-205.
- Yamashita, H., Morita, M., Sugiura, H., Fujiwara, K., Onoe, H., Takinoue, M. 2015. "Generation of monodisperse cell-sized microdroplets using a centrifuge-based axisymmetric co-flowing microfluidic device". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(4), 492-495.
- Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., Walker, B. 2018. "Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria". *AMB Express*, 8(1), 10.
- Yang, S., Qiao, J., Zhang, M., Kwok, L.-Y., Matijašić, B. B., Zhang, H., Zhang, W. 2024. "Prevention and treatment of antibiotics-associated adverse effects through the use of probiotics: A review". *Journal of Advanced Research*.
- Yaqoob, A. A., Ahmad, H., Parveen, T., Ahmad, A., Oves, M., Ismail, I. M. I., ... Mohamad Ibrahim, M. N. 2020. "Recent Advances in Metal Decorated Nanomaterials and Their Various Biological Applications: A Review". *Frontiers in Chemistry*, 8.
- Yörük, G., Güner, A. 2011. "Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması ve Weissella Türlerinin Gıda Mikrobiyolojisinde Önemi". *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(2), 163-176. Geliş tarihi gönderen <https://dergipark.org.tr/tr/pub/ataunivbd/issue/2912/40290>
- Zhang, X. R., Chen, X. Y., Hu, L. D., Tang, X., Li, S. M., & Zhong, D. F. 2005. Evaluation of in-vitro dissolution and in-vivo absorption for two different film-coated pellets of clarithromycin. *Archives of pharmacal research*, 28, 977-982.

- Zhang, Yong, Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., Xie, S. 2010. "DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles". The AAPS Journal, 12(3), 263-271.
- Zhang, Yongmin, Mu, M., Zhou, Y., Xie, H., Zhao, S. 2023. "Redox-responsive microemulsion: Fabrication and application to curcumin encapsulation". Journal of Colloid and Interface Science, 647, 384-394.
- Zhou, S., Wang, M., Li, W., Zhang, Y., Zhao, T., Song, Q., Cong, J. 2024. "Comparative efficacy and tolerability of probiotic, prebiotic, and synbiotic formulations for adult patients with mild-moderate ulcerative colitis in an adjunctive therapy: A network meta-analysis". Clinical Nutrition, 43(1), 20-30.
- Zhu, L., Qiao, L., Dou, X., Song, X., Chang, J., Zeng, X., Xu, C. 2023. "Lactobacillus casei ATCC 393 combined with vasoactive intestinal peptide alleviates dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in C57BL/6 mice via NF- κ B and Nrf2 signaling pathways". Biomedicine & Pharmacotherapy, 165, 115033.