TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BERBERİN FOSFOLİPİD KOMPLEKSİ YÜKLÜ KİTOZAN MİKROPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE İN VİTRO/İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

Ayça GÜNGÖR AK

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül KARATAŞ

ANKARA
2022

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BERBERİN FOSFOLİPİD KOMPLEKSİ YÜKLÜ KİTOZAN MİKROPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE İN VİTRO/İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

Ayça GÜNGÖR AK

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşegül KARATAŞ

Bu Araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün 19L0237002 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ANKARA
2022

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Berberin Fosfolipid Kompleksi Yüklü Kitozan Mikropartiküllerin Hazırlanması ve *İn Vitro/İn Vivo* Değerlendirilmesi" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ayça GÜNGÖR AK
Tarih: 29/06/2022
İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında
Ayça GÜNGÖR AK tarafından hazırlanan
"Berberin Fosfolipid Kompleksi Yüklü Kitozan Mikropartiküllerin Hazırlanması ve *İn Vitro/İn Vivo* Değerlendirilmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29/06/2022

Prof. Dr. Ayşe Nurten ÖZDEMİR
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ayşegül KARATAŞ
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Betül ARICA YEGİN
Hacettepe Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Hale SAYAN ÖZAÇMAK
Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Müge KILIÇARSLAN
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	xi
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xvii
1. GİRİŞ	**1**
1.1.Veziküler Sistemler	2
1.2. Fitozomların Tanımı ve Genel Özellikleri	3
1.2.1. Fitozom ve Lipozomun Karşılaştırılması	4
1.2.2. Fitozom Hazırlama Yöntemleri	6
1.2.3. Fitozom Formülasyonu için Uygun Fito-aktif Moleküller	7
1.2.4. Fitozom Oluşumuna Etki Eden Faktörler	8
1.2.5. Fitozomların Karakterizasyonu	10
1.2.6. Fitozomların Stabilitesi	11
1.2.7. Fitozomların Farmasötik Alanda Kullanımları	13
1.2.8. Fitoaktif Bileşiklerin Kalite Parametreleri	16
1.3. Mikropartiküllerin Tanımı ve Genel Özellikleri	17
1.3.1. Mikropartiküllerin Hazırlanmasında Yararlanılan Polimerler	18
1.4. Kitozan	20
1.4.1. Kitozanın Özellikleri ve Elde Edilmesi	21
1.4.2. Kitozanın Kullanım Alanları	22
1.5. Mikropartikül Hazırlama Yöntemleri	23
1.5.1. İyonik Jelasyon Yöntemiyle Kitozan Mikropatiküllerin Hazırlanması	29
1.6. BER Hakkında Genel Bilgiler	31
1.6.1. BER'in Kimyasal Yapısı	32
1.6.2. BER'in Fizikokimyasal Özellikleri	32
1.6.3. BER'in Stabilitesi	33
1.6.4. BER'in Farmakokinetik Özellikleri	34
1.6.5. BER'in Farmakolojik Özellikleri	37
1.6.6. BER ve Oksidatif Stres	38
1.7. Oral Yoldan Verilen Dozaj Formlarının Emilimi	40
1.8. *İn vivo* Hayvan Deneylerinde Değerlendirilen Farmakokinetik Parametreler	42
2. GEREÇ VE YÖNTEM	**45**
2.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	45
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	46
2.3. Çalışmalarda Kullanılan Ortamların Bileşimi ve Hazırlanması	49
2.4. BER'in Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	51
2.4.1. BER'in Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile Analizi	51

2.4.2. BER'in Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Spektrumunun Alınması 52
2.4.3. BER'in SEM ile Görüntülenmesi 52
2.5. BER'in Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi 52
2.5.1. BER'in Su Ortamındaki HPLC Analizi 52
2.5.2. BER'in HPLC ile Su Ortamındaki Standart Doğrusunun Hazırlanması 52
2.5.3. BER'in pH 1,2 ve pH 6,8 Ortamlarındaki HPLC Analizi 53
2.5.4. BER'in HPLC ile pH 1,2 ve pH 6,8 Ortamlarındaki Standart Doğrularının Hazırlanması 53
2.6. BER'in Miktar Tayini Yöntemlerinin Analitik Validasyonları 54
2.6.1. Doğrusallık ve Aralığı 54
2.6.2. Doğruluk ve Geri Elde 55
2.6.3. Kesinlik 55
2.6.4. Özgünlük (Seçicilik) 57
2.6.5. Teşhis (LOD) ve Tayin Sınırlarının (LOQ) Belirlenmesi 57
2.7. Formülasyon Çalışmaları 58
2.7.1. BER Fosfolipid Komplekslerinin Hazırlanması ve Formülasyon Optimizasyonu 58
2.7.2. BER Yüklü Kitozan Mikropartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Formülasyon Optimizasyonu 62
2.7.3. BER Fosfolipid Kompleksi Yüklü Kitozan Mikropartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Formülasyon Optimizasyonu 72
2.8. Hazırlanan Formülasyonların *İn vitro* Karakterizasyonu 74
2.8.1. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini 74
2.8.2. Formülasyon Üretim İşlemi Verim Tayini 75
2.8.3. Partikül Büyüklüğü ve Partikül Büyüklüğü Dağılımı Tayini 75
2.8.4. Zeta Potansiyeli Ölçümü 75
2.9. Optimum Formülasyonların Seçilmesi 75
2.10. Optimum Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları 76
2.10.1. Çözünürlük Tayini 76
2.10.2. Partisyon Katsayısı Tayini 77
2.10.3. *İn Vitro* Çözünme Hızı Çalışmaları 78
2.10.4. Formülasyonlardan Etkin Madde Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi 79
2.10.5. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile Görüntüleme 79
2.10.6.Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi 79
2.10.7. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi 80
2.11. Stabilite Çalışmaları 80
2.11.1. Simüle Gastrik Sıvılarda Stabilite Analizleri 80
2.11.2. Buzdolabı ve Oda Sıcaklığında Uzun Süreli Stabilite Analizleri 81
2.12. Formülasyonların *İn Vivo* Etkinliğinin İncelenmesi 82
2.13. Karaciğer Dokularında Antioksidan Aktivite Tayini 86
2.14. İstatistiksel Analiz 88

3. BULGULAR **89**
3.1. BER'in Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi 89
3.1.1. BER'in Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile Analizi 89

3.1.2. BER'in Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Spektrumunun Alınması 90
3.1.3. BER'in SEM ile Görüntülenmesi 90
3.2. BER'in Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi 91
3.2.1. BER'in HPLC ile Su Ortamındaki Kalibrasyon Doğrusunun Hazırlanması 92
3.2.2. BER'in HPLC ile pH 1,2 ve pH 6,8 Ortamlarındaki Kalibrasyon Doğrularının Hazırlanması 93
3.2.3. BER'in HPLC ile Miktar Tayini Yöntemlerinin Analitik Validasyonları 95
3.2.3.1. Doğrusallık ve Aralığı 95
3.2.3.2. Doğruluk ve Geri Elde 98
3.2.3.3. Kesinlik 100
3.2.3.4. Özgünlük (Seçicilik) 103
3.2.3.5. Teşhis (LOD) ve Tayin Sınırlarının (LOQ) Belirlenmesi 103
3.3. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları 104
3.3.1. BER Fosfolipid Komplekslerinin Hazırlanması 104
3.3.2. BER Yüklü Kitozan Mikropartikül Formülasyonlarının Hazırlanması 107
3.3.2.1. Boş Mikropartiküllerin Karakterizasyonu Üzerine Formülasyon Parametrelerinin Etkisine Ait Bulgular 107
3.3.2.2. Mikroskopta Görüntüleme Amacıyla Hazırlanan BER Yüklü Kitozan Mikropartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular 110
3.3.2.3. BER Yüklü Kitozan Mikropartikül Formülasyonlarının Optimizasyonuna Ait Bulgular 110
3.3.3. BER Fosfolipid Kompleksi Yüklü Kitozan Mikropartikül Formülasyonlarının Hazırlanması 121
3.4. Optimum Formülasyonların Seçilmesi 127
3.5. Optimum Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular 127
3.5.1. Çözünürlük Tayini 127
3.5.2. Partisyon Katsayısı Tayini 128
3.5.3. *İn Vitro* Çözünme Hızı Çalışmaları 128
3.5.4. Formülasyonlardan Etkin Madde Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi 129
3.5.5. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile Görüntüleme 132
3.5.6. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi 134
3.5.7. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi 135
3.6. Stabilite Çalışmaları 139
3.6.1. Simüle Gastrik Sıvılarda Stabilite Analizleri 139
3.6.2. Buzdolabı ve Oda Sıcaklığında Uzun Süreli Stabilite Analizleri 141
3.7. Formülasyonların *İn Vivo* Etkinliğinin İncelenmesine Ait Bulgular 143
3.8. Karaciğer Dokularında Antioksidan Aktivite Tayinine Ait Bulgular 146

4. TARTIŞMA **147**
4.1. BER'in Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi 147
4.1.1. BER'in Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile Analizi 147
4.1.2. BER'in Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Spektrumunun Alınması 147
4.1.3. BER'in SEM ile Görüntülenmesi 148

4.2. BER'in Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 148
4.3. BER'in Miktar Tayini Yöntemlerinin Analitik Validasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 149
4.4. Formülasyon Geliştirme Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 151
4.4.1. BER Fosfolipid Kompleksi Formülasyonları 151
4.4.2. BER Yüklü Kitozan Mikropartikül Formülasyonları 155
4.4.3. BER Fosfolipid Kompleksi Yüklü Kitozan Mikropartikül Formülasyonları 158
4.5. Optimum Formülasyonların Seçilmesi 161
4.6. Optimum Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 162
4.6.1. Çözünürlük Tayinine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 162
4.6.2. Partisyon Katsayısı Tayinine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 163
4.6.3. *İn Vitro* Çözünme Hızı Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 163
4.6.4. Formülasyonlardan Etkin Madde Salım Kinetiklerine Ait Verilerin Değerlendirilmesi 165
4.6.5. Formülasyonların Görüntülenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 166
4.6.6. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 167
4.6.7. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 168
4.7. Stabilite Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi 169
4.7.1. Simüle Gastrik Sıvılarda Stabilite Analizlerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 169
4.7.2. Buzdolabı ve Oda Sıcaklığında Uzun Süreli Stabilite Analizlerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 170
4.8. Formülasyonların *İn Vivo* Etkinliğinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 171
4.9. Karaciğer Dokularında Antioksidan Aktivite Tayinine Ait Bulguların Değerlendirilmesi 172

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 175
ÖZET 178
SUMMARY 179
KAYNAKLAR 180
EKLER 199
Ek-1. Etik Raporu 199
ÖZGEÇMİŞ 200

ÖNSÖZ

Bu tez kapsamında bitkisel bir etkin madde olan berberinin fosfolipid kompleksi, berberin yüklü kitozan mikropartikül ve berberin fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlar *in vitro* olarak değerlendirilmiştir, formülasyonların farmakokinetik parametreleri ve biyoyararlanımları *in vivo* hayvan deneyleriyle tayin edilerek karşılaştırılmıştır.

Doktora eğitimim boyunca bilgisi ve tecrübesiyle bana yol gösterici olan, bu tez çalışmasının tasarlanması, yürütülmesi ve sonlandırılması gibi her aşamada desteğini, ilgisini her zaman hissettiğim, akademik hayatım boyunca çalışkanlığını, üretkenliğini ve enerjisini örnek aldığım ve hayatım boyunca da örnek almaya devam edeceğim çok kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayşegül KARATAŞ'a teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Çalışmalarımı devam ettirebilmem için imkan sağlayan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Ayşe Nurten ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Tez çalışmama olan katkılarından dolayı tez izleme jürisinde yer alan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Neşe Buket AKSU, Prof. Dr. Betül ARICA YEGİN ve Doç. Dr. Müge KILIÇARSLAN'a teşekkür ederim.

Lisans eğitimden bugünlere gelmemde katkısı bulunan, mesleki anlamda bana katkı sağlayan, her türlü tecrübelerinden faydalandığım Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nın saygıdeğer öğretim üyelerine ve öğretim elemanlarına teşekkür ederim.

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca tecrübelerinden yararlandığım, desteklerinin benden esirgemeyen başta Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Mehmet AKYÜZ olmak üzere, Zonguldak Bülent

Ecevit Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nin değerli öğretim üyelerine ve öğretim elemanlarına teşekkür ederim.

Doktora sürecim boyunca bana her anlamda destek olan, akademik tecrübesinden yararlandığım, ne zaman kapısını çalsam güler yüzle karşılayan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Ceylan HAMAMCIOĞLU'na teşekkür ederim.

Lisans eğitimimden beri her zaman desteğini hissettiğim, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, güler yüzüyle bana yol gösteren değerli Arş. Gör. Dr. Aslıhan Hilal ALGAN'a teşekkür ederim.

İn vivo hayvan çalışmalarımda bana yardımcı olan ve tecrübesiyle büyük katkılar sağlayan Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hale SAYAN ÖZAÇMAK başta olmak üzere, Dr. Öğr. Üyesi İnci TURAN'a, Öğr. Gör. Meryem ERGENÇ'e, Arş. Gör. Nazan ELMA'ya, Arş. Gör. Bengisu KARAGÖZ'e ve bölümdeki diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İn vivo hayvan çalışmalarımı yapma imkanı sağlayan Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi yönetimine, veteriner hekim Osman CENGİL'e ve tüm birim çalışanlarına teşekkür ederim.

TEM, DSC ve FTIR analizlerini yaptığımız ODTÜ Merkez Laboratuvarına teşekkür ederim.

Destekleri ve güzel enerjileri ile bu süreçte yanımda olduklarını her an hissettiğim oda arkadaşımdan öte dostum olan Arş. Gör. Burcu TİMUR'a ve Dr. Öğr. Üyesi Aysun ÇELİK SOYSAL'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca desteklerini her an yanımda hissettiğim, kızları olmaktan gurur duyduğum canım annem Figen GÜNGÖR'e, canım babam Vedat GÜNGÖR'e ve hep yanımda olan destekleriyle enerji bulduğum ablam Gökçe BEKÖZ'e, abim Alican BEKÖZ'e, yeğenlerim Beste-Dağhan BEKÖZ'e ve tüm aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

Hayatıma girdiği andan itibaren güzellikler katan, her zaman olduğu gibi doktora sürecinde de desteğiyle yanımda olan değerli hayat arkadaşım, eşim Aysan AK'a çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına 19L0237002 nolu proje ile destek sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Son olarak, 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı ile doktora tez dönemimde beni destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

λ_{max}	Maksimum absorbansın elde edildiği dalga boyu
β	Şekil faktörü
τ_d	Etkin maddenin %63,2'sinin salınması için geçen süre
AFM	Atomik kuvvet mikroskopisi (Atomic Force Microscopy)
AIC	Akaike Ölçütü
APLC	Apigenin-fosfolipid fitozom
APT	Aprepitant
AUC	Plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altında kalan alan
BER	Berberin
BSS	Bağıl standart sapma
C	Konsantrasyon
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri (Differential Scanning Calorimetry)
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GACP	İyi Tarım ve Toplama Uygulamaları
GPx	Glutatyon peroksidaz
GSH	İndirgenmiş glutatyon
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Örgütü
k_r^0	Sıfır derece salım kinetiği hız sabiti
k_r^1	Birinci derece salım kinetiği hız sabiti
kH	Higuchi kinetiği salım hızı sabiti
k_p	Korsmeyer Peppas kinetiği salım hızı sabiti
k_{HC}	Hixson Crowell kinetiği salım hızı sabiti
LMW	Düşük molekül ağırlığı
LOD	Teşhis sınırı (Limit of Detection)
LOQ	Tayin sınırı (Limit of Quantification)
MDA	Malondialdehit
MSC	Model seçim kriteri

n	Difüzyonal sabit
PAA	Poliakrilik asit
PDMS	Poli dimetil siloksan
PEG	Polietilen glikol
PEO	Polietilen oksit
PEVAc	Polietilen vinil asetat kopolimeri
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PNVP	Poli N-vinil-2-prolidon
PVA	Polivinil alkol
PVAc	Polivinil asetat
r^2	Determinasyon katsayısı
ROS	Reaktif oksijen türleri
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SH	Salım hızı sabitlerinin standart hatası
SOD	Süperoksit dismutaz
SS	Standart sapma
$t_{1/2}$	Etkin maddenin vücutta yarılanma ömrü
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
t_{max}	Maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşma süresi
TPP	Sodyum tripolifosfat
DLS	Dinamik ışık saçılımı

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. BER klorürün kimyasal yapısı 2
Şekil 1.2. Veziküler sistemlerin basit gösterimi 3
Şekil 1.3. Fitozomun şematik gösterimi 4
Şekil 1.4. Fitozom (sol) ve lipozom (sağ) moleküler organizasyonu 5
Şekil 1.5. Fitozom hazırlama aşamalarının şematik gösterimi 7
Şekil 1.6. Fitozom oluşumunun şematik gösterimi 9
Şekil 1.7. Mikrokapsül ve mikroküre yapılarının şematik gösterimi 18
Şekil 1.8. Vücutta parçalanan polimerler ve kimyasal yapıları 20
Şekil 1.9. Kitin ve kitozanın kimyasal yapısı 20
Şekil 1.10. Karides kabuğundan kitozan eldesinin şematik gösterimi 22
Şekil 1.11. Püskürterek kurutma yönteminin şematik gösterimi 25
Şekil 1.12. Çözücü buharlaştırma yöntemiyle mikropartiküllerin oluşumunun şematik gösterimi 26
Şekil 1.13. Kompleks koaservasyon yöntemiyle mikropartikül üretimi 27
Şekil 1.14. (a) İyonik jelasyon yöntemiyle partiküllerin oluşumunun şematik gösterimi (b) İyonik çapraz bağlı kitozan partiküllerin hazırlanmasının şematik diyagramı 30
Şekil 1.15. Kitozan ve tripolifosfat arasındaki elektrostatik etkileşim 31
Şekil 1.16. BER'e ait SEM görüntüsü 33
Şekil 1.17. Oral uygulama sonrası BER'in bağırsak emiliminin şematik gösterimi 35
Şekil 1.18. BER ve çeşitli metabolitlerinin kimyasal yapıları 36
Şekil 1.19. Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine göre ilaçların sınıflandırılması 40
Şekil 1.20. Farklı ilaç uygulama yolları ve bu yollardan uygulanan dozaj formları 41
Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan maddelerin kimyasal formülleri 48
Şekil 2.2. Rotavapor yardımıyla organik solvanların uzaklaştırılması 59
Şekil 2.3. BER fosfolipid kompleks formülasyonlarının hazırlanışının şematik gösterimi 60
Şekil 2.4. BER-F3 formülasyonu optimizasyonunda kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi 62
Şekil 2.5. BER yüklü kitozan mikropartiküllerin hazırlanışının şematik gösterimi 68
Şekil 2.6. Çalkalamalı inkübatör içinde çözünme hızı numunelerinin yerleşimi 78
Şekil 2.7. Sıçanların deney gruplarına göre ayrılması 83
Şekil 2.8. Deney hayvanlarının boyanması 83

Şekil 2.9. Sıçanlara yapılan oral gavaj uygulaması 84
Şekil 2.10. Kuyruk veninden kan alma işlemi 85
Şekil 2.11. Karaciğer dokularının çıkartılması 86
Şekil 2.12. Karaciğer dokularının homojenize edilmesi 87
Şekil 3.1. BER'e ait DSC termogramı 89
Şekil 3.2. BER'e ait FTIR spektrumu 90
Şekil 3.3. BER'e ait SEM görüntüleri 91
Şekil 3.4. BER pikini gösteren HPLC kromatogramı 92
Şekil 3.5. BER'in HPLC ile analizinde su ortamındaki kalibrasyon doğrusu 93
Şekil 3.6. BER'in pH 1,2 ortamındaki kalibrasyon doğrusu 94
Şekil 3.7. BER'in pH 6,8 ortamındaki kalibrasyon doğrusu 94
Şekil 3.8. BER'in su ortamındaki doğrusallık grafiği 95
Şekil 3.9. BER'in pH 1,2 ortamındaki doğrusallık grafiği 96
Şekil 3.10. BER'in pH 6,8 ortamındaki doğrusallık grafiği 96
Şekil 3.11. BER fosfolipid kompleksi formüllerine ait partikül boyutu dağılımları 105
Şekil 3.12. Tekrarlanabilirlik çalışmasında hazırlanan BER-F3 formülasyonlarının partikül boyutu dağılımları 107
Şekil 3.13. Boş mikropartikül formülasyonları üzerine % TPP çözeltisi konsantrasyonunun etkisi 108
Şekil 3.14. Boş mikropartikül formülasyonları üzerine kitozan çözeltisi sıcaklığının etkisi 109
Şekil 3.15. Boş mikropartikül formülasyonları üzerine kitozan çözeltisi pH değerinin etkisi 109
Şekil 3.16. MBER-KM11 kodlu formülasyona ait mikroskop görüntüleri (Büyütme: a: x40, b: x100) 110
Şekil 3.17. BER-KM8 ve BER-KM10 formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve % enkapsülasyon etkinliği karşılaştırma grafiği 113
Şekil 3.18. BER-KM9 ve BER-KM11 formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve % enkapsülasyon etkinliği karşılaştırma grafiği 113
Şekil 3.19. BER-KM16 ve BER-KM20 formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve % enkapsülasyon etkinliği karşılaştırma grafiği 113
Şekil 3.20. Farklı % TPP çözeltisi konsantrasyonlarının formülasyonların zeta potansiyelleri üzerine etkisi 114

Şekil 3.21. Farklı % TPP çözeltisi konsantrasyonlarının formülasyonların partikül büyüklükleri üzerine etkisi 115
Şekil 3.22. Farklı % TPP çözeltisi konsantrasyonlarının formülasyonların % enkapsülasyon etkinlikleri üzerine etkisi 116
Şekil 3.23. Farklı kitozan çözeltisi pH değerlerinin formülasyonların % enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi 117
Şekil 3.24. Farklı kitozan çözeltisi sıcaklıklarının formülasyonların zeta potansiyelleri üzerine etkisi 118
Şekil 3.25. Farklı kitozan çözeltisi sıcaklıklarının formülasyonların % enkapsülasyon etkinlikleri üzerine etkisi 118
Şekil 3.26. Homojenizasyon işleminin formülasyonların partikül büyüklükleri üzerine etkisi 119
Şekil 3.27. Homojenizasyon işleminin formülasyonların % enkapsülasyon etkinlikleri üzerine etkisi 119
Şekil 3.28. BER-KM31 formülasyonuna ait partikül boyutu dağılımı 120
Şekil 3.29. BER-KM31 formülasyonuna ait zeta potansiyeli grafiği 120
Şekil 3.30. % TPP çözeltisi konsantrasyonunun formülasyonların zeta potansiyelleri üzerine etkisi 123
Şekil 3.31. % TPP çözeltisi konsantrasyonunun formülasyonların % enkapsülasyon etkinlikleri üzerine etkisi 123
Şekil 3.32. Kitozan çözeltisi pH değerinin formülasyonların % enkapsülasyon etkinlikleri (sol) ve zeta potansiyelleri (sağ) üzerine etkisi 124
Şekil 3.33. Sonikasyon işleminin formülasyonların zeta potansiyelleri (sol), partikül büyüklükleri (orta) ve % enkapsülasyon etkinlikleri (sağ) üzerine etkisi 124
Şekil 3.34. Ultrasonik banyo uygulamasının formülasyonların zeta potansiyelleri (sol) ve % enkapsülasyon etkinlikleri (sağ) üzerine etkisi 125
Şekil 3.35. BER-FM3 formülasyonuna ait zeta potansiyeli grafiği 126
Şekil 3.36. BER, BER-F3, BER-FM3 ve BER-KM31 formülasyonlarına ait 24 saatlik (A) ve 8 saatlik (B) etkin madde salım profilleri (n=3) 129
Şekil 3.37. BER-F3 formülasyonuna ait TEM görüntüleri 132
Şekil 3.38. BER-KM31 formülasyonuna ait TEM görüntüleri 133
Şekil 3.39. BER-FM3 formülasyonuna ait TEM görüntüleri 134
Şekil 3.40. DSC termogramları a) BER b) Fosfolipid c) Kitozan d) TPP e) BER-F3 kodlu formülasyon f) BER-KM31 kodlu formülasyon 135

g) BER-FM3 kodlu formülasyon
Şekil 3.41. BER'in FTIR spektrumu 136
Şekil 3.42. Fosfolipid FTIR spektrumu 136
Şekil 3.43. Kitozanın FTIR spektrumu 137
Şekil 3.44. TPP'nin FTIR spektrumu 137
Şekil 3.45. BER-F3 formülasyonunun FTIR spektrumu 138
Şekil 3.46. BER-KM31 formülasyonunun FTIR spektrumu 138
Şekil 3.47. BER-FM3 formülasyonunun FTIR spektrumu 139
Şekil 3.48. Simüle gastrik sıvı (pH 1,2) ortamında % değişmeden kalan BER miktarları (n=3) 140
Şekil 3.49. Simüle intestinal sıvı (pH 6,8) ortamında % değişmeden kalan BER miktarları (n=3) 141
Şekil 3.50. BER'e ait ortalama plazma konsantrasyonu- zaman profili (n=8) 143
Şekil 3.51. BER-F3 formülasyonuna ait ortalama plazma konsantrasyonu- zaman profili (n=8) 144
Şekil 3.52. BER-KM31 formülasyonuna ait ortalama plazma konsantrasyonu- zaman profili (n=8) 144
Şekil 3.53. BER-FM3 formülasyonuna ait ortalama plazma konsantrasyonu- zaman profili (n=8) 145
Şekil 3.54. BER ve BER-F3, BER-KM31, BER-FM3 formülasyonlarının plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri (n=8) 145
Şekil 3.55. Kontrol, BER ve formülasyon gruplarının MDA (a) ve GSH (b) seviyeleri (n=8) 146

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Doğal ve sentetik fosfolipidler arasındaki farklılıklar 10
Çizelge 1.2. Indena'ya ait mevcut fitozom preparatları 15
Çizelge 1.3. Mikropartiküler sistemlerin hazırlanmasında kullanılan polimerlerin sınıflandırılması 19
Çizelge 1.4. Mikropartikül hazırlama yöntemleri 24
Çizelge 2.1. BER'in HPLC ile miktar tayini yönteminin farklı ortamlarda analitik validasyonları için uygulama koşulları 56
Çizelge 2.2. BER fosfolipid kompleks formülasyonlarının hazırlanma koşulları 60
Çizelge 2.3. Optimizasyon çalışmasında hazırlanan BER fosfolipid kompleksi formülasyon parametreleri 61
Çizelge 2.4. Etkin madde içermeyen mikropartikül formülasyonları ve karakteristik özellikleri 64
Çizelge 2.5. Mikroskopta görüntüleme amacıyla hazırlanan BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları 66
Çizelge 2.6. BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının hazırlanması için kullanılan parametreler 69
Çizelge 2.7. Optimum BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının elde edilmesi için hazırlanan formüller 71
Çizelge 2.8. BER fosfolipid komplesi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları 73
Çizelge 2.9. Uzun süreli stabilite test koşulları ve çalışılan formülasyonlar 81
Çizelge 2.10. Deneylerde kullanılan hayvanlara ait özellikler 82
Çizelge 3.1. BER'in HPLC ile miktar tayininde belirlenen koşullar 92
Çizelge 3.2. BER'in HPLC ile su ortamındaki miktar tayini için geliştirilen analitik yöntemin doğrusallık ve aralığı çalışmasına ait istatistiksel veriler 97
Çizelge 3.3. BER'in HPLC ile pH 1,2 ortamındaki miktar tayini için geliştirilen analitik yöntemin doğrusallık ve aralığı çalışmasına ait istatistiksel veriler 97
Çizelge 3.4. BER'in HPLC ile pH 6,8 ortamındaki miktar tayini için geliştirilen analitik yöntemin doğrusallık ve aralığı çalışmasına ait istatistiksel veriler 98
Çizelge 3.5. BER'in su ortamında doğruluk ve geri elde verileri 99
Çizelge 3.6. BER'in pH 1,2 ortamında doğruluk ve geri elde verileri 99
Çizelge 3.7. BER'in pH 6,8 ortamında doğruluk ve geri elde verileri 100

Çizelge 3.8. BER'in su ortamındaki tekrarlanabilirlik analizi verileri 101
Çizelge 3.9. BER'in pH 1,2 ortamındaki tekrarlanabilirlik analizi verileri 101
Çizelge 3.10. BER'in pH 6,8 ortamındaki tekrarlanabilirlik analizi verileri 102
Çizelge 3.11. BER'in su, pH 1,2 ve pH 6,8 ortamlarında ara kesinlik analizlerine ait veriler 103
Çizelge 3.12. BER'in farklı ortamlardaki miktar tayini yöntemlerinin teşhis ve tayin sınırları 104
Çizelge 3.13. BER fosfolipid kompleksi formülasyonlarının karakterizasyonlarına ait bulgular (n=3, Ortalama ± SS) 104
Çizelge 3.14. BER fosfolipid kompleksi formülasyonlarında optimizasyon işlemine ait karakterizasyon sonuçları (n=3, Ortalama ± SS) 106
Çizelge 3.15. BER-F3 formülasyonunun tekrarlanabilirliğine ait karakterizasyon sonuçları (Ortalama ± SS) 106
Çizelge 3.16. Etkin madde yüklü olmayan mikropartiküllere ait zeta potansiyel değerleri (n=3, Ortalama ± SS) 107
Çizelge 3.17. BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarına ait karakterizasyon sonuçları (n=3, Ortalama ± SS) 111
Çizelge 3.18. BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının istatiksel değerlendirilmeleri sonucu elde edilen p değerleri 112
Çizelge 3.19. BER-KM31 formülasyonunun tekrarlanabilirliğine ait karakterizasyon sonuçları (Ortalama ± SS) 121
Çizelge 3.20. BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının karakterizasyonlarına ait bulgular (n=3, Ortalama ± SS) 121
Çizelge 3.21. BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının istatiksel değerlendirilmeleri sonucu elde edilen p değerleri 122
Çizelge 3.22. BER-FM3 formülasyonunun tekrarlanabilirliğine ait karakterizasyon sonuçları (Ortalama ± SS) 126
Çizelge 3.23. Optimum seçilen BER fosfolipid kompleksi, BER yüklü kitozan mikropartikül ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarına ait özellikler (Ortalama ± SS) 127
Çizelge 3.24. BER ve BER fosfolipid kompleksine ait çözünürlük değerleri (n=3, Ortalama ± SS) 128
Çizelge 3.25. Partisyon katsayısı değerleri (n=3, Ortalama ± SS) 128

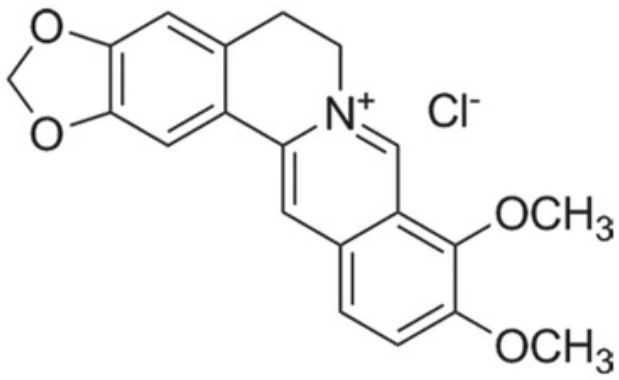
Çizelge 3.26. Formülasyonların *in vitro* salım hızı kinetik verileri 131
Çizelge 3.27. BER ve formülasyonlarda simüle vücut ortamlarında parçalanmadan kalan BER miktarları (n=3, Ortalama ± SS) 140
Çizelge 3.28. BER-F3 formülasyonuna ait stabilite bulguları (Ortalama±SS) 142
Çizelge 3.29. BER-KM31 formülasyonuna ait stabilite bulguları (Ortalama±SS) 142
Çizelge 3.30. BER-FM3 formülasyonuna ait stabilite bulguları (Ortalama±SS) 142
Çizelge 3.31. BER ve formülasyonlara ait farmakokinetik parametreler (n=8, Ortalama±SS) 145
Çizelge 3.32. BER'in oksidatif strese etkisi (n=8, Ortalama±SS) 146

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre özellikle gelişmekte olan ülkelerde, insanların yüzde 80-90'ı tedavinin ilk basamağında konvansiyonel olmayan ve bitkisel kaynaklardan elde edilen etkin maddeleri tercih etmektedir (Karataş ve Turhan, 2015). Karbonhidratlar, lipitler ve nükleik asitler gibi esansiyel metabolitlerin yanı sıra terpenoidler, alkoloidler ve fenolik bileşikler gibi ikincil metabolitlerin de bitkilerden elde edilebildiği gösterilmiştir (Sellami ve ark., 2018). Bu bileşikler antialerjik, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antiviral, antibakteriyel, antikarsinojenik, antitrombotik ve kardiyoprotektif gibi biyolojik etkileri nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır (Kumar ve Pandey, 2013; Oyenihi ve Smith, 2019; Sellami ve ark., 2018). Ancak bitkilerden elde edilen birçok biyoaktif bileşen yapısında birden fazla halka ve uzun yan zincir bulundurur ve bu nedenle, bağırsaktan pasif difüzyonla emilip kana geçemez. Ayrıca, bazı bitkisel aktif moleküller yağlarla ve diğer lipitlerle zayıf karışabilir ve sıklıkla bağırsaktan geçemezler. Herhangi bir bitkisel ürünün etkinliği, aktif bileşeni istenen seviyede etki bölgesine iletebilmesine bağlıdır (Alexander ve ark., 2016; Khan ve ark., 2013; Saha ve ark., 2013). Bağırsak absorbsiyonunun düşük olması sonucunda bitkisel üründen elde edilen biyoyararlanım da düşmektedir (Talware ve ark., 2018). Zayıf biyoyararlanımlı fitobileşenler, sebep olabileceği yüksek yan etki potansiyeli ve moleküler hedefine ulaşma ihtimalinin uzaklığı nedeniyle formülasyon tasarımcıları için büyük sorunlardan biri olmaktadır. Fitobileşikler genellikle suda iyi çözünebilen yapılardır ancak ideal bir biyoyararlanım için yeterli bir hidrofilik-lipofilik dengeye sahip değillerdir (Lu ve ark., 2019). Bu noktada bitkisel aktif bileşiklerden maksimum etkinlik elde edebilmek ve bu bileşikleri etki bölgesine taşıyabilmek için ilaç taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyulmuştur.

Berberin (BER), birçok farklı bitkinin yapısında bulunan kuaterner benzilizokinolin alkaloidtir. Son yıllarda antikanser (Wang ve ark., 2020), antihipertansif (Sut ve ark., 2017), antidepresan (Kulkami ve Dhir, 2010), antiinflamatuvar (Cicero ve Baggioni, 2016), hipoglisemik (Liang ve ark., 2019) hepatoprotektif (Zhao ve ark., 2018) etkileri yanı sıra birçok farklı biyolojik aktivitesi araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. Farklı tedavi edici biyolojik aktiviteleri bizi

BER üzerinde çalışmaya yönlendirmiştir. Ancak BER'in oral biyoyararlanımı düşüktür. Çalışmamızda fito-bileşenler için ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanımı uygun görülen fitozomların BER için kullanılması tercih edilmiştir. BER klorürün kimyasal yapısı Şekil 1.1'de gösterilmiştir.

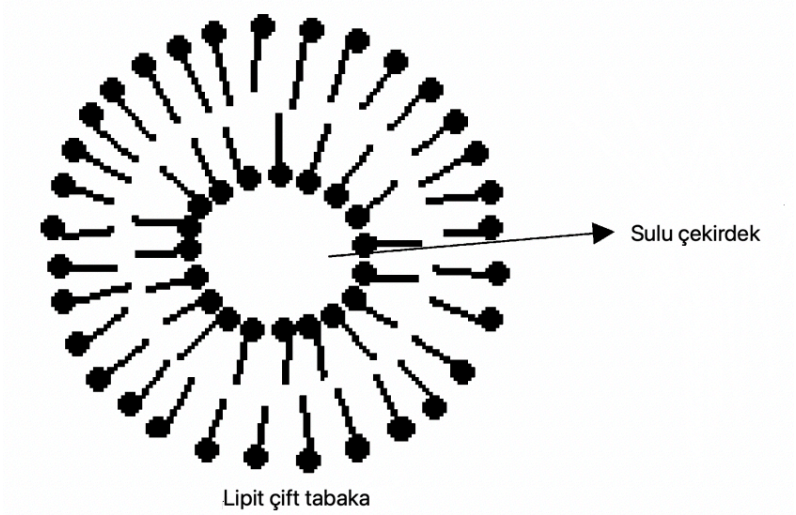


Şekil 1.1. BER klorürün kimyasal yapısı (Zhou ve ark., 2017).

Fitozomlar, fosfolipid esaslı taşıyıcı sistemler olarak da tanımlanmaktadırlar (Hüsch ve ark., 2013). Suda çözünür bitkisel aktif maddelerin fosfolipid komplekslerine dahil edilmesi, lipoidal biyolojik membranlar boyunca penetrasyonu artırarak maddelerin biyoyararlanımlarını önemli ölçüde artırmaktadır (Bombardelli ve ark., 1989). Fito-fosfolipid komplekleştirme tekniği, gelişmiş etkin biyolojik profil ile bitkisel aktif moleküllerin vücuda taşınmasını mümkün kılmıştır (Khan ve ark., 2013).

1.1. Veziküler Sistemler

Veziküler ilaç taşıyıcı sistemler; terapötik etkinlikleri iyileştirmek amacıyla ilaç hedeflemede kullanılan ve sıklıkla tercih edilen sistemlerdir. Bu sistemler sayesinde ilaç moleküllerinin istenen salım bölgesine, önceden belirlenen hızda verilmesi sağlanabilir (Jain ve ark., 2020). Veziküler sistemler genellikle bir ya da birden fazla lipit tabaka içerirler. Şematik gösterimi Şekil 1.2' de verilmiştir.



Şekil 1.2. Veziküler sistemlerin basit gösterimi (Kaur ve ark., 2004).

Veziküler sistemler iç kısımda bulunan sulu tabaka ve dış lipit tabaka sayesinde hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçların verilmesi için uygun sistemlerdir (Mahale ve ark., 2012).

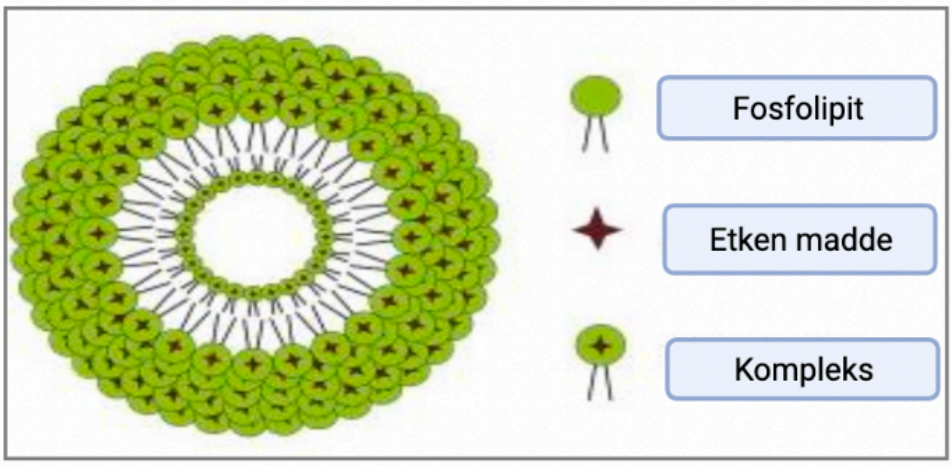
Veziküler sistemlerin avantajlarından bazıları:

1. Uzun süreli etkin madde salımı sağlayabilirler.
2. Çözünürlüğü az olan maddelerin biyoyararlanımı yükseltebilirler.
3. Etkin maddelerin hızlı bir şekilde degrade olması engellenebilir.
4. Etkin maddelerin düşük çözünürlük özelliklerini iyileştirebilirler.
5. Etkin madde stabilitesini koruyarak, daha stabil kalmasını sağlayabilirler.

1.2. Fitozomların Tanımı ve Genel Özellikleri

Fitozom terimi, bitkisel bir aktif maddenin hücre zarlarının ana bileşenlerinden biri olan emülsifiye edici olarak da görev yapan fosfatidilkolinle bağlandığı patentli bir üretim sürecine sahip yeni bir formülasyon türüdür (Güngör ve ark., 2020). Fitozom kelimesi iki terim içermektedir; ‘fito’ kompleksin bitkilerden kaynaklanan biyoaktif kısmını işaret ederken ‘zom’ kompleksin yapısının hücrelere benzerliğini işaret etmektedir (Wang ve ark., 2020).

Fitozom ilk olarak Bombardelli ve ark. tarafından 1989 yılında İtalya'da polifenolik aktif madde içeren bitkisel ekstrelerin fosfatidilkolin içeren fosfolipidlerle kimyasal olarak reaksiyona sokulmasıyla geliştirilmiştir (Bombardelli ve ark., 1989; Karataş ve Turhan, 2015; Kumar ve Pandey, 2013). Fitozomlar bitki ekstrelerini veya suda çözünebilen fito-bileşenleri lipitle uyumlu moleküler kompleksler üreterek bünyesinde toplayabilir, böylece fito-bileşenlerin absorbsiyonlarını ve biyoyararlanımlarını artırabilirler (Güngör ve ark., 2022; Mota ve ark., 2017). Fitozomlar bitkisel aktif maddelerin farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini geliştirmek amacıyla lipitlerin polar baş kısımlarıyla bitkisel aktif madddelerin birleştirilmesiyle hazırlanmaktadır (Handa ve ark., 2017). Fitozom yapısı Şekil 1.3'te gösterilmiştir.

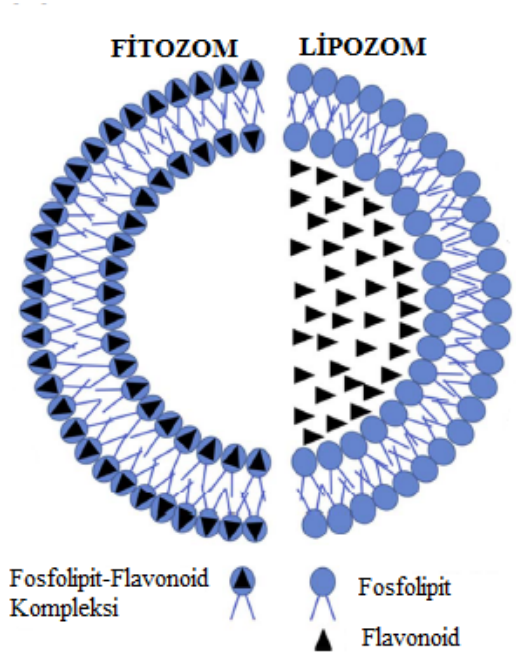


Şekil 1.3. Fitozomun şematik gösterimi (Chivte ve ark., 2017).

1.2.1. Fitozom ve Lipozomun Karşılaştırılması

Lipozomlar; birçok farklı ilaç molekülünün ve fitokimyasalın taşınması için kullanılan çok bilinen başarılı ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Mirzaei ve ark., 2015). Lipozomlar; ilk zamanlarda kozmetik amaçlı olarak suda çözünen bileşiklerin deriye uygulanması amacıyla kullanılmıştır. Suda çözünebilen bir maddenin fosfatidilkolin ile karıştırılması sonucunda oluşurlar (Sindhumol ve ark., 2010).

Aktif molekülün fosfolipid ile spesifik oranlarda karıştırılması fitozom ve lipozom üretiminde ana adımdır. Lipozomlar ve fitozomlar bazı benzerlikler gösterseler de kimyasal yapıları birbirinden farklıdır (Ghanbarzadeh ve ark., 2016). Lipozom formülasyonlarında yüzlerce, hatta binlerce fosfatidilkolin molekülü suda çözünen aktif bileşenin etrafını sarar ve bu moleküller arasında kimyasal bir bağ oluşmazken; fitozom formülasyonlarında bunun aksine fosfatidilkolin molekülleri ve bitkisel kökenli aktif bileşikler arasında aktif maddenin çeşidine göre değişen 1:1, 2:1 gibi oranlarda kimyasal bağ içeren kompleksler oluşmaktadır. Fitozomlar birbirinden ayrı farklı tabakalardan oluşan yapılar değildir, tam bir kompleks yapısı gösterirler (Kidd, 2009; Sindhumol ve ark., 2010). Lipozomda aktif bileşik orta boşluk içinde veya membranın katmanları içinde dağılmış yüzerken, fitozomda membranın integral bir parçasıdır, fosfolipidin polar başına hidrojen bağı ile bağlanmış olarak bulunur (Karataş ve Turhan, 2015; Lu ve ark., 2019). Bu bağlar fitozomlara diğer veziküler sistemler yanında lipozomlardan daha iyi bir stabilite kazandırmaktadır (Alam ve ark., 2013). Lipozom ve fitozom yapılarının karşılaştırmalı yapıları Şekil 1.4'te gösterilmiştir.



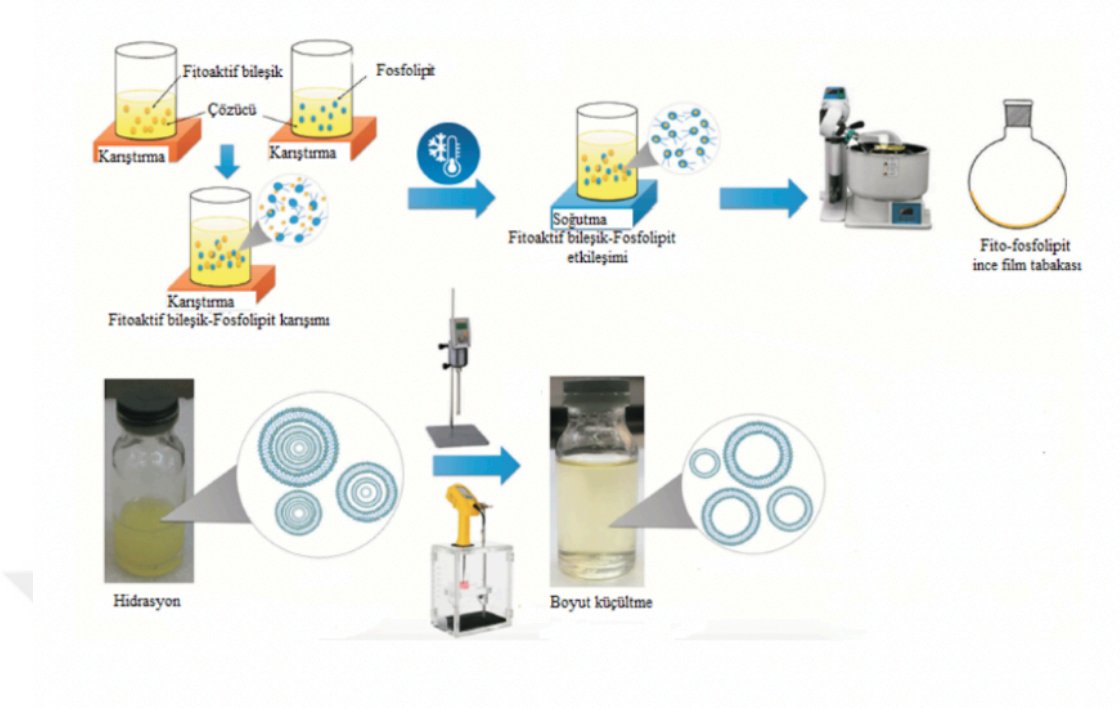
Şekil 1.4. Fitozom (sol) ve lipozom (sağ) moleküler organizasyonu (Ghanbarzadeh ve ark.,2016).

1.2.2. Fitozom Hazırlama Yöntemleri

Fitozom formülasyonları doğal bitkisel ekstrelerin ya da bitkisel aktif bileşenlerin fosfolipidlerle genellikle nonpolar bir ortamda bir araya getirilmesiyle oluşturulmaktadır. Bitkisel aktif madde, fosfolipidin polar kısmı ile hidrojen bağları ya da kovalent bağlar yardımıyla birleşmektedir. Fosfatidilkolin, hidrofilik özellik gösteren kolin ve lipofilik özellik gösteren fosfatidil gruplarından oluşan amfifilik yapıda bir moleküldür; polar kolin kısmı biyoaktif molekül ile hidrojen bağları yardımıyla birleşirken, lipofilik ve nonpolar fosfatidil grubu kolin-biyoaktif molekülün kompleksini sarar. Kolin-biyoaktif bileşen kısmı fitozomun gövde bölümünü oluştururken, fosfatidil grubu da kompleksi sarmak üzere kuyruk kısmını oluşturur. Bunun sonucunda fitozom olarak adlandırılan hücre benzeri küresel partiküller oluşmaktadır (Amit ve ark., 2007).

Fitozom formülasyonu stokiyometrik olarak 1-10 oranında; tercihen 1 mol fosfolipid ve 1 mol fitoaktif bileşenin aprotik organik çözücü içinde birleştirilmesiyle oluşmaktadır. Fito-fosfolipid kompleksi oluşturulduktan sonra organik çözücü ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Bu amaçla vakum altında kurutma, alifatik hidrokarbon (örneğin n-heksan) yardımıyla çöktürme, dondurarak kurutma ve püskürterek kurutma gibi farklı yöntemler uygulanmaktadır (Ghanbarzadeh ve ark., 2016).

Fitozom hazırlanmasında sıklıkla çözücü buharlaştırma yöntemi tercih edilir. Maksimum verim elde etmek ve maksimum oranda etkin madde yüklenmesini sağlamak amacıyla belirlenen sıcaklıkta, belirlenen süre zarfında reaksiyon meydana gelmesi sağlanır. Fitozom formülasyonunun hazırlanmasında genel olarak kontrol altında tutulan parametreler bitkisel aktif madde/fosfolipidin oranı, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresidir. Formülasyon hazırlanmasında çeşitli oranlar, sıcaklık dereceleri ve reaksiyon süreleri denenmesinin ardından optimum bir formülasyon elde edilir. Fitozom formülasyonu hazırlanışının şematik gösterimi Şekil 1.5'te verilmiştir.



Şekil 1.5. Fitozom hazırlama aşamalarının şematik gösterimi (Babazadeh ve ark., 2018).

1.2.3. Fitozom Formülasyonu için Uygun Fito-aktif Moleküller

Biyoaktif moleküller esas nutrisyonel değerlerine ek olarak biyolojik aktiviteye sahip gıda bileşikleridir. Polifenoller majör antioksidanlardan oluşan ve bitkisel gıdalarda en çok bulunan bileşenlerdir. Bitkisel ekstreler önemli bir polifenol kaynağıdır. Polifenollerin üç başlıca kategorileri flavonoidler, terpenoidler ve fenolik asitlerdir. Flavonoidler kendi arasında; flavonlar (örneğin luteolin), flavonoller (örneğin rutin ve kersetin), flavanon (örneğin naringin ve hesperidin), izoflavonlar (örneğin daidzein ve genistein), proantosiyanidin ve antosiyaninler (örneğin siyanidin ve pelargonidin) olarak gruplandırılabilirler. Polifenollerin kimyasal yapısı gastrointestinal koşullarda nispeten kararsızdır. Fitozom teknolojisi çevresel koşullar (oksijen, ışık, yüksek sıcaklık, enzimler, metaller gibi), sindirim enzimleri ve gastrointestinal kanaldaki bağırsak bakterilerinin neden olduğu yıkımdan bileşikleri koruyan kompleksler üretmektedir. Polifenolik bileşiklerin bazıları yüksek lipofilik doğaya sahiptir ve gastrointestinal sıvılarda çözünmezler. Diğerleri oldukça hidrofiliktir ve biyolojik membranlardan geçemezler. Fitozom lipofilik polifenollerin sulu ortamda çözünme ve hidrofilik olanların sulu fazdan lipofilik çevreye geçme ve

oradan kan dolaşımına ulaşması sorunlarını iyileştirme potansiyeline sahiptir (Ghanbarzadeh ve ark., 2016).

Birçok bitkisel ekstre ve fitobileşik yüksek *in vitro* biyoaktiviteye sahip olsa da zayıf lipofilik doğalarına veya büyük moleküler yapılarına ya da her ikisine de bağlı olarak daha düşük absorbsiyon ve biyoyararlanıma neden olan *in vivo* aktivite sergilemektedir. Herhangi bir bitkisel ekstrenin ya da onların fitobileşiklerinin etkinlikleri vücuda etkili bir seviyede taşınmasına bağlıdır. Fitozomların bitkisel ekstrelerin ve bitkisel aktif bileşiklerin biyoyararlanımlarını ve fizikokimyasal stabilitelerini potansiyel olarak iyileştirdikleri raporlanmıştır.

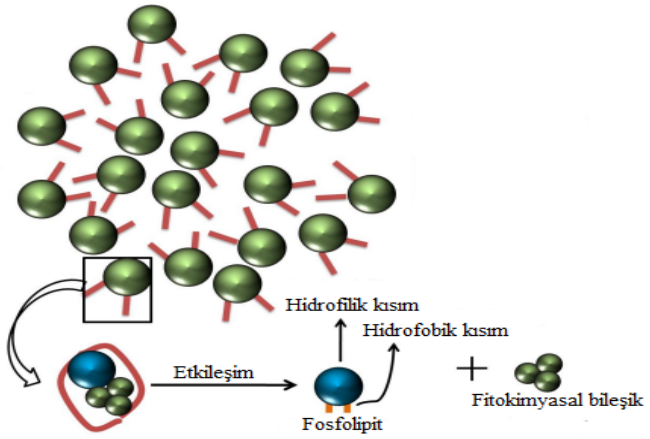
Her bitkisel ekstre ya da bitkisel aktif maddenin fitozom formülasyonu hazırlanmamaktadır. Bitkisel bileşiklerin seçimi, fitokimyasalın yapısına ve farmakokinetik profiline bağlıdır. Genellikle uzun yan zincirleri ve çok sayıda halkalı yapı içermeleri nedeniyle bağırsak membranlarından pasif difüzyonla geçemeyen fitobileşiklerin fitozom formülasyonlarının hazırlanması tercih edilir (Gnananath ve ark., 2017).

1.2.4. Fitozom Oluşumuna Etki Eden Faktörler

Yapılan spektroskopik analizler göstermiştir ki fosfolipid-substrat etkileşiminin temelini polar baştaki fosfat ve amonyum grupları ile substratın polar kısımlarının arasında oluşan hidrojen bağları oluşturmaktadır. Öte yandan uzun alifatik zincirlerin lipofilik bir zarf oluşturarak, fito-molekül ile fosfolipidin polar başını içine aldığı anlaşılmıştır (Dulbecco ve Savarino, 2013). Büyük hacimli bitkisel molekülün kapsanarak hapsedilmesi bazen birden fazla fosfolipid tarafından gerçekleştirilebilmektedir (Kidd, 2009).

Aktif hidrojen atomlu (-COOH, -OH, -NH, - NH_2, =NH gibi) bütün bileşikler fosfatidil molekülünün hidroksil grubuna esterlenebilir, bu da hücre membran duvarının geçilmesini kolaylaştıran amfifilik ajanı meydana getirmektedir. Bu

veziküler sistemler fosfatidilkolin aracılığıyla oluşmaktadır. Bu oluşumun şematik gösterimi Şekil 1.6'da verilmiştir. Fosfatidilkolin flavonoidlerin zayıf absorbsiyonunun üstesinden gelmekte ve hücre lipitleri ile karışabilirliği arttırmaktadır (Mota ve ark., 2017).



Şekil 1.6. Fitozom oluşumunun şematik gösterimi (Mota ve ark., 2017).

Fitozom formülasyonları genel olarak bitkisel aktif bileşen, fosfolipid ve çözücüden oluşmaktadır. Fosfolipidler hem doğal hem de sentetik kaynaklardan elde edilirler. Fosfolipidler bitkilerde ve hayvanlarda yaygın olarak bulunur; soya fasulyesi, ayçiçeği tohumu, kolza tohumu ve pamuk gibi bitkisel yağlar ve sığır beyni, yumurta sarısı gibi hayvansal dokular ana kaynakları arasında yer alır (Chaurio ve ark., 2009). Birçok çalışmada, bitkisel aktif moleküllerin fosfolipid komplekslerinin hazırlanmasında soya fasulyesi kaynaklı fosfolipidler kullanılırken, birkaç tanesinde ise yumurta sarısı kaynaklı fosfolipidlerin kullanıldığı görülmüştür (Gnananath ve ark., 2017). Doğal kaynaklardan fosfolipidlerin izolasyonu ve saflaştırılması sentetik ve yarı sentetik metotlar ile karşılaştırıldığında her zaman daha az maliyete sahip olmaktadır (Singh ve ark., 2017). Fosfolipidlerin doğal ve sentetik kaynakları arasındaki farklar Çizelge 1.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Doğal ve sentetik fosfolipidler arasındaki farklılıklar (Singh ve ark., 2017).

Özellik	Doğal Fosfolipid	Sentetik Fosfolipid
Stabilite	Daha az	Görece stabil
Saflık	Kontrolü zor ve daha az	Yüksek
Maliyet	Düşük	Yüksek

1.2.5. Fitozomların Karakterizasyonu

Fitozomlar morfolojik şekil, partikül büyüklüğü ve dağılımı, formülasyon içine yüklenen etkin madde yüzdesi, formülasyondan salınan etkin madde yüzdesi, kristalite ve erime noktası gibi fiziksel nitelikler ile karakterize edilebilirler. Kimyasal kompozisyon karakteristikleri nükleer manyetik rezonans (NMR) ve fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FTIR) yöntemleriyle belirlenebilir. Bunlara ek olarak formülasyonlardan etkin madde miktarlarının tayin edilebilmesi amacıyla çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemler de kullanılmaktadır; yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile ölçüm de son zamanlarda fitozom karakterizasyonunda ön plana çıkmaktadır (Ghanbarzadeh ve ark., 2016; Karataş ve Turhan, 2015).

Fitozomların yüzey morfolojisi atomik kuvvet mikroskobu (AFM), geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak görüntülenebilir. Morfolojik görüntüleme çalışmaları çoğunlukla partikül boyutunun, yakalama davranışının (aktif molekülün fosfolipide tutunması), yüzey özelliklerinin gözlenmesi ve partikül yüzeyinde olası safsızlıkların varlığının tanımlanması için kullanılmaktadır (Agarwal ve ark., 2012).

FTIR fitozom komplekslerinin tespiti için en kolay yöntem olarak değerlendirilmektedir. Bu yöntemde ayrı ayrı bileşenlerin, kompleksin ve bunların fiziksel karışımın spektrumları karşılaştırılmaktadır. Fitozom formülasyonunda fitoaktif bileşiğin serbest grubu fosfolipidin polar grubu olan kolin kısmı ile etkileşmektedir. Bu nedenle –OH piki yerine geniş bir pik görülmesi fitozom kompleksinin doğru oluştuğunu göstermektedir (Vu ve ark., 2018).

Fitozomların stabilitesi zaman içinde vezikülün partikül boyutu ve morfolojik yapısındaki değişim ölçülerek değerlendirilir. Yapısal değişiklikler SEM, TEM ile belirlenebilirken; partikül boyutunda meydana gelen değişimler dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemiyle ölçülebilir (Pawar ve Bhangale, 2015).

İn vitro etkin madde salım çalışmaları farklı pH değerleri ve farklı tampon çözeltiler kullanılarak hazırlanan salım ortamlarında yürütülmektedir. Farklı zaman aralıklarında salım ortamından örnek alınarak, alınan örnekler spektrofotometrik ya da kromatografik olarak analiz edilmekte ve böylece etkin madde salım hızı profili oluşturulmaktadır (Zhang ve ark., 2013). *İn vivo* çalışmalar av köpekleri, kemirgenler, wistar türü sıçanlar üzerinde saf bitkisel madde ile onun fosfolipid kompleksinin farmakokinetik parametlerinin karşılaştırılması ile yapılabilmektedir (Saha ve ark, 2013).

1.2.6. Fitozomların Stabilitesi

Doymamış doğal fosfolipidlerin oksidasyona duyarlı oldukları bilinmektedir (van Hoogevest, 2017). Yüksek oranda fosfolipid içeren preparatların nihai ürünün kararlılığı açısında belirleyici bir faktör olabilecek oksidatif değişikliklere karşı daha duyarlı olduğu düşünülmektedir (Khan ve ark., 2013). Oral dozaj formlarının üretim işlemlerinde doymamış doğal fosfolipidlerin kullanımı, oksidasyonun önlenmesi için nem/sıcaklık kontrolünü ve önlemlerini gerektirir. Aynı zamanda depolama sırasında dozaj formu daha yüksek sıcaklıklardan, ışıktan, oksijenden ve nemden korunmalıdır (van Hoogevest, 2017).

Fosfolipidlerin stabilitesiyle ilgili Zhang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada Aprepitant (APT) etkin maddesinin sterilizasyon stabilitesini artırmak amacıyla kolestril hemisüksinat ile film dispersiyon homojenizasyon yöntemiyle yüksek lesitin içeriğine sahip iyon çifti kompleks emülsiyonu hazırlanmıştır (Zhang ve ark., 2020). Kolestril hemisüksinat, stearilamin veya diseltifosfat gibi maddeler veziküler sistemlerin yapısına giren ve pozitif veya negatif yük sağlayan bileşenlerdir (Mazda

ve Özer, 1993). APT'nin yağ fazındaki çözünürlüğünü ve stabilitesini artırmak amacıyla yağ fazı olarak orta zincirli trigliseritler seçilmiştir. Yapılan analizler ile etkin madde ile kolestril hemisüksinat arasında iyon çiftinin oluştuğu doğrulanmıştır. İyon çiftinin oluşumu APT'nin lipofilikliğini yüksek oranda artırmış; bunun sonucunda da kimyasal kararlılık yüksek oranda artmıştır. Kolestril hemisüksinatın, iyon çifti emülsiyonun fiziksel stabilitesini artırarak daha güçlü ve daha kalın bir membran meydana getirerek lipit membranları stabilize ettiği görülmüştür. Çalışmada formülasyonun partikül büyüklüğünde veya içeriğinde herhangi bir değişiklik olmadan 8 dakika boyunca 120 °C'de otoklavlamaya dayanabildiği gösterilmiştir. Stabilite çalışmaları yapılırken zeta potansiyel, partikül boyutu ve dağılımı ve etkin madde yükleme kapasitesi analizi değerlendirme için yapılmıştır. Formülasyonun 25 °C ± 2 °C'de en az 6 ay saklanabileceği görülmüştür. Etkin maddenin çözeltisi ile karşılaştırıldığında fosfolipid ile hazırlanan formülasyonun daha yüksek biyoyararlanım, uzun süreli salım etkisi, absorbsiyonunu yüksek oranda artması gibi avantajları olduğu görülmüştür. Sonuç olarak APT kolestril hemisüksinat iyon çifti emülsiyonunun yüksek derecede sterilizasyon stabilitesine sahip ilaç taşıyıcı sistem olarak uygulama değerine sahip olduğu görülmüştür (Zhang ve ark., 2020).

Fito-fosfolipid kompleksleri depolama sırasında agregasyon oluşumu ve kimyasal degradasyon riski taşımaktadırlar. Formülasyonların sıcaklığa bağlı higroskopikliği, partiküller arası etkileşimlerin stabiliteye etkilerinin belirlenmesi gibi durumları zeta potansiyel ölçümüyle değerlendirilmektedir. Saf aktif bileşiğe kıyasla fito-fosfolipid komplekslerinin daha yüksek nem çekme potansiyellerinin olduğu ortaya konmuştur ve formülasyonların açık havada bırakıldığında daha viskoz hale geldikleri görülmüştür (Khan ve ark., 2013). Fitozom formülasyonlarının stabilitesi kompleksin partikül büyüklüğünün ve yapısal bütünlüğünün uygun zaman aralıklarında ölçülmesiyle değerlendirilir. Ortalama partikül boyutu ölçümü için dinamik ışık saçılımı yöntemiyle ölçüm yapan partikül boyutu analiz cihazları ya da SEM kullanılabilir (Bhosale ve ark., 2016).

Fito-fosfolipid komplekslerinde diğer dozaj formlarında olduğu gibi 25 °C ± 2 °C / % 60 ± 5 bağıl nem koşullarında 6 ay süresince uzun süreli stabilite testleri yapılır.

Fosfolipidlerin stabilitelerinin nem çekme gibi durumlarda bozulmaya yatkın olması sebebiyle fitozomların stabilitesi buzdolabı stabilite koşulları olan 5 °C ± 3 °C'de 6 ay boyunca uzun süreli olarak değerlendirilmektedir. Hazırlanan bazı fitozom formülasyonlarının oldukça yapışkan ve viskoz halde oldukları, sıcaklık ve nem koşullarından etkilenerek eriyik haline geçme eğiliminde oldukları bildirilmiştir. Kullanılan bitkisel aktif madde ve fosfolipidin tipine ve özelliklerine göre stabilite test koşullarının belirlenmesi gerekir. Ayrıca fito-fosfolipid komplekslerinde değerlendirilen bir diğer stabilite parametresi formüllerin gastrointestinal sıvılardaki stabilitesidir; simüle mide (pH 1,2) ve bağırsak (pH 6,8) ortamlarında formülasyon üzerine yapılan deneylerde kompleksin bu ortamlardaki davranışı *in vitro* olarak gözlenmiş olmaktadır. Deneyler sonucunda bozunmadan kompleks içinde kalan madde miktarı spektrofotometrik ya da kromatografik yöntemlerle ölçülmektedir.

1.2.7. Fitozomların Farmasötik Alanda Kullanımları

Fitozom ilaç taşıyıcı sistemleri oral ve topikal olarak formüle edilmiştir. En uygun üretim yöntemi üretim kolaylığı ve maddenin biyoyararlanımı göz önüne alınarak seçilmelidir (Santos ve ark., 2019). Oral uygulamada fitozomlar için yumuşak jelatin kapsüller, sert jelatin kapsüller ve tabletler tercih edilebilir. Fitozomlar genel olarak yağlı taşıyıcılarda disperse edilerek süspansiyon formunda bulunduğundan yumuşak jelatin kapsüller ideal bir dozaj formu olmaktadır. Doğal veya yarı sentetik yağlar bu amaçla kullanılmaktadır. Bu dozaj formu için yağlı taşıyıcıların tipi en önemli kritik parametredir. Uygun dozaj formuna ön uygunluk değerlendirmeleri yapıldıktan sonra karar verilmelidir; çünkü yumuşak jelatin kapsüller her fitozom için uygun dozaj formu olmayabilirler. Fitozom kompleslerinin volumetrik olarak sert jelatin kapsüllere dolumu yapılabilir. Gerekli olduğu takdirde dolum öncesinde kuru granülasyon işlemi önerilmektedir. Fito-fosfolipid kompleksleri sınırlı akabilirlik, potansiyel yapışkanlık ve düşük yoğunlukları nedeniyle iyi stabilite özelliklerine sahip değillerdir. Tabletleme aşamasında granülasyon için kullanılan suyun ve kurutma için kullanılan ısının negatif etkisi nedeniyle mümkün olduğunca yaş granülasyondan kaçınılması gerekmektedir. Kuru granülasyon yüksek dozlarda doz tekdüzeliğinin

sağlanması ve uygun biyoyararlanım elde edilmesi amacıyla uygun olabilmektedir. Doğrudan basım yöntemi de bazen fito-fosfolipid komplekslerinin tablet olarak basılması amacıyla kullanılabilmektedir (Saha ve ark., 2013).

Fitozomların sunumu için bir diğer alternatif topikal dozaj şekilleridir. Hazırlama aşamasında öncelikle yağ fazının küçük bir miktarında fito-fosfolipid kompleksi dağıtılmakta ve önceden hazırlanmış 40 °C'den daha düşük sıcaklıktaki emülsiyona eklenmektedir. Eğer dış faz su ise, fito-fosfolipid kompleksi su fazına eklenmekte ve daha sonra yine 40 °C altında final emülsiyona ilave edilmektedir (Karataş ve Turhan, 2015).

Indena firması son zamanlarda oldukça popüler olan fitozom ürünleri ile öncü bir firma olarak piyasada yer almaktadır (Khan ve ark., 2013). Indena firması fitozom tabanlı birçok ürün üretmiştir. Bunlardan piyasada yer alanlar Çizelge 1.2'de verilmiştir (Indena, 2022).

Çizelge 1.2. Indena'ya ait mevcut fitozom preparatları (Indena, 2022).

Preparat adı	Bitkisel kaynak	Miktar	Biyolojik aktivite
BERBEVIS® BERBERIN PHYTOSOME®	Berberis aristata L. - kök	≥%28.0 ≤%34.0 berberin	Metabolizma sağlığı
CASPEROME® BOSWELLIA PHYTOSOME®	Boswellia serrata Roxb. ex Colebr. - Reçine	≥ %25 boswellik asit	Antiinflamatuvar Eklem sağlığı Bağırsak sağlığı
GINKGOSELECT® PHYTOSOME® GINKGO BILOBA PHYTOSOME®	Ginkgo biloba L. – Yaprak	≥ %7 ginkgoflavonglukozit ≥ %2 ginkgoterpenler ≥ %0.8 ginkgolid ≤ 5 ppm ginkgolik asitler	Kavrama ve dolaşım sağlığı Antioksidan Vazokinetik
GREENSELECT® PHYTOSOME® GREEN TEA PHYTOSOME®	Camellia sinensis (L.) O. - Genç yapraklar	≥ %19 ≤% 25 (-)-epigallokateşin-3-0-gallat olarak ifade edilen polifenoller ≥ %13 (-)- epigallokateşin-3-0-gallat ≤ %0.1 kafein	Kilo kontrolü sağlama Antioksidan
LEUCOSELECT® PHYTOSOME® GRAPE SEED PHYTOSOME®	Vitis vinifera L. - Tohum	≥ %25 ≤ %30 proantosiyanidinler	Kardiyovasküler koruyucu UV koruyucu Antioksidan
SILYMARIN PHYTOSOME®	Silybum marianum (L.) Gaertn. - Meyve	≥ %15 ≤ %20 silibin	Karaciğer sağlığını koruma UV koruyucu Antioksidan
SILIPHOS® SILYBIN PHYTOSOME®	Silybum marianum (L.) Gaertn. – Meyve	≥ %29.7 ≤ %36.3 silibin	Karaciğer sağlığını koruma Retinoik asit benzeri aktivite
MERIVA® TURMERIC PHYTOSOME®	Curcuma longa L. - Rizom	≥ %18 ≤ %22 kurkuminoidler	Eklem sağlığı Antiinflamatuvar
UBIQSOME® COENZYME Q10 PHYTOSOME®	-	≥%18.0 ≤%22.0 koenzim Q10	Hücresel enerji kaynağı Spor beslenmesi Kalp ve kardiyovasküler sağlık Beyin sağlığı Yaşlanma karşıtı etki
VAZGUARD® BERGAMOT PHYTOSOME®	Citrus bergamia Risso & Poit. – Meyve suyu	≥%11.0 ≤%19.0 toplam flavanoller	Sağlıklı kan seviyesi
QUERCEFIT® QUERCETIN PHYTOSOME® SF/MD	Sophora japonica L. - Çiçeklik	≥%34.0 ≤%42.0 kuersetin	Spor beslenmesi Antioksidan

1.2.8. Fitoaktif Bileşiklerin Kalite Parametreleri

Fitozom formülasyonlarında bitkisel başlangıç maddesinin kalitesi bütün aşamaların emniyetini etkilemesi nedeniyle önemlidir. Bu nedenle üretimin ilk basamaklarından itibaren final ürünün niteliklerini garanti altına almak için iyi imalat uygulamaları prosedürleri uygulanır. Bu aşamada aşağıdaki ölçümler yapılmalıdır:

- Tedarikçi denetimi ve kalifikasyonu
- Bitkisel ekstre ya da bitkisel aktif bileşenin GACP (Good Agricultural and Collection Practices - İyi Tarım ve Toplama Uygulamaları)'na uygunluğu
- Bitkinin ve bitki kısımlarının botanik teşhis ve tanımaları
- Bitkisel materyalin işlenmesinin (hasat zamanı, hasat metodu, kurutma koşulları, depolama koşulları) kontrolü
- İzlenen koşullar altında biyokütlenin karantinasının sağlanması
- Kimyasal analiz
- Kontaminasyon kontrolü (pestisit, aflatoksin, ağır metal vs.)

Kontrol edilen parametrelerin herhangi birinde uygunsuzluk görülürse ham materyal ileri aşamalara geçirilmemelidir. Prosesin tamamı iyi tanımlanmış prosedürler ile üretimin kritik adımlarındaki analizlerle iyi imalat uygulamalarına bağlı olarak kontrol edilmelidir. Tüm veriler kaydedilmeli, kritik parametre ve prosedürler tanımlanmalıdır. Bitmiş üründe, final ürün analizi ve dokümantasyon değerlendirmesi spesifikasyonlara uygunluğu doğrulamak için gerçekleştirilmelidir. Laboratuvar malzeme kalifikasyonu ve periyodik bakım uygun olarak valide edilmiş analitik metodlara göre güvence altına alınmalıdır. Tüm analitik veri gelecek referanslar için saklanmalıdır.

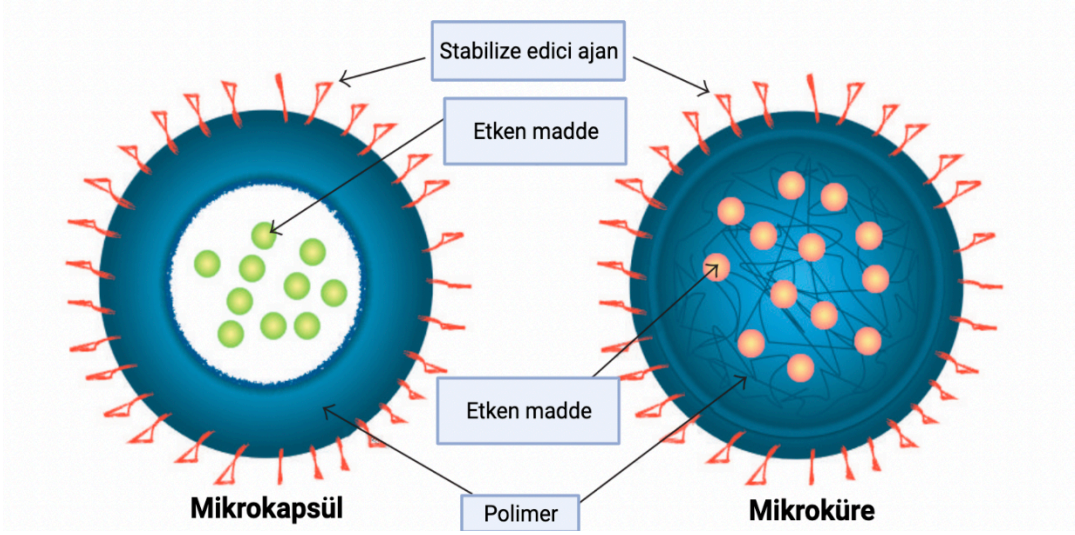
İyi Tarım ve Toplama Uygulamaları için bitkinin yetiştirilmesi, büyütülmesi ve hasatı dahil olmak üzere kalite güvence/kalite kontrol değerlendirmesini içeren son basamak çok önemlidir. Ürünün kalitesi sürecin bütün aşamaları boyunca kapsamlı olarak kontrol edilir. Ürün kalitesi pazara çıkmak için tatmin edici olmalıdır (WHO, 2003).

1.3. Mikropartiküllerin Tanımı ve Genel Özellikleri

Mikropartikül, 1-1000 μm aralığında boyuta sahip olan partiküllere verilen isimdir. Mikropartiküller, bazı avantajlarından dolayı son yıllarda birçok farklı çalışmanın konusu olmuştur. Biyolojik sistemlerle kontrollü etkileşimleri sayesinde farmasötik ve biyomedikal araştırmalarda ön plana çıkan partiküller olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Özellikle kontrollü ilaç salımı, doku mühendisliği, biyosensör uygulamaları gibi alanlarda kullanımları giderek artmaktadır (Galogahi ve ark., 2020).

Mikropartiküller; etkin maddeyi *in vitro* ve *in vivo* degradasyondan koruma, etkin maddenin stabilitesini arttırma, yüksek yüzey/hacim oranına sahip olmak, kontrollü etkin madde salımı sağlamak, etkin maddenin biyoyararlanımını arttırmak gibi avantajlara sahiptir (Wong ve ark., 2018).

Mikropartiküllerin iki çeşidi vardır. Merkezinde etkin maddeyi bulunduran çekirdek ve bu çekirdeği polimerik kabuk ile saran tipte olanlar mikrokapsül olarak adlandırılırken, polimerik matriste etkin maddenin çözünüp dağılmasıyla oluşanlar ise mikroküre olarak adlandırılır (Prajapati ve ark., 2015). Mikropartiküller vücutta kontrollü salım sağlamak üzere kullanılabilen taşıyıcı sistemlerdir. Ayrıca etkin maddenin hedeflendirilmesi için de kullanılabilirler (Karataş ve ark., 2009). İlaç yüklü polimerik mikropartiküller özellikle nazal uygulama, pulmoner inhalasyon, oral uygulama ve implant uygulamaları için geliştirilmektedir. Mikropartiküllerin hazırlanmasında kontrollü salımda umut vadeden uygulamaları nedeniyle poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), polilaktik asit (PLA) ve poliglikolik asit (PGA) polimerleri sıklıkla tercih edilmektedir (Davoodi ve ark., 2018). Mikrokapsül ve mikroküre yapıları Şekil 1.7'de şematize edilmiştir.



Şekil 1.7. Mikrokapsül ve mikroküre yapılarının şematik gösterimi (Vilos ve Velasquez, 2012).

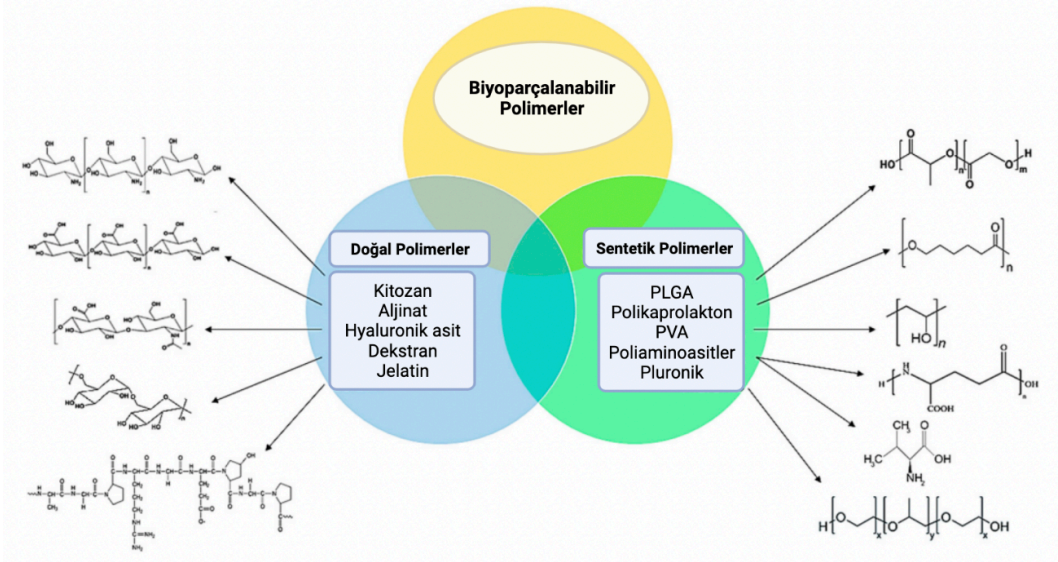
1.3.1. Mikropartiküllerin Hazırlanmasında Yararlanılan Polimerler

Mikropartiküllerin oluşturulmasında doğal ve sentetik kaynaklı polimerlerden yararlanılmaktadır. Kitozan, aljinat, albümin sıklıkla tercih edilen doğal polimerler arasında yer almaktadır. Poliakrilatlar, polilaktitler ve kopolimerleri, poliglikolitler, polikaprolaktonlar ise sentetik polimerler grubunda yer almaktadırlar. Polimerlerin kristal formu, çözünürlüğü ve molekül ağırlığı gibi özellikleri önemlidir. Mikropartiküllerin hazırlanmasında kullanılacak polimerler teratojenik, kanserojenik, toksik olmamalıdır. Polimerler vücutta parçalanabilen ve vücutta parçalanamayan polimerler olarak da sınıflanabilmektedirler (Gürsoy, 2004; Müderrisoğlu ve Çomoğlu, 2010). Biyolojik olarak parçalanabilen doğal veya sentetik kaynaklı polimerik mikropartiküler sistemlerin ilaç salım ve hedeflendirmede kullanımı son zamanlarda artmıştır. Biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin tercih edilme nedenleri arasında; toksik özellik göstermemeleri, parçalanarak vücutta uzaklaştırılabilmeleri, vücutla geçimli olmaları yer almaktadır. Polimerlerin sınıflandırılması Çizelge 1.3'te verilmiştir.

Çizelge 1.3. Mikropartiküler sistemlerin hazırlanmasında kullanılan polimerlerin sınıflandırılması (Müderrisoğlu ve Çomoğlu, 2010; Tunçay ve Çalış, 1999).

Polimer türü	Doğal	Sentetik
Biyoparçalanabilir	Kitozan Aljinat Jelatin Kollajen İnülin Nişasta Selüloz Dekstran Albumin	PLA PGA PLGA Polikaprolakton Poliamid, poliakrilamid Polistiren Polialkilsiyanoakrilat Vinil türevleri, polikarbonat Poliortoester Polianhidrit Poliaminoasitler
Biyoparçalanamaz		Polihidroksi etil metakrilat Polimetil metakrilat Poli N-vinil-2-prolidon (PNVP) Polivinil alkol (PVA) Poliakrilik asit (PAA) Polivinil asetat (PVAc) Polimetakrilik asit) Polietilen oksit (PEO) Polietilen glikol (PEG) Polietilen vinil asetat kopolimeri (PEVAc) Silikonlar Poli dimetil siloksan (PDMS)

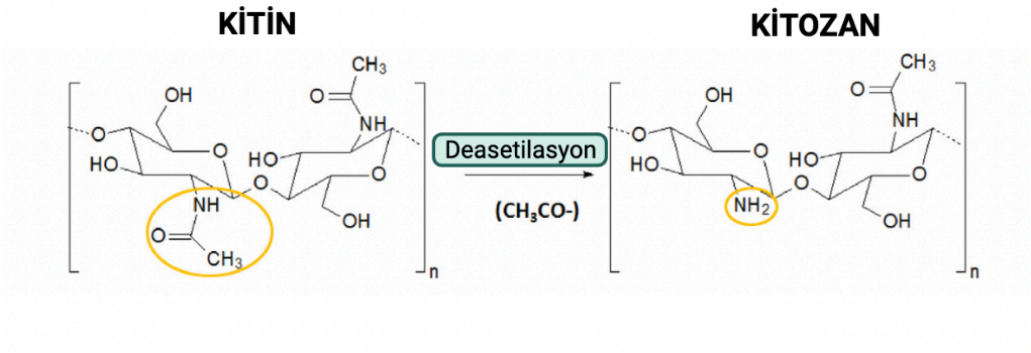
Polimerlerin vücutta parçalanması kimyasal, mikrobiyolojik veya enzimatik yollarla meydana gelmektedir. Bu mekanizmalar bir arada ya da ayrı ayrı meydana gelebilir. Vücutta parçalanabilen polimerlerin bazılarının kimyasal yapıları Şekil 1.8'de gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Vücutta parçalanan polimerler ve kimyasal yapıları (Mansoor ve ark., 2019).

1.4. Kitozan

Kitozan, β-(1,4)-glikosidik bağlarla konjuge edilmiş D-glukozamin ve N-asetil glukozamin zincirlerine sahip olan pozitif yüklü doğal kaynaklı bir polimerdir (Zhao ve ark., 2018). Kitinin N-asetilasyon ürünü olan kitozan, polisakkarit yapısında olup çoğunlukla kabuklular, mantarlar ve böceklerin dış iskeletinde bulunur. Kitin ve kitozanın kimyasal yapısı Şekil 1.9'da gösterilmiştir.

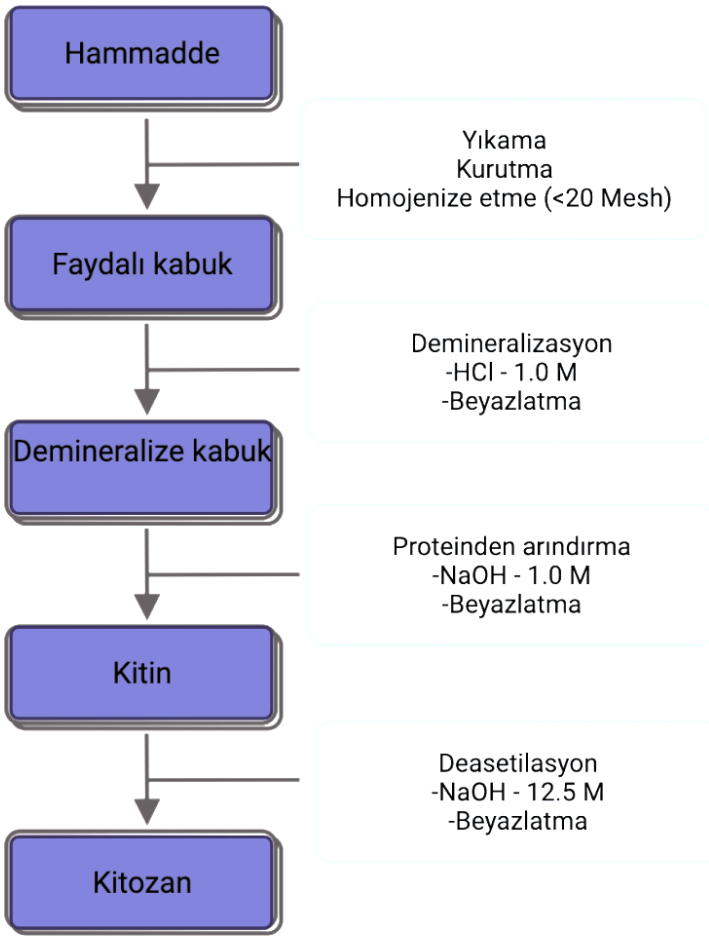


Şekil 1.9. Kitin ve kitozanın kimyasal yapısı (Muxika ve ark., 2017).

Kitozanın biyouyumlu, biyobozunur olması gibi avantajlarının yanı sıra ayrıca bazı farmakolojik özelliklere (antimikrobiyal, antifungal) sahip olması nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanımı sıklıkla tercih edilmektedir (Handa ve ark., 2021; Luo ve Wang, 2014).

1.4.1. Kitozanın Özellikleri ve Elde Edilmesi

Kitozan kimyasal, enzimatik yollarla kitinin deasetilasyonuyla elde edilmektedir. Kitozan dilüe organik asitlerde çözünen bir polimer olarak bilinmektedir (Khayrova ve ark., 2021; Sacco ve ark., 2021). Polikatyonik yapısı sayesinde polianyonlarla etkileşerek polielektrolit kompleksleri oluşturabilmektedir. Karides kabuğundan kitozan üretimi Şekil 1.10'da gösterilmiştir (De Queiroz Antonino ve ark., 2017). Kitozanın suda ve birçok organik çözücüde çözünmemesi bazı alanlarda kullanımını sınırlandırmaktadır. Kullanımını kolaylaştırmak amacıyla fonksiyonel gruplarında modifikasyon yapılabilmektedir. Özellikle -OH ve -NH_2 aktif grupları kimyasal reaksiyonlara daha açık kısımlarıdır. Kitozanın kimyasal modifikasyonu fiziksel ve kimyasal özelliklerini geliştirmenin yanı sıra kullanım alanlarını da genişletmektedir. Modifiye kitozan türevleri daha yüksek biyouyumluluk, biyoaktivite ve biyobozunurluk özellikleri gösterirler. Ayrıca toksik olmamaları da ön plana çıkan özellikleri arasındadır (Wang ve ark., 2020).



Şekil 1.10. Karides kabuğundan kitozan eldesinin şematik gösterimi.

Kitozanın karakteristik özelliklerinden biri de yüzeylere yapışma özelliğidir. Bu sayede kitozan etkin maddelerin mukozal yollardan vücuda iletiminde yeni taşıyıcı sistemlerde yer almaktadır. Ayrıca mukusa herhangi bir afinitesi olmayan etkin maddelerin daha kolay adsorblanabilmesini sağlamaktadır (Bugnicourt ve Ladavière, 2016).

1.4.2. Kitozanın Kullanım Alanları

Kitozan ve türevleri yiyecek endüstrisi, kozmetoloji, ilaç endüstrisi, tekstil, kimyasal üretim gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Son yıllarda dişçilik uygulamalarında, oftalmolojide, veteriner uygulamalarda, atık su arıtma, biyoteknoloji

vb. alanlarda kitozana olan ilgi artmıştır (Bokura ve Kobayashi, 2003; Morin-Crini ve ark., 2019; Shigemasa ve Minami, 1998).

Doğal kaynaklı polimerler etkin maddeyi degradasyondan korumaları, kontrollü salım sağlama yetenekleri, absorbsiyonu arttırmaları, buna bağlı olarak terapötik etkiyi arttırmaları ve uygulama sıklığını azaltmaları gibi avantajları nedeniyle sıklıkla ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmaktadırlar. Kitozan da farklı terapötik etkin maddelerin özellikle mikro- ve nanopartikül yapısında taşınmasında üstün özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır (Khor ve Lim, 2003). Mukoadezif formülasyonların hazırlanması, ilaç hedeflendirmesi, absorbsiyonun arttırılması gibi uygulamalarda kitozandan yararlanılmaktadır. Kitozan ayrıca doku mühendisliği, biyomüdendislik uygulamaları gibi güncel alanlarda da sıklıkla kullanılmaktadır (Ahmed and Aljaeid, 2016).

Farklı araştırmacılar ilaç taşıyıcı sistem olarak kitozan mikropartikül hazırlamışlardır. Diklofenak sodyum (Açıkgöz ve ark., 1996), 5-florourasil (Akbuga ve Bergisadi, 1996), sisplatin (Wang ve ark., 1996), felodipin (Ko ve ark., 2002) ve hidrokinon (Dini ve ark., 2003) etkin maddeleri kitozan mikropartiküller içinde enkapsüle edilmiştir ve partiküllerin etkin maddeleri kontrollü olarak saldıkları görülmüştür. Antibiyotik yüklü kitozan mikropartiküller lokal yara iyileşmesi amacıyla uygulanabilirler; ayrıca implantlarda kullanımlarının da biyoyararlanımı artırdığı görülmüştür (Jameela ve Jayakrishnan, 1995).

1.5. Mikropartikül Hazırlama Yöntemleri

Mikropartiküllerin hazırlama yöntemleri; basit koaservasyon, iyonotropik jelasyon, kompleks koaservasyon, püskürterek kurutma, emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma olarak sınıflandırılabilir (Anal ve ark., 2006). Mikropartikül hazırlama yöntemleri Çizelge 1.4'te özetlenmiştir.

Çizelge 1.4. Mikropartikül hazırlama yöntemleri (Zırh-Gürsoy A., 2014).

Polimerizasyon	Emülsiyon Polimerizasyonu Süspansiyon Polimerizasyonu
Koaservasyon	Basit Koaservasyon Kompleks Koaservasyon
Emülsiyon Oluşturma/Çözücü Buharlaştırma	Y/S Emülsiyonu Y/Y Emülsiyonu S/Y/S Emülsiyonu
İn-Situ Yöntem	
Kondenzasyon	Emülsiyon Polikondenzasyonu Süspansiyon Polikondenzasyonu
Püskürterek Kurutma	
Dispers Fazda Jelleşme ve Çapraz Bağlama	

Mikroenkapsülasyon yöntemleri temelde üç grupta da sınıflandırılabilir; I) fiziksel yöntemler (püskürterek kurutma, süperkritik sıvı çöktürme ve çözücü buharlaştırma), II) fizikokimyasal yöntemler (koaservasyon, iyonotropik jelasyon), III) kimyasal yöntemler (yüzeylerarası polimerizasyon ve moleküler inklüzyon kompleksi) (Tyagi ve ark., 2011).

a) Polimerizasyon Yöntemi

Emülsiyon Polimerizasyonu: Sulu ortamda yürütülen bir işlem olan emülsiyon polimerizasyonunda polimerizasyon işlemi emülgatör maddeler tarafından oluşturulan misellerde yürütülmektedir. Etkin maddenin polimerizasyon sırasında yüklenmesi olasıdır. Suda çözündürülen ya da dağıtılan etkin madde yağ içinde disperse edilir. Düşük sıcaklıkta eklenen monomerler arayüzeyde hızla polimerleşerek mikropartikül oluşturur. Uygun misellerin oluşması ve oluşan emülsiyonun stabilitesi kullanılan emülgatöre bağlıdır (Zırh-Gürsoy A., 2014).

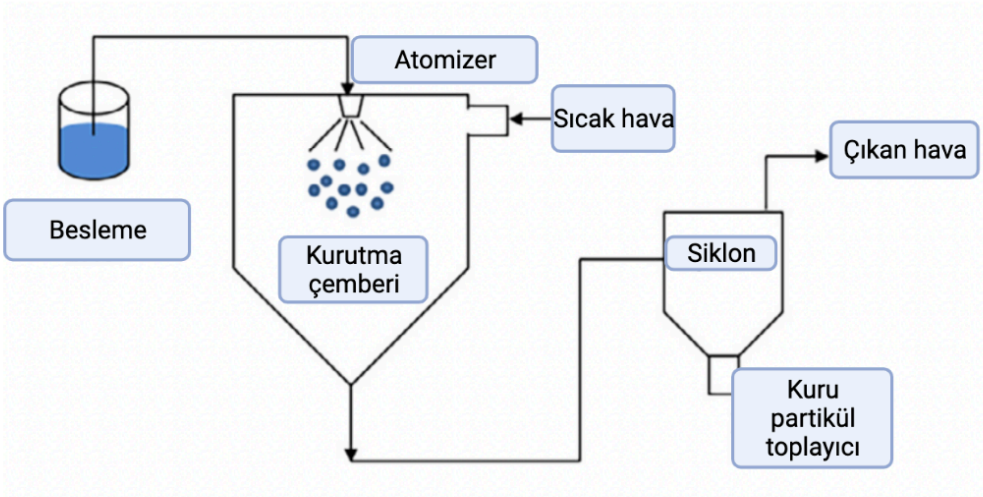
b) Dispers Fazda Jelleşme ve Çapraz Bağlanma Yöntemi

Bu yöntem sıklıkla jelatin, albümin, nişasta mikropartiküllerinin hazırlanmasında kullanılır (Madan ve ark., 1978). Doğal polimer sulu fazda çözündürülür. Etkin madde aynı faz içinde çözündürülür. Sulu faz emülgatör içeren

yağ fazında dağıtılır. Numune soğutulup, ısıtılır veya çapraz bağlayıcı ilave edilerek, polimerin jelleşmesi, denatürasyonu veya çapraz bağ oluşumu sağlanır. Yağ fazından ayrılan mikropartiküller kurutulur. Bu yöntemle etkin madde miktarı %25 ve daha düşük konsantrasyonda olduğunda düzgün yüzeyli, küresel, yüzeyde etkin madde kristali olmayan mikropartiküller elde edilir. Etkin madde miktarı %65'in üzerinde olduğunda ise yüzeyde etkin madde kristalleri ve salım profilinde patlama etkisi gözlenir (Zırh-Gürsoy A., 2014).

c) Püskürterek Kurutma Yöntemi

Püskürterek kurutma işlemi öncelikle işlemin yapılacağı emülsiyonun ve dispersiyonun hazırlanması, hazırlanan dispersiyon ve emülsiyonun homojenizasyonu, sonrasında homojen numunenin kurutma hücresindeki atomizasyonu ile gerçekleşmektedir. İşlemin uygulanacağı çözeltinin, atomize edilecek olan materyalin kaplama çözeltisi içindeki dispersiyonu ve emülsiyonu ile hazırlanmaktadır. Bu işlemde kaplama materyali olarak jelatin, modifiye nişasta, dekstrin kullanılabilmektedir (Peker ve Arslan, 2011). Yöntemin şematik gösterimi Şekil 1.11'de verilmiştir.

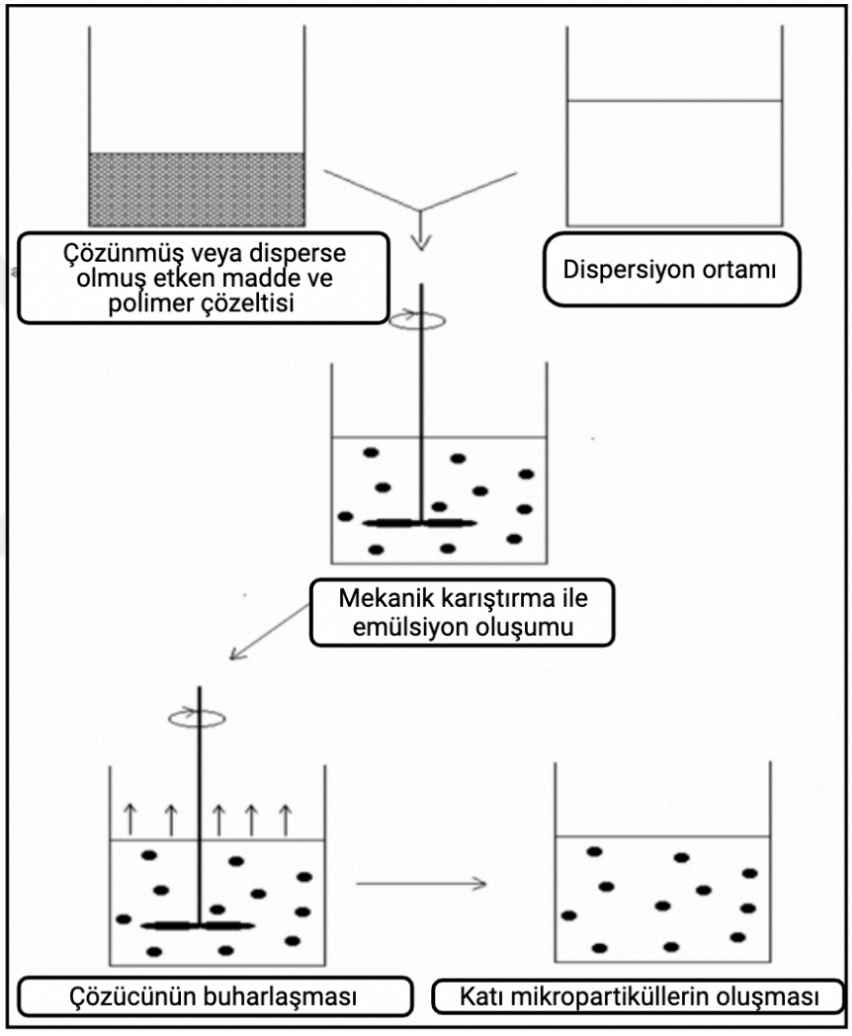


Şekil 1.11. Püskürterek kurutma yönteminin şematik gösterimi (Özkan ve ark., 2019).

d) Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Çözücü buharlaştırma yöntemi polimer içeren emülsiyondan çözücünün uzaklaştırılması olarak tanımlanabilir. Bu yöntem dört temel adımdan oluşmaktadır;

I) kaplama materyali olarak polimerin organik çözücü içinde süspansiyon, emülsiyon ya da çözelti oluşturacak şekilde çözünmesi, II) organik (dispers) fazın sulu faz (sürekli faz) içinde karıştırılarak, ekstrüzyon veya damlatma ile emülsifikasyonu, III) çözücünün uzaklaştırılması, IV) filtrasyon ya da santrifüj ile partiküllerin elde edilmesi ve partiküllerin kurutulması. Çözücü buharlaştırma yöntemiyle mikropartiküllerin elde edilişinin şematik gösterimi Şekil 1.12'de verilmiştir.

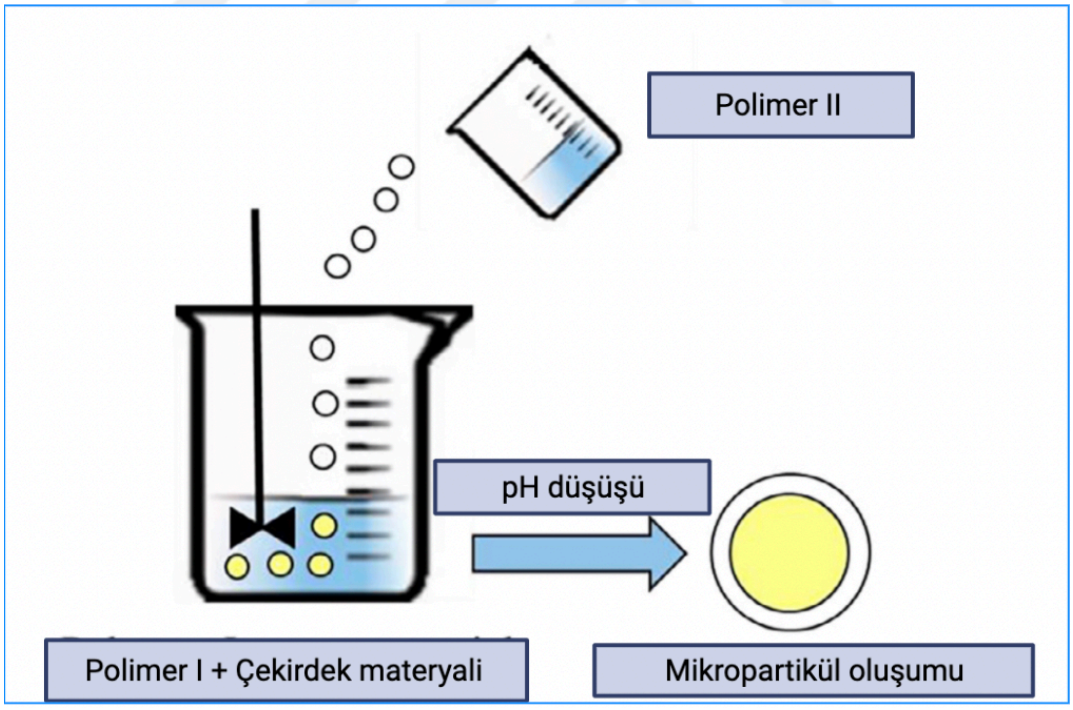


Şekil 1.12. Çözücü buharlaştırma yöntemiyle mikropartiküllerin oluşumunun şematik gösterimi (Hwisa ve ark., 2013).

e) Koaservasyon Yöntemi

Koaservasyon tekniği elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler yanı sıra gluteraldehit, transglutaminaz gibi kimyasal ya da enzimatik çapraz bağlayıcılar tarafından tetiklenen tek ya da karışım olarak bulunan farklı

yükteki polimerlerin sulu çözeltisinin sıvı-sıvı faz ayrışmasını içeren kolloidal bir olay olarak tanımlanabilir (Xiao ve ark., 2014). Biyopolimerler arasındaki etkileşimin kuvveti; polimer türü (molar kütlesi, esnekliği ve yükü), pH, iyonik kuvvet, konsantrasyon ve polimerlerin oranı gibi birçok faktöre bağlıdır (Özkan ve ark., 2019). Kullanılan polimer sayısına bağlı olarak bu yöntem basit veya kompleks koaservasyon olarak adlandırılabilmektedir. Basit koaservasyon sadece bir tür polimer içerirken; kompleks koaservasyon iki ya da daha fazla türde farklı polimerin çekirdek etrafını sarmasıyla oluşmaktadır. Kompleks koaservasyonda öncelikle sulu polimer çözeltisi içinde çekirdek materyalinin disperse edilmesiyle bir emülsiyon oluşturulmaktadır. Daha sonra bunu diğer sulu fazın eklenmesiyle çekirdek materyalin etrafında bir katman oluşumuyla bu fazın sarılması takip etmektedir. Mikropartiküller filtrasyon veya santrifüjleme yöntemiyle elde edilmekte ve uygun çözücüyle yıkandıktan sonra kurutulmaktadır (Livney, 2008). Koaservasyon yöntemiyle mikropartikül elde edilişinin şematik gösterimi Şekil 1. 13'de verilmiştir.



Şekil 1.13. Kompleks koaservasyon yöntemiyle mikropartikül üretimi (Özkan ve ark., 2019).

f) İyonik Jelasyon Yöntemi

İyonik jelasyon yöntemi Ca^{+2}, Ba^{+2} ve Al^{+3} gibi çok değerlikli iyonların varlığında polielektrolitleri çapraz bağlama yeteneğine dayanan bir mikroenkapsülasyon yöntemidir. Yöntem ekstrüzyon ya da emülsifikasyon/jelasyon kullanılarak uygulanabilir (Lupo ve ark., 2015). Küresel partiküllerin hazırlanmasında ekstrüzyon sıklıkla kullanılan üretim yöntemidir. Ekstrüzyon yönteminde polimer çözeltisi şırınga yardımıyla ortama damlatılmaktadır. Emülsifikasyon/jelasyon yönteminde ise polimer çözeltisi içinde hidrofobik etkin maddeyi içeren emülsiyon hazırlanır ve çapraz bağlayıcı çözeltiye damlatılır.

İyonik jelasyon yönteminde doğal ya da sentetik kaynaklı polianyonik veya polikatyonik polimerler kullanılmaktadır. Polianyonik polimerlere örnek olarak karboksilik asit veya sülfat grupları içeren pektin, dekstran sülfat, selüloz sülfat, aljinik asit gibi doğal polimerler ve polimetakrilik asit gibi sentetik polimerler söylenebilir (Park ve Kang, 2005; Reis ve ark., 2006; Thimma ve Tammishetti, 2001). Kitozan, amino dekstran gibi doğal polimerler ve polialilamin hidroklorür, polidialkil dimetilamonyum klorür gibi sentetik polimerler polikatyonik yapıdaki polimerlere örnek olarak verilebilir. Çapraz bağlayıcı olarak polianyonlar için, baryum, magnezyum ve kalsiyum gibi çok değerlikli katyonların; polikatyonik polimerler için ise çok değerlikli anyonların kullanımı tercih edilmektedir.

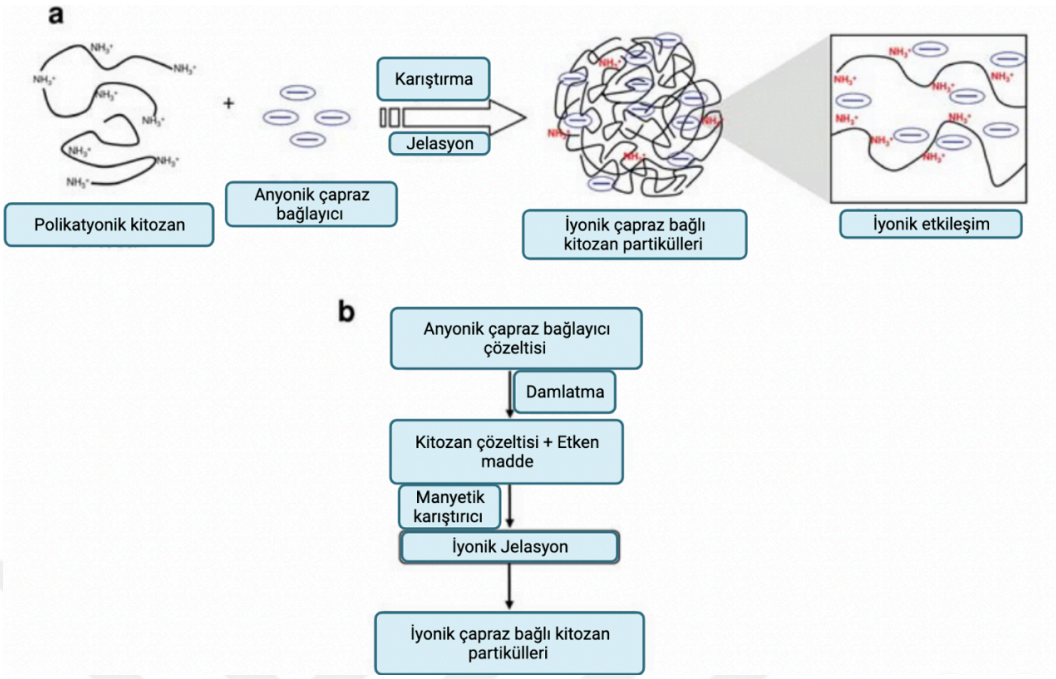
Birçok mikropartikül hazırlama yöntemi arasında iyonotropik jelasyon metodu toksik olmaması, organik çözücü içermemesi, güvenli ve kontrol edilebilir olması yönleriyle ön plana çıkmaktadır (Agnihotri ve ark., 2004).

Fundueanu ve ark. iyonik jelasyon ve farklı metodlar ile Ca-aljinat mikropartiküller üretmişlerdir. İyonik jelasyon yöntemiyle elde edilen mikropartiküllerin tekdüze yüzey yapısında, 1.0 ve 1.4 mm arasında ortalama 1.2 mm partikül boyutuna sahip oldukları görülmüştür (Fundueanu ve ark., 1999). Fan ve ark. düşük molekül ağırlıklı kitozan ve çapraz bağlayıcı olarak sodyum tripolifosfat kullanarak iyonik jelasyon metoduyla nanopartikül hazırlamışlardır. Çalışmada kitozan çözeltisinin konsantrasyonu, sodyum tripolifosfat (TPP) çözeltisi konsantrasyonu, kitozan ve sodyum tripolifosfat oranı, kitozan çözeltisinin pH ve

sıcaklığı, çapraz bağlanma esnasında ortam sıcaklığı gibi farklı parametrelerin nanopartikül oluşumuna etkisini incelemişlerdir. Parametreler stabil ve monondispers nanopartikül elde etmek amacıyla değerlendirilmiştir. Asetik asit konsantrasyonunun düşürülmesinin ve çapraz bağlanma esnasında ortam sıcaklığının düşürülmesinin nanopartiküllerin partikül boyutu dağılımını önemli ölçüde daralttığı bulunmuştur (Fan ve ark, 2012).

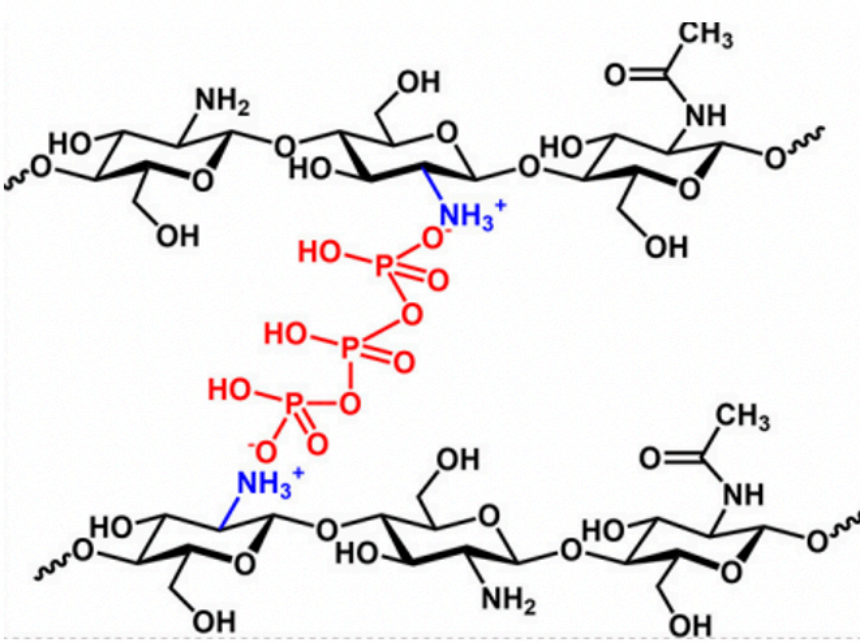
1.5.1. İyonik Jelasyon Yöntemiyle Kitozan Mikropartiküllerin Hazırlanması

İyonik jelasyon yöntemi kitozanın pozitif yüklü primer amino grubu ile negatif yüklü polianyon grupları arasında iyonik etkileşime dayanmaktadır. Çok değerlikli ve non-toksik yapısı nedeniyle çapraz bağlayıcı olarak en çok kullanılan sodyum tripolifosfat negatif yüklü gruplara sahip olan bir polianyondur (Shu ve Zhu, 2002). İyonik jelasyon yöntemi elektrostatik etkileşimlere dayanan çapraz bağlanma metodu sayesinde toksik olan kimyasal çapraz bağlayıcıların ve emülsiyon oluşturucu ajanların kullanılmaması yönüyle avantajlıdır (Berger ve ark., 2004). İyonik jelasyon yöntemiyle partiküllerin oluşumunun şematik gösterimi (a) ve iyonik çapraz bağlı kitozan partiküllerin hazırlanmasının şematik diyagramı (b) Şekil 1.14'te verilmiştir.



Şekil 1.14. (a) İyonik jelasyon yöntemiyle partiküllerin oluşumunun şematik gösterimi (b) İyonik çapraz bağlı kitozan partiküllerin hazırlanmasının şematik diyagramı (Desai, 2016).

İyonik jelasyon metodu ile hem hidrofilik hem de hidrofobik etkin maddeler yüksek yükleme etkinliği ile enkapsüle edilebilmektedir. Bu yöntemde kitozan asetik asit içinde çözülmekte ve polianyon üzerine damlatma yöntemiyle ilave edilmektedir. İyonik jelasyon yöntemi basit ve uygulaması kolay bir yöntem olarak bilinmektedir. Ayrıca sulu ortamda gerçekleşmesi diğer yöntemlere göre avantaj oluşturmaktadır (Nagpal ve ark., 2010). Kitozan ve tripolifosftat arasındaki etkileşim kendiliğinden meydana gelmektedir (Du ve ark., 2010; Keawchaoon ve Yoksan, 2011). Bu yöntemle hazırlanan mikropartiküllerin fiziksel stabilitesini (agregasyon, disintegrasyon vb.) etkileyen faktörler araştırılmış ve uygun stabilizasyon stratejileri geliştirilmiştir (Giacalone ve ark., 2014; Jonassen ve ark., 2012; Liu ve Gao, 2009; López-León ve ark., 2005). Kitozan ve tripolifosfat kimyasal grupları arasındaki elektrostatik etkileşim Şekil 1.15'te gösterilmiştir.



Şekil 1.15. Kitozan ve tripolifosfat arasındaki elektrostatik etkileşim (Wang ve ark., 2021).

Bu yöntemle hazırlanacak partiküllerin boyutu ve yüzey yükleri; kullanılan kitozan ve stabilize edici ajan oranına göre değişmektedir. Kitozan:tripolifosfat ağırlık oranı yüksek yükleme kapasitesi elde edebilmek için kritik proses parametresi olarak değerlendirilmekte ve kontrol altında tutulmaktadır. Ortalama partikül boyutu, partikül boyutu dağılımı, partikülün yüzey yükü, yükleme kapasitesi gibi özellikler kullanılan çözeltilerin sıcaklığı, kullanılan çözeltilerin pH'sı, çapraz bağlayıcı çözelti konsantrasyonu gibi parametrelere bağlı olarak değişmektedir (Gan ve ark., 2005; Prabaharan ve Mano, 2004; Tang ve Shi, 2007; Tsai ve ark., 2008).

1.6. BER Hakkında Genel Bilgiler

BER kuaterner izokinolin bir alkaloidtir. Çok sayıda farklı bitkinin kökünden veya gövde kabuğundan elde edilebilen, iyi bilinen doğal bir etkin madde olarak kabul edilir. Hydrastis canadensis, Berberis aquifolium, Berberis aristata, Berberis vulgaris ve diğer birçok farklı bitkinin yapısında bulunur (Battu ve ark., 2010; Feng ve ark., 2019; Gaba ve ark., 2021; Zuo ve ark., 2006). Sarı renkli, kokusuz, acı tada sahip kristal toz haldedir. Doğal formu metanol ve etanolde az çözünür, suda ise çok az çözünür. Tuz formları etanol, metanol ve suda daha çok çözünür (Dostál ve ark., 2004).

BER bakteriler, mantarlar, protozoalar, virüsler ve helmintler gibi birçok farklı organizma üzerinde önemli ölçüde antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Bu etkisi sebebiyle farklı deri ve göz hastalıklarında kullanımı söz konusudur (Hayashi ve ark., 2007). Geleneksel Çin tıbbında özellikle diyare ve gastroenterit tedavisinde yüzyıllar boyunca kullanılmıştır (Taylor ve ark., 1999). Çin tıbbında klinik özelliklerinin iyi olması ve güvenli olması yönüyle geniş kullanım alanı bulmuştur (Jin ve ark., 2016).

1.6.1. BER'in Kimyasal Yapısı

BER klorür ve BER sülfat klinik olarak sıklıkla kullanılan BER tuzu türevleridir. BER hidroklorür krem formülasyonu topikal olarak antimikrobiyal ve antiinflamatuvar uygulama amacıyla kullanılmaktadır. BER'in kimyasal adı 5,6-dihidro-9,10-dimetoksi-benzo[g]-1,3-benzodioksolo[5,6-á] kinolizinyumdur (Lau ve ark., 2001).

1.6.2. BER'in Fizikokimyasal Özellikleri

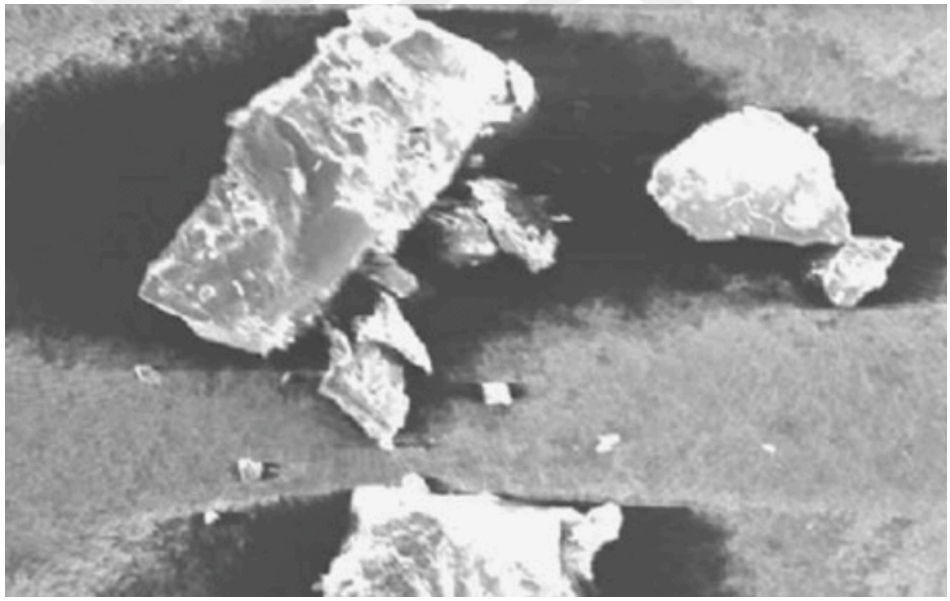
BER koyu sarı renkli, kokusuz ve karakteristik acı tada sahip bir alkaloidtir. Genellikle suda çok az çözünür; etanolde az çözünür ve metanolde çözünür. BER'in tuz formları daha iyi çözünürlük özelliği gösterir. Klinik amaçlarla klorür ve sülfat tuzları sıklıkla tercih edilmektedir (Kumar ve ark., 2015).

Absorbsiyonunun zayıf olması ve düşük biyoyararlanım göstermesi nedeniyle BER'in terapötik faydası önemli ölçüde azalmaktadır. Suda çözünürlüğünün düşük olmasının sebebi muhtemel olarak sahip olduğu kuaterner amonyum katyonudur. Hidrofobik özelliği ve düşük suda çözünürlüğü gastrointestinal alanda absorbsiyonunu minimuma indirmekte ve etkili konsantrasyonu azaltmaktadır; bu durumlar da BER'in farmasötik dozaj formlarının geliştirilmesini ve uygulamasını önemli ölçüde sınırlandırmaktadır. Terapötik potansiyelini geliştirmek ve farmakokinetik kısıtlamaların üstesinden gelmek amacıyla birçok yapısal değişiklik yapılarak çeşitli BER türevleri sentezlenebilmektedir. Sentezlenen bu BER türevleri BER'in

farmakolojik özelliklerini ve farmakokinetik profilini iyileştirmektedir (Gaba ve ark., 2021).

BER klorürün sudaki çözünürlüğünün sıcaklık artışına bağlı olarak arttığı görülmüştür. BER'in sudaki çözünürlüğü 25°C ve 37°C'de sırasıyla 5.27±0.29 ve 8.50±0.40 mM olarak bulunmuştur. Ayrıca BER klorürün sudaki çözünürlüğü için test edilen tüm pH değerleri arasında en yüksek çözünürlük pH 7.0 fosfat tamponunda görülmüştür. BER klorürün suda 25°C'de pH 1.2 (HCl), pH 3.0 ve 5.0 (ftalat tamponu) ve pH 9.0 (borat tamponu) ortamlarında pH 7.0 (fosfat tamponu)'na göre 20 kat düşük çözünürlüğe sahip olduğu görülmüştür.

BER'in ve hazırlanan formülasyonların yüzey özelliklerinin belirlenmesi için SEM kullanılabilmektedir. BER'in SEM görüntüsü Şekil 1.16'da verilmiştir.



Şekil 1.16. BER'e ait SEM görüntüsü (Battu ve ark., 2010).

1.6.3. BER'in Stabilitesi

Etkin maddenin ve formülasyonlarının stabilitesinin değerlendirilmesi dozaj formu tasarımında önemli kriterlerden biri olarak değerlendirilmektedir. Stabilite çalışmaları kısa süreli veya uzun süreli olarak farklı sıcaklık, nem ve pH koşullarında

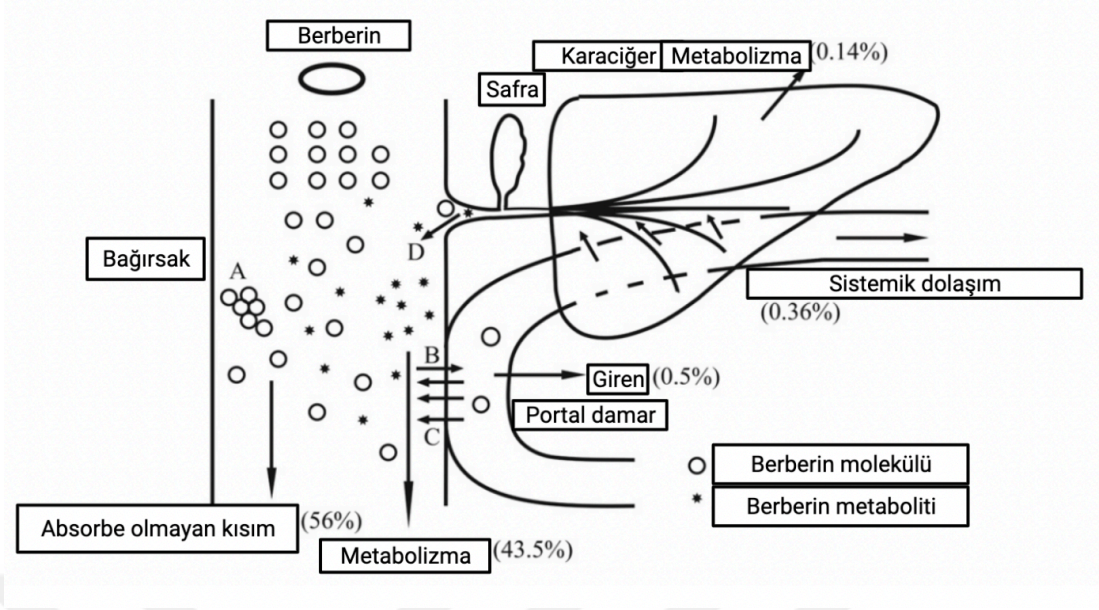
yapılabilmektedir. Yapılan bu stabilite çalışmaları boyunca etkin maddenin önemli bir bozunmaya uğramaması gerekmektedir. Formülasyon çalışmalarında en az 6 ay boyunca etkin maddenin ve dozaj formunun stabilitesinin değerlendirilmesi gerekmektedir.

Battu ve ark. tarafından yapılan çalışmada BER'in çalışma yapılan tüm pH ve sıcaklık değerlerinde stabilitesini koruduğu görülmüştür. 6 ay süresince yapılan çalışmada BER'in %5'ten az bozulma gösterdiği gözlenmiştir (Battu ve ark., 2010).

Nano boyutta olan dozaj formlarının kullanımı etkin maddelerin stabilitesini artırmakta, farmakokinetik özelliklerini iyileştirmekte ve yan etkilerini azaltarak terapötik etkinliklerini artırmaktadır. BER'in de nano boyutta ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlanması sonucunda stabilitesi artırılabilmektedir (Khan ve ark., 2022).

1.6.4. BER'in Farmakokinetik Özellikleri

Kemirgenlerde ve insanlarda yapılan farmakokinetik çalışmalarda BER'in bağırsakta zayıf absorbsiyon özelliği gösterdiği, vücutta hızla metabolize olduğunu ve buna bağlı olarak da oral uygulamada düşük biyoyararlanıma sahip olduğu görülmüştür. Fizyolojik koşullarda BER iyonik forma dönüşmekte ve düşük pH değerlerinde agregasyon özelliği göstermektedir. Bu özellik nedeniyle BER'in gastrointestinal kanaldaki çözünürlüğü ve bağırsaktan emilimi azalmaktadır. Epitel hücre membranlarında yer alan P-glikoprotein BER'in oral biyoyararlanımını azaltır (Chen ve ark., 2011; Liu ve ark., 2016; Pan ve ark., 2002). BER'in oral uygulama sonrasında bağırsaktan emilimi Şekil 1.17'de şematize edilmiştir.



Şekil 1.17. Oral uygulama sonrası BER'in bağırsak emiliminin şematik gösterimi (Liu ve ark., 2016).

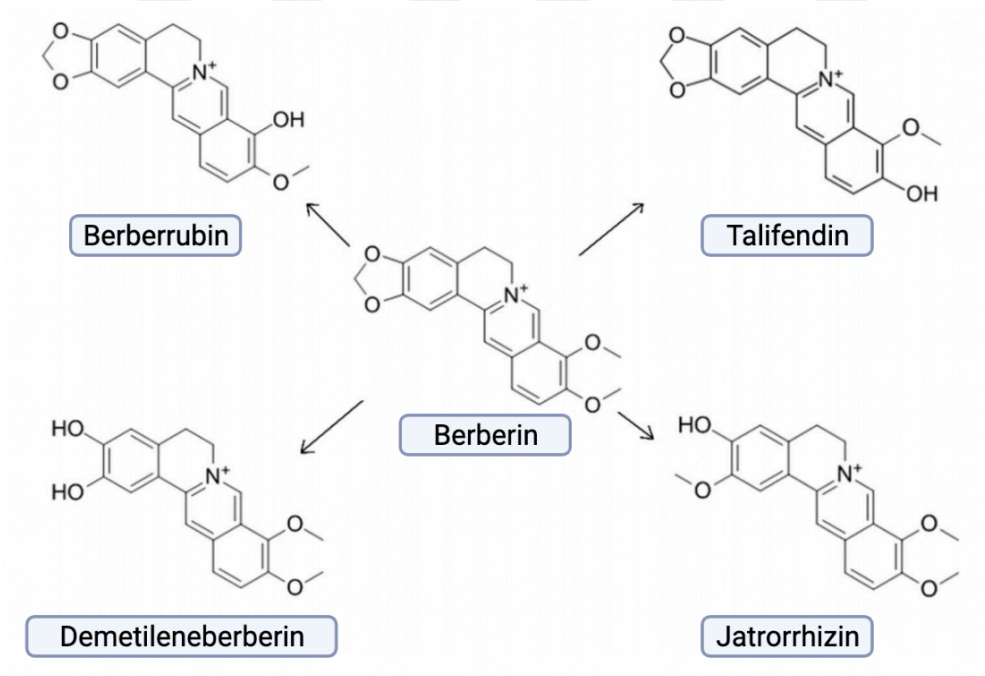
Şekil 1.17'de de gösterildiği gibi kendi kendine agregasyon (A), zayıf absorbsiyon (B), P-glikoprotein aracılı akış (C), hepatobiliyer yeniden atılım (D) gibi durumlar nedeniyle BER'in %56'lık kısmı gastrointestinal kanaldan absorbe olamaz. Bağırsakta yaklaşık %43.5'inin metabolize olması sonucunda da uygulanan dozun sadece %0.5'lik kısmı portal vene geçebilir. Vücuda giren bu dozun yaklaşık %0.14'ü karaciğerde metabolize edilir ve dolayısıyla BER'den sağlanan toplam biyoyararlanım yalnızca %0.36 civarında olur.

BER'in ratlarda 100 mg/kg dozda oral uygulama sonrası maksimum plazma konsantrasyonu (Cmax) 4 ng/mL olarak bulunmuştur (Liu ve ark., 2009). Başka bir çalışmada ratlarda 25 mg/kg dozda oral BER uygulamasından 15 dakika sonra plazma konsantrasyonu 16.74 ng/mL olarak bulunmuştur. BER'in plazma konsantrasyonu 12 saat içinde hızla azalmaktadır (Gong ve ark., 2014).

Bağırsak mikrobiyotası aracılığıyla BER absorblanabilir formu olan dihidroberberine dönüştürülebilir. Dihidroberberinin bağırsaktan absorbsiyonu BER'e göre beş kat daha yüksektir. Bu dönüşüm gut mikrobiyotasında bulunan

nitroredüktazlar yoluyla gerçekleşir. Dihidroberberin bağırsaktan geçtikten sonra oksitlenme ile hızla BER'e dönüşür (Feng ve ark., 2015).

BER oral uygulamasını takiben yaygın olarak karaciğer, böbrekler, kas, akciğerler, beyin, kalp, pankreas ve yağda dağılsa da; ağırlıklı olarak karaciğerde dağılım gösterdiği görülmüştür. BER'in karaciğerde yüksek dağılım göstermesi kolesterol ve glukoz düşürücü aktivitelerine kanıt olarak gösterilebilir (Tan ve ark., 2013). Sıçanlarda BER karaciğerde sitokrom P450 izoformları (CYPs) tarafından metabolize edilir. Faz I oksidatif demetilasyonu takiben faz II glukuronidasyon yoluyla metabolize olmaktadır (Liu ve ark., 2016). BER ve bazı metabolitlerinin kimyasal yapıları Şekil 1.18'de gösterilmiştir. BER hepatobiliyer sistem ve böbrekler vasıtasıyla vücuttan atılmaktadır. Farelerde idrarda ve dışkıda on bir BER metabolitine rastlanmıştır (Li ve ark., 2011).



Şekil 1.18. BER ve çeşitli metabolitlerinin kimyasal yapıları (Warowicka ve ark., 2020).

1.6.5. BER'in Farmakolojik Özellikleri

BER'in diyare ve gastrointestinal rahatsızlıklarda geleneksel kullanımının yanı sıra farklı hastalıklarda çok sayıda biyolojik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Antihipertansif (Ko ve ark., 2010), antiaritmik (Tsai ve Tsai, 2004), antihiperglisemik (Pan ve ark., 2003), antitümör (Jantová ve ark., 2003; Kettmann ve ark., 2004), antiinflamatuvar (Küpeli ve ark., 2002; Yeşilada ve Küpeli, 2002), antioksidan (Mišík ve ark., 1995) özellikleri farklı araştırmacılar tarafından çalışılmıştır.

Son yıllarda kanser hücre hatları kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmalarda BER'in kanser hücresi üretimini inhibe ettiği ve bazı kanser hücre hatlarında apoptozisi indüklediği görülmüştür. Bu nedenle farklı BER türevleri kanseri önlemek ve tedavi etmek amacıyla geliştirilmektedir (Liu ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2010). BER telomeraz, DNA topoizomeraz I, p53, NF-kB ve östrojen reseptörleri gibi çeşitli nükleik asitler ve proteinlerle direkt etkileşime girme potansiyeline sahiptir (Guamán Ortiz ve ark., 2014).

BER klinik olarak kardiyovasküler sistem rahatsızlıklarındaki etkileri açısından incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda BER'in antiaritmik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca BER'in ejeksiyon fraksiyonunu iyileştirdiği, konjestif kalp yetmezliğinde sol ventrikülün işlevini artırdığı ve genel fiziksel kapasiteyi artırdığı ortaya konulmuştur. BER LDL-C'nin kandan atılmasını uyarma, bağırsaktan kolestrol emilimini azaltma, dışkı ile kolestrol atılımını artırma, karaciğerde kolestrolü işleyerek safra asidi oluşumuna yardımcı olma ve kolestrolün serumdan karaciğer tarafından tutulmasını sağlama gibi farklı ve çeşitli mekanizmalar yardımıyla kolestrolü azaltarak kan basıncının düşmesine katkıda bulunur (Zeng ve ark., 2003).

BER'in viral yaşam döngüsünde farklı adımları hedef alması sebebiyle yeni antiviral ilaçlarda kullanım için iyi bir aday olduğu görülmüştür. BER'in virüs replikasyonunu azalttığı ve virüsler arasındaki spesifik etkileşimleri hedef aldığı gösterilmiştir. BER'in, virüslerde DNA sentezini ve ters transkriptaz aktivitesini inhibe ettiği görülmüştür. BER herpes simpleks virüsü, insan sitomegalovirüsü, insan

papilloma virüsü ve insan immün yetmezlik virüsünün replikasyonunu engeller. Ayrıca viral replikasyon için gerekli olan MEK-ERK, AMPK/mTOR ve NF-κB sinyal yolaklarını da düzenleme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. Konak bağışıklığını desteklediği de ortaya konmuştur; böylece viral arınma sağlamaktadır (Warowicka ve ark., 2020).

1.6.6. BER ve Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türleri (ROS), çeşitli endojen ve eksojen süreçler tarafından üretilir ve olumsuz etkileri antioksidan savunma ile nötralize edilir. ROS aşırı üretimine karşı hücresel antioksidan savunma sistemi yetersiz kalırsa oksidatif stres oluşur ve oksidatif stres çeşitli hastalıkların hem başlangıcında hem de ilerlemesinde önemli rol oynar (Sinha ve Dabla, 2015).

ROS, solunumun tamamlanmamış oksijen indirgeme işlemi sırasında aerobik hücreler tarafından üretilir (Santilli ve ark., 2015). Organizmada aşırı miktarda biriken ROS ve azalan antioksidan savunma sistemleri lipit, protein ve DNA metabolizmasını olumsuz etkiler. Sonuçta diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, nörodejeneratif hastalıklar başta olmak üzere birçok hastalığın patogenezine aracılık eder. Bunun yanında ROS çok sayıda kronik karaciğer hastalığının gelişimini de tetiklemektedir (Zhu ve ark., 2012). Çoklu doymamış yağ asitleri biyolojik membranların yapısının büyük bir bölümünü oluşturur ve ROS tarafından saldırıya uğradıklarında aldehitler ve malondialdehit (MDA) gibi çeşitli yan ürünler oluşur (Bovi ve ark., 2021). Dolayısıyla MDA lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biridir ve hem deneysel hem de klinik çalışmalarda oksidatif stresin bir göstergesi olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Ghavipanje ve ark., 2021). Öte yandan hücreler ROS ortadan kaldıracak ya da etkisiz hale getirebilecek antioksidan savunma mekanizmasına sahiptir. Düşük moleküllü süpürücüler grubundan glutatyon (GSH), karotenoidler, vitamin C, vitamin E ve katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi ROS'un reaktivite derecesini düşürebilen endojen antioksidanlar savunma

sisteminin ilk basamağını oluşturur (Bukowska ve Duchnowicz, 2022; Santilli ve ark., 2015).

Hücrelerde ROS'un büyük bir bölümü mitokondriyal solunum zincirinden türetilir. GSH'nin diğer mitokondriyal enzimler tarafından katalize edilen reaksiyonlarda doğrudan veya bir kofaktör olarak hareket etme yeteneği, mitokondriyal işlev bozukluğuna ve ardından hücre ölümüne yol açabilecek oksidatif modifikasyonları önlemek veya onarmak için GSH varlığını gerekli kılar. Mitokondriyal redoks bozuklukları birçok hastalıkta merkezi bir rol oynadığından, optimal GSH seviyelerini barındırmak hayati önem taşımaktadır (Mari ve ark., 2020).

Ayrıca ekzojen antioksidanların da DNA mutasyonlarını, oksidatif stresi ve bunlardan başka hücre hasarı parametrelerini azaltarak, çeşitli hastalıkların görülme sıklığını düşürdüğü farklı çalışmalarda gösterilmiştir (Ma ve ark., 2022; Xu ve ark., 2021).

BER'in antioksidan aktivitesi yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Hasanein ve ark., 2017). Chen ve ark., levrek balıkları üzerinde yaptıkları çalışmada BER'in lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesini önemli derecede azalttığını göstermişlerdir. Bu azalmanın BER'in ROS üzerinde düşüşe sebep olmasından kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Bu sonuçlar BER'in antioksidan etkinliğinin göstergesi olarak kabul edilmiştir (Chen ve ark., 2022). Zhang ve ark., alkol kaynaklı akut ve kronik karaciğer hasarında BER'in etkinliğini araştırmışlardır. Deneyler sonucunda aşırı alkol tüketiminden kaynaklı, hepatik lipid peroksidasyonuyla sonuçlanan oksidatif stresin ve oksidatif mitokondriyal hasarın BER ile zayıflatıldığı görülmüştür. Ayrıca BER'in kronik alkol tüketimine bağlı olarak karaciğerde lipid birikimini kısmen azalttığı anlaşılmıştır (Zhang ve ark., 2014).

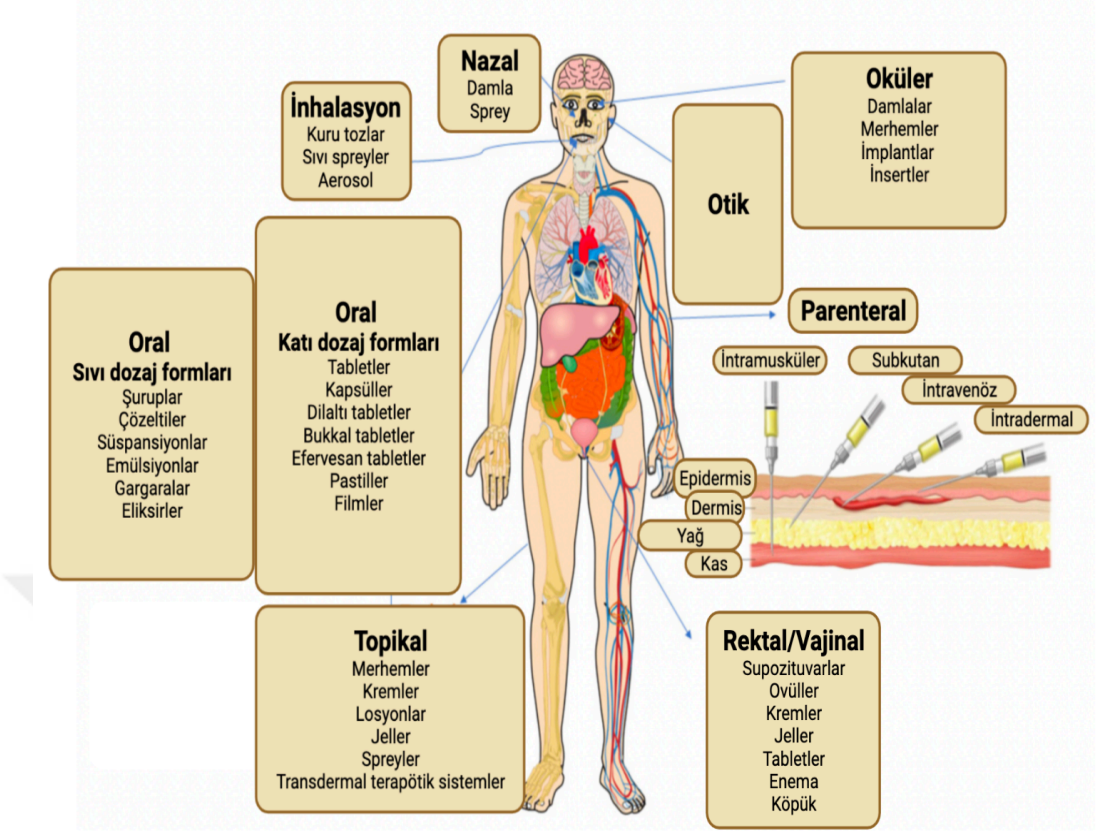
1.7. Oral Yoldan Verilen Dozaj Formlarının Emilimi

Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi ilaçları permeabilite (bağırsak) ve çözünürlük özelliklerine göre dört farklı gruba ayırır. Bunlar; yüksek permeabilite/yüksek çözünürlük gösteren Sınıf I ilaçlar, yüksek permeabilite/düşük çözünürlük gösteren Sınıf II ilaçlar, düşük permeabilite/yüksek çözünürlük gösteren Sınıf III ilaçlar ve düşük permeabilite/düşük çözünürlük gösteren Sınıf IV ilaçlardır (Amidon ve ark., 1995). Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine göre ilaçların sınıflandırılması Şekil 1.19'da verilmiştir.



Şekil 1.19. Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine göre ilaçların sınıflandırılması.

Dozaj formları vücuda farklı yollardan uygulanabilmektedir. Uygulama yolunun seçiminde hedef bölge, tedavi süresi ve etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri etkili olmaktadır. Uygulama yolunun seçilmesinde etkin maddenin çözünürlüğü ve permeabilitesi de önemlidir (Verma ve ark., 2010). Farklı ilaç uygulama yolları ve bu yollardan uygulanan dozaj formları Şekil 1.20'de gösterilmiştir.



Şekil 1.20. Farklı ilaç uygulama yolları ve bu yollardan uygulanan dozaj formları (Adepu ve Ramakrishna, 2021).

Absorbsiyon etkin maddenin uygulama bölgesinden kan dolaşımına geçmesini ifade etmektedir. İlacın absorbsiyonu çeşitli faktörlere bağlı olarak değişir. Bunlar; uygulama yolu, etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri, formülasyon tipi ve etkin madde yiyecek etkileşimidir. Sistemik dolaşıma geçen etkin madde miktarı biyoyararlanımı ifade etmektedir. İntravenöz uygulamada biyoyararlanım %100 olarak kabul edilmektedir. Oral uygulamada eksik absorbsiyon ve karaciğerde etkin maddenin metabolize olmasına neden olan ilk geçiş etkisi nedeniyle biyoyararlanım düşük olmaktadır (Fleisher ve ark., 1999).

Oral yoldan ilaç uygulanması güvenilir, ekonomik ve pratik bir yol olması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Bu yolla uygulanan ilaçlar mukozadan genellikle pasif difüzyonla geçerken, nadiren de aktif transport ve filtrasyon ile geçerler.

Oral olarak uygulanan dozaj formlarına tablet, kapsül, granül, çözelti, emülsiyon, süspansiyon, şurup ve posyonlar örnek olarak verilebilir. İlaçların emilimi için ilk etapta farmasötik dozaj formundan salınması gerekir. Etkin maddenin salınabilmesi için de öncelikle ilaç formunun dağılması gerekir. Etkin madde açığa çıktıktan sonra ise çözünme ortamında çözünmesi gerekir. Etkin maddelerin emilimi ancak çözündükten sonra gerçekleşebilir. Molekülün çözünmesi ne kadar hızlı gerçekleşiyor ise o denli hızlı emilmektedir. Etkin maddenin çözünme hızı; maddenin kimyasal yapısına, çözüneceği ortamın hacmine ve ortamın pH'sına bağlı olarak değişir. İlaçtan beklenen etkilerin gözlenebilmesi için emildikten sonra dolaşıma katılıp etki yerine ulaşması, metabolize olması ve son olarak da vücuttan atılması gerekir. İlacın emilim hızı tedaviden alınan verim açısından önemlidir. Çok hızlı emilen etkin madde molekülleri toksik konsantrasyona ulaşma riskini artırmaktadır; çok yavaş emilen etkin madde moleküllerinde ise etkili konsantrasyona ulaşamama riski söz konusudur.

Gastrointestinal kanalda oral emilimi engelleyen birçok bariyer bulunmaktadır. Genellikle düşük molekül ağırlıklı ve nonpolar moleküller gastrointestinal bariyerlerden daha kolay geçerken; yüksek molekül ağırlıklı ve polar moleküllerin geçişi zor olmaktadır. Lipofiliklik, iyonik kuvvet, hidrojen bağı yapma yeteneği ve moleküler boyut gibi özellikleri moleküllerin gastrointestinal kanaldaki epitelyal bariyerlerden geçişini düzenler. Oral emilimi iyileştirmek için bu özellikler arasında bir denge sağlanmalıdır (Padhye ve ark., 2021).

1.8. *İn vivo* Hayvan Deneylerinde Değerlendirilen Farmakokinetik Parametreler

Yeni ilaç tasarımlarında klinik uygulamalara geçmeden önce en önemli analizlerden biri oral biyoyararlanımın değerlendirilmesidir (Yu ve ark., 2016). İlaçların oral biyoyararlanımının değerlendirilebilmesi temel olarak ilaç plazma konsantrasyonunun zamana göre grafiği üzerinden anlaşılmaktadır. Bu amaçla sıklıkla değerlendirilen *in vivo* farmakokinetik parametreler ilacın maksimum plazma

konsantrasyonu (C_{max}), maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşma süresi (t_{max}), ilacın vücutta yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) ve eğri altında kalan alan (AUC)'dir.

İn vivo hayvan deneylerinde oral uygulamayı takiben belli zaman aralıklarında hayvanlardan kan örnekleri alınarak santrifüjlenmekte ve plazmaları elde edilmektedir. Etkin maddenin plazmada tayin edilebilmesi amacıyla geliştirilen kromatografik yöntemler ile plazma numunelerindeki etkin madde miktarı tayin edilmektedir. Elde edilen bu değerler yardımıyla plazma konsantrasyonu-zaman grafiği çizilmektedir.

Uygulanan formülasyonların bağıl biyoyararlanım değerleri formülasyon ve saf etlen maddenin AUC sonuçları ile Eşitlik 1.1 yardımıyla hesaplanabilmektedir. Bu yolla uygulanan farklı formülasyonların biyoyararlanımları karşılaştırılabilmektedir (Ergin ve ark., 2021).

$$\% \text{ Bağıl Biyoyararlanım} = [AUC_{(test)}/AUC_{(referans)}] \times 100 \qquad \text{Eşitlik 1.1.}$$

Telange ve ark., tarafından yapılan çalışmada apigenin-fosfolipid fitozom (APLC) apigeninin çözünürlüğünü, *in vivo* biyoyararlanımını ve antioksidan potansiyelini geliştirmek amacıyla hazırlanmıştır. *İn vivo* hayvan deneyleri yapılarak AUC, C_{max} ve t_{max} değerleri hesaplanmıştır. APLC'nin saf apigenin ile karşılaştırılmalı yapılan *in vivo* farmakokinetik analiz sonucunda apigeninin oral biyoyararlanımını önemli derecede artırdığı bulunmuştur (Telange ve ark., 2017).

Liu ve ark. tarafından yapılan çalışmada PVP ile modifiye edilmiş oleanolik asit lipozomları hazırlanmış ve oleanolik asit tabletleri ile *in vivo* farmakokinetik parametreleri açısından ratlar üzerinde karşılaştırılmıştır. Deneyler sonunda lipozom formülasyonunun tabletlere oranla C_{max} değerini 6,90 kat artırdığı görülmüştür. Relatif biyoyararlanım değerinin lipozom formülasyonlarında %607,9 olduğu bulunmuştur. Çalışmada ayrıca t_{max}, $t_{1/2}$ ve AUC değerleri de hesaplanarak karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir (Liu ve ark., 2017).

Bu çalışma kapsamında bitkisel bir etkin madde olan BER'in ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlanarak tedavide daha etkin olarak kullanımının sağlanması amaçlanmıştır. BER'i vücuda verildikten sonra degradasyondan korumak, biyolojik membranlardan geçişini artırmak gibi amaçlarla öncelikle BER fosfolipid komplekslerinin hazırlanması ve daha sonra hazırlanan formülasyonlar arasından seçilen optimum BER fosfolipid kompleksinin kitozan mikropartiküllere yüklenmesi hedeflenmiştir. BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının optimize edilmesi ve bir optimum formül seçilmesi hedeflenmiştir. *İn vivo* farmakokinetik parametreler açısından diğer formülasyonlarla karşılaştırmak amacıyla BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının geliştirilmesi ve optimize edilerek karakterizasyonlarının yapılması amaçlanmıştır.

Tüm BER fosfolipid kompleksi, BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül ve BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları üzerinde enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel tayinlerinin yapılması amaçlanmıştır. Bu analizlerden elde edilen sonuçlara göre seçilen optimum formülasyonlar üzerinde *in vitro* karakterizasyon çalışmaları (TEM görüntüleme, DSC analizi, FTIR), *in vitro* çözünme hızı tayini, çözünürlük tayini, partisyon katsayısı tayini ve stabilite çalışmaları yapılması hedeflenmiştir. Optimum olarak seçilen formülasyonların *in vivo* hayvan deneyleriyle farmakokinetik parametreleri açısından karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi çalışmanın hedefleri arasındadır. BER'in ve çalışmada hazırlanan formülasyonların karaciğer dokularında antiosidan aktivite tayininin yapılarak karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi de bu çalışmanın amaçları arasındadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Cam malzemeler	İldam (Türkiye)
Çalkalayıcı inkübatör	Jeio Tech SI-300 (Kore)
Dairesel çalkalayıcı	Thermo Scientific SHKA4450-1CE (ABD)
Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)	Shimadzu (Japonya)
Diyaliz membran (12000 Da)	Sigma Aldrich (Almanya)
Doku Homojenizatörü	Heidolph Diax 900 (Almanya)
Etüv	Heraeus B5050
Hassas terazi	Sartorius BL210S (Almanya)
Homojenizatör	IKA T25 Basic (Almanya)
HPLC	Agilent 1260 Infinity II (ABD)
Kesintisiz güç kaynağı 3KVA	Makelsan Powerpack SE
Liyofilizatör	Christ Gamma 2-16 LSCPlus (Almanya)
Manyetik karıştırıcı	Daihan Scientific Wisestir SMHS-6 (Kore)
Membran filtre; 0.45 μm (Selüloz Asetat)	Sartorius (Almanya)
Membran filtre; 3.0 μm (Selüloz Asetat)	Sartorius (Almanya)
Mikropipet	Eppendorf (Almanya)
Optik mikroskop	Leica (Almanya)
pH Metre (İsviçre)	Mettler Toledo Seven Compact S210
Plastik enjektör	Set inject (Türkiye)
Rotary evaporatör	Buchi RII (İsviçre)
Santrifüj	Sigma 3-30 KS (Almanya)
SEM	ZEIS Evo-40 (ABD)
Spektrofotometre	Thermo Scientific Evolution 201 (ABD)
Stir-Pak karıştırıcı	Cole-Parmer (ABD)

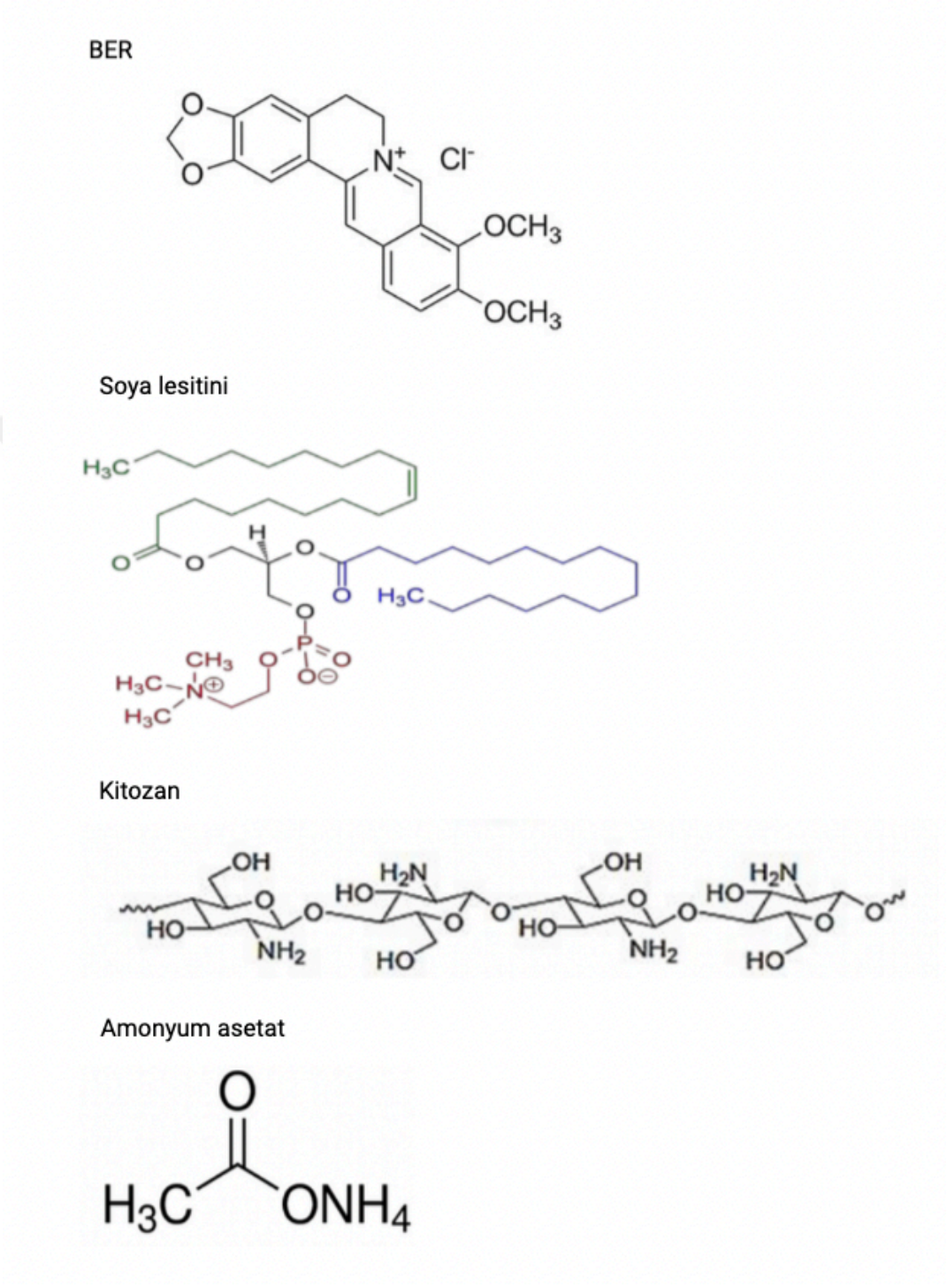
Su sistemi	Milipor Mili-Q Plus System (Fransa)
TEM	FEI Tecnai G2 Spirit Bio (Hollanda)
Ultrasonik banyo	Bransonic 321
Ultrasonik prob	Bandelin Sonoplus HD 2070 (Almanya)
UltraTurrax	IKA T18 (Almanya)
Zeta potansiyel ve partikül büyüklüğü ölçüm cihazı	Nano ZS, Malvern (İngiltere)

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amonyum asetat	Merck (Almanya)
Asetik asit	Sigma Aldrich (Almanya)
Asetonitril	Sigma Aldrich (Almanya)
Berberin klorür	Sigma Life Science (Hindistan)
Bütil hidroksi toluen	Sigma Aldrich (ABD)
Diklorometan	Sigma Aldrich (İngiltere)
Disodyum hidrojen fosfat	Merck (Almanya)
Ditiobisnitrobenzoat	Sigma Aldrich (ABD)
Etanol	Merck (Almanya)
Gliserol	Sigma Aldrich (ABD)
Kitozan (Düşük molekül ağırlıklı)	Sigma Aldrich (Almanya)
Kitozan (Orta molekül ağırlıklı)	Sigma Aldrich (Almanya)
Kitozan (Yüksek molekül ağırlıklı)	Fluka (Japonya)
Kloroform	Sigma Aldrich (Almanya)
L-a-Fosfatidilkolin	Sigma Aldrich (Almanya)
Metanol	Sigma Aldrich (Almanya)
Oktanol	Merck (Almanya)
Pankreatin	Sigma (İngiltere)
Pepsin	Sigma (İngiltere)
Potasyum dihidrojen fosfat	Deajung (Japonya)
Potasyum klorür	Merck (Almanya)
Sodyum bikarbonat	Merck (Almanya)

Sodyum hidroksit	MolyChem (Hindistan)
Sodyum klorür	Merck (Almanya)
Sodyum tripolifosfat	Sigma Aldrich (Almanya)
Tiyobarbitürik asit	Sigma Aldrich (ABD)
Trikloroasetik asit	Merck (Almanya)
Trisodyum sitrat 5-5 hidrat	Merck (Almanya)

Çalışmada kullanılan maddelerin kimyasal formülleri Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan maddelerin kimyasal formülleri.

2.3. Çalışmalarda Kullanılan Ortamların Bileşimi ve Hazırlanması

1N NaOH Çözeltisi

NaOH……..…44 g

Distile su…….y.m……..1000 ml

Hazırlanış: 44 g NaOH bir miktar distile suda çözülür. Çözelti hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

1N HCl Çözeltisi

Derişik HCl Çözeltisi…….85 ml

Distile su…….y.m…….1000 ml

Hazırlanış: 85 ml derişik HCl çözeltisi alınarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

pH 1,2 HCl Tamponu

NaCl……...2 g

Derişik HCl çözeltisi……..7 ml

Distile su…….y.m…….1000 ml

Hazırlanış: 2 g NaCl distile suda çözülür, 7 ml derişik HCl çözeltisinden ilave edilir. Çözelti pH'sı 1,2'ye ayarlanır ve distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

pH 6,8 Fosfat Tamponu

KH_2PO_4……..…6,8 g

NaOH……..…...…0,64 g

Distile su…….y.m……...…..1000 ml

Hazırlanış: 6,8 g KH_2PO_4 ve 0,64 g NaOH bir miktar distile suda çözülür, pH'sı 6,8'e ayarlanır ve çözelti distile suyla 1000 ml'ye tamamlanır.

Suni Mide Ortamı – pH 1,2 (SGF)

NaCl……..……2 g
Pepsin……..…….3,2 g
Derişik HCl çözeltisi……..……..7 ml
Distile su……y.m…….…….….1000 ml

Hazırlanış: 2 g NaCl distile suda çözülür. Çözeltiye 3,2 g pepsin ve 7 ml derişik HCl çözeltisi ilave edilir. Çözeltinin pH'sı 1,2'ye ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Suni Bağırsak Ortamı – pH 6,8 (SIF)

KH_2PO_4……6,8 g
0,2N NaOH …….77 ml
Pankreatin…….10 g
Distile su…..……y.m……...1000 ml

Hazırlanış: 6,8 g KH_2PO_4 250 ml distile suda çözülür. 77 ml 0,2 N NaOH ve 500 ml distile su eklenir. Çözeltiye 10 g pankreatin eklenir ve karıştırılır. pH 0,1 N NaOH veya 0,1 N HCl ile 6,8'e ayarlanır. Çözelti distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

HPLC Analizi için Mobil Faz Çözeltisi

$C_2H_7NO_2$…….….2,31 g
Ultra saf su……y.m……1000 ml

Hazırlanış: Mobil faz tampon çözeltisinin hazırlanması için 2,31 g $C_2H_7NO_2$ bir miktar ultra saf su içinde çözülür. Çözelti ultra saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır. HPLC'de kullanılmak amacıyla hazırlanan çözelti vakum yardımıyla 0,45 μm por açıklığa sahip filtreden süzülür.

%1 Bütil hidroksi toluen Çözeltisi

Bütil hidroksi toluen ……..……1 g
Distile su……...…….5 ml
Etanol ……...y.m……..….100 ml

Hazırlanış: 1 g bütil hidroksi toluen 5 ml distile suda çözülür. Çözelti etanol ile 100 ml'ye tamamlanır (Casini ve ark., 1986).

Ditiobisnitrobenzoat Çözeltisi

Ditiobisnitrobenzoat ……..……..0,040 g
Trisodyum sitrat 5-5 hidrat (%1)……y.m……...100 ml

Hazırlanış: 0,040 g ditiobisnitrobenzoat 100 ml trisodyum sitrat 5-5 hidratta çözülür ve çözelti 100 ml'ye tamamlanır (Aykac ve ark., 1985).

2.4. BER'in Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

BER'in fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla DSC ile termal analizi yapılmış, FTIR spektrumu alınmış ve SEM ile görüntülenmiştir.

2.4.1. BER'in Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile Analizi

Etkin maddenin termal davranışının incelenmesi ve kristal formunun belirlenmesi amacıyla alüminyum pan içine yerleştirilen BER preslenerek cihaza yerleştirilmiştir. 25-400 ^{o}C aralığında, 10 ^{o}C/dakika hızda sıcaklık artırılarak termogramlar oluşturulmuştur.

2.4.2. BER'in Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Spektrumunun Alınması

BER'in FTIR spektroskopisi ile tanınmasında Perkin Elmer Spectrum 400 (ABD) cihazı kullanılmıştır. Etkin madde toz olarak cihazın elmas kristali olan özel bölmesine yerleştirilip basıldıktan sonra 4000-400 cm^{-1} dalga aralığında FTIR spektrumları alınmıştır.

2.4.3. BER'in SEM ile Görüntülenmesi

BER, morfolojik inceleme amacıyla SEM ile görüntülenmiştir. Numune plakalara yerleştirilerek altın kaplama yapılmıştır. Analizde ZEISS Evo-40 SEM (Almanya) cihazı kullanılmıştır.

2.5. BER'in Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi

2.5.1. BER'in Su Ortamındaki HPLC Analizi

Literatür incelemeleri sonucunda HPLC yöntemi ile araştırmamız için gerekli doğruluk, tekrarlanabilirlik ve kesinliğin elde edebileceğine karar verilmiştir (Yi ve Xu, 2004). BER'in su ile çözeltileri hazırlanmış ve mobil faz olarak 30 mM amonyum asetat:asetonitril (67:33) kullanılarak UV dedektör ile 200-400 nm arasında spektrumu alınarak maksimum absorbansın gözlendiği dalga boyu tayin edilmiştir.

2.5.2. BER'in HPLC ile Su Ortamındaki Standart Doğrusunun Hazırlanması

BER'in suda 100 µg/ml stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden hareketle seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda (1-20 µg/ml) çözeltiler

hazırlanmıştır. Bu numuneler BER'in maksimum absorbans verdiği dalga boyunda analiz edilmiştir. Bilinen konsantrasyonlara karşı (x), okunan alan değerleri (y) grafiğe geçirilerek BER'in standart doğrusu çizilmiştir (n=6). Doğru denklemi buradan hesaplanmıştır. BER'in alıkonma zamanı da belirlenmiştir.

2.5.3. BER'in pH 1,2 ve pH 6,8 Ortamlarındaki HPLC Analizi

İn vitro çözünme hızı ve simüle vücut sıvılarında stabilite deneylerinin sonuçlarının değerlendirilebilmesi amacıyla BER'in pH 1,2 ve pH 6,8 ortamlarında miktar tayini yöntemleri geliştirilmiştir. BER'in pH 1,2 ve pH 6,8 ortamlarında çözeltileri hazırlanmış ve 30 mM amonyum asetat:asetonitril (67:33) mobil fazı kullanılarak UV dedektör ile 200-400 nm arasında spektrumu alınarak maksimum absorbansın gözlendiği dalga boyu belirlenmiştir.

2.5.4. BER'in HPLC ile pH 1,2 ve pH 6,8 Ortamlarındaki Standart Doğrularının Hazırlanması

BER'in pH 1,2 ve pH 6,8 tamponları içinde 100 µg/ml konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlanmıştır. pH 6,8 tamponundaki stok çözeltiden seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda (1-20 µg/ml) çözeltiler hazırlanmıştır; ayrıca pH 1,2 tamponundaki stok çözeltiden seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda (1-50 µg/ml) çözeltiler hazırlanmıştır. Bu numuneler BER'in maksimum absorbans verdiği dalga boyunda analiz edilmiştir. Bilinen konsantrasyonlara karşı (x), okunan alan değerleri (y) grafiğe geçirilerek BER'in standart doğruları çizilmiştir (n=6). Doğru denklemleri buradan hesaplanmıştır. BER'in pH 1,2 ve pH 6,8 tampon ortamlarındaki alıkonma zamanları da belirlenmiştir.

2.6. BER'in Miktar Tayini Yöntemlerinin Analitik Validasyonları

Analitik yöntem validasyonu miktar tayini yöntemlerinin uygulama açısından güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini kanıtlamak amacıyla uygulanır. Miktar tayini yöntemlerinin analitik validasyon parametreleri olarak ICH Q2R1 kılavuzunun gereği olan doğrusallık ve aralığı, doğruluk ve geri elde, kesinlik (ara kesinlik ve tekrarlanabilirlik), özgünlük, teşhis ve tayin sınırları (LOD ve LOQ) incelenmiştir. Değerlendirmede kullanılan kriterler resmi kılavuzlar ve literatürlerden yararlanılarak belirlenmiştir (Ertaş ve Kayalı, 2005; FDA, 2014; International Center of Harmonization, 1995;).

2.6.1. Doğrusallık ve Aralığı

Doğrusallık yöntemin belirli bir aralıktaki etkin madde konsantrasyonu ile orantılı sonuçları verebilme yeteneğidir (Raposo ve Ibelli-Bianco2020). Doğrusallık verilen bir aralıktaki örnekte bulunan analitin bilinen konsantrasyonda ve enstrümental cevap arasındaki ilişkiyi belirtmek için lineer regresyon analizi kullanılarak belirlenir. Korelasyon katsayısı ve determinasyon katsayısı (r^2) doğrusallığı veren parametrelerdir. Doğrunun eğimi, analit konsantrasyonu ile test sonuçları arasındaki matematiksel ilişkiyi ifade eder. Analitik bir yöntemin aralığı ise kullanılan yönteme göre etkin maddenin yer aldığı alt ve üst limitler arasındaki oranın kesinlik, doğruluk ve doğrusallık açısından tayin edildiği aralıktır. Analitik işlemin doğrusallığı tayin edilirken uygun istatistiksel hesaplamalarla regresyon doğrusu elde edilir. Yapılan hesaplar sonucunda bulunan artık kareler toplamı ve ortalamanın artık kareler toplamı küçük, determinasyon katsayısı ise 1'e yakın olmalıdır (Güngör Ak ve Karataş, 2020; Povolo ve ark., 2022). BER'in farklı ortamlardaki miktar tayininde kullanılacak olan standart doğrularını belirlemek amacıyla Çizelge 2.1'de gösterilen şekilde stok çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltiler hazırlanan ortamlarla seyreltilerek çizelgede verilen aralıklarda seri çözeltileri hazırlanmıştır. Bilinen konsantrasyonlara karşı (x), elde edilen alanlar (y) grafiğe geçirilerek standart doğruları çizilmiştir.

2.6.2. Doğruluk ve Geri Elde

Doğruluk, kabul edilen değer ile doğru denkleminden elde edilen değerin yakınlığının ölçüsüdür. Doğruluk aynı zamanda analitik yöntemin hatasızlığının bir ölçüsüdür. Analitik işlemin doğruluğu en az üç farklı konsantrasyon noktasında en az üçer kez hazırlanan numunedeki miktarların belirlenen konsantrasyonlardaki % geri elde değerlerinin ortalaması, bu dağılımın standart sapması ve % bağıl standart sapması hesaplanarak tayin edilmektedir. BER'in düşük, orta ve yüksek olarak belirlenen 2 µg/ml, 10 µg/ml ve 16 µg/ml konsantrasyonlardaki 3 farklı çözeltisinin analizi yapılmış ve yüzde geri eldeleri, standart sapmaları ve % bağıl standart sapmaları hesaplanmıştır. Elde edilen % bağıl standart sapma değerinin %2'den küçük olması analitik yöntemin doğruluğunu göstermektedir.

2.6.3. Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği aynı homojen numunenin belirlenen şartlar altında çok sayıdaki analizlerinden elde edilen ölçüm sonuçlarının yakınlığı olarak ifade edilir. Tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar edilebilirlik olmak üzere üç farklı aşamada değerlendirilir (van Beers ve ark., 2021). Analitik yöntemin kesinliğinin ölçüsü olarak elde edilen % bağıl standart sapma değerleri kullanılır. BER'in miktar tayini yöntemlerinin kesinliğini belirlemek amacıyla analiz yöntemlerinin tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik değerleri incelenmiştir.

Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik; aynı işlem koşullarında, aynı kişi tarafından ve kısa zaman aralıklarında yapılan ölçümlerin kesinlik ölçüsüdür. Cihazda analizler yapıldıktan sonra standart doğrular kullanılarak her bir analiz için pik alanına karşılık gelen konsantrasyon hesaplanır. Bulunan konsantrasyonların ortalamaları, standart sapmaları ve bağıl standart sapmaları hesaplanır. Analitik yöntemin tekrarlanabilir olması için % bağıl standart sapma değerlerinin %2'den küçük olması gerekmektedir

(Shabir, 2003). BER'in miktar tayini yöntemlerinin tekrarlanabilirliğinin değerlendirilmesi amacıyla Çizelge 2.1'de belirtildiği gibi yapılan ölçümlerin sonucunda elde edilen pik alanları standart doğru denklemlerinde yerlerine konularak hesaplanan konsantrasyonların ortalama, standart sapma ve % bağıl standart sapma değerleri bulunmuştur.

Ara Kesinlik

Ara kesinlik laboratuvar içi deneysel farklılıkları belirlemek amacıyla yapılır. Farklı gün, farklı analist ve farklı ekipman gibi çeşitli faktörlerin incelenmesi amacıyla tayin edilir. Analiz sonucu elde edilen pik alanlarının karşılık geldiği konsantrasyon değerlerinden elde edilen ortalama, standart sapma, bağıl standart sapma sonuçları hesaplanır (Shabir, 2003). Çizelge 2.1'de verilen işlem koşullarından farklı günlerde hazırlanan çözeltiler ve ölçümler değerlendirilmiştir. Bu amaçla 2 µg/ml konsantrasyondaki çözeltinin farklı günlerde analizi yapılmıştır.

Çizelge 2.1. BER'in HPLC ile miktar tayini yönteminin farklı ortamlarda analitik validasyonları için uygulama koşulları.

		Analitik Validasyon Parametreleri			
		Doğrusallık ve aralığı n=3	**Doğruluk ve Geri Elde** 6'şar enjeksiyon	**Kesinlik**	
				Tekrarlanabilirlik 6'şar enjeksiyon	**Ara kesinlik** 12 enjeksiyon
Ortam	**Stok çözelti konsantrasyonu**	**Konsantrasyon aralığı**	**Konsantrasyon**	**Konsantrasyon**	**Konsantrasyon**
Su ortamı	100 µg/ml	1-20 µg/ml	2 µg/ml 10 µg/ml 16 µg/ml	2 µg/ml 10 µg/ml 16 µg/ml	2 µg/ml
pH 1,2 tamponu	100 µg/ml	1-50 µg/ml	8 µg/ml 20 µg/ml 50 µg/ml	8 µg/ml 20 µg/ml 50 µg/ml	20 µg/ml
pH 6,8 tamponu	100 µg/ml	1-20 µg/ml	2 µg/ml 10 µg/ml 16 µg/ml	2 µg/ml 10 µg/ml 16 µg/ml	2 µg/ml

2.6.4. Özgünlük (Seçicilik)

Analizi yapılacak olan etkin maddenin belirlenen analiz koşullarında kullanılacak diğer maddelerden ayırt edilebilme yeteneğinin ölçüsüdür. Farklı maddeler varlığında analiz edilen maddeyi tayin edebilme özelliği olarak da tanımlanır. Özgünlük tayini için formülasyonlarda kullanılan maddelerin su ortamında tek tek ve karışım halinde dispersiyonları 0,22 µm filtrelerden geçirilerek 346 nm'de HPLC'de analiz edilmiştir ve etkin madde ile girişim yapıp yapmadıkları incelenmiştir.

2.6.5. Teşhis (LOD) ve Tayin Sınırlarının (LOQ) Belirlenmesi

Teşhis Sınırı (LOD)

LOD bir numunedeki analitin tutarlı bir şekilde tespit edilebilen en düşük konsantrasyonudur. Birkaç şekilde bulunabilir. Deneylerde bulunan sonuçların kullanıldığı hesaplamalardan elde edilebildiği gibi doğrudan gözlemle de bulunabilir. Yapılan çalışmalarda 10 farklı konsantrasyondaki BER çözeltisi analiz edilerek (n=6) ve elde edilen pik alanlarından yola çıkılarak kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir. Bu kalibrasyon denklemlerine göre Eşitlik 2.1'den yararlanılarak teşhis sınırı hesaplanmıştır.

$$LOD = (SS/m) \times 3,3 \qquad \text{Eşitlik 2.1.}$$

SS: Kalibrasyon doğrularının kesişim değerlerinin standart sapması
m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Tayin Sınırı (LOQ)

LOQ analizi yapılan maddenin miktar tayini yöntemi vasıtasıyla belirlenen doğruluk, kesinlik ile tayin edilebilen en düşük konsantrasyon düzeyidir. Yapılan çalışmalardan elde edilen kalibrasyon denklemlerinden yola çıkılarak Eşitlik 2.2 yardımıyla hesaplanmıştır.

LOQ = (SS/m) x 10 Eşitlik 2.2.

SS: Kalibrasyon doğrularının kesişim değerlerinin standart sapması
m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

2.7. Formülasyon Çalışmaları

Çalışmamızda BER fosfolipid komplekslerinin hazırlanarak kitozan mikropartiküllere yüklenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla öncelikle BER fosfolipid kompleksleri hazırlanarak formülasyon optimize edilmiştir. Daha sonra optimize edilen BER fosfolipid komplekslerinin kitozan mikropartiküllere yüklenmesi amacıyla formülasyon çalışmaları yürütülmüştür. Ayrıca mikropartikül formülasyon tasarımını kolaylaştırmak ve diğer formülasyonlarla *in vitro/in vivo* özelliklerini karşılaştırmak amacıyla BER yüklü kitozan mikropartiküllerin formülasyon çalışmaları yürütülmüştür.

Önformülasyon çalışmalarında etkin madde, fosfolipid ve kitozanın özellikleri göz önünde bulundurularak kritik işlem parametreleri belirlenmiştir. Hazırlanan tüm formülasyonlar üzerinde enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı tayinleri ve zeta potansiyeli ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu sonuçlar üzerinden değerlendirme yapılarak optimum formüller seçilmiştir. Diğer karakterizasyon çalışmaları, *in vitro* çözünme hızı deneyleri ve *in vivo* hayvan deneyleri optimum formüller üzerinden yürütülmüştür.

2.7.1. BER Fosfolipid Komplekslerinin Hazırlanması ve Formülasyon Optimizasyonu

BER fosfolipid komplekslerinin hazırlanması için ters faz buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Formülasyonlarda fosfolipid kaynağı olarak soya lesitini kullanılmıştır. Bu yöntemde kritik olarak değerlendirilen formülasyon parametreleri etkin madde:fosfolipid oranı, reaksiyon süresi ve reaksiyon sıcaklığıdır (Güngör Ak ve ark., 2020). Bu parametreler çeşitlendirilerek farklı BER:fosfolipid kütlesel oranları, farklı

sıcaklık ve farklı reaksiyon süreleri kullanılarak formülasyonlar hazırlanmıştır. Formülasyonlarda 20 mg BER kullanılmıştır ve 1:1 oranında distile su ve etanol karışımında çözülmüştür. Formülasyonda kullanılan kütlesel orana (1:1, 1:2, 1:3 ve 1:5) göre hesaplanan fosfolipid diklorometanda çözülmüştür. BER çözeltisi fosfolipid çözeltisi üzerine yavaş yavaş ilave edilmiştir. Daha sonra bu karışım farklı sıcaklıklarda (40 °C, 60 °C ve 70 °C) ve farklı reaksiyon sürelerinde (1 saat ve 2 saat) kapalı sistem olarak manyetik karıştırıcıda 400 rpm hızda karıştırılarak kompleksler oluşturulmuştur. Reaksiyon süresi sonunda organik solvanlar rotavapor yardımıyla 60 °C sıcaklıkta 20 dakika boyunca uzaklaştırılmıştır (Şekil 2.2). BER fosfolipid komplekleri suda disperse edilerek elde edilmiştir. Partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı ve zeta potansiyeli tayinleri için bu dispersiyonlardan ayrılmıştır. Kompleksler 25 °C'de 10000 rpm hızda 1 saat boyunca santrifüjlenmiştir. Elde edilen kompleksler suyla yıkanarak bu işlem tekrar edilmiştir ve süpernatan elde edilmiştir. Miktarı kaydedilmiştir. Süpernatanlar enkapsülasyon etkinliği tayini için ayrılmıştır. Çöktürülen BER fosfolipid komplekleri suda disperse edilerek -20 °C'de dondurulmuştur ve 48 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Stabilite çalışmaları, karakterizasyon çalışmaları ve *in vivo* hayvan deneyleri bu toz formülasyonlar üzerinden yapılmıştır. Hazırlanan BER fosfolipid kompleks formülasyon işlem koşulları Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

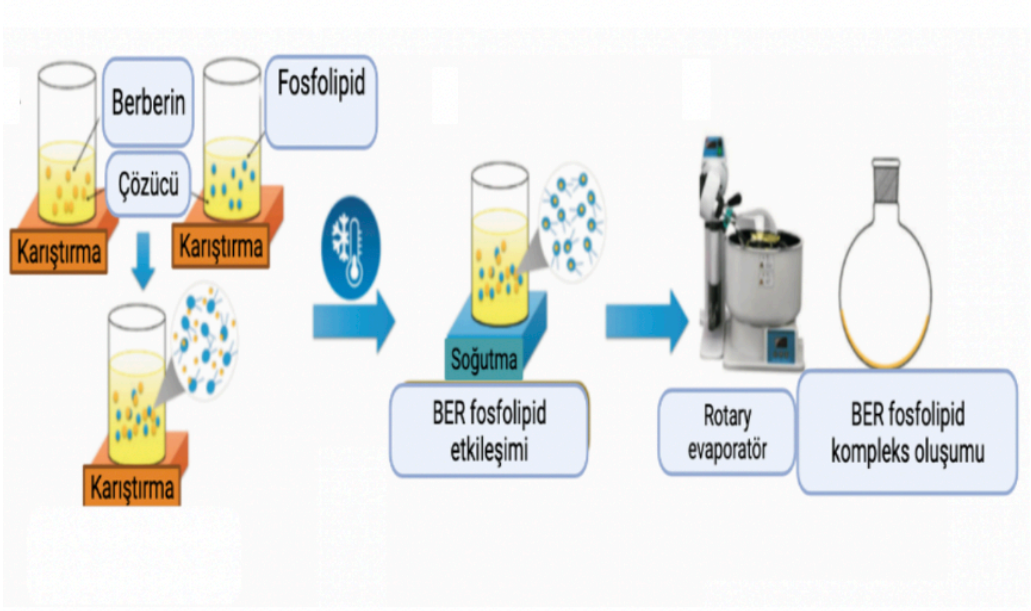


Şekil 2.2. Rotavapor yardımıyla organik solvanların uzaklaştırılması.

Çizelge 2.2. BER fosfolipid kompleks formülasyonlarının hazırlanma koşulları.

Formül kodu	Reaksiyon sıcaklığı (°C)	Reaksiyon süresi (saat)	Karışım oranı (BER:Fosfolipid)
BER-F1	40	1	1:1
BER-F2	60	1	1:1
BER-F3	60	1	1:2
BER-F4	60	1	1:3
BER-F5	60	1	1:5
BER-F6	60	2	1:3
BER-F7	60	2	1:5
BER-F8	70	1	1:1
BER-F9	70	1	1:2
BER-F10	70	1	1:5

BER fosfolipid kompleks formülasyonlarının hazırlanışı Şekil 2.3'te şematize edilmiştir.



Şekil 2.3. BER fosfolipid kompleks formülasyonlarının hazırlanışının şematik gösterimi.

Formülasyon Optimizasyonu

Optimum BER fosfolipid kompleksi formülasyonunun seçilmesi aşamasında hazırlanan formülasyonların enkapsülasyon etkinliği, zeta potansiyelleri, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı değerleri analiz edilmiştir. Hazırlanan bu formülasyonlar arasından en yüksek enkapsülasyon etkinliğine ve düşük partikül

büyüklüğü ve partikül büyüklük dağılımına sahip olan BER-F3 formülasyonu optimum BER fosfolipid kompleksi formülü olarak seçilmiştir.

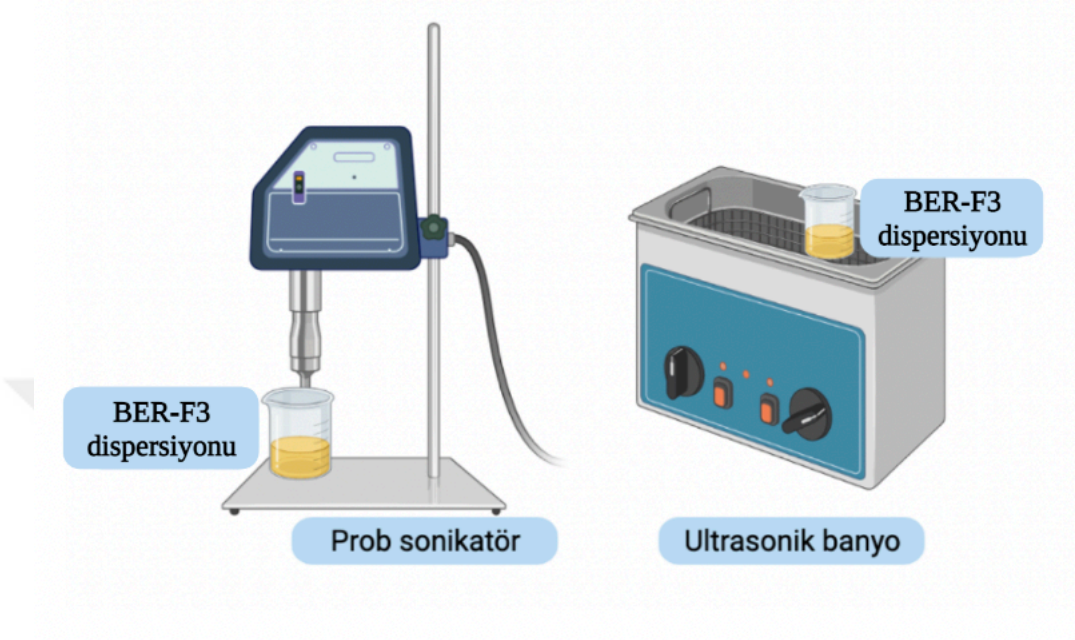
BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyon çalışmalarına geçmeden önce; çalışmalarda hazırlanarak optimum formül olarak seçilen BER-F3 formülasyonu üzerinden optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Optimum formülasyon olarak seçilen BER-F3 formülasyonu iyi bir yükleme etkinliğine sahip olmasına rağmen, bu aşamada kitozan ile kaplanacağından iyi bir çekirdek materyal olması için partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı değerleri üzerinde iyileştirme çalışması amaçlanmıştır. BER-F3 formülasyonları yeniden hazırlanarak partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı değerlerini küçültmek amacıyla prob sonikatörde ve ultrasonik banyoda belli süreler bekletilmiştir (Şekil 2.4). Hazırlanan bu farklı BER fosfolipid kompleksi formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliği, zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı değerleri ölçülerek değerlendirilmiştir. Hazırlanan formülasyonlara uygulanan işlem ve uygulama süresi değerleri Çizelge 2.3'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. Optimizasyon çalışmasında hazırlanan BER fosfolipid kompleksi formülasyon parametreleri.

Formül kodu	Uygulanan işlem	Uygulama süresi (dakika)
BER-F3I	Prob sonikatör	2
BER-F3II	Prob sonikatör	4
BER-F3III	Ultrasonik banyo	5
BER-F3IV	Ultrasonik banyo	10

Optimum formül olarak seçilen BER-F3 formülü prob sonikatörle ve ultrasonik banyoda sonike edildiğinde özellikle enkapsülasyon etkinliğinin ciddi oranda düştüğü görülmüştür. Yapılan işlemlerin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımını da beklenen oranda azaltmadığı görülmüştür. Bu nedenle formülasyonun hazırlanmasında bu yöntemlerin kullanılmamasına karar verilmiştir. Formülasyonların hazırlanması esnasında sıcaklık gibi ortam koşullarının formülasyon oluşumu üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Ortam sıcaklığı 18-20 °C arasında olduğunda

formülasyonun karakteristik özelliklerinin daha iyi olması nedeniyle ortam sıcaklığı bu değerlerde sabit tutularak çalışılmıştır.



Şekil 2.4. BER-F3 formülasyonu optimizasyonunda kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi.

2.7.2. BER Yüklü Kitozan Mikropartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Formülasyon Optimizasyonu

BER yüklü kitozan mikropartiküllerin hazırlanması amacıyla iyonotropik jelasyon yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle formülasyon üzerine etkili parametreleri incelemek için etkin madde içermeyen mikropartiküller hazırlanmıştır. Hazırlanan etkin maddesiz mikropartiküllerin zeta potansiyel değerleri ölçülerek değerlendirilmiştir. Mikropartiküllerin hazırlanmasında değerlendirilen formülasyon parametreleri kitozan çözeltisi konsantrasyonu, TPP çözeltisi konsantrasyonu, TPP çözeltisi pH değeri, kitozan çözeltisi pH değeri ve kitozan çözeltisi sıcaklık değeridir. Etkin madde içermeyen formülasyonların hazırlanmasında düşük molekül ağırlıklı (LMW) kitozan kullanılmıştır. Değerlendirilen bu formülasyon parametreleri ile hazırlanan mikropartikül formülasyonları (N-KM1- N-KM8) Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda LMW kitozan çözeltisi %2 (h/h) asetik asit çözeltisi içinde bir gece boyunca çözülerek hazırlanmıştır. TPP çözeltisi distile su içinde hazırlanmıştır. Kitozan çözeltisi manyetik karıştırıcı üzerinde 800 rpm hızda karıştırılırken, TPP çözeltisi kitozan çözeltisi üzerine insülin enjektörü yardımıyla 30 damla/dakika hızda damlatılarak etkin madde içermeyen mikropartiküller hazırlanmıştır. Mikropartiküllerin oluşması için 30 dakika boyunca çözelti aynı hızda karıştırılmıştır. Mikropartiküller 25 °C'de 10000 rpm hızda 30 dakika boyunca santrifüjlenerek elde edilmiştir.

Çizelge 2.4. Etkin madde içermeyen mikropartikül formülasyonları ve karakteristik özellikleri.

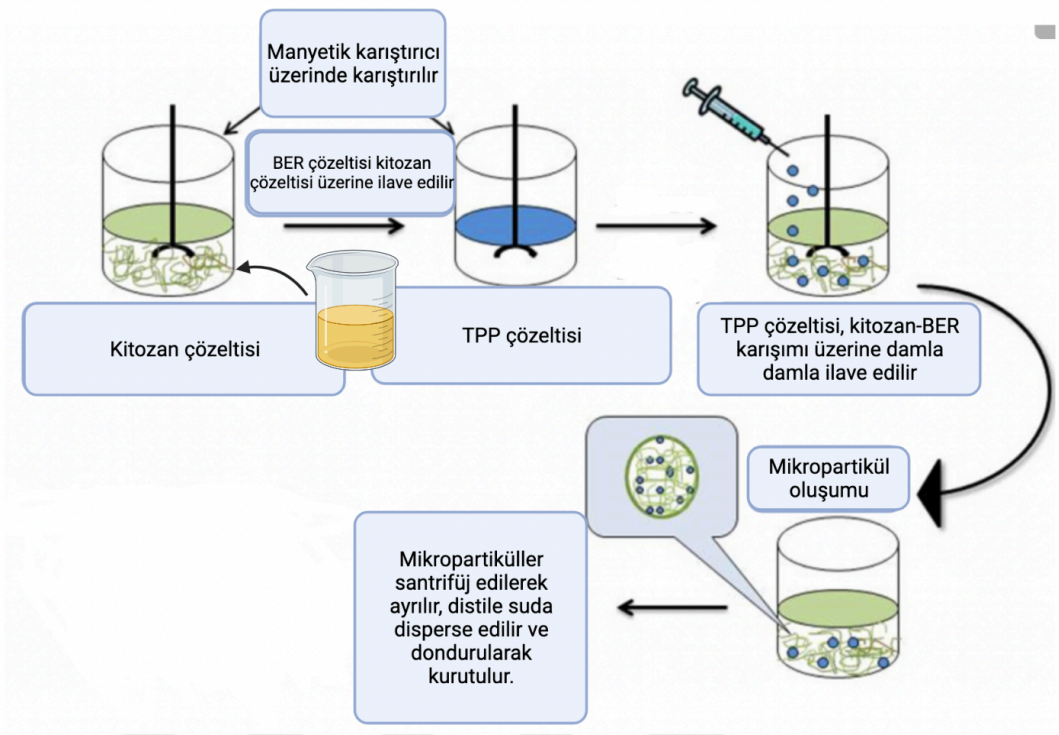
Formül kodu	% Kitozan çözeltisi Konsantrasyonu (a/h)	% TPP çözeltisi Konsantrasyonu (a/h)	TPP çözeltisi pH	Kitozan çözeltisi pH	Kitozan çözeltisi sıcaklığı (°C)	Kitozan:TPP oranı
N-KM1	0,2	0,5	6	4,7	25	1,2:1
N-KM2	0,2	1	6	4,7	25	0,6:1
N-KM3	0,2	1	6	4,7	60	0,6:1
N-KM4	0,2	1	6	4	25	0,6:1
N-KM5	0,2	2	6	4,7	25	0,3:1
N-KM6	0,75	1	8,93	4	25	1,5:1
N-KM7	0,75	1	8,93	4	40	1,5:1
N-KM8	0,75	1	8,93	4	50	1,5:1

BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının hazırlanmasında bir sonraki aşamada; hazırlanan mikropartikülleri optik mikroskopta görüntülemek ve düzgün şekilli partiküller elde etmek amacıyla farklı parametreler değerlendirilerek farklı formülasyonlar hazırlanmıştır. Bu aşamada kitozan çözeltisi konsantrasyonu, TPP çözeltisi konsantrasyonu, kitozan:BER oranı, kitozan:TPP oranı, karıştırma hızı, TPP çözeltisi pH değeri, sonikasyon ve kitozan molekül ağırlığının formülasyon üzerine etkileri optik mikroskopta incelenerek değerlendirilmiştir. Bu amaçla hazırlanan farklı mikropartikül formülasyonları (MBER-KM1 – MBER-KM14) Çizelge 2.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. Mikroskopta görüntüleme amacıyla hazırlanan BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları.

Formül kodu	% Kitozan çözeltisi konsantrasyonu (a/h)	Kitozan molekül ağırlığı	% TPP çözeltisi konsantrasyonu (a/h)	Kitozan:BER oranı	Kitozan:TPP oranı	Karıştırma Hızı (rpm)	TPP çözeltisi pH değeri	Sonikasyon
MBER-KM1	0,2	LMW	0,2	1:2	4:1	800	4,7	-
MBER-KM2	0,2	LMW	0,2	1:1	4:1	800	4,7	-
MBER-KM3	0,2	LMW	0,2	1:2	2:1	800	4,7	-
MBER-KM4	0,75	LMW	0,75	5:1	1:1	800	9,73	-
MBER-KM5	0,75	LMW	0,75	5:1	1:1	800	9,73	2 dakika prob sonikasyon
MBER-KM6	0,75	LMW	0,75	5:1	1:1	800	12,00	-
MBER-KM7	0,75	LMW	0,75	5:1	1:1	1200	9,73	-
MBER-KM8	0,75	LMW	0,75	5:1	1:1	600	12,00	-
MBER-KM9	0,75	MMW	0,75	5:1	1:1	800	12,00	-
MBER-KM10	0,75	MMW	0,25	5:1	3:1	800	12,00	-
MBER-KM11	0,75	MMW	0,25	5:1	3:1	1000	12,00	-
MBER-KM12	0,75	HMW	0,25	5:1	3:1	1000	12,00	-
MBER-KM13	0,75	LMW	0,75	5:1	1:1	1500	12,00	-
MBER-KM14	0,75	HMW	0,75	5:1	1:1	1000	12,00	-

Hazırlanan bu formülasyonların optik mikroskop görüntülerinin alınmasından sonra BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları geliştirmek amacıyla çalışmalara devam edilmiştir. BER'i çözmek amacıyla öncelikle metanol kullanılmış; daha sonra farklı formülasyonlarda distile su, distile su ve etanol karışımı kullanılmıştır. Formülasyonlar hazırlanırken kitozan çözeltisi konsantrasyonu, BER'in çözücüsü, kitozan:BER oranı, TPP çözeltisi konsantrasyonu, kitozan çözeltisi pH değeri ve kitozan çözeltisi sıcaklığı formülasyon parametreleri olarak değerlendirilmiştir. Hazırlanan formülasyonlarda kullanılan parametreler Çizelge 2.6'da gösterilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda BER çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözelti üzerine kitozan çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. Hazırlanan TPP çözeltileri, etkin madde polimer karışımı üzerine 30 damla/dakika hızla insülin enjektörü yardımıyla damlatılmıştır. Hazırlanan karışım 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde 800 rpm hızda karıştırılmıştır. Mikropartiküller 25 °C'de 10000 rpm hızda 30 dakika boyunca santrifüjlenerek elde edilmiştir. Mikropartiküller her seferinde distile su ile yıkanarak tekrar santrifüj edilmiştir ve toplanan süpernatanlar birleştirilmiştir. Elde edilen mikropartiküller 2 ml distile suda disperse edilerek -20 °C'de dondurulmuş ve liyofilize edilmiştir. Formüllerin partikül büyüklüğü ve partikül büyüklük dağılımı ve zeta potansiyeli dondurulmadan önce dispersiyon halindeyken ölçülmüştür. Toplanan süpernatanlardan indirekt yöntemle HPLC'de enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır. BER yüklü kitozan mikropartiküllerin hazırlanışının şematik gösterimi Şekil 2.5'te verilmiştir.



Şekil 2.5. BER yüklü kitozan mikropartiküllerin hazırlanışının şematik gösterimi.

Çizelge 2.6. BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının hazırlanması için kullanılan parametreler.

Formül kodu	% Kitozan çözeltisi konsantrasyonu (a/h)	BER'i çözmek için kullanılan çözücü	Kitozan:BER oranı	% TPP çözeltisi konsantrasyonu (a/h)	Kitozan çözeltisi pH değeri	Kitozan çözeltisi sıcaklığı (°C)
BER-KM1	0,2	Metanol	3:10	0,1	3,30	25
BER-KM2	0,2	Metanol	3:10	0,5	3,30	25
BER-KM3	0,2	Metanol	3:10	1	3,30	25
BER-KM4	0,2	Metanol	3:10	2	3,30	25
BER-KM5	0,2	Distile su	2:1	0,5	3,30	25
BER-KM6	0,2	Distile su	2:1	1	3,30	25
BER-KM7	0,2	Distile su	2:1	2	3,30	25
BER-KM8	0,75	Distile su	5:1	0,5	3.50	25
BER-KM9	0,75	Distile su	5:1	1	3.50	25
BER-KM10	0,75	Distile su ve etanol (1:1)	5:1	0,5	3.50	25
BER-KM11	0,75	Distile su ve etanol (1:1)	5:1	1	3.50	25
BER-KM12	0,75	Distile su ve etanol (1:1)	5:1	2	3.50	25
BER-KM13	1,5	Distile su ve etanol (1:1)	10:1	0,5	3,79	25
BER-KM14	1,5	Distile su ve etanol (1:1)	10:1	1	3,79	25
BER-KM15	1,5	Distile su ve etanol (1:1)	10:1	2	3,79	25
BER-KM16	1,5	Distile su ve etanol (1:1)	10:1	1	4	25
BER-KM17	1,5	Distile su ve etanol (1:1)	10:1	1	5	25
BER-KM18	1,5	Distile su ve etanol (1:1)	10:1	1	6,5	25
BER-KM19	0,75	Metanol	5:1	1	4	25
BER-KM20	1,5	Metanol	10:1	1	4	25
BER-KM21	0,2	Metanol	2:1	1	4	25
BER-KM22	0,2	Metanol	2:1	1	4	50
BER-KM23	0,2	Metanol	2:1	1	4,7	25
BER-KM24	0,75	Metanol	10:1	1	4	50

Formülasyon Optimizasyonu

Hazırlanan BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları optik mikroskop görüntüleri, enkapsülasyon etkinliği, zeta potansiyel, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı açısından değerlendirildikten sonra elde edilen veriler ışığında optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. BER'in metanolde çözülmesinin daha uygun olduğuna karar verilmiştir. Kitozan mikropartiküllerin oluşumunda kitozan çözeltisinin pH'ı iyonik jelleşme için çok önemlidir. Kitozan pKa değeri 6,5 civarındadır ve zayıf bir elektrolittir (Shu ve Zhu, 2002). Kitozanın protonasyon derecesi esas olarak çözelti pH'ı ile kontrol edilir. Yapılan çalışmalarda kitozan çözeltisinin pH'ının 4,7'den 8'e kadar yükseldiğinde protonasyon derecesinin %100'den %0 a kadar düştüğü gösterilmiştir. Kitozan çözeltisinin pH'ı kritik pH değerinin üstünde olduğunda kitozan daha az proton kazanma eğiliminde olacaktır. Bunun sonucunda da TPP iyonları ile çapraz bağlanma kapasitesi azalacak ve bu da mikropartikül oluşumunu olumsuz etkileyecektir (Fan ve ark., 2012). Çünkü kitozanın pozitif iyonları ve TPP'nin negatif iyonları arasında etkileşim olmaktadır (Naskar ve ark., 2019). Bu nedenle optimizasyon çalışmasında hazırlanan formülasyonlarda kitozan çözeltisi pH'sı 4,7'ye ayarlanmıştır. TPP çözeltisinin pH'sının da 6'ya ayarlanması ile daha aktif bir çapraz bağlanma sağlandığı anlaşılmıştır. Hazırlanan formülasyonlar üzerinde homojenizasyonun etkisini görmek amacıyla bazı formüller homojenize edilmiştir. Homojenizasyonun mikropartiküllerin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı, zeta potansiyelleri ve enkapsülasyon etkinliği üzerinde etkili olup olmadığı değerlendirilmiştir. Bu aşamada hazırlanan BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları Çizelge 2.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.7. Optimum BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının elde edilmesi için hazırlanan formüller.

Formül kodu	% Kitozan çözeltisi Konsantrasyonu (a/h)	Kitozan:BER oranı	% TPP çözeltisi Konsantrasyonu (a/h)	TPP çözeltisi pH değeri	Kitozan çözeltisi pH değeri	Kitozan çözeltisi sıcaklığı (°C)	Homojenizasyon işlem hızı ve süresi (rmp/dakika)
BER-KM25	0,2	2:1	1	6	4,7	25	-
BER-KM26	1,5	10:1	1	6	4,7	25	-
BER-KM27	0,2	2:1	1	6	4,7	25	10000/5
BER-KM28	0,2	2:1	1	6	4,7	50	-
BER-KM29	0,2	2:1	0,5	6	4,7	25	-
BER-KM30	0,2	2:1	0,5	6	4,7	25	10000/5
BER-KM31	1,5	10:1	0,5	6	4,7	25	-
BER-KM32	1,5	10:1	0,5	6	4,7	25	10000/10
BER-KM33	0,75	5:1	0,5	6	4,7	25	-

2.7.3. BER Fosfolipid Kompleksi Yüklü Kitozan Mikropartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Formülasyon Optimizasyonu

BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartiküller iyonotropik jelasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan BER fosfolipid kompleksleri arasından seçilen optimum formülün kitozan mikropartiküllere yüklenmesi amaçlanmıştır. Enkapsülasyon etkinliği, zeta potansiyel, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı sonuçlarına göre optimum seçilen BER fosfolipid kompleksi formülasyonu hazırlanmış ve distile su ile disperse edilmiştir. BER fosfolipid kompleksi dispersiyonu üzerine farklı konsantrasyonlarda kitozan çözeltisi eklenerek 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde 800 rpm hızda karıştırılmıştır. Karıştırma hızı 300 rpm'e düşürülerek farklı konsantrasyonlarda TPP çözeltisi 30 damla/dakika hızda bu karışım üzerine ilave edilmiştir. Mikropartiküllerin oluşması amacıyla karışım 1 saat boyunca 300 rpm hızda manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. Hazırlanan mikropartiküller 25 °C'de 10000 rpm hızda 30 dakika boyunca santrifüjlenerek elde edilmiştir. Her seferinde 2 ml distile su ile yıkanarak mikropartiküller 3 kez daha santrifüjlenmiş ve süpernatanlar toplanarak birleştirilmiştir. Formülasyonlar içine yüklenen BER fosfolipid kompleksi miktarı toplanan bu süpernatanlardan HPLC'de indirekt yöntem ile hesaplanmıştır. BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları 3 ml distile suda disperse edilmiştir. Bu dispersiyonlardan mikropartiküllerin zeta potansiyelleri, partikül büyüklükleri ve büyüklük dağılımları bulunmuştur. Daha sonra mikropartiküller -20 °C'de dondurulmuş ve liyofilizatörde kurutulmuştur. Diğer *in vitro* karakterizasyon çalışmaları, stabilite çalışmaları ve *in vivo* hayvan deneyleri kuru toz halinde olan formülasyonlar üzerinden yapılmıştır. Hazırlanan BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları Çizelge 2.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.8. BER fosfolipid komplesi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları.

Formül kodu	% Kitozan çözeltisi konsantrasyonu (a/h)	BER:kitozan oranı	% TPP çözeltisi konsantrasyonu (a/h)	Kitozan çözeltisi pH değeri	Sonikasyon süresi (dakika)	Ultrasonik banyo süresi (dakika)
BER-FM1	1,5	1:15	0,5	3,79	-	-
BER-FM2	1,5	1:15	0,5	4,7	-	-
BER-FM3	1,5	1:15	1	4,7	-	-
BER-FM4	1,5	1:15	1	4,7	2	-
BER-FM5	1,5	1:15	1	4,7	-	2
BER-FM6	1,5	1:15	1	4,7	-	5
BER-FM7	1,5	1:15	1	4,7	-	8
BER-FM8	1,5	1:15	2	4,7	-	-
BER-FM9	1,5	1:15	1,5	4,7	-	-
BER-FM10	2	1:20	1	4,7	-	-

2.8. Hazırlanan Formülasyonların *İn Vitro* Karakterizasyonu

Hazırlanan tüm BER fosfolipid kompleksi, BER yüklü kitozan mikropartikül ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliği, zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı analizleri yapılmıştır.

2.8.1. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini

BER fosfolipid komplekslerine ve mikropartikül formülasyonlarına yüklenen BER miktarları formülasyonların hazırlanması esnasında elde edilen süpernatanlar kullanılarak indirekt yöntemle tayin edilmiştir. Süpernatanlar 0,45 μm membran filtrelerden süzülerek, ultra saf su ile seyreltilmiş ve HPLC'de önceden BER miktarını tayin etmek için geliştirilen miktar tayini yöntemi ile BER miktarları tayin edilmiştir (n=3). Formülasyonlara yüklenen maddenin enkapsülasyon etkinliği Eşitlik 2.3 yardımıyla hesaplanmıştır.

% Enkapsülasyon etkinliği = [(Toplam BER miktarı – Serbest BER miktarı) / Toplam BER miktarı] x100

Eşitlik 2.3.

Ayrıca optimum formülasyonlar için formülasyonlara yüklenen etkin madde içeriği hesaplanmıştır. BER fosfolipid kompleksi ve mikropartikül formülasyonlarının etkin madde içeriğinin hesaplanması için Eşitlik 2.4'ten yararlanılmıştır.

% Etkin madde içeriği = (Formülasyon içine yüklenen etkin madde miktarı (mg) / Formülasyon kütlesi (mg)) x 100

Eşitlik 2.4.

2.8.2. Formülasyon Üretim İşlemi Verim Tayini

Optimum formülasyonların üretim işlem verimi Eşitlik 2.5 kullanılarak hesaplanmıştır.

% İşlem verimi = (Elde edilen formülasyon miktarı (mg) / Formülasyonda kullanılan toplam katı madde miktarı (mg)) x 100

Eşitlik 2.5.

2.8.3. Partikül Büyüklüğü ve Partikül Büyüklüğü Dağılımı Tayini

Hazırlanan BER fosfolipid kompleksi ve mikropartikül formülasyonlarının partikül büyüklükleri ve polidispersite indeksleri Malvern ZetaSizer (Malvern Instruments, İngiltere) cihazı kullanılarak tayin edilmiştir. Ölçümler formüller hazırlandıktan sonra bekletilmeden, ultrasaf su ile disperse edilerek oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir (n=3).

2.8.4. Zeta Potansiyeli Ölçümü

BER fosfolipid kompleksleri ve mikropartikül formülasyonlarının yüzey yüklerinin tayin edilmesi amacıyla zeta potansiyel ölçümü yapılmıştır. Bu amaçla Malvern ZetaSizer (Malvern Instruments, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Formülasyonlar hazırlandıktan sonra bekletilmeden ölçümleri yapılmıştır. Hazırlanan formülasyonlar ultra saf su ile seyreltilerek oda sıcaklığında zeta potansiyelleri ölçülmüştür (n=3).

2.9. Optimum Formülasyonların Seçilmesi

Hazırlanan tüm BER fosfolipid kompleksi, BER yüklü kitozan mikropartikül ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel

değerleri ölçülerek analiz edilmiştir. Formülasyonlar arasından en yüksek enkapsülasyon etkinliği ve en düşük partikül büyüklüğüne sahip olanlar optimum olarak seçilmiştir. BER fosfolipid kompleksleri için **BER-F3**, BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları için **BER-KM31** ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları için **BER-FM3** kodlu formüller optimum formül olarak seçilmiştir.

Optimum seçilen formülasyonlar üçer seri üretilerek formülasyonların tekrarlanabilirlikleri değerlendirilmiştir. Bu kapsamda hazırlanan formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımları ve zeta potansiyelleri ölçülmüştür. Formülasyonların aynı koşullarda tekrarlanabilir oldukları görülmüştür.

2.10. Optimum Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonlar arasından seçilen optimum formüllerin çözünürlüğü ve partisyon katsayıları analiz edilmiştir. Bu formülasyonların morfolojik olarak görüntülenmesi amacıyla TEM kullanılmıştır. Optimum seçilen formülasyonlar için DSC ve FTIR analizleri yapılmıştır. Ayrıca formülasyonların *in vitro* çözünme hızları pH 6,8 tampon ortamında değerlendirilmiştir.

2.10.1. Çözünürlük Tayini

Bir etkin maddenin çözünürlüğü %1 den düşükse pH 1-8 aralığında sıklıkla absorbsiyon ve biyoyararlanım problemlerine rastlanabilir. BER büyük oranda ince bağırsakta absorbe olmaktadır. Dolayısıyla çözünürlük çalışmaları pH 6.8 fosfat tamponunda ve suda gerçekleştirilmiştir. Ortam sıcaklığı olarak oda sıcaklığında (25 ^{o}C) ve vücut sıcaklığında (37 °C) çalışılmıştır.

10 ml tampon çözeltisine ve suya aşırı miktarda (50 mg) BER ve BER'e karşılık gelen BER fosfolipid kompleksi ilave edilerek 25 °C ve 37 °C'de karıştırılmaya bırakılmıştır (Das ve Kalita, 2014). Numuneler 24 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde 75 rpm hızda karıştırılmıştır. 24 saat sonunda numuneler 10000 rpm hızda 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.

Süpernatanlar ayrılarak uygun seyreltmeler yapıldıktan sonra numunelerdeki BER miktarı HPLC'de ölçülmüştür. Deneyler üç kez tekrar edilerek çözünürlük değerleri hesaplanmıştır (Battu ve ark., 2010).

2.10.2. Partisyon Katsayısı Tayini

Partisyon katsayısı etkin maddelerin hücre membranlarından geçişini değerlendirebilmek için *in vitro* olarak tayin edilen önemli bir parametredir. Özellikle bağırsaktan absorbe olan BER'in bağırsak permeabilitesi üzerine yorum yapabilmek adına BER'in ve BER fosfolipid kompleksinin partisyon katsayıları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

10'ar mg BER ve BER'e karşılık gelen BER fosfolipid kompleksi tartılarak 100'er ml distile su içinde çözülmüştür. Her bir çözeltiden 10'ar ml alınarak üzerlerine 10'ar ml oktanol ilave edilmiştir. Numunelerin su içindeki konsantrasyonları çalkalamadan önce HPLC'de ölçülmüştür. Daha sonra numuneler 24 saat boyunca 50 rpm hızda ve 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde karıştırılmıştır. Numunelerin sudaki konsantrasyonları çalkalama sonrasında HPLC'de ölçülmüştür. Deneyler 3 kez tekrarlanmıştır. BER'in ve BER fosfolipid kompleksinin partisyon katsayısı değerleri Eşitlik 2.6'ya göre hesaplanmıştır.

$$P_{y/s} = (C_{ilk}-C_{son})/C_{son} \qquad \text{Eşitlik 2.6.}$$

P: Partisyon katsayısı
y/s: yağ/su
C: Konsantrasyon

2.10.3. *İn Vitro* Çözünme Hızı Çalışmaları

BER fosfolipid kompleksi, BER yüklü kitozan mikropartikül ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarından *in vitro* etkin madde salımının tayininde diyaliz membran metodu kullanılmıştır. Diyaliz membranlar (Sigma, cut-off 12000 Da) bir gece boyunca pH 6,8 tampon ortamında bekletilmiş ve tampon çözelti ile yıkanmıştır. 10 mg BER içeren formülasyonlar 2 ml pH 6,8 fosfat tamponda disperse edilerek diyaliz membranlara konulmuş ve membranlar klipsler ile kapatılmıştır. Diyaliz membranlar 150 ml pH 6,8 tamponu içeren kavanozlara konulmuştur (n=3).

Kavanozlar sıcaklığı 37 ± 0,5 °C'ye ve hızı 100 rpm'e sabitlenmiş olan çalkalamalı inkübatöre konulmuştur (Şekil 2.6). Belirlenen zaman aralıklarında (5., 10., 15., 20., 30., 45., 60., 90., 120., 180., 240., 300., 360., 480. dakikalar ve 24. saatte) ortamdan 1 ml numune alınarak yerine aynı sıcaklıkta taze tampon eklenmiştir. Numuneler 0,45 µm filtreden geçirilerek uygun seyreltmeler yapılarak HPLC'de analiz edilmiştir. Deneyler her bir formülasyon için üç paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Formülasyonlardan açığa çıkan BER yüzde miktarları zamana karşı grafiğe geçirilmiş ve etkin madde salım profilleri elde edilmiştir.



Şekil 2.6. Çalkalamalı inkübatör içinde çözünme hızı numunelerinin yerleşimi.

2.10.4. Formülasyonlardan Etkin Madde Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi

Hazırlanan ve optimum olarak seçilen BER fosfolipid kompleksi (BER-F3), BER yüklü kitozan mikropartikül (BER-KM31) ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül (BER-FM3) formülasyonlarından pH 6,8 fosfat tamponu salım ortamında etkin maddenin açığa çıkışının uyum sağladığı kinetik salım modelleri Microsoft Excel'de DDsolver program eklentisi kullanılarak analiz edilmiştir.

2.10.5. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile Görüntüleme

Formülasyonlar morfolojik olarak TEM ile görüntülenmiştir. Bunun için FEI Tecnai G2 marka cihaz kullanılmıştır. Formüller saf su içerisinde disperse edildikten sonra karbon kaplı grid üzerine damlatılmış ve oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır. Formülasyonların fazlası filtre kağıdı ile alınarak mikroskopta inceleme yapılmıştır.

2.10.6. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

BER, fosfolipid, kitozan, TPP, BER fosfolipid kompleksi, BER yüklü kitozan mikropartikül ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının termal özellikleri TA Instruments DSC 250 cihazı ile incelenmiştir. 2-10 mg ağırlığındaki numuneler alüminyum pana yerleştirilerek sıkıştırılmıştır. Numuneler için 20 °C/dk hızda doğrusal ısıtma yapılarak 25-400 °C aralığında termogramlar alınmıştır. Formülasyonlarda herhangi bir geçimsizlik olup olmadığı ve formülasyonlara yüklenen etkin maddenin sistem içindeki fizikokimyasal durumu değerlendirilmiştir.

2.10.7. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

BER, fosfolipid, kitozan, TPP, BER fosfolipid kompleksi, BER yüklü kitozan mikropartikül ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının FTIR spektroskopisi kullanılarak tanımlanmasında Perkin Elmer UATR Two FTIR cihazından yararlanılmıştır. Cihaza liyofilize toz halinde yerleştirilen numunelerin 4000-500 cm^{-1} dalga boyları arasındaki spektrumları alınmıştır.

2.11. Stabilite Çalışmaları

Hazırlanan BER fosfolipid kompleksi, BER yüklü kitozan mikropartikül ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının stabilitelerini değerlendirmek amacıyla simüle gastrik sıvılarda stabilite analizi yapılmıştır; buna ilaveten formülasyonların buzdolabı koşullarında ve oda sıcaklığında uzun süreli stabilite analizleri yapılmıştır.

2.11.1. Simüle Gastrik Sıvılarda Stabilite Analizleri

BER oral olarak verildiğinde gastrointestinal kanalın farklı bölgelerinden geçer. Bu sırada etkin madde ve formülasyonlar stabilitelerini etkileyecek farklı enzimatik ve pH koşullarına maruz kalır. Formülasyonların bu şartlar altındaki stabilitesini değerlendirmek amacıyla simüle sıvılar hazırlanmış ve stabiliteleri *in vitro* olarak tayin edilmiştir. Bu amaçla simüle gastrik sıvı (pH 1,2) ve simüle intestinal sıvı (pH 6,8) ortamları kullanılmıştır. Simüle gastrik sıvı ortamına enzim olarak pepsin, simüle intestinal sıvı ortamına ise pankreatin ilave edilmiştir. 2 mg BER ve formülasyon numuneleri 1'er ml simüle gastrik sıvı içinde 37 ºC'de 2 saat ve 1'er ml simüle intestinal sıvı içinde 37 ºC'de 6 saat inkübe edilmiştir. Bu süreler maddenin midede ve bağırsakta tahmini kalış süresi göz önünde tutularak belirlenmiştir. Bu süre sonunda enzimatik faaliyeti durdurmak için numunelere trifloro asetik asit ilave edilmiştir. Daha sonra numuneler 8000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatan

ayrılmıştır. Süpernatan kısımları 0,45 μm filtreden geçirilerek ve uygun seyreltmeler yapılarak HPLC'de analiz edilmiştir. Buradan hareketle formülasyonlar içinde bozunmadan kalan BER miktarı hesaplanmıştır. Deneyler üç paralel olarak tekrarlanmıştır.

2.11.2. Buzdolabı ve Oda Sıcaklığında Uzun Süreli Stabilite Analizleri

Farmasötik dozaj formlarının stabilitelerinin belirlenmesi güvenlik ve etkinlik açısından kritik öneme sahiptir. Bu testler ideal depolama koşullarının oluşturulmasında kullanılır. Spesifikasyonlar dışında kalan sonuçların elde edilmesi üretim sürecinin güvenliğini, ilacın etkinliği ve kalitesini etkileyecektir (Santamaria ve ark., 2018).

Hazırlanan formülasyonların stabilite tayinleri için kurutulan liyofilize tozlar cam flakonlar içine konulmuş ve ağızları sıkıca kapatılmıştır. Bu flakonlar buzdolabında 5 ºC ± 3 ºC'de ve 25 ºC ± 2 ºC, % 60 BN ± % 5 BN bağıl nem koşullarında iklim dolabında 6 ay süresince bekletilmiştir. Formülasyonların başlangıçta, 1., 3. ve 6. ay sonunda enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. Stabilite test koşulları ve çalışılan formülasyonlar Çizelge 2.9'da verilmiştir.

Çizelge 2.9. Uzun süreli stabilite test koşulları ve çalışılan formülasyonlar.

Stabilite Test Koşulları	Test süresi	Formülasyonlar
Buzdolabı 5 ºC ± 3 ºC	6 ay	BER-F3 BER-KM31 BER-FM3
Oda sıcaklığı 25 ºC ± 2 ºC, %60 BN ± % 5 BN		

2.12. Formülasyonların *İn Vivo* Etkinliğinin İncelenmesi

Optimum seçilen formüllerin (BER-F3, BER-KM31 ve BER-FM3) ve BER'in *in vivo* etkinlikleri sıçanlar üzerinde incelenmiştir. Bu çalışma için Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Tarih: 10/01/2019; Protokol No: 2019-01-10/01). Deneylerimiz Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezinde yetiştirilen deney hayvanları ile bu merkezde yapılmıştır. Araştırmamızda 340-500 g ağırlığındaki erkek Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. Deney hayvanlarına ait özellikler Çizelge 2.10'da verilmiştir. Benzer biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip deneklerimizden ağırlıkları dengeli olacak şekilde her biri 8 sıçan içeren 1'i kontrol, 4'ü deney grubu olmak üzere toplam 5 grup oluşturulmuştur.

Çizelge 2.10. Deneylerde kullanılan hayvanlara ait özellikler.

Deney Hayvanı Kimliği					
Kullanılacak Hayvan Türü	**Cinsiyeti**	**Yaşı**	**Sayısı**	**Deney Hayvanının Temin Edileceği Yer**	**Deneyin Yapılacağı Birimler**
Sıçan-Wistar Albino	Erkek	3-4 ay	40	Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı	ZBEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Laboratuvarı ve Deney Hayvanları Laboratuvarı

Deney grupları aşağıda verilen şekilde oluşturulmuştur (n=8);

Grup 1: Kontrol grubu

Grup 2: BER uygulama grubu

Grup 3: BER fosfolipid kompleksi uygulama grubu

Grup 4: BER yüklü kitozan mikropartikül uygulama grubu

Grup 5: BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül uygulama grubu

Deney gruplarına ayrılan hayvanların laboratuvarda yerleşimi Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Sıçanların deney gruplarına göre ayrılması.

Grup içindeki sıçanlar farklı renklere boyanarak birbirinden ayırt edilmiştir. Sıçanların boyanması Şekil 2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Deney hayvanlarının boyanması.

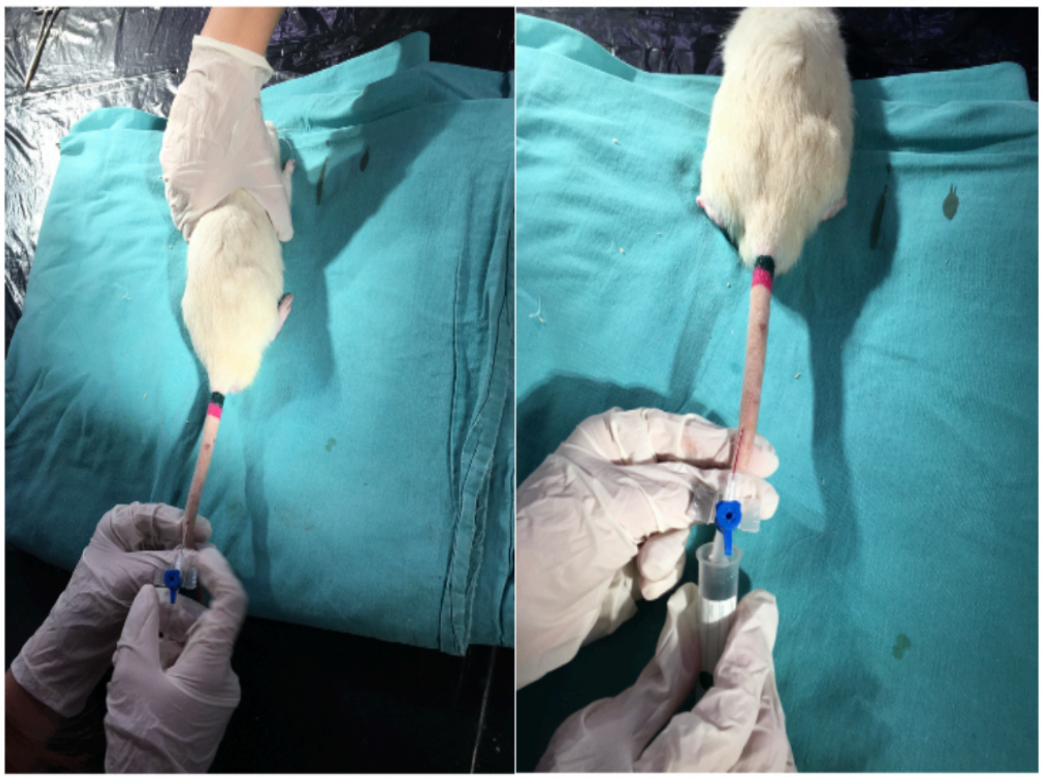
Hayvanların deney ortamına adapte olabilmeleri için deneyler başlamadan önce laboratuvar şartlarında 1 hafta bekletilmişlerdir. Deney süresi boyunca tüm deneklerimiz optimum laboratuvar koşulları (22±1 °C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) altında tutulmuş, günlük içme suyu ve standart pellet yemlerle beslenmişlerdir. BER dozu tüm uygulamalar için 50 mg/kg vücut ağırlığı olarak uygulanmıştır.

İn vivo uygulamalarda BER, BER fosfolipid kompleksi, BER yüklü kitozan mikropartikül ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları için hayvanların ağırlıklarına göre su içinde hesaplanan miktarlarda hazırlanan stok çözeltiler vortex ile karıştırılarak homojenize edilmiştir. Uygulama yapılacak sıçanın ağırlığına göre 50 mg/kg doza karşılık gelecek miktar hesaplanarak oral gavaj ile uygulanmıştır. Oral gavaj uygulaması Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Sıçanlara yapılan oral gavaj uygulaması

Kan örnekleri (0.5 ml) oral uygulamayı takiben, 30. dakika, 1., 2., 6. ve 24. saatlerde olmak üzere kuyruk veninden alınarak EDTA'lı tüplerde muhafaza edilmiştir. Kuyruk veninden kan alınması işlemi Şekil 2.10'da gösterilmiştir. Kan numuneleri 3000 rpm hızda 30 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve toplanan plazmalar -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Numuneler içindeki BER miktarı daha sonra HPLC'de geliştirilen miktar tayini yöntemi ile tayin edilmiştir. Denekler; deney sonunda yüksek doz ketamin ve xylazine uygulaması sonucu sakrifiye edilmiştir. Deneyler sonunda BER, BER fosfolipid kompleksi, BER yüklü kitozan mikropartikül ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları için C_{max}, t_{max} ve AUC değerleri hesaplanmıştır.

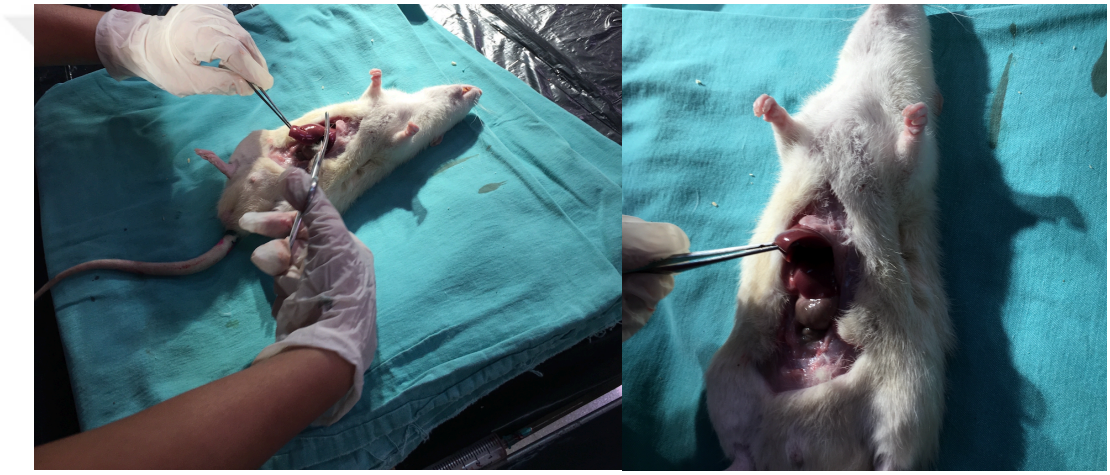


Şekil 2.10. Kuyruk veninden kan alma işlemi.

2.13. Karaciğer Dokularında Antioksidan Aktivite Tayini

Doku Örneklerinin Alınması

Tüm sıçanlar son kan örneklerinin alınmasının ardından yüksek doz anestezi uygulaması ile feda edildi. Karaciğer dokuları buz üstünde hızlı bir şekilde çıkarıldı. Dokular çalışmanın yapılacağı güne kadar alüminyum folyolara sarılarak -80 °C de derin dondurucuda saklandı. Karaciğer dokularının çıkartılışı Şekil 2.11'de gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Karaciğer dokularının çıkartılması.

Doku MDA Seviyesi ve GSH İçeriğinin Ölçümü

Karaciğer dokusu oksidan ve antioksidan durumu, lipid peroksidasyonu ve indirgenmiş glutatyon ölçülerek değerlendirildi.

MDA Tayini

Lipid peroksidasyonun bir göstergesi olarak MDA seviyesi Casini ve arkadaşlarının yöntemiyle belirlendi (Casini ve ark., 1986). Deney günü -80 °C saklanan doku örnekleri dondurucudan çıkarılarak buz üstünde çözünmeleri sağlandı. Doku örnekleri, doku gramı başına 9 ml olacak şekilde soğuk % 10'luk trikloroasetik

asit eklenerek homojenleştirildi. Dokuların homojenize edilişi Şekil 2.12'de gösterilmiştir. Homojenatlar 18-20°C'de 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjlemenin ardından, 750 µl süpernatan üzerine, 750 µl % 0,67 tiyobarbitürik asit ve 10 µl %1'lik bütil hidroksi tolüen eklendi ve 15 dakika boyunca 100°C'de inkübe edildi. Örneklerin 535 nm'de absorbansları spektrofotometrik olarak ölçüldü. MDA seviyeleri aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplandı.

MDA Seviyesi = (Okunan absorbans değeri x 128) / doku ağırlığı (g) Eşitlik 2.7.



Şekil 2.12. Karaciğer dokularının homojenize edilmesi.

GSH Tayini

Major endojen antioksidan olan GSH seviyeleri Aykac ve arkadaşlarının (Aykac ve ark., 1985) metoduna göre çalışıldı. Doku örnekleri, doku gramı başına 9 ml olacak şekilde soğuk % 10'luk trikloroasetik asit eklenerek homojenleştirildi. Homojenatlar 18-20°C'de 4000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Elde edilen 250 µl süpernatana 1 ml 0.3 M Na_2HPO_4 çözeltisi ilave edildi. Üzerine 125 µl ditiobisnitrobenzoat eklendi ve örnekler vortekslenerek 412 nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri okundu. GSH seviyeleri aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplandı.

GSH Seviyesi = (Okunan absorbans değeri x 4,23) / doku ağırlığı (g) Eşitlik 2.8.

2.14. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler GraphPad Prism (Version 9.3.1) programı ile Student t testi ve tek yönlü ANOVA testi kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farkların değerlendirilmesi amacıyla Tukey testi kullanılmıştır. Ayrıca nonparametrik testlerde gruplar arasındaki farklılıkların karşılaştırılması için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. $p<0,05$ olduğunda sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

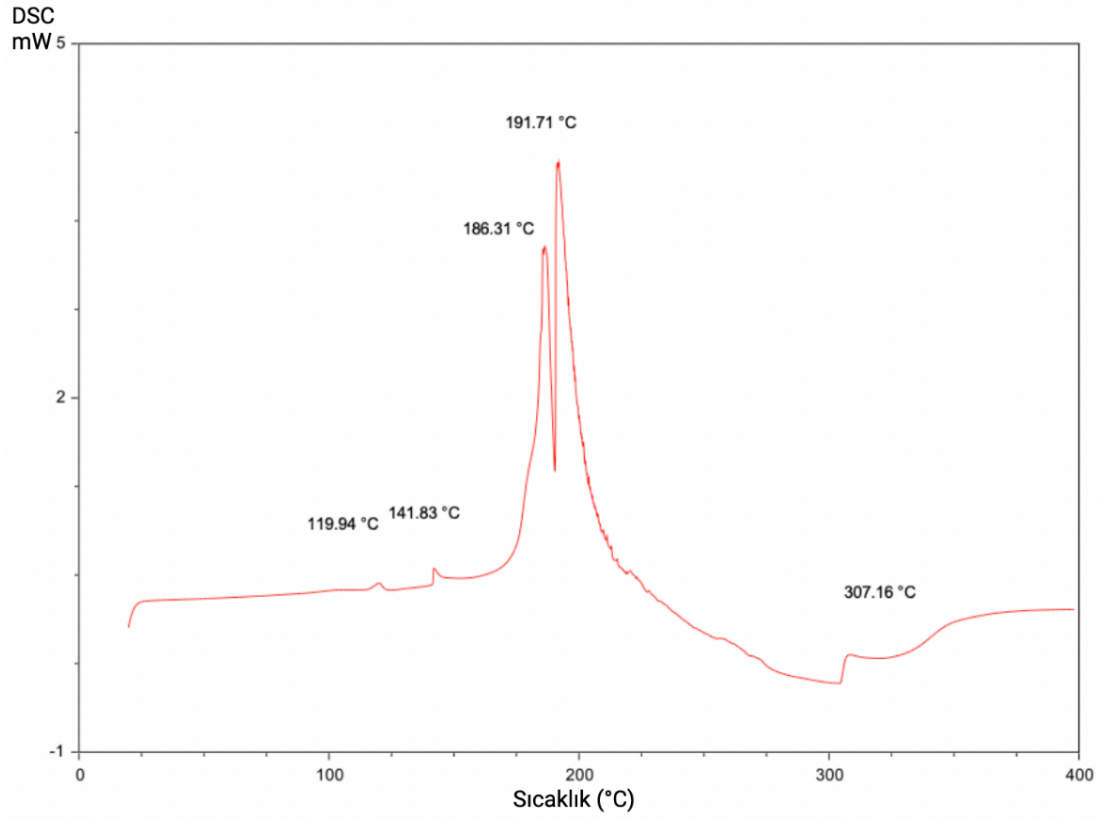
3. BULGULAR

3.1. BER'in Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

BER'in fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla FTIR spektrumu alınmış, DSC termogramı incelenmiş ve SEM ile görüntülenmesi yapılmıştır.

3.1.1. BER'in Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile Analizi

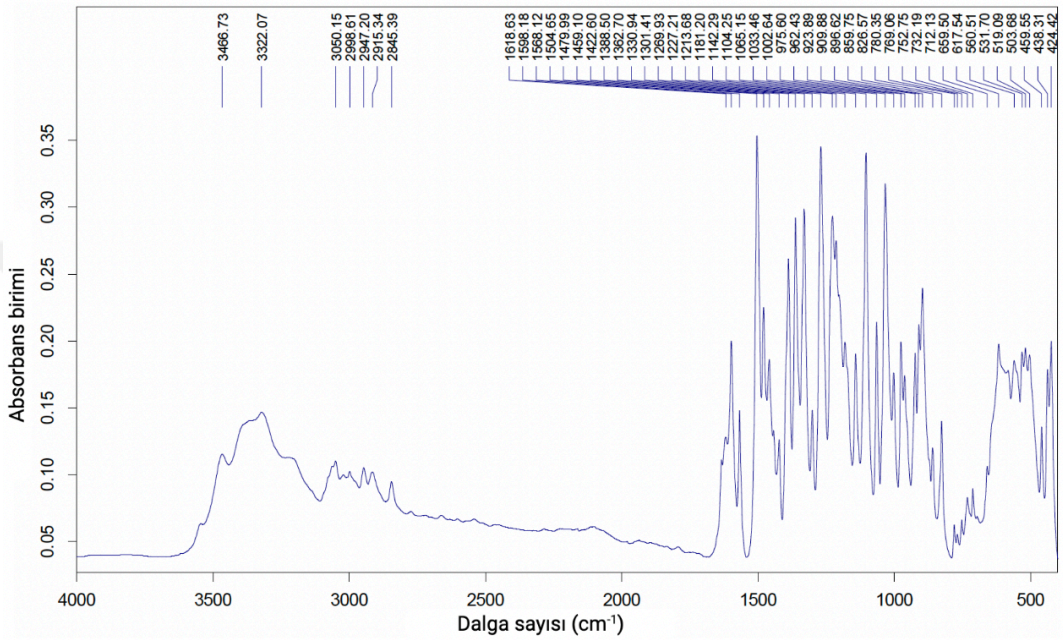
DSC analizi Bölüm 2.4.1'de anlatılan şekilde yapılmıştır ve BER'e ait DSC termogramı elde edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. BER'e ait DSC termogramı.

3.1.2. BER'in Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Spektrumunun Alınması

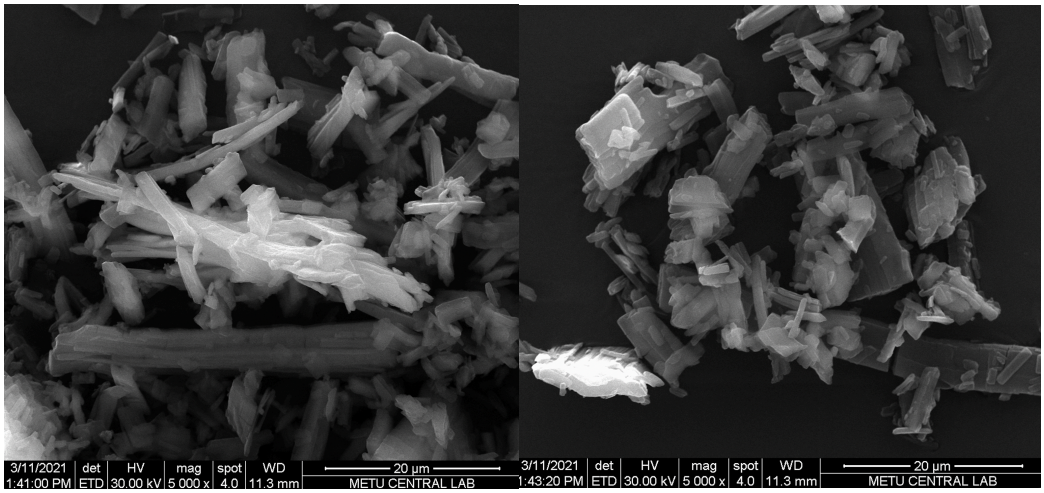
BER'in FTIR spektrumu Bölüm 2.4.2'de anlatıldığı şekilde elde edilmiştir ve fonksiyonel gruplarına ait bantlar Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. BER'e ait FTIR spektrumu.

3.1.3. BER'in SEM ile görüntülenmesi

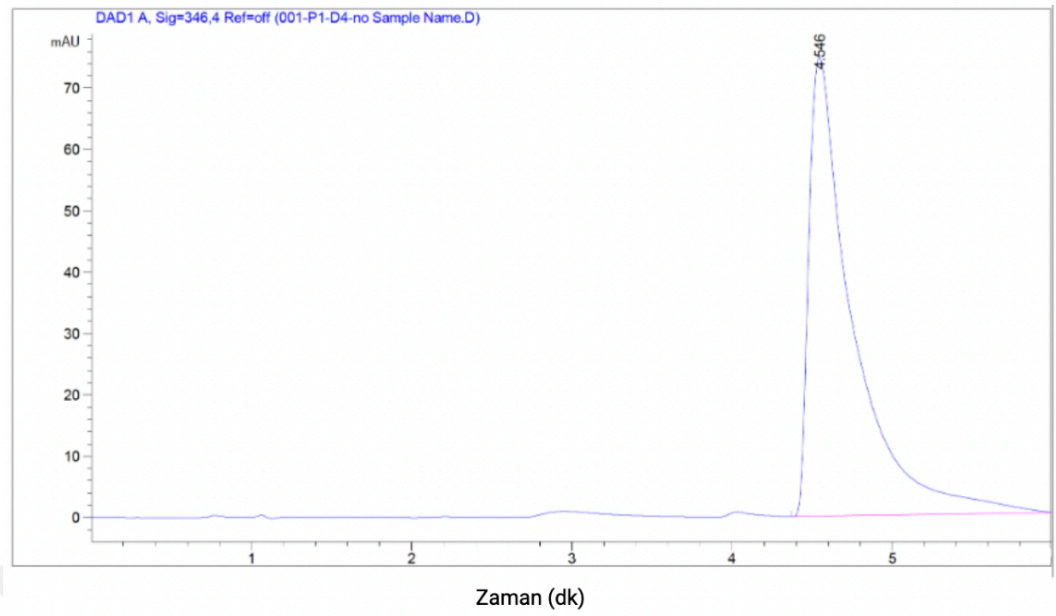
BER'in SEM analizi Bölüm 2.4.3'te anlatıldığı şekilde yapılmıştır ve BER'e ait SEM görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. BER'e ait SEM görüntüleri.

3.2. BER'in Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi

BER'in miktar tayini HPLC'de geliştirilen analitik yöntem yardımıyla yapılmıştır. BER'in su içindeki çözeltisinin 200-400 nm aralığında taranan spektrumunda maksimum absorbansın elde edildiği dalga boyunun (λ_{max}) 346 nm olduğu görülmüştür. BER'e ait HPLC spektrumu Şekil 3.4'te gösterilmiştir. Ayrıca formülasyonların simüle gastrik sıvılarda stabilitesinin değerlendirilmesinde kullanılacak olan pH 1,2 ve pH 6,8 tampon ortamlarında da miktar tayini yöntemi geliştirilmiştir. pH 1,2 ve pH 6,8 tampon ortamlarında da BER'in maksimum absorbansının elde edildiği dalga boyu 346 nm olarak belirlenmiştir.



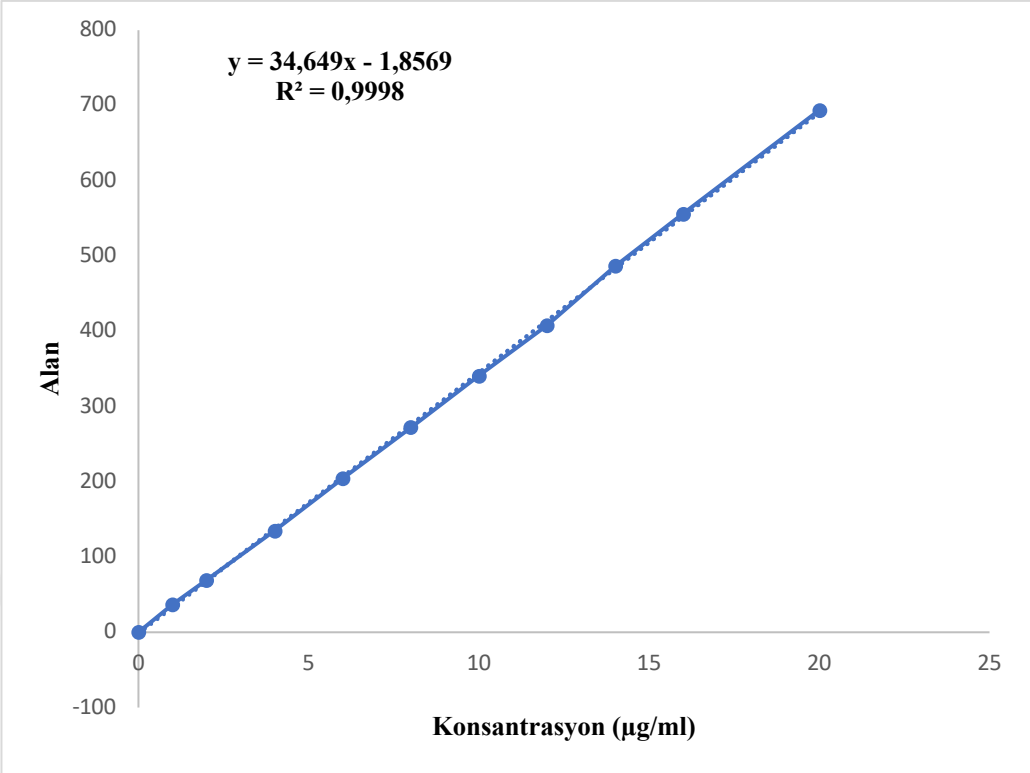
Şekil 3.4. BER pikini gösteren HPLC kromatogramı.

3.2.1. BER'in HPLC ile Su Ortamındaki Kalibrasyon Doğrusunun Hazırlanması

BER'in miktar tayininde HPLC'de belirlenen koşullar Çizelge 3.1'de verilmiştir. BER'in su ortamındaki kalibrasyon doğrusu Şekil 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.1. BER'in HPLC ile miktar tayininde belirlenen koşullar.

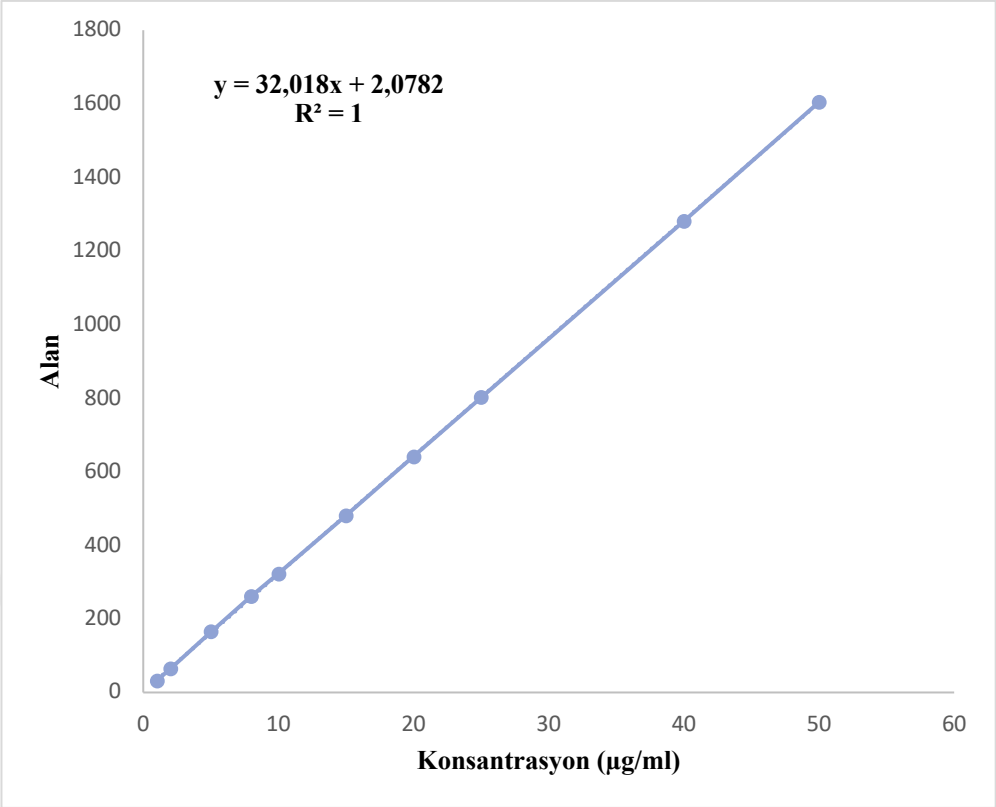
Parametre	**Koşullar**
Sıcaklık	30±2 °C
Cihaz	Agilent 1260 Infinity II
Kolon	Zorbax Eclipse Plus C18 (100 mm x 4.6 mm x 3.5 µm)
Dalga boyu	346 nm
Mobil faz	30 mM amonyum asetat:asetonitril (67:33)
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Akış hızı	1 ml/dakika



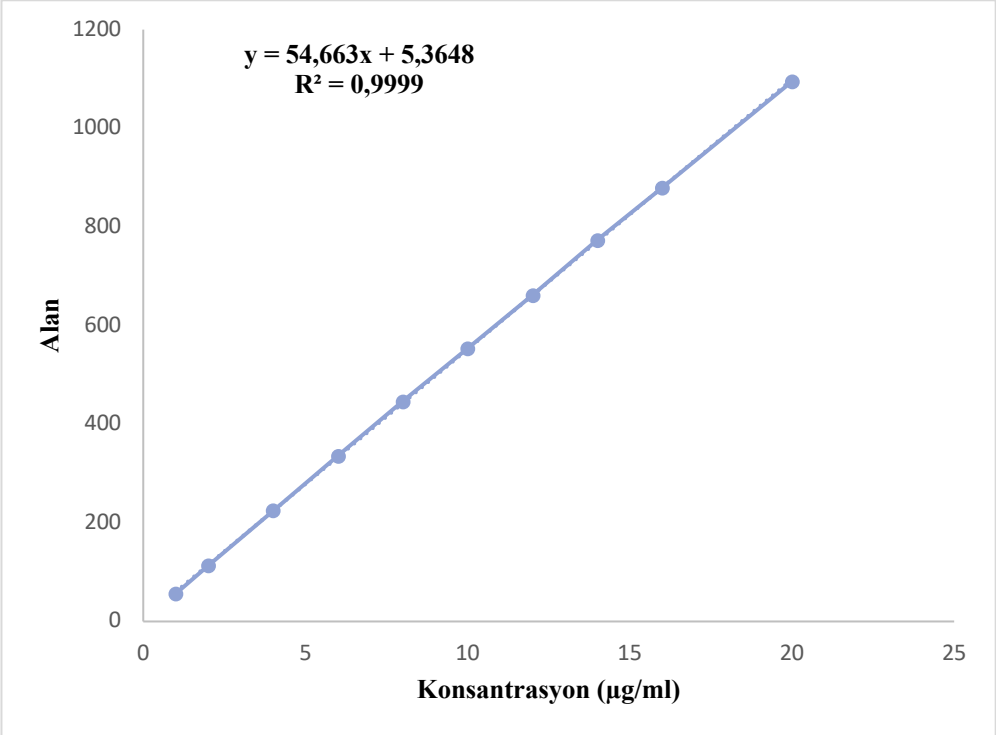
Şekil 3.5. BER'in HPLC ile analizinde su ortamındaki kalibrasyon doğrusu.

3.2.2. BER'in HPLC ile pH 1,2 ve pH 6,8 Ortamlarındaki Kalibrasyon Doğrularının Hazırlanması

Bölüm 2.5.4'te belirtildiği şekilde hazırlanan BER stok çözeltilerinden seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda hazırlanan BER çözeltilerinin okunan alan değerlerinden pH 1,2 ve pH 6,8 tampon ortamları için kalibrasyon doğruları hazırlanmıştır. pH 1,2 ortamındaki HPLC analizi için hazırlanan kalibrasyon doğrusu Şekil 3.6'da ve pH 6,8 ortamındaki HPLC analizi için hazırlanan kalibrasyon doğrusu Şekil 3.7'de verilmiştir.



Şekil 3.6. BER'in pH 1,2 ortamındaki kalibrasyon doğrusu.



Şekil 3.7. BER'in pH 6,8 ortamındaki kalibrasyon doğrusu.

3.2.3. BER'in HPLC ile Miktar Tayini Yöntemlerinin Analitik Validasyonları

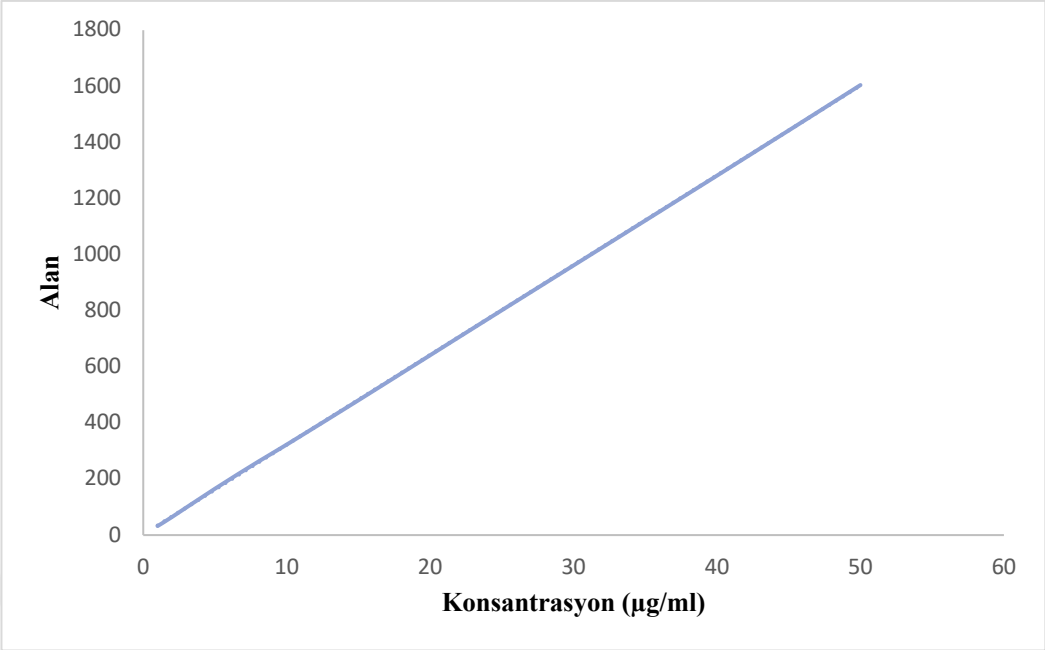
BER'in Bölüm 2.6'da anlatıldığı gibi gerçekleştirilen analitik validasyon çalışmalarına ait sonuçlar aşağıda verilmiştir.

3.2.3.1. Doğrusallık ve Aralığı

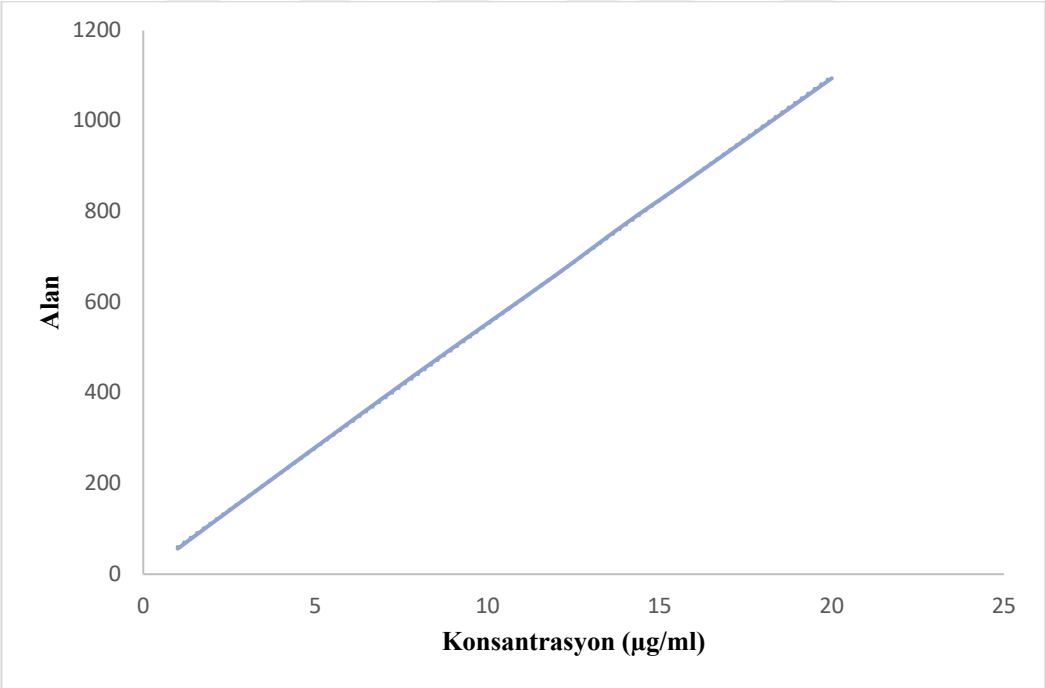
BER'in su, pH 1,2 ve pH 6,8 ortamlarında 100 µg/mL konsantrasyon hazırlanan stok çözeltilerinden sırasıyla 1-20 µg/ml, 1-50 µg/ml ve 1-20 µg/ml konsantrasyon aralığında farklı seyreltmeler yapılarak hazırlanan çözeltileri geliştirilen HPLC yöntemleri ile analiz edilerek konsantrasyona karşı elde edilen eğri altında kalan alan değerleri grafiğe geçirilerek standart doğrular elde edilmiştir. Ortamlar için hazırlanan doğrusallık grafikleri Şekil 3.8, Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.8. BER'in su ortamındaki doğrusallık grafiği.



Şekil 3.9. BER'in pH 1,2 ortamındaki doğrusallık grafiği.



Şekil 3.10. BER'in pH 6,8 ortamındaki doğrusallık grafiği.

BER'in HPLC ile miktar tayini için su, pH 1,2 ve pH 6,8 ortamlarında hazırlanan kalibrasyon doğrularına ait doğrusallık ve aralığı verileri sırasıyla Çizelge 3.2, Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.2. BER'in HPLC ile su ortamındaki miktar tayini için geliştirilen analitik yöntemin doğrusallık ve aralığı çalışmasına ait istatistiksel veriler.

Doğrusallık ve aralığı	**1-20 µg/mL**
Eğim	34,65
Eğimin standart hatası	0,1747
Eğimin %95 güven aralığı	34,25 - 35,04
Eğimin önemlilik değeri	<0,0001
Kesişim	-1,857
Kesişimin standart hatası	1,838
Kesişimin %95 güven aralığı	-6,014 - 2,301
Regresyon doğrusundan olan sapmaların standart hataları (Sy.x)	3,626
Determinasyon katsayısı (R^2)	0,9998

Çizelge 3.3. BER'in HPLC ile pH 1,2 ortamındaki miktar tayini için geliştirilen analitik yöntemin doğrusallık ve aralığı çalışmasına ait istatistiksel veriler.

Doğrusallık ve aralığı	**1-50 µg/ml**
Eğim	32,02
Eğimin standart hatası	0,0417
Eğimin %95 güven aralığı	31,92-32,11
Eğimin önemlilik değeri	<0,0001
Kesişim	2,078
Kesişimin standart hatası	0,9822
Kesişimin %95 güven aralığı	-0,1868 - 4,343
Regresyon doğrusundan olan sapmaların standart hataları (Sy.x)	2,063
Determinasyon katsayısı (R^2)	1

Çizelge 3.4. BER'in HPLC ile pH 6,8 ortamındaki miktar tayini için geliştirilen analitik yöntemin doğrusallık ve aralığı çalışmasına ait istatistiksel veriler.

Doğrusallık ve aralığı	**1-20 µg/ml**
Eğim	54,66
Eğimin standart hatası	0,1458
Eğimin %95 güven aralığı	54,33 – 55
Eğimin önemlilik değeri	<0,0001
Kesişim	5,365
Kesişimin standart hatası	1,608
Kesişimin %95 güven aralığı	1,656 – 9,073
Regresyon doğrusundan olan sapmaların standart hataları (Sy.x)	2,735
Determinasyon katsayısı (R^2)	0,9999

3.2.3.2. Doğruluk ve Geri Elde

BER'in su ve pH 6,8 ortamlarında 2, 10 ve 16 µg/ml; pH 1,2 ortamında ise 8, 20 ve 50 µg/ml konsantrasyondaki çözeltileri HPLC'de 6'şar enjekte edilmiş ve analizleri yapılarak yüzde geri elde, standart sapma (SS) ve % bağıl standart sapma (BSS) değerleri hesaplamıştır. Doğruluk ve geri elde analizlerine ait sonuçlar su, pH 1,2 ve pH 6,8 ortamları için sırasıyla Çizelge 3.5, Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. BER'in su ortamında doğruluk ve geri elde verileri.

2 µg/ml			10 µg/ml			16 µg/ml		
Alan	**C (µg/ml)**	**% Geri elde**	**Alan**	**C (µg/ml)**	**% Geri elde**	**Alan**	**C (µg/ml)**	**% Geri elde**
69,32	2,054	102,7	341,2	9,900	99,00	552,9	16,01	100,1
69,15	2,049	102,5	340,2	9,872	98,72	553,9	16,04	100,3
69,15	2,049	102,5	341,9	9,922	99,22	552,2	15,99	99,9
68,87	2,041	102,1	342,3	9,934	99,34	552,4	15,99	99,9
69,22	2,051	102,5	342,2	9,929	99,29	554,7	16,06	100,4
68,39	2,027	101,4	343,2	9,959	99,59	553,2	16,02	100,1
Ortalama		102,3	**Ortalama**		99,19	**Ortalama**		100,1
SS		0,475	**SS**		0,300	**SS**		0,204
%BSS		0,464	**%BSS**		0,302	**%BSS**		0,204

Çizelge 3.6. BER'in pH 1,2 ortamında doğruluk ve geri elde verileri.

8 µg/ml			20 µg/ml			50 µg/ml		
Alan	**C (µg/ml)**	**% Geri elde**	**Alan**	**C (µg/ml)**	**% Geri elde**	**Alan**	**C (µg/ml)**	**% Geri elde**
258,9	8,022	100,3	645,9	20,11	100,5	1610,2	50,23	100,5
259,1	8,027	100,3	643,1	20,02	100,1	1608,9	50,19	100,4
258,6	8,010	100,1	644,1	20,05	100,3	1605,6	50,08	100,2
257,2	7,968	99,60	644,0	20,05	100,3	1608,3	50,17	100,3
259,1	8,027	100,3	643,1	20,02	100,1	1604,2	50,04	100,1
257,3	7,971	99,63	641,3	19,97	99,83	1605,8	50,09	100,2
Ortalama		100,0	**Ortalama**		100,2	**Ortalama**		100,3
SS		0,337	**SS**		0,231	**SS**		0,147
%BSS		0,337	**%BSS**		0,231	**%BSS**		0,147

Çizelge 3.7. BER'in pH 6,8 ortamında doğruluk ve geri elde verileri.

2 µg/ml			10 µg/ml			16 µg/ml		
Alan	**C (µg/ml)**	**% Geri elde**	**Alan**	**C (µg/ml)**	**% Geri elde**	**Alan**	**C (µg/ml)**	**% Geri elde**
116,1	2,026	101,3	548,7	9,939	99,39	896,4	16,30	101,9
114,7	1,999	100,0	546,6	9,900	99,00	893,5	16,25	101,6
113,3	1,974	98,72	545,4	9,880	98,80	892,3	16,23	101,4
113,7	1,981	99,06	546,6	9,902	99,02	891,1	16,20	101,3
115,1	2,008	100,41	545,6	9,883	98,83	889,9	16,18	101,1
114,0	1,987	99,37	546,0	9,891	98,91	901,4	16,39	102,5
Ortalama		99,81	**Ortalama**		98,99	**Ortalama**		101,6
SS		0,955	**SS**		0,214	**SS**		0,505
%BSS		0,957	**%BSS**		0,216	**%BSS**		0,497

3.2.3.3. Kesinlik

Geliştirilen miktar tayini yöntemlerinin kesinlik analizleri Bölüm 2.6.3'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Tekrarlanabilirlikleri ve farklı günlerde yapılan analizler ile ara kesinlikleri değerlendirilmiştir.

Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik analizlerinde su ve pH 6,8 ortamı için 2,10 ve 16 µg/ml konsantrasyonlarında; pH 1,2 ortamı için 8, 20 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında HPLC'de 6'şar enjeksiyon yapılarak analiz edilmiştir. Analizler sonucu hesaplanan konsantrasyon değerlerinin ortalama, standart sapma (SS) ve % bağıl standart sapma (BSS) sonuçları belirlenmiştir. Hesaplanan sonuçlar su, pH 1,2 ve pH 6,8 ortamları için sırasıyla Çizelge 3.8, Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3.8. BER'in su ortamındaki tekrarlanabilirlik analizi verileri.

C teorik (µg/ml)	C pratik (µg/ml)	C teorik (µg/ml)	C pratik (µg/ml)	C teorik (µg/ml)	C pratik (µg/ml)
2	2,032	10	9,957	16	16,05
2	2,016	10	9,879	16	16,10
2	2,045	10	9,967	16	16,01
2	1,990	10	9,902	16	16,00
2	2,023	10	9,845	16	15,99
2	1,996	10	9,934	16	16,03
Ortalama	2,017	**Ortalama**	9,914	**Ortalama**	16,03
SS	0,021	**SS**	0,047	**SS**	0,041
%BSS	1,041	**%BSS**	0,474	**%BSS**	0,256

Çizelge 3.9. BER'in pH 1,2 ortamındaki tekrarlanabilirlik analizi verileri.

C teorik (µg/ml)	C pratik (µg/ml)	C teorik (µg/ml)	C pratik (µg/ml)	C teorik (µg/ml)	C pratik (µg/ml)
8	8,022	20	20,03	50	50,03
8	7,903	20	20,06	50	50,17
8	8,029	20	19,97	50	50,09
8	7,966	20	20,07	50	50,07
8	8,002	20	20,10	50	50,01
8	7,969	20	20,02	50	50,07
Ortalama	7,982	**Ortalama**	20,04	**Ortalama**	50,07
SS	0,047	**SS**	0,045	**SS**	0,056
%BSS	0,589	**%BSS**	0,225	**%BSS**	0,112

Çizelge 3.10. BER'in pH 6,8 ortamındaki tekrarlanabilirlik analizi verileri.

C teorik (µg/ml)	C pratik (µg/ml)	C teorik (µg/ml)	C pratik (µg/ml)	C teorik (µg/ml)	C pratik (µg/ml)
2	1,999	10	9,989	16	16,30
2	1,991	10	9,972	16	16,29
2	1,997	10	9,934	16	16,30
2	2,007	10	9,965	16	16,25
2	2,003	10	9,973	16	16,23
2	2,004	10	9,963	16	16,38
Ortalama	2,000	**Ortalama**	9,966	**Ortalama**	16,29
SS	0,006	**SS**	0,018	**SS**	0,052
%BSS	0,300	**%BSS**	0,181	**%BSS**	0,319

Ara Kesinlik

Ara kesinlik tayinleri su ve pH 6,8 ortamları için 2 µg/ml; pH 1,2 ortamı için ise 20 µg/ml konsantrasyondaki BER çözeltilerinin 2 farklı günde 6'şar kez analizleri ile yapılmıştır. Bu analizler sonucunda hesaplanan konsantrasyonların ortalama, standart sapma (SS) ve % bağıl standart sapma (BSS) değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan sonuçlar Çizelge 3.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.11. BER'in su, pH 1,2 ve pH 6,8 ortamlarında ara kesinlik analizlerine ait veriler.

Analiz ortamı	Su	pH 1,2	pH 6,8
C teorik	**2 µg/ml**	**20 µg/ml**	**2 µg/ml**
1. Gün	2,054	19,96	2,022
	2,049	19,99	2,003
	2,049	19,97	1,999
	2,041	20,04	2,002
	2,051	19,99	1,986
	2,027	19,96	2,008
2. Gün	2,032	20,00	2,030
	2,016	20,02	2,012
	2,045	20,03	2,004
	1,990	19,99	1,990
	2,023	19,98	2,012
	1,996	20,01	1,996
Ortalama	**2,031**	**20,00**	**2,005**
SS	**0,022**	**0,026**	**0,013**
%BSS	**1,083**	**0,130**	**0,648**

3.2.3.4. Özgünlük (Seçicilik)

Bölüm 2.6.4'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen özgünlük çalışmalarında kullanılan yardımcı maddelerin 346 nm dalga boyunda yapılan analizleri sonucunda aynı dalga boyunda BER piki ile herhangi bir girişim göstermedikleri görülmüştür.

3.2.3.5. Teşhis (LOD) ve Tayin Sınırlarının (LOQ) Belirlenmesi

BER'in su, pH 1,2 ve pH 6,8 ortamlarındaki miktar tayini yönteminin teşhis ve tayin sınırları Eşitlik 2.1 ve Eşitlik 2.2 yardımıyla hesaplanmıştır. Hesaplanan sonuçlar Çizelge 3.12'de sunulmuştur.

Çizelge 3.12. BER'in farklı ortamlardaki miktar tayini yöntemlerinin teşhis ve tayin sınırları.

Ortam	Su	pH 1,2	pH 6,8
Teşhis sınırı LOD (µg/ml)	0,175	0,101	0,097
Tayin sınırı LOQ (µg/ml)	0,530	0,307	0,294

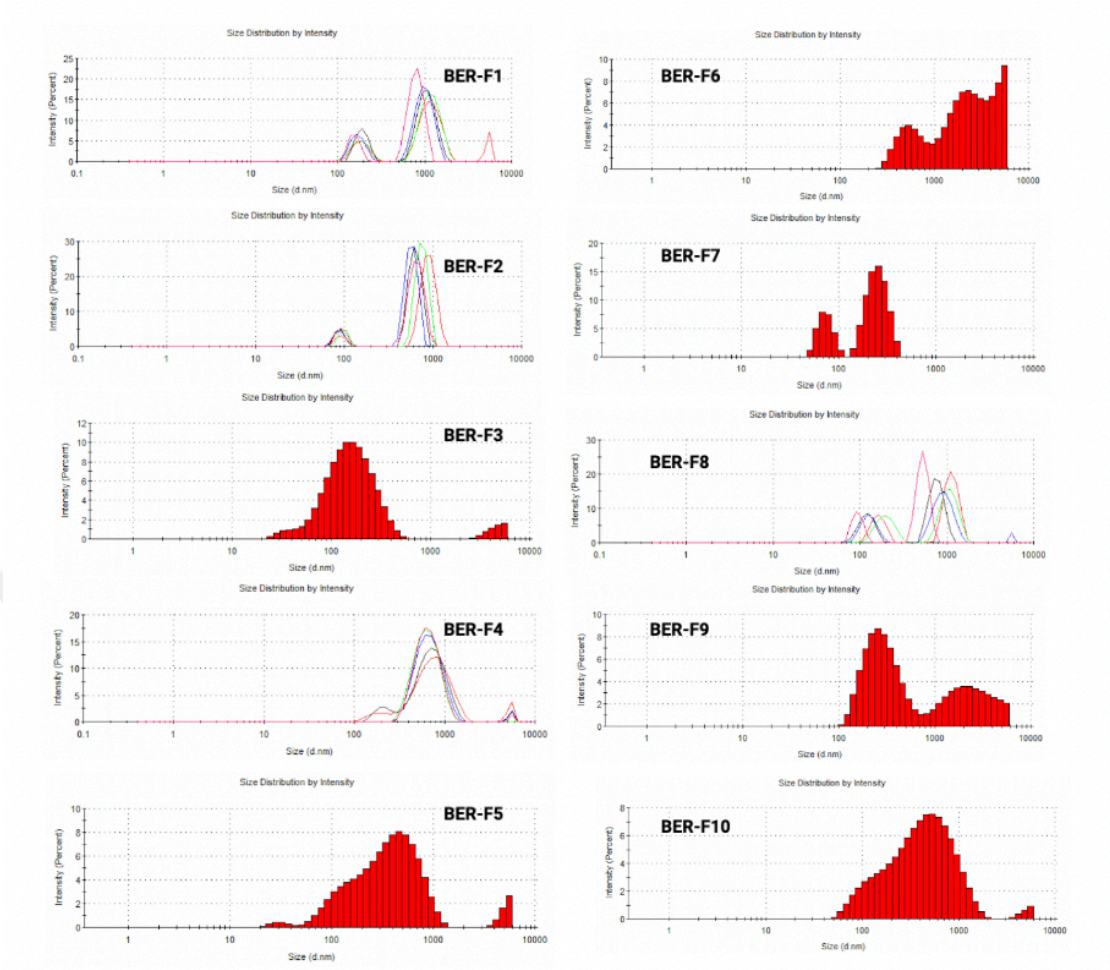
3.3. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

3.3.1. BER Fosfolipid Komplekslerinin Hazırlanması

BER fosfolipid kompleksleri Bölüm 2.7.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan BER fosfolipid komplekslerinin enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. Yapılan bu analizlere ait sonuçlar Çizelge 3.13'te verilmiştir. Formülasyonlara ait partikül boyutu dağılımları Şekil 3.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.13. BER fosfolipid kompleksi formülasyonlarının karakterizasyonlarına ait bulgular (n=3, Ortalama ± SS).

Formül kodu	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu (nm)	Polidispersite indeksi	% Enkapsülasyon etkinliği
BER-F1	-20.9 ± 0,74	1184 ± 84,9	0,847 ± 0,10	57,2 ± 2,52
BER -F2	-0,21 ± 0,35	1203 ± 208,1	0,817 ± 0,10	69,5 ± 1,21
BER -F3	-24,3 ± 1,68	244,3 ± 21,9	0,305 ± 0,05	81,2 ± 3,41
BER -F4	-0,50 ± 0,12	705,3 ± 26,1	0,362 ± 0,03	75,8 ± 4,87
BER -F5	-0,08 ± 0,33	338 ±72,8	0,523 ± 0,07	78,2 ± 1,55
BER -F6	-12,7 ± 1,12	1546 ± 92,7	0,679 ± 0,14	52,6 ± 2,34
BER -F7	-23,1 ± 0,79	217,3 ± 5,68	0,521 ± 0,07	51,2 ± 4,02
BER -F8	-0,45 ± 0,29	1089 ± 200,5	0,984 ± 0,04	71,6 ± 3,76
BER -F9	-0,03 ± 0,45	364,7 ± 20,5	0,548 ± 0,08	75,0 ± 6,05
BER -F10	-0,69 ± 0,80	305 ± 2,49	0,420 ± 0,03	78,2 ± 1,32



Şekil 3.11. BER fosfolipid kompleksi formüllerine ait partikül boyutu dağılımları.

Enkapsülasyon etkinliğinin diğerlerine göre yüksek olması ve partikül boyutunun küçük olması nedeniyle BER-F3 formülasyonu optimum formül olarak belirlenmiştir. Bölüm 2.7.1'de anlatıldığı şekilde bu formülasyon üzerine prob sonikatör (BER-F3I ve BER-F3II) ve ultrasonik banyo (BER-F3III ve BER-F3IV) ile işlem uygulanarak formülün enkapsülasyon etkinliği yükseltilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmaya ait fizikokimyasal karakterizasyon verileri Çizelge 3.14'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.14. BER fosfolipid kompleksi formülasyonlarında optimizasyon işlemine ait karakterizasyon sonuçları (n=3, Ortalama ± SS).

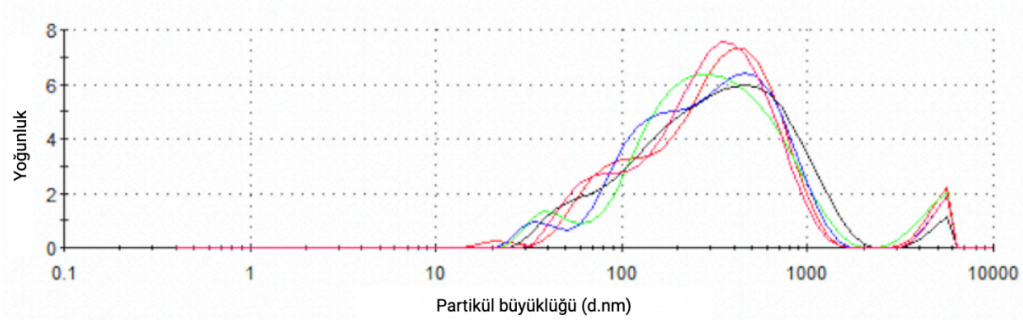
Formül kodu	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu (nm)	Polidispersite indeksi	% Enkapsülasyon etkinliği
BER-F3I	-31,3 ± 2,55	489,1 ± 77,1	0,578 ± 0,11	30,31 ± 4,66
BER-F3II	-49,2 ± 4,59	515,1 ± 298,3	0,597 ± 0,20	29,44 ± 2,73
BER-F3III	-30,6 ± 4,87	625,2 ± 28,1	0,523 ± 0,03	41,72 ± 2,78
BER-F3IV	-53,0 ± 4,33	865,3 ± 92,2	0,768 ± 0,07	39,72 ± 2,44

Formülasyonun Tekrarlanabilirliğine ait Bulgular

Formülasyonlar arasından optimum seçilen BER-F3 formülasyonunun aynı koşullarda her zaman aynı özelliklerde üretilebilir olduğunun değerlendirilmesi amacıyla tekrarlanabilirlik çalışması yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında BER-F3 formülasyonu üç kez hazırlanarak enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. Bu ölçümlere ait sonuçlar Çizelge 3.15'te verilmiştir. Hazırlanan formülasyonların partikül boyutu dağılımları Şekil 3.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.15. BER-F3 formülasyonunun tekrarlanabilirliğine ait karakterizasyon sonuçları (Ortalama ± SS).

Formül kodu	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu (nm)	Polidispersite indeksi	% Enkapsülasyon etkinliği
BER-F3-1	-24,3 ± 1,50	255,6 ± 52,5	0,336 ± 0,05	81,54 ± 3,46
BER-F3-2	-25,9 ± 1,73	262,2 ± 4,68	0,338 ± 0,02	81,46 ± 2,51
BER-F3-3	-24,5 ± 0,54	249,3 ± 29,2	0,324 ±0,04	78,9 ± 2,87
%BSS	3,50	2,52	2,27	1,86



Şekil 3.12. Tekrarlanabilirlik çalışmasında hazırlanan BER-F3 formülasyonlarının partikül boyutu dağılımları.

3.3.2. BER Yüklü Kitozan Mikropartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

3.3.2.1. Boş Mikropartiküllerin Karakterizasyonu Üzerine Formülasyon Parametrelerinin Etkisine Ait Bulgular

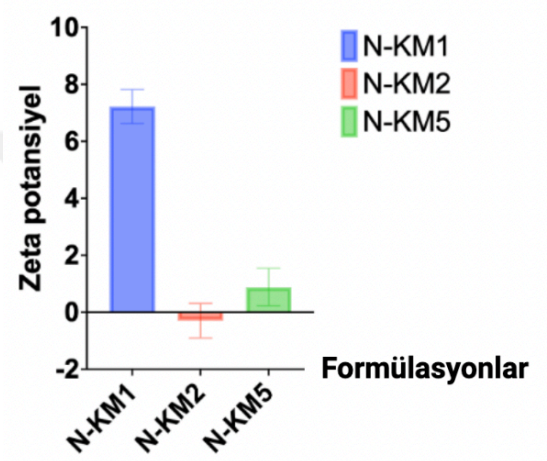
Formülasyon parametrelerini optimize edebilmek amacıyla hazırlanan BER içermeyen boş mikropartikül formülasyonlarına (N-KM1-N-KM8) ait zeta potansiyel değerleri Çizelge 3.16'da verilmiştir. Formülasyonlar iyonotropik jelasyon yöntemiyle Bölüm 2.7.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.16. Etkin madde yüklü olmayan mikropartiküllere ait zeta potansiyel değerleri (n=3, Ortalama ± SS).

Formül kodu	Zeta potansiyeli (mV)
N-KM1	7,220 ± 0,600
N-KM2	-0,292 ± 0,608
N-KM3	0,048 ± 0,246
N-KM4	0,032 ± 0,028
N-KM5	0,882 ± 0,661
N-KM6	-0,057 ± 0,279
N-KM7	0,041 ± 0,049
N-KM8	4,570 ± 2,180

% TPP Çözeltisi Konsantrasyonunun Etkisi

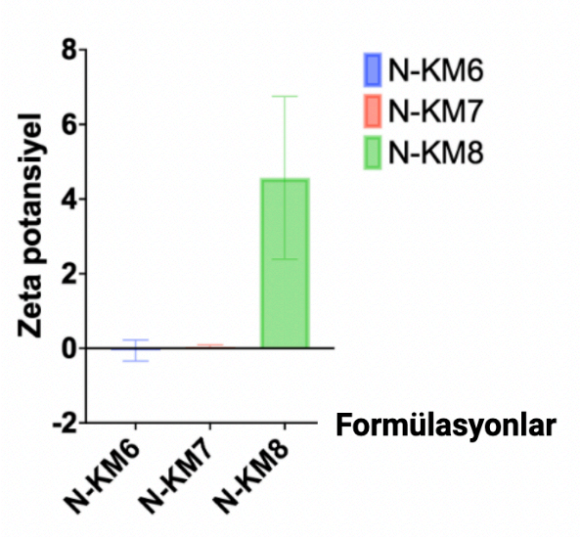
% TPP çözeltisi konsantrasyonunun formülasyonun zeta potansiyeli üzerine etkisini belirlemek amacıyla diğer parametreler aynı tutularak N-KM1, N-KM2 ve N-KM5 formülasyonları hazırlanmış ve değerlendirilmiştir. Formülasyonlar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Sonuçlara ait grafik Şekil 3.13'te gösterilmiştir.



Şekil 3.13. Boş mikropartikül formülasyonları üzerine % TPP çözeltisi konsantrasyonunun etkisi.

Kitozan Çözeltisi Sıcaklığının Etkisi

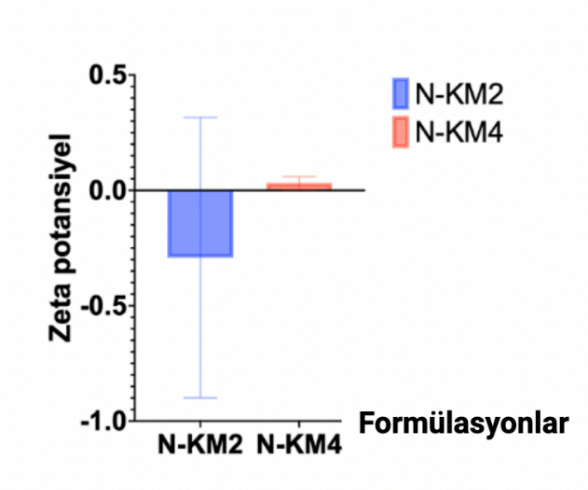
Boş mikropartikül formülasyonları üzerinden kitozan çözeltisi sıcaklığının etkisini görmek amacıyla N-KM6, N-KM7 ve N-KM8 formülasyonları hazırlanarak zeta potansiyelleri değerlendirilmiştir. Formülasyonlar arasında anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0,05$). Sonuçlara ait grafik Şekil 3.14'te verilmiştir.



Şekil 3.14. Boş mikropartikül formülasyonları üzerine kitozan çözeltisi sıcaklığının etkisi.

Kitozan Çözeltisi pH Değerinin Etkisi

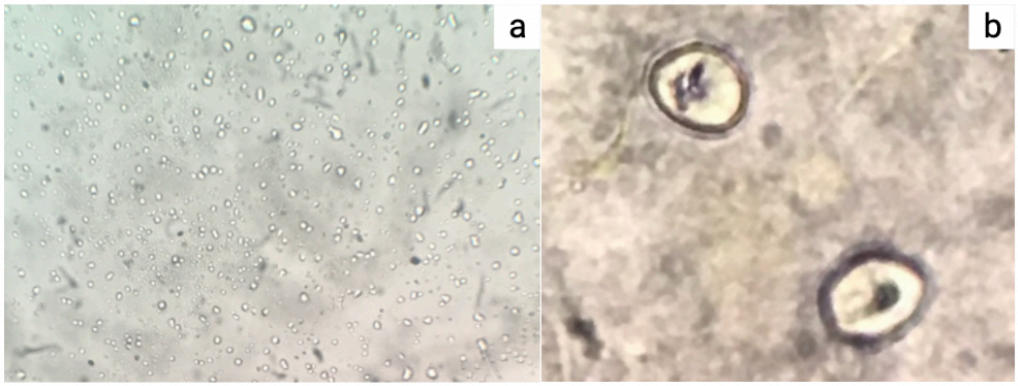
Kitozan çözeltisinin pH değerinin mikropartikül karakterizasyonu üzerine etkisini görmek amacıyla N-KM2 ve N-KM4 formülasyonları hazırlanmıştır. Formülasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Sonuçlara ait grafik Şekil 3.15'te verilmiştir.



Şekil 3.15. Boş mikropartikül formülasyonları üzerine kitozan çözeltisi pH değerinin etkisi.

3.3.2.2. Mikroskopta Görüntüleme Amacıyla Hazırlanan BER Yüklü Kitozan Mikropartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular

BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları Bölüm 2.7.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanarak optik mikroskopta görüntülenmiştir. Düzgün şekilli mikropartiküller elde etmek amacıyla kullanılması gereken formülasyon parametreleri optimize edilmeye çalışılmıştır. Hazırlanarak optik mikroskop altında incelenen birçok formülde küresel şeklin oluştuğu görülmüştür. MBER-KM1 – MBER-KM14 formülleri arasında mikropartiküllerin en düzgün şekilde görüntülendiği formülasyon MBER-KM11 olmuştur. Bu formüle ait mikroskop görüntüleri Şekil 3.16'da verilmiştir.



Şekil 3.16. MBER-KM11 kodlu formülasyona ait mikroskop görüntüleri (Büyütme: a: x40, b: x100).

3.3.2.3. BER Yüklü Kitozan Mikropartikül Formülasyonlarının Optimizasyonuna Ait Bulgular

Hazırlanan boş mikropartikül formülasyonlarından ve mikroskopta görüntüleme amacıyla hazırlanan BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının karakterizasyonlarından yola çıkarak; farklı formülasyon parametreleri denenerek BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları hazırlanmıştır. Bu formülasyonlara ait zeta potansiyel, enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve partikül büyüklük dağılımı sonuçları Çizelge 3.17'de verilmiştir.

Çizelge 3.17. BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarına ait karakterizasyon sonuçları (n=3, Ortalama ± SS).

Formül kodu	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu (nm)	Polidispersite indeksi	% Enkapsülasyon etkinliği
BER-KM1	0,122 ± 0,824	370 ± 1,70	0,350 ± 0,053	8,34 ± 1,76
BER-KM2	0,183 ± 0,372	6469 ± 540	0,818 ± 0,082	9,14 ± 0,465
BER-KM3	6,40 ± 0,152	8826 ± 790	0,952 ± 0,083	9,09 ± 0,278
BER-KM4	0,127 ± 0,930	9893 ± 1456	0,997 ± 0,006	9,02 ± 1,21
BER-KM5	-0,424 ± 0,134	19000 ± 3317	0,672 ± 0,170	4,69 ± 0,983
BER-KM6	0,483 ± 0,143	4248 ± 63,6	0,335 ± 0,035	5,16 ± 0,342
BER-KM7	11.7 ± 0,503	11000 ± 1245	0,447 ± 0,492	3,34 ± 0,765
BER-KM8	-0,115 ± 0,0615	349 ± 10,9	0,762 ± 0,034	5,90 ± 1,94
BER-KM9	-0,107 ± 0,0282	11000 ± 1856	0,422 ± 0,247	7,49 ± 0,258
BER-KM10	-0,103 ± 0,457	3684 ± 453	0,792 ± 0,146	2,63 ± 0,411
BER-KM11	-0,302 ± 0,674	7349 ± 1438	0,496 ± 0,161	10,2 ± 0,406
BER-KM12	-0,119 ± 0,145	1448 ± 298	0,300 ± 0,308	1,83 ± 0,753
BER-KM13	-0,151 ± 0,160	766 ± 33,1	0,799 ± 0,125	19,6 ± 5,75
BER-KM14	-0,360 ± 0,179	806 ± 103	0,650 ± 0,037	14,4 ± 2.51
BER-KM15	-0,325 ± 0,394	2323 ± 236	0,423 ± 0,221	10,0 ± 4,28
BER-KM16	-0,860 ± 0,529	392 ± 19,4	0,458 ± 0,005	9,50 ± 0,0984
BER-KM17	-0,146 ± 0,166	1985 ± 113	0,936 ± 0,034	13,4 ± 1,00
BER-KM18	-0,0352 ± 0,202	1877 ± 255	0,846 ± 0,164	16,2 ± 0,566
BER-KM19	-0,0893 ± 0,127	902 ± 193	0,543 ± 0,001	15,8 ± 2,87
BER-KM20	-0,0647 ± 0,217	829 ± 198	0,623 ± 0,107	12,5 ± 1,75
BER-KM21	7,83 ± 0,885	3148 ± 375	0,875 ± 0,060	10,7 ± 2,33
BER-KM22	0,491 ± 0,204	3143 ± 1139	0,841 ± 0,275	5,50 ± 2,04
BER-KM23	-18,00 ± 3,74	865 ± 132	0,729 ± 0,046	14,6 ± 1,06
BER-KM24	40,9 ± 7,20	785 ± 193	1.000	6,35 ± 2,52
BER-KM25	6,78 ± 1,45	6540 ± 1723	0,732 ± 0,233	0,400 ± 0,291
BER-KM26	7,09 ± 5,34	8639 ± 3732	0,636 ± 0,347	1,54 ± 1,28
BER-KM27	6,25 ± 2,35	18714 ± 4780	1.000	29,2 ± 4,90
BER-KM28	2,05 ± 1,35	1795 ± 776	0,893 ± 0,185	15,1 ± 3,99
BER-KM29	3,94 ± 2,03	16364 ± 2321	0,863 ± 0,237	41,5 ± 6,31
BER-KM30	6,83 ± 1,17	12064 ± 7156	0,722 ± 0,180	20,9 ± 3,41
BER-KM31	41,6 ± 0,838	406 ± 25,2	0,462 ± 0,105	31,5 ± 0,384
BER-KM32	0,200 ± 0,00751	519 ± 32,5	0,577 ± 0,026	24,6 ± 0,678
BER-KM33	10,1 ± 2,39	1460 ± 365	0,902 ± 0,091	17,0 ± 0,591

BER-KM1-BER-KM33 formülasyonlarında BER'i çözmek için kullanılan çözücünün tipi, % TPP çözeltisi konsantrasyonu, kitozan çözeltisinin pH değeri, kitozan çözeltisinin sıcaklığı ve homojenizasyonun etkisi gibi formülasyon parametreleri ve bunlara karşılık formülasyonların karakteristik özellikleri Çizelge 3.17'deki bulgular olmak üzere bu sonuçlar istatiksel programda t testi ve ANOVA testi ile değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda her bir parametre için bulunan p değerleri Çizelge 3.18'de verilmiştir.

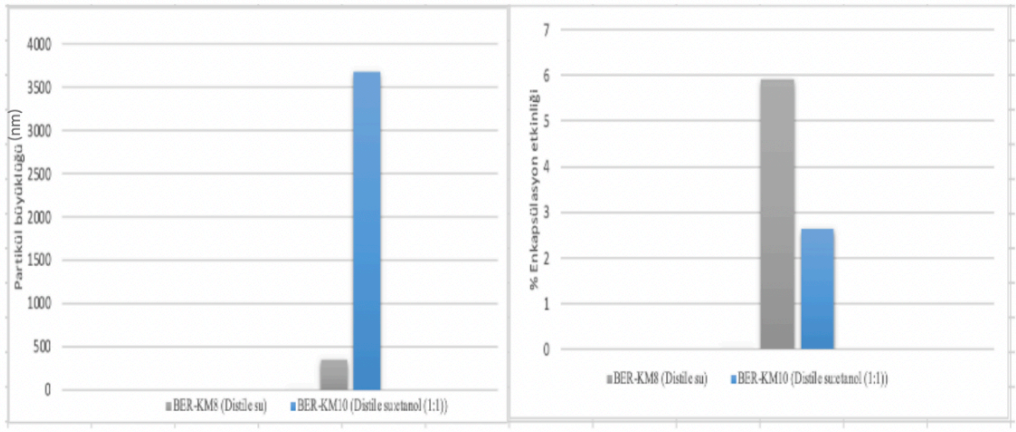
Çizelge 3.18. BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının istatiksel değerlendirilmeleri sonucu elde edilen p değerleri.

	Zeta potansiyeli	**Partikül boyutu**	**Polidispersite indeksi**	**% Enkapsülasyon etkinliği**
BER'i çözmek için kullanılan çözücünün tipi	0,9662	0,0002*	0,7463	0,0461*
% TPP çözeltisi konsantrasyonu	<0,0001*	0,0007*	0,7142	0,0197*
Kitozan çözeltisinin pH değeri	0,0896	0,5392	0,4047	0,0025*
Kitozan çözeltisinin sıcaklığı	0,0002*	0,9946	0,8445	0,0438*
Homojenizasyon	0,7562	0,0143*	0,2051	0,0005*

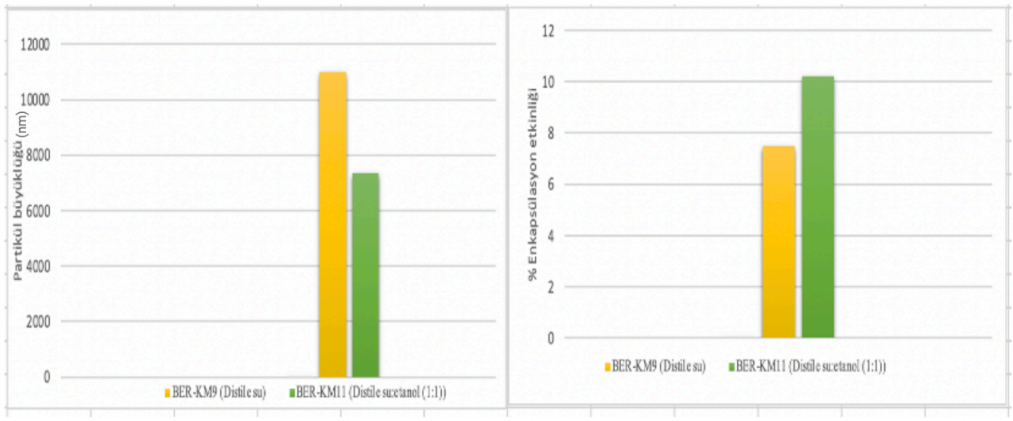
*p<0,05

BER'i Çözmek için Kullanılan Çözücünün Tipinin Etkisi

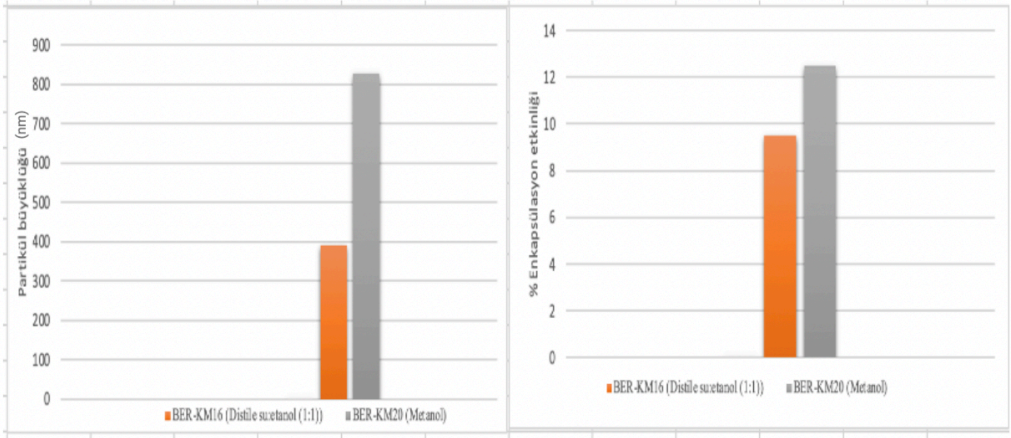
İstatistiksel analiz sonucu etkin maddeyi çözmek için kullanılan çözücünün tipinin formülasyonların partikül büyüklüğü ve % enkapsülasyon etkinliği değerleri üzerinde anlamlı etkisi olduğu görülmüştür (p<0,05). BER-KM8 ve BER-KM10, BER-KM9 ve BER-KM11 formülasyonlarında distile su ve distile su:etanol karışımı çözücü olarak kullanılarak diğer formülasyon parametreleri sabit tutularak çözücünün etkisi değerlendirilmiştir. BER-KM16 ve BER-KM20 formülasyonlarında ise distile su: etanol karışımı ve metanol çözücü olarak kullanılarak formülasyonlar arasındaki fark değerlendirilmiştir. Buradan elde edilen sonuçlara ait grafikler Şekil 3.17 (BER-KM8 ve BER-KM10), Şekil 3.18 (BER-KM9 ve BER-KM11) ve Şekil 3.19 (BER-KM16 ve BER-KM20)'da gösterilmiştir.



Şekil 3.17. BER-KM8 ve BER-KM10 formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve % enkapsülasyon etkinliği karşılaştırma grafiği.



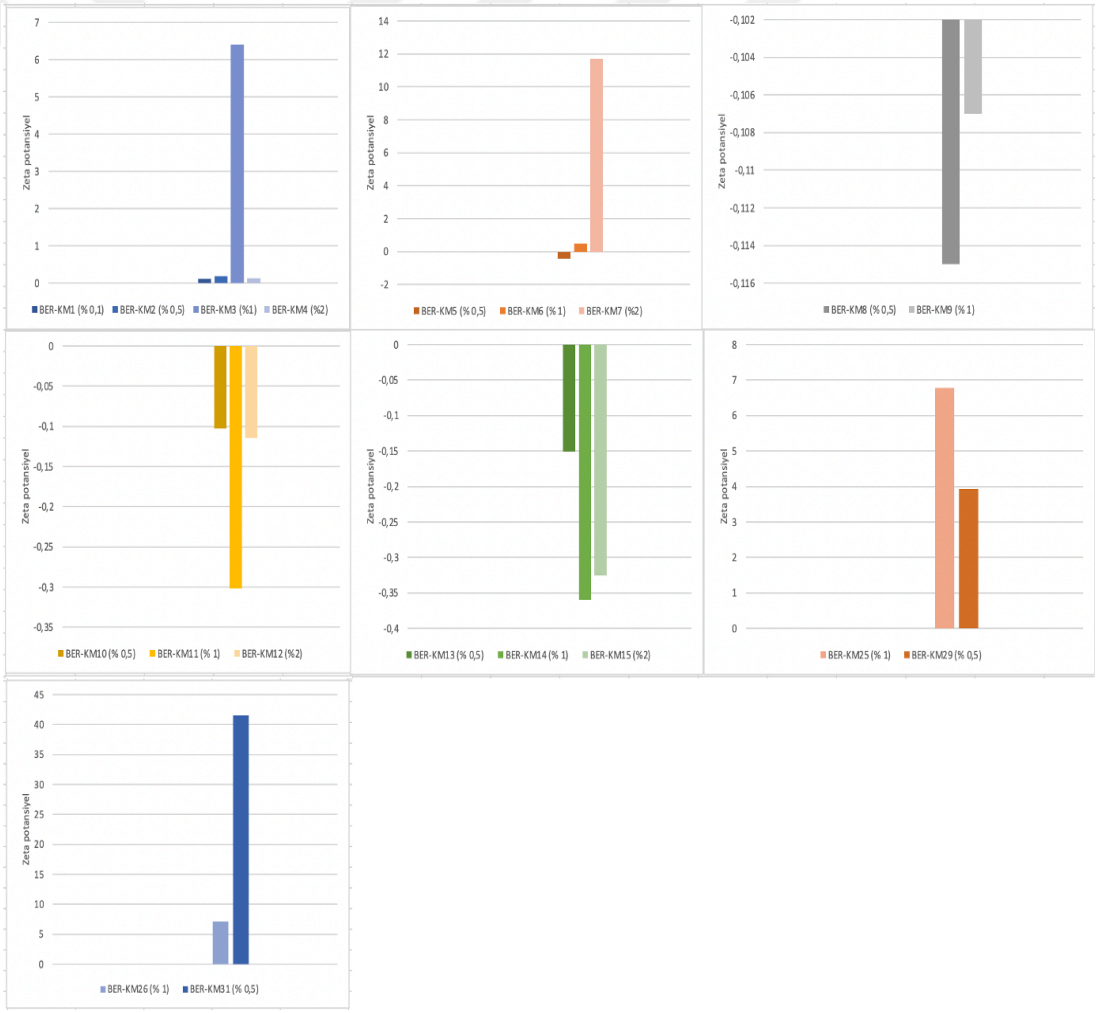
Şekil 3.18. BER-KM9 ve BER-KM11 formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve % enkapsülasyon etkinliği karşılaştırma grafiği.



Şekil 3.19. BER-KM16 ve BER-KM20 formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve % enkapsülasyon etkinliği karşılaştırma grafiği.

% TPP Çözeltisi Konsantrasyonunun Etkisi

İstatistiksel analiz sonucu BER yüklü kitozan mikropartiküllerin hazırlanmasında kullanılan % TPP çözeltisi konsantrasyonunun formülasyonların zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü ve % enkapsülasyon etkinliği değerleri üzerinde anlamlı etkisi olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Formülasyonlar hazırlanırken %0,1, %0,5, %1 ve %2 TPP çözeltisi konsantrasyonları diğer formülasyon parametreleri sabit tutularak farklı formülasyonlarda denenmiştir. Farklı formülasyonlarda çalışılan % TPP çözeltisi konsantrasyonlarının zeta potansiyel üzerine etkilerin gösteren grafikler Şekil 3.20'de verilmiştir.

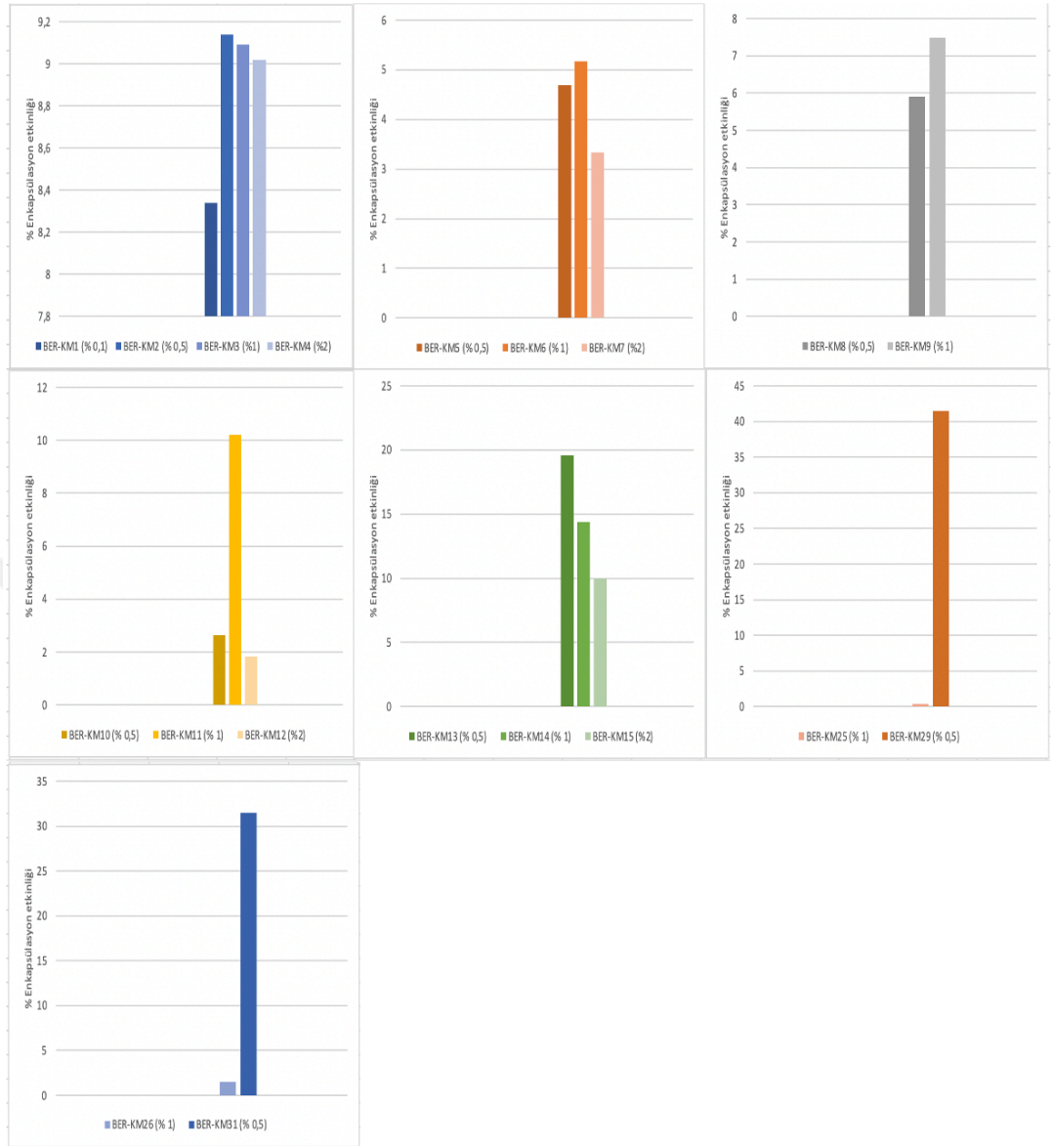


Şekil 3.20. Farklı % TPP çözeltisi konsantrasyonlarının formülasyonların zeta potansiyelleri üzerine etkisi.

Farklı formülasyonlarda çalışılan % TPP çözeltisi konsantrasyonlarının formülasyonların partikül büyüklükleri ve % enkapsülasyon etkinlikleri üzerine etkilerini gösteren grafikler Şekil 3.21(partikül büyüklüğüne etkisi) ve Şekil 3.22 (% enkapsülasyon etkinliğine etkisi)'de verilmiştir.



Şekil 3.21. Farklı % TPP çözeltisi konsantrasyonlarının formülasyonların partikül büyüklükleri üzerine etkisi.

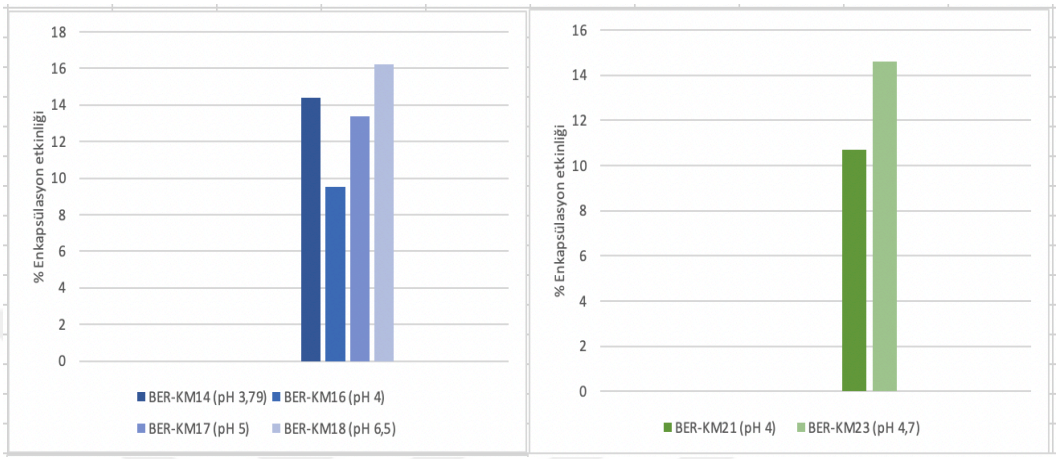


Şekil 3.22. Farklı % TPP çözeltisi konsantrasyonlarının formülasyonların % enkapsülasyon etkinlikleri üzerine etkisi.

Kitozan Çözeltisinin pH Değerinin Etkisi

İstatistiksel analiz sonucunda kitozan çözeltisinin pH değerinin BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının % enkapsülasyon etkinlikleri üzerinde anlamlı etkisi olduğu görülmüştür ($p<0,05$). BER-KM14 (pH 3,79), BER-KM16 (pH 4), BER-KM17 (pH 5) ve BER-KM18 (pH 6,5) kodlu formülasyonlar arasında diğer formülasyon parametleri sabit tutularak kitozan çözeltisinin pH etkisi değerlendirilmiştir. Kitozan çözeltisinin pH değerinin bu formülasyonların %

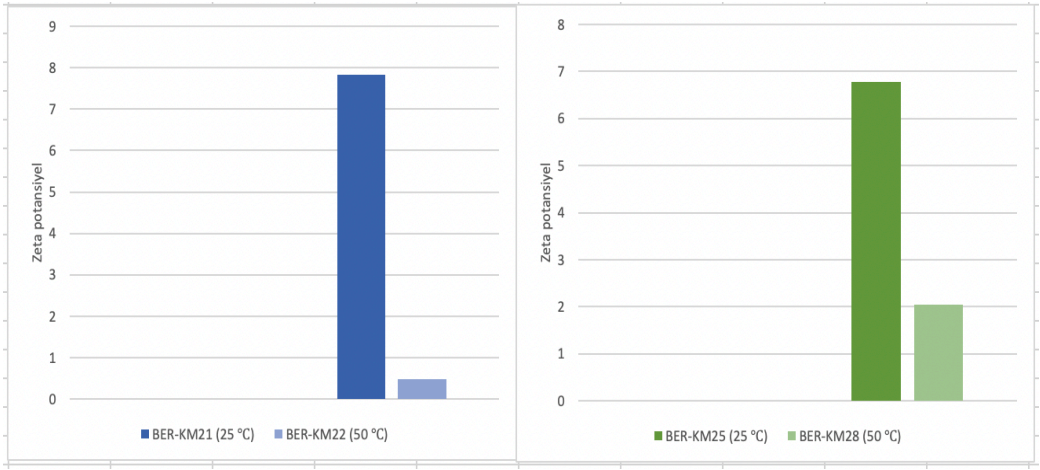
enkapsülasyon etkinlikleri üzerine olan etkileri Şekil 3.23'te grafik üzerinde gösterilmiştir. BER-KM21 (pH 4) ve BER-KM23 (pH 4,7) formülasyonlarında da farklı kitozan çözeltisi pH değerleri denenmiştir ve bu parametrenin % enkapsülasyon etkinlikleri üzerine olan etkisi Şekil 3.23'te grafik ile gösterilmiştir.



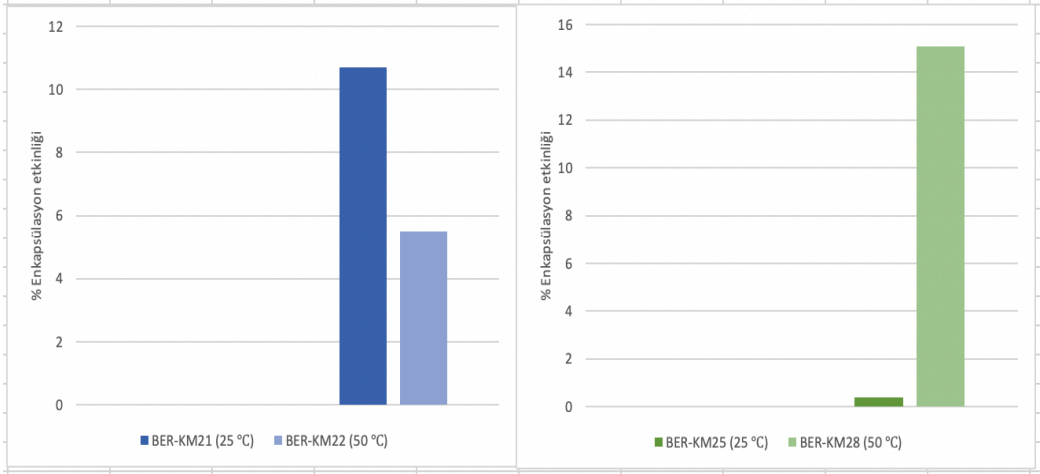
Şekil 3.23. Farklı kitozan çözeltisi pH değerlerinin formülasyonların % enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi.

Kitozan Çözeltisinin Sıcaklığının Etkisi

İstatistiksel analiz sonucunda kitozan çözeltisinin sıcaklığının BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının zeta potansiyelleri ve % enkapsülasyon etkinlikleri üzerinde anlamlı etkisi olduğu görülmüştür ($p<0,05$). BER-KM21 (25 °C) ve BER-KM22 (50 °C), BER-KM25 (25 °C) ve BER-KM28 (50 °C) kodlu formülasyonlar arasında diğer formülasyon parametleri sabit tutularak kitozan çözeltisinin sıcaklığının etkisi değerlendirilmiştir. Kitozan çözeltisinin sıcaklığının bu formülasyonların zeta potansiyelleri ve % enkapsülasyon etkinlikleri üzerine olan etkileri Şekil 3.24 (zeta potansiyellerine etkisi) ve Şekil 3.25 (% enkapsülasyon etkinliğine etkisi)'te grafik üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 3.24. Farklı kitozan çözeltisi sıcaklıklarının formülasyonların zeta potansiyelleri üzerine etkisi.

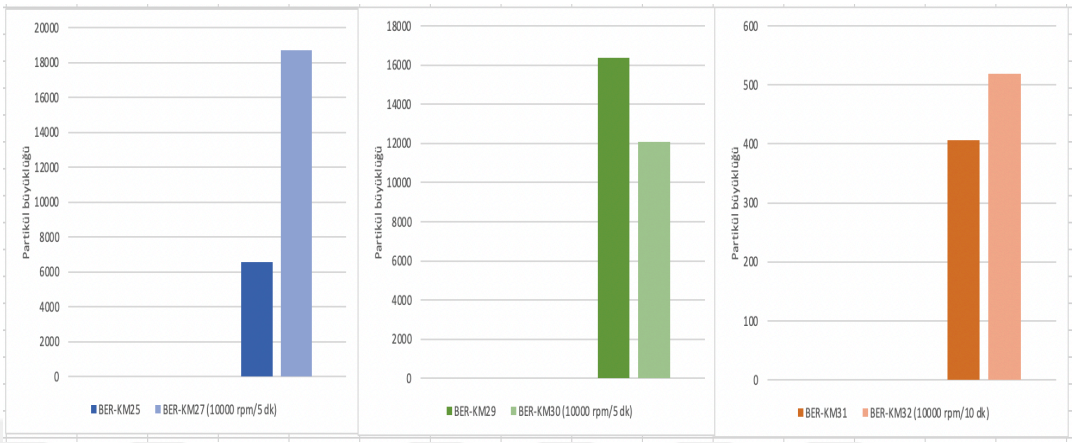


Şekil 3.25. Farklı kitozan çözeltisi sıcaklıklarının formülasyonların % enkapsülasyon etkinlikleri üzerine etkisi.

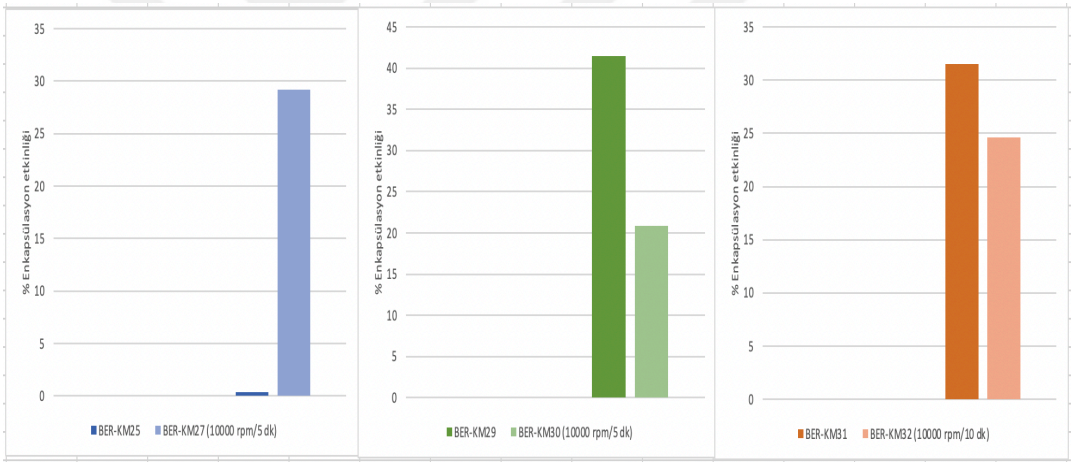
Homojenizasyonun Etkisi

İstatistiksel analiz sonucunda homojenizasyon işleminin BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının partikül büyüklükleri ve % enkapsülasyon etkinlikleri üzerinde anlamlı etkisi olduğu görülmüştür ($p<0,05$). BER-KM25 ve BER-KM27, BER-KM29 ve BER-KM30, BER-KM31 ve BER-KM32 kodlu formülasyonlar arasında diğer formülasyon parametreleri sabit tutularak homojenizasyonun etkisi değerlendirilmiştir. Homojenizasyon işleminin bu formülasyonların partikül büyüklüğü ve % enkapsülasyon etkinlikleri üzerine olan

etkileri Şekil 3.26 (partikül büyüklüğüne etkisi) ve Şekil 3.27 (% enkapsülasyon etkinliğine etkisi)'de grafik üzerinde gösterilmiştir.



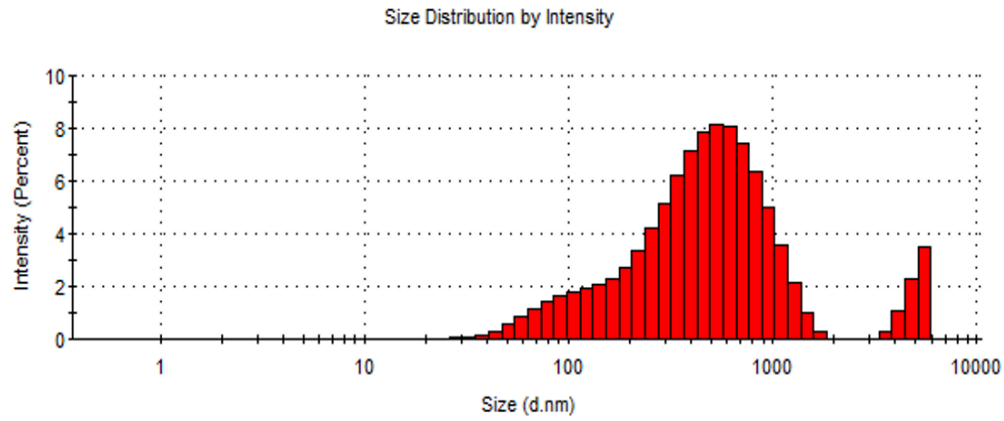
Şekil 3.26. Homojenizasyon işleminin formülasyonların partikül büyüklükleri üzerine etkisi.



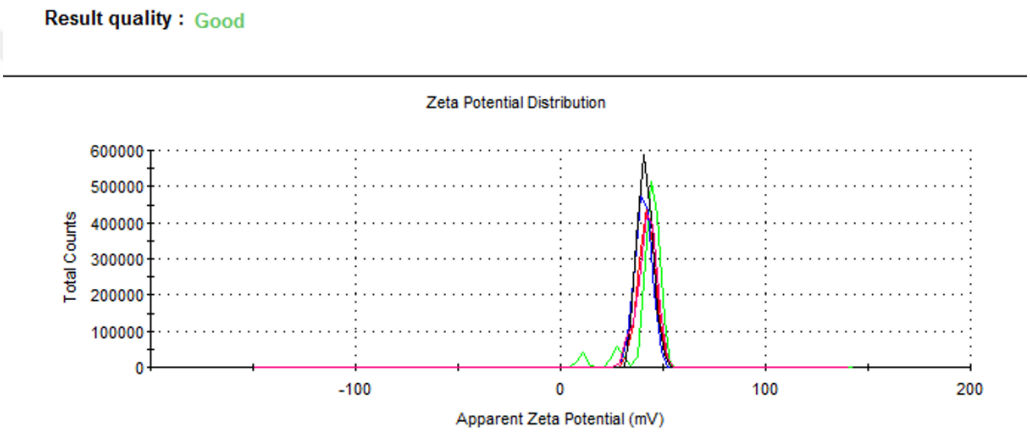
Şekil 3.27. Homojenizasyon işleminin formülasyonların % enkapsülasyon etkinlikleri üzerine etkisi.

Optimum Formülasyonun Belirlenmesi

BER-KM31 kodlu formülasyon enkapsülasyon etkinliğinin hazırlanan diğer formülasyonlara göre belirgin derecede yüksek olması, partikül büyüklüğünün küçük olması, polidispersite indeksi değerinin düşük olması ve zeta potansiyel değerinin uygun olması nedeniyle BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları arasında optimum formülasyon olarak seçilmiştir. BER-KM31 formülasyonuna ait partikül boyutu dağılımı Şekil 3.28'de ve zeta potansiyeline ait grafik Şekil 3.29'da verilmiştir.



Şekil 3.28. BER-KM31 formülasyonuna ait partikül boyutu dağılımı.



Şekil 3.29. BER-KM31 formülasyonuna ait zeta potansiyeli grafiği.

Formülasyonun Tekrarlanabilirliğine ait Bulgular

Formülasyonlar arasından optimum seçilen BER-KM31 formülasyonunun aynı koşullarda her zaman aynı özelliklerde üretilebilir olduğunun değerlendirilmesi amacıyla tekrarlanabilirlik çalışması yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında BER- KM31 formülasyonu üç kez hazırlanarak enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. Bu ölçümlere ait sonuçlar Çizelge 3.19'da verilmiştir.

Çizelge 3.19. BER-KM31 formülasyonunun tekrarlanabilirliğine ait karakterizasyon sonuçları (Ortalama ± SS).

Formül kodu	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu (nm)	Polidispersite indeksi	% Enkapsülasyon etkinliği
BER-KM31-1	42,0 ± 3,30	412 ± 25,2	0,475 ± 0,105	30,1 ± 1,23
BER-KM31-2	41,2 ± 3,23	432 ± 28,6	0,449 ± 0,0781	28,8 ± 2,08
BER-KM31-3	40,3 ± 3,16	405 ± 13,4	0,460 ± 0,147	30,4 ± 2,14
%BSS	2,07	3,37	2,83	2,86

3.3.3. BER Fosfolipid Kompleksi Yüklü Kitozan Mikropartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları Bölüm 2.7.3'te anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartiküllerin enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. Bu analizlere ait sonuçlar Çizelge 3.20'de verilmiştir.

Çizelge 3.20. BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının karakterizasyonlarına ait bulgular (n=3, Ortalama ± SS).

Formül kodu	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu (nm)	Polidispersite indeksi	% Enkapsülasyon etkinliği
BER-FM1	34,7 ± 0,833	883 ± 193	0,647 ± 0,011	10,7 ± 0,901
BER-FM2	29,5 ± 0,850	665 ± 230	0,661 ± 0,039	42,8 ± 0,799
BER-FM3	6,50 ± 0,721	624 ± 93,5	0,576 ± 0,053	59,1 ± 0,946
BER-FM4	13,5 ± 0,500	11334 ± 2845	0,471 ± 0,304	33,2 ± 2,43
BER-FM5	4,48 ± 2,80	867 ± 249	0,719 ± 0,112	47,4 ± 2,24
BER-FM6	3,53 ± 0,425	652 ± 194	0,664 ± 0,046	50,1 ± 3,16
BER-FM7	-0,389 ± 0,396	617 ± 373	0,616 ± 0,165	53,1 ± 2,09
BER-FM8	3,53 ± 2,17	848 ± 297	0,709 ± 0,149	52,7 ± 0,194
BER-FM9	0,438 ± 0,0480	1697 ± 906	0,851 ± 0,258	32,1 ± 2,30
BER-FM10	7,69 ± 1,93	15434 ± 4039	0,566 ± 0,165	34,9 ± 0,139

BER-FM1-BER-FM10 formülasyonlarında % TPP çözeltisi konsantrasyonu, kitozan çözeltisinin pH değeri, sonikasyon ve ultrasonik banyoda bekletme işlemi formülasyon parametreleri ve bunlara karşılık formülasyonların karakteristik

özellikleri Çizelge 3.20'deki bulgular olmak üzere bu sonuçlar istatiksel programda t testi ve ANOVA testi ile değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda her bir parametre için bulunan p değerleri Çizelge 3.21'de verilmiştir.

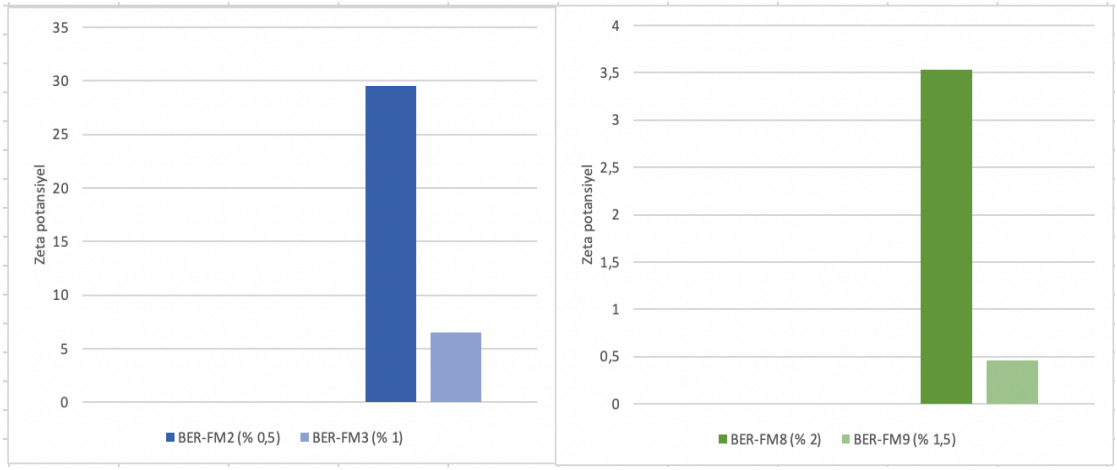
Çizelge 3.21. BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının istatiksel değerlendirilmeleri sonucu elde edilen p değerleri.

	Zeta potansiyeli	**Partikül boyutu**	**Polidispersite indeksi**	**% Enkapsülasyon etkinliği**
% TPP çözeltisi konsantrasyonu	<0,0001*	0,7891	0,0889	<0,0001*
Kitozan çözeltisi pH değeri	0,0016*	0,2770	0,5818	<0,0001*
Sonikasyon	0,0002*	0,0029*	0,5873	<0,0001*
Ultrasonik banyo uygulaması	0,0028*	0,5853	0,4321	0,0012*

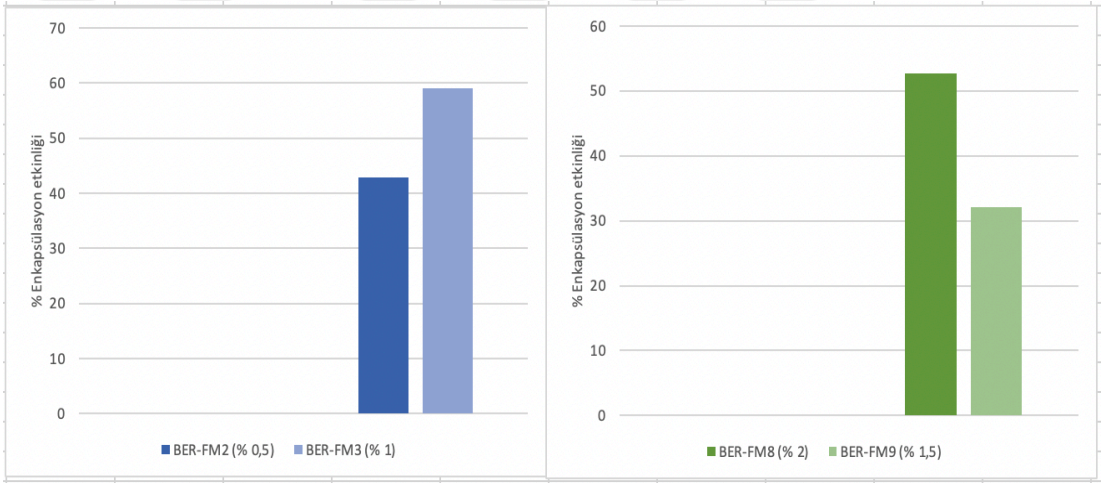
*p<0,05

% TPP Çözeltisi Konsantrasyonunun Etkisi

Hazırlanan BER-FM2 (% 0,5) ve BER-FM3 (% 1), BER-FM8 (% 2) ve BER-FM9 (% 1,5) formülasyonlarında farklı % TPP çözeltisi konsantrasyonlarının formülasyonların fizikokimyasal özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirildiğinde % TPP çözeltisi konsantrasyonunun formülasyonların zeta potansiyelleri ve % enkapsülasyon etkinlikleri üzerine anlamlı etkisinin olduğu görülmüştür ($p<0,05$). % TPP çözeltisi konsantrasyonunun bu formülasyonların zeta potansiyelleri ve % enkapsülasyon etkinlikleri üzerine olan etkileri Şekil 3.30 (zeta potansiyeline etkisi) ve Şekil 3.31 (% enkapsülasyon etkinliğine etkisi)'de grafik üzerinde gösterilmiştir.



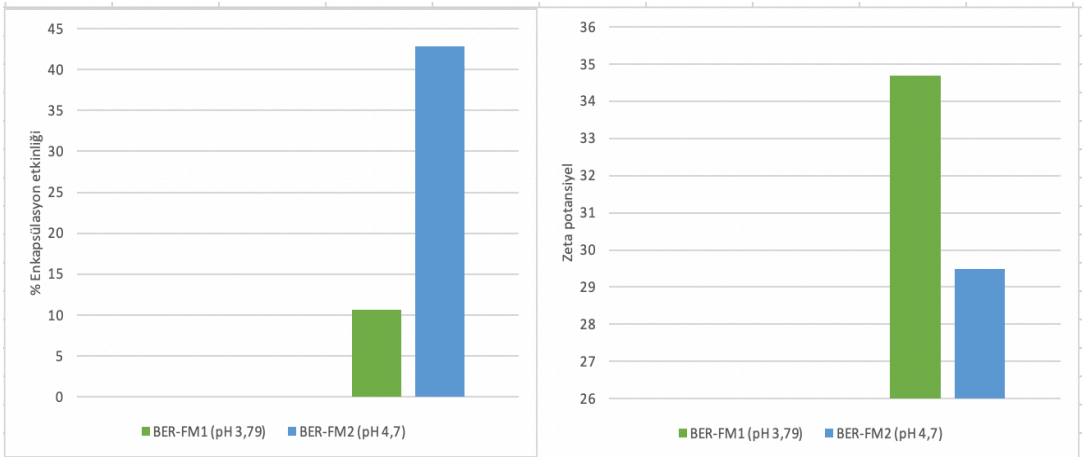
Şekil 3.30. % TPP çözeltisi konsantrasyonunun formülasyonların zeta potansiyelleri üzerine etkisi.



Şekil 3.31. % TPP çözeltisi konsantrasyonunun formülasyonların % enkapsülasyon etkinlikleri üzerine etkisi.

Kitozan Çözeltisinin pH Değerinin Etkisi

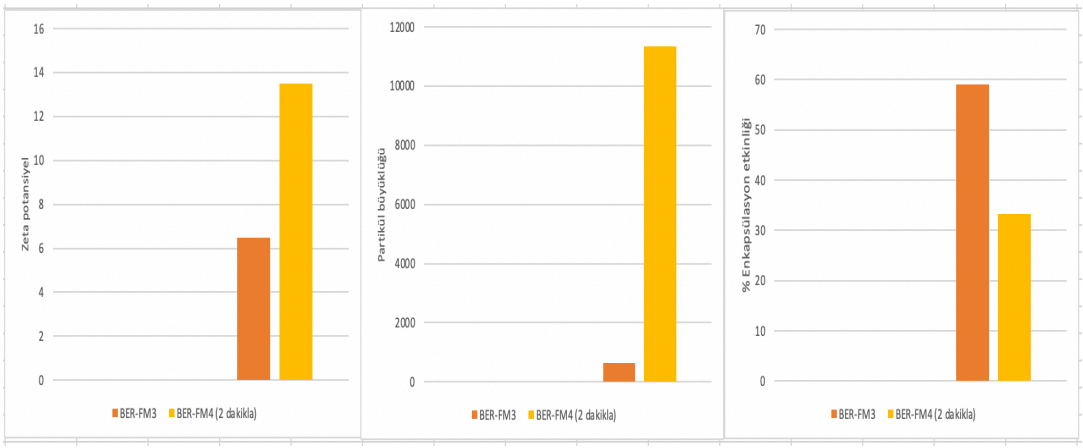
Hazırlanan BER-FM1 (pH 3,79) ve BER-FM2 (pH 4,7) formülasyonlarında diğer formülasyon parametreleri sabit tutularak farklı kitozan çözeltisi pH değerlerinin etkisi değerlendirilmiştir. Formülasyonların karakteristik özellikleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kitozan çözeltisinin pH değerinin zeta potansiyel ve % enkapsülasyon etkinliği üzerine anlamlı etkisinin olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Kitozan çözeltisi pH değerinin formülasyonların zeta potansiyel ve % enkapsülasyon etkinliği üzerine olan etkisini gösteren grafikler Şekil 3.32'de verilmiştir.



Şekil 3.32. Kitozan çözeltisi pH değerinin formülasyonların % enkapsülasyon etkinlikleri (sol) ve zeta potansiyelleri (sağ) üzerine etkisi.

Sonikasyon İşleminin Etkisi

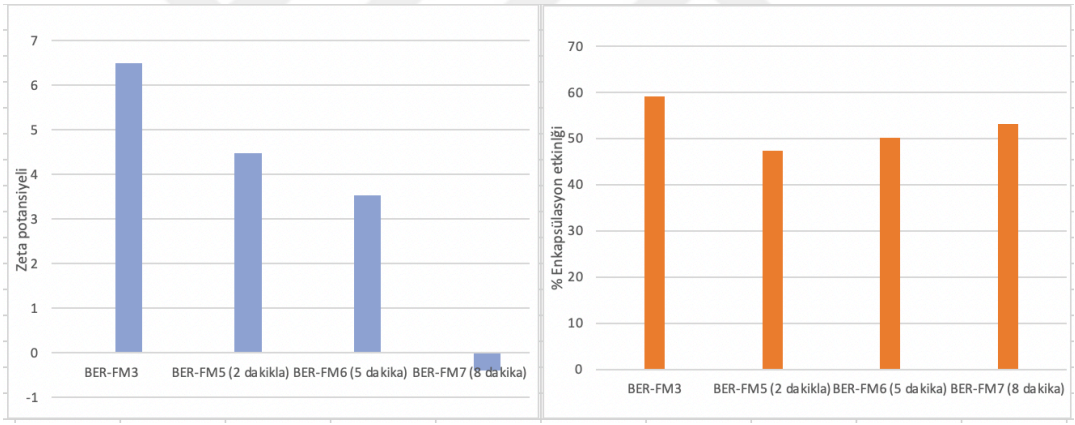
BER-FM3 formülasyonuna 2 dakika sonikasyon işlemi uygulanarak BER-FM4 formülü hazırlanmıştır. Bu formülasyonların karakteristik özellikleri ölçülerek istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İstatiksel analiz sonucunda sonikasyon işleminin formülasyonların zeta potansiyelleri, partikül büyüklüğü ve % enkapsülasyon etkinlikleri üzerinde anlamlı etkisi olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Sonikasyonun formülasyonların zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü ve % enkapsülasyon etkinliği üzerine olan etkisini gösteren grafikler Şekil 3.33'te verilmiştir.



Şekil 3.33. Sonikasyon işleminin formülasyonların zeta potansiyelleri (sol), partikül büyüklükleri (orta) ve % enkapsülasyon etkinlikleri (sağ) üzerine etkisi.

Ultrasonik Banyo Uygulamasının Etkisi

BER-FM3 formülasyonu baz alınarak diğer formülasyon parametreleri değiştirilmeden farklı sürelerden ultrasonik banyo uygulaması yapılarak BER-FM5 (2 dakika), BER-FM6 (5 dakika) ve BER-FM7 (8 dakika) formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların karakteristik özelikleri değerlendirilmiş ve istatiksel olarak analiz edilmiştir. Analiz sonucunda ultrasonik banyo uygulamasının formülasyonların zeta potansiyelleri ve % enkapsülasyon etkinlikleri üzerine anlamlı etkisi olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Ultrasonik banyo uygulamasının formülasyonların zeta potansiyelleri ve % enkapsülasyon etkinlikleri üzerine olan etkisini gösteren grafikler Şekil 3.34'te verilmiştir.

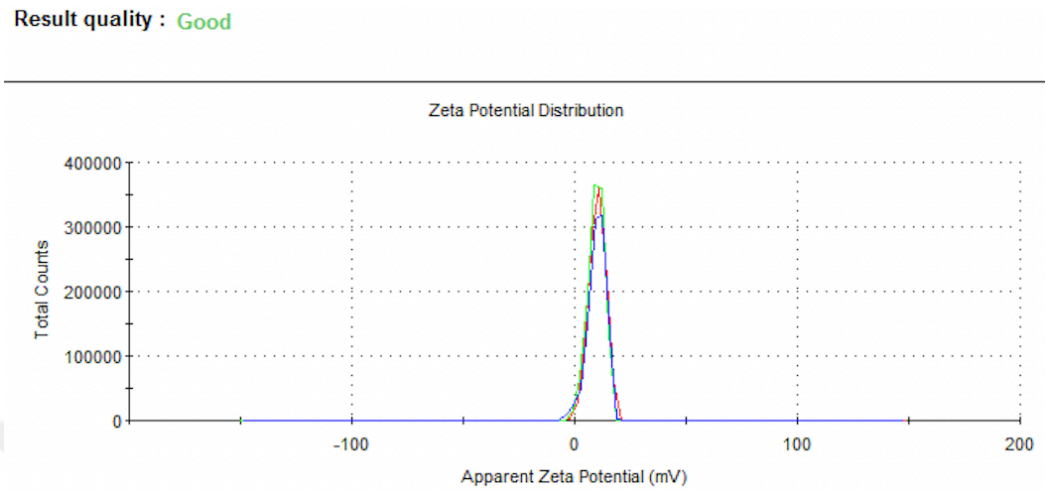


Şekil 3.34. Ultrasonik banyo uygulamasının formülasyonların zeta potansiyelleri (sol) ve % enkapsülasyon etkinlikleri (sağ) üzerine etkisi.

Optimum Formülasyonun Belirlenmesi

Yapılan değerlendirmeler sonucunda BER-FM3 formülasyonu enkapsülasyon etkinliğinin hazırlanan diğer formülasyonlara göre belirgin derecede yüksek olması, partikül büyüklüğünün küçük olması, polidispersite indeksi değerinin düşük olması ve zeta potansiyel değerinin uygun olması nedeniyle BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları arasında optimum formülasyon olarak

seçilmiştir. BER-FM3 formülasyonuna ait zeta potansiyelini gösteren grafik Şekil 3.35'te verilmiştir.



Şekil 3.35. BER-FM3 formülasyonuna ait zeta potansiyeli grafiği.

Formülasyonun Tekrarlanabilirliğine ait Bulgular

Formülasyonlar arasından optimum seçilen BER-FM3 formülasyonunun aynı koşullarda her zaman aynı özelliklerde üretilebilir olduğunun değerlendirilmesi amacıyla tekrarlanabilirlik çalışması yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında BER- FM3 formülasyonu üç kez hazırlanarak enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. Bu ölçümlere ait sonuçlar Çizelge 3.22'de verilmiştir.

Çizelge 3.22. BER-FM3 formülasyonunun tekrarlanabilirliğine ait karakterizasyon sonuçları (Ortalama ± SS).

Formül kodu	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu (nm)	Polidispersite indeksi	% Enkapsülasyon etkinliği
BER-FM3-1	6,38 ± 2,34	664 ± 56,1	0,562 ± 0,398	59,0 ± 0,568
BER-FM3-2	6,40 ± 1,79	631 ± 43,6	0,554 ± 0,345	56,4 ± 0,305
BER-FM3-3	6,54 ± 0,260	630 ± 65,2	0,533 ± 0,0880	58,4 ± 0,289
% BSS	1,35	3,02	2,72	2,35

3.4. Optimum Formülasyonların Seçilmesi

Elde edilen bulguları yukarıda sunulan formülasyon çalışmalarının ardından seçilen BER fosfolipid kompleksi (BER-F3), BER yüklü kitozan mikropartikül (BER-KM31) ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül (BER-FM3) formülasyonlarının *in vitro* özellikleri Çizelge 3.23'te verilmiştir.

Çizelge 3.23. Optimum seçilen BER fosfolipid kompleksi, BER yüklü kitozan mikropartikül ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarına ait özellikler (Ortalama ± SS).

Formülasyon özellikleri	BER-F3	BER-KM31	BER-FM3
% Enkapsülasyon etkinliği	81,2 ± 3,41	31,5 ± 0,384	59,1 ± 0,946
Zeta potansiyel (mV)	-24,3 ± 1,68	41,6 ± 0,838	6,50 ± 0,721
Partikül büyüklüğü (nm)	244 ± 21,9	406 ± 25,2	624 ± 93,5
Polidispersite indeksi	0,305 ± 0,05	0,462 ± 0,105	0,576 ± 0,053
% İşlem verimi	46,3 ± 0,523	21,4 ± 0,471	46,2 ± 0,688
% Etkin madde içeriği	59,9 ± 1,94	11,5 ± 0,179	3,86 ± 0,00950

3.5. Optimum Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

3.5.1. Çözünürlük Tayini

Çözünürlük analizleri Bölüm 2.10.1'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. BER ve BER fosfolipid kompleksi çözünürlüklerine ait sonuçlar Çizelge 3.24'te sunulmuştur.

Çizelge 3.24. BER ve BER fosfolipid kompleksine ait çözünürlük değerleri (n=3, Ortalama±SS).

Etkin madde ve Formülasyon	Çözünürlük (mg/ml)			
	Su/25 ºC	Su/37 ºC	pH 6,8 fosfat tamponu/25 ºC	pH 6,8 fosfat tamponu/37 ºC
BER	1,47 ± 0,0780	2,72 ± 0,212	1,65 ± 0,0280	3,15 ± 0,164
BER-F3	0,708 ± 0,177	1,77 ± 0,124	0,730 ± 0,174	1.95 ± 0,347

3.5.2. Partisyon Katsayısı Tayini

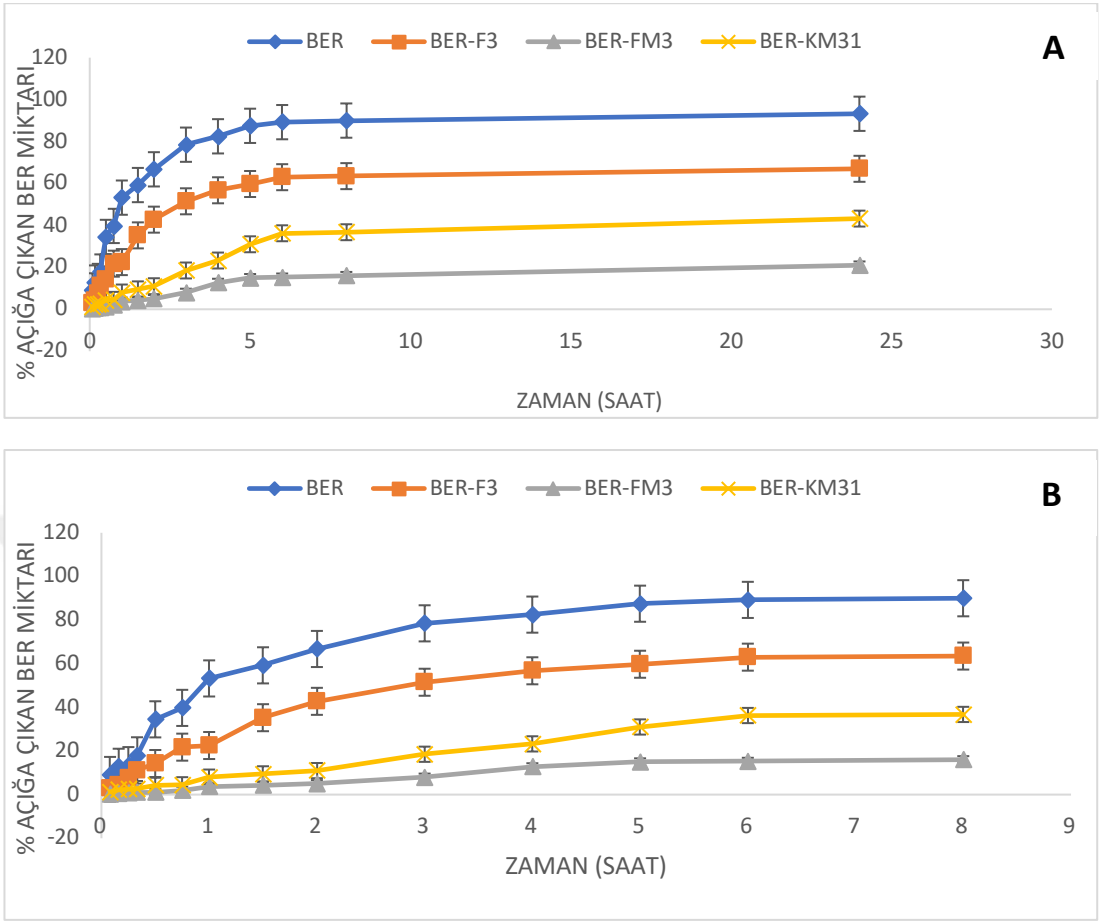
Partisyon katsayıları ($P_{y/s}$) Bölüm 2.10.2'de anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. BER, Fiziksel karışım (1:2) ve BER fosfolipid kompleksinin partisyon katsayılarına ait sonuçlar Çizelge 3.25'te sunulmuştur.

Çizelge 3.25. Partisyon katsayısı değerleri (n=3, Ortalama±SS).

Etkin madde ve Formülasyon	Partisyon Katsayısı
BER	0,0246 ± 0,0016
Fiziksel karışım	0,236 ± 0,0326
BER-F3	0,674 ± 0,101

3.5.3. *İn Vitro* Çözünme Hızı Çalışmaları

Formülasyonlardan etkin maddenin çözünme hızı çalışmaları Bölüm 2.10.3'te anlatıldığı şekilde diyaliz membran yöntemiyle yapılmıştır. Formülasyonlardan BER'in çözünme hızı grafiği Şekil 3.36'da gösterilmiştir.



Şekil 3.36. BER, BER-F3, BER-FM3 ve BER-KM31 formülasyonlarına ait 24 saatlik (A) ve 8 saatlik (B) etkin madde salım profilleri (n=3).

3.5.4. Formülasyonlardan Etkin Madde Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi

İn vitro etkin madde salım çalışmalarından elde edilen veriler formülasyonlardan etkin madde salımının uyum sağladığı salım kinetiklerinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 2.10.4'te verilen şekilde analiz edilmiştir. Analizi yapılan farklı salım kinetiği sonuçları Çizelge 3.26'da verilmiştir.

Çizelgede yer alan kısaltmaların açıklaması:

k_r^0: Sıfır derece salım kinetiği hız sabiti (mg/sa)

k_r^1: Birinci derece salım kinetiği hız sabiti (sa^{-1})

kH: Higuchi kinetiği salım hızı sabiti

k_p: Korsmeyer Peppas kinetiği salım hızı sabiti

k_{HC}: Hixson Crowell kinetiği salım hızı sabiti

r^2: Determinasyon katsayısı

β: Şekil faktörü

n: Difüzyonal sabit

τ_d: Etkin maddenin %63,2'sinin salınması için geçen süre (sa)

SH: Salım hızı sabitlerinin standart hatası

AIC: Akaike Ölçütü

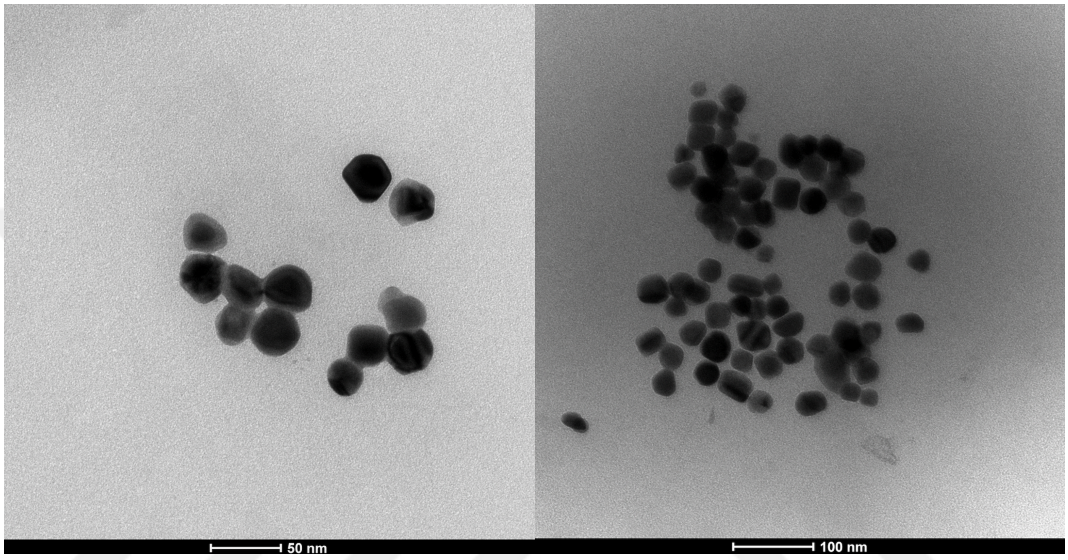
MSC: Model seçim kriteri

Çizelge 3.26. Formülasyonların *in vitro* salım hızı kinetik verileri.

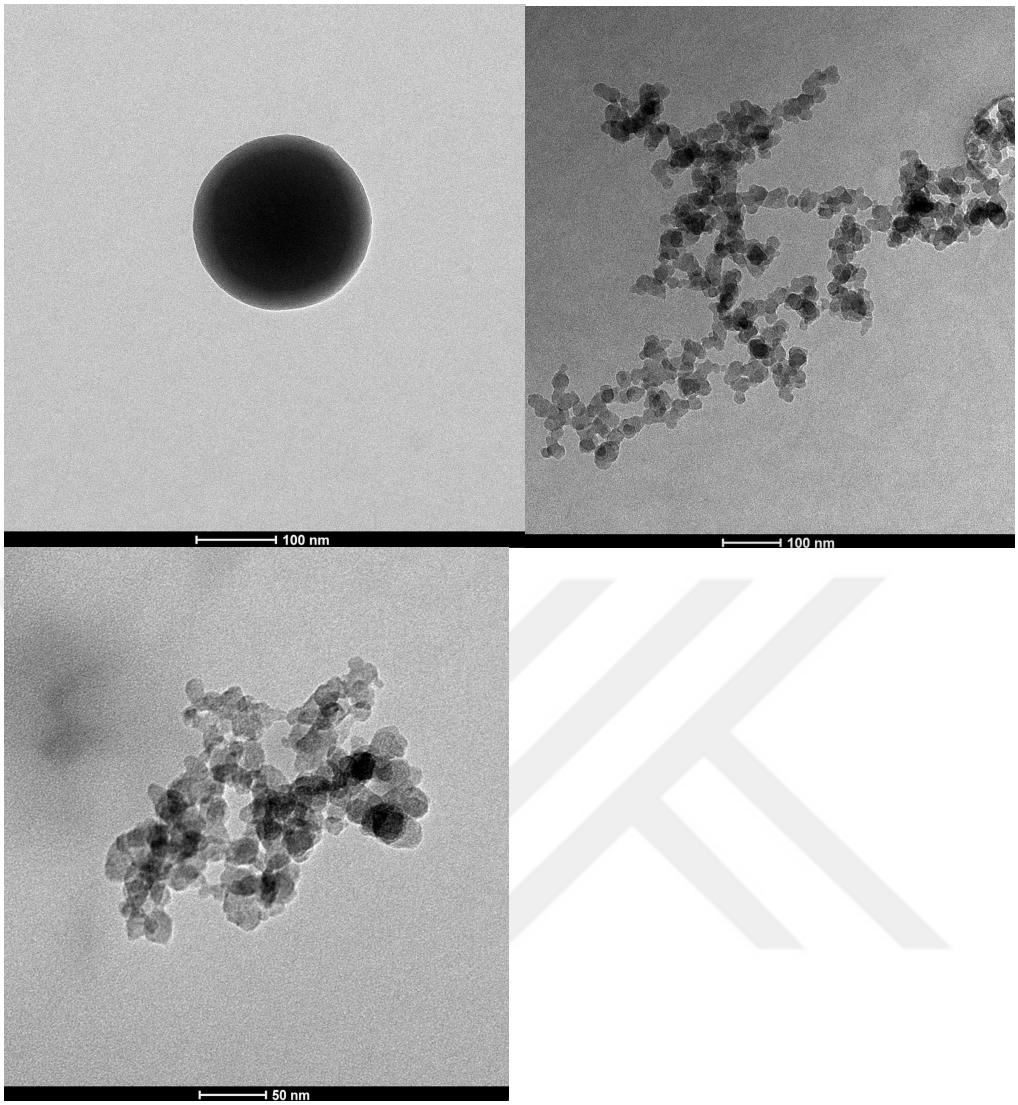
KİNETİK MEKANİZMA		FORMÜLLER		
		BER-F3	**BER-KM31**	**BER-FM3**
Sıfır Derece Salım Kinetiği	k_r^0	4,59	2,60	1,22
	r^2	0,389	0,386	0,463
	SH	0,0798	0,017	0,028
	MSC	-0,462	0,354	0,490
	AIC	141,9	114,9	90,6
Birinci Derece Salım Kinetiği	k_r^1	0,108	0,049	0,014
	r^2	0,529	0,665	0,546
	SH	0,003	0,0004	0,0003
	MSC	0,621	0,959	0,657
	AIC	125,7	105,9	88,1
Higuchi Kinetiği	kH	20,8	10,7	4,95
	r^2	0,701	0,865	0,879
	SH	0,410	0,056	0,102
	MSC	1,08	1,87	1,98
	AIC	118,8	92,2	68,2
Hixon Crowell Kinetiği	k_{HC}	0,0307	0,015	0,004
	r^2	0,401	0,551	0,520
	SH	0,0008	0,0001	0,0001
	MSC	0,380	0,669	0,603
	AIC	129,3	110,2	88,9
Korsmeyer Peppas Kinetiği	k_p	23,1	11,1	3,75
	n	0,663	0,362	0,513
	r^2	0,926	0,716	0,722
	SH	0,478	0,327	0,144
	MSC	2,36	1,07	1,10
	AIC	73,4	104,3	81,5
Weibull Kinetiği	β	0,691	0,726	0,842
	τ_d	6,92	29,8	103,2
	r^2	0,875	0,839	0,633
	SH	0,151	2,18	11,7
	MSC	1,843	1,59	0,758
	AIC	107,3	96,5	86,6

3.5.5. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile Görüntüleme

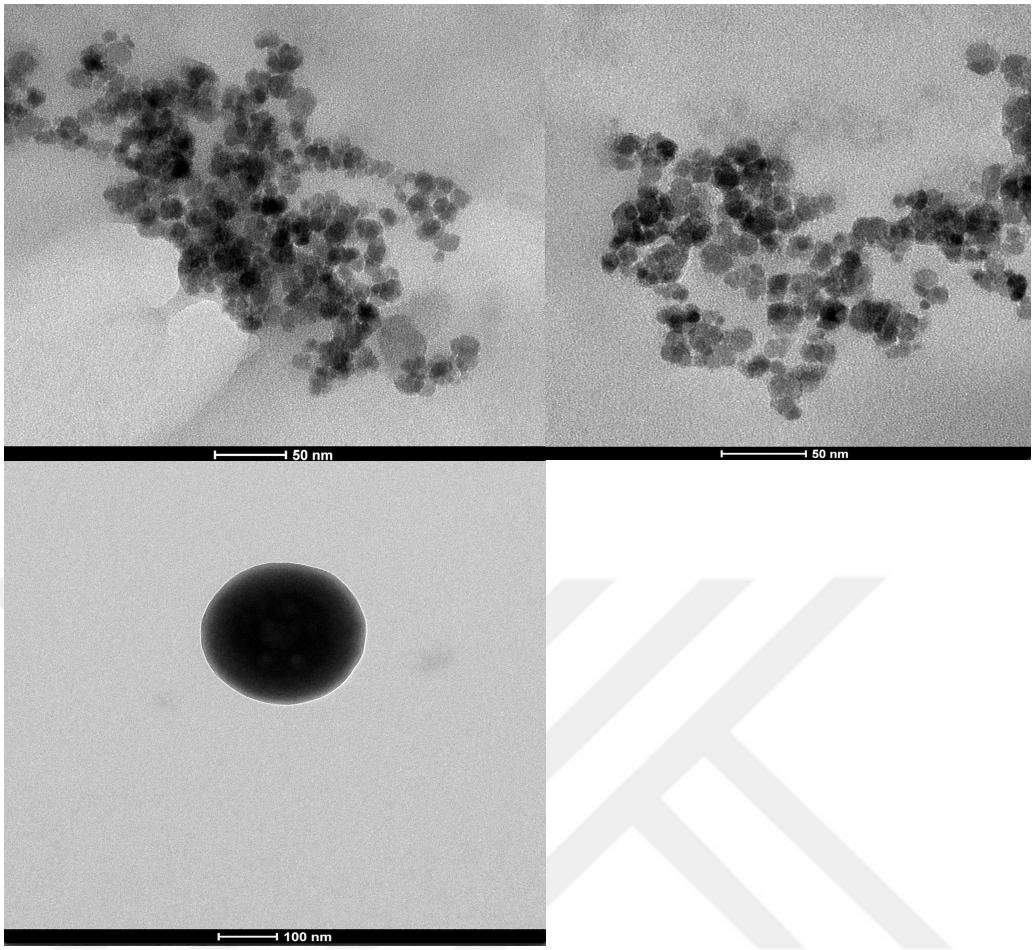
Hazırlanan BER fosfolipid kompleksi, BER yüklü kitozan mikropartikül ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarına ait TEM görüntüleri Şekil 3.37 (BER-F3), Şekil 3.38 (BER-KM31) ve Şekil 3.39 (BER-FM3)'de verilmiştir.



Şekil 3.37. BER-F3 formülasyonuna ait TEM görüntüleri.



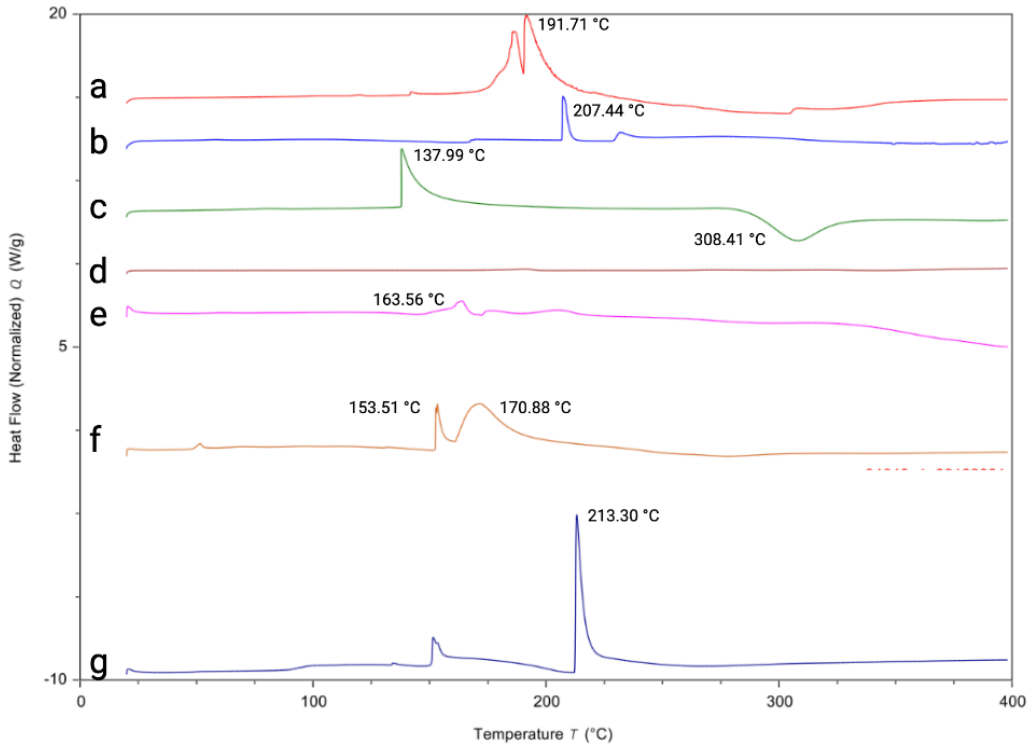
Şekil 3.38. BER-KM31 formülasyonuna ait TEM görüntüleri.



Şekil 3.39. BER-FM3 formülasyonuna ait TEM görüntüleri.

3.5.6. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

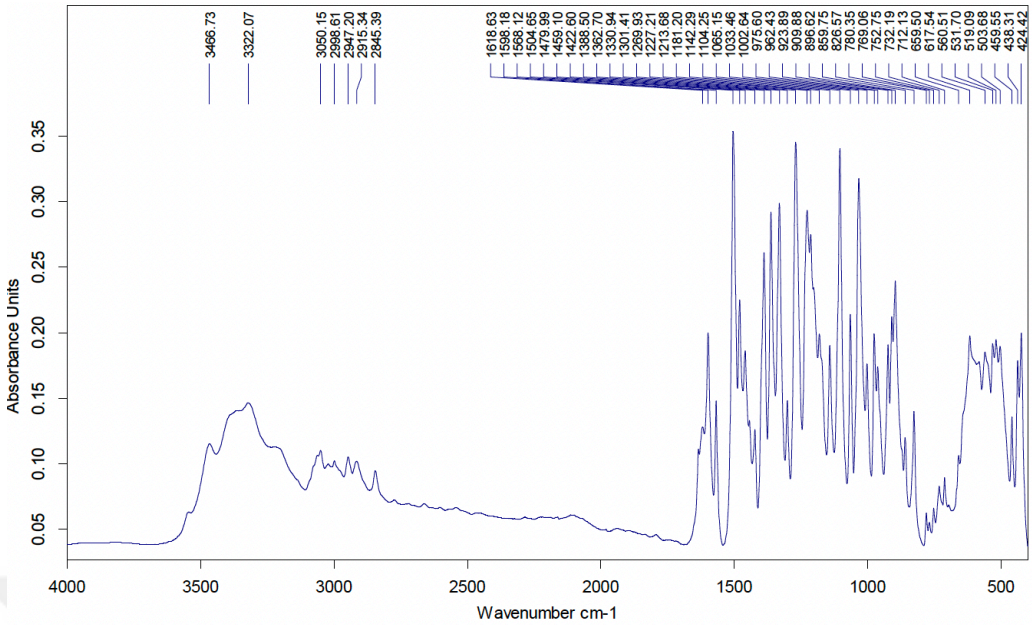
BER, fosfolipid, kitozan, TPP, BER fosfolipid kompleksi (BER-F3), BER yüklü kitozan mikropartikül (BER-KM31) ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül (BER-FM3) formülasyonlarının DSC analizleri Bölüm 2.10.6'da anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Elde edilen termogramlar Şekil 3.40'te gösterilmiştir.



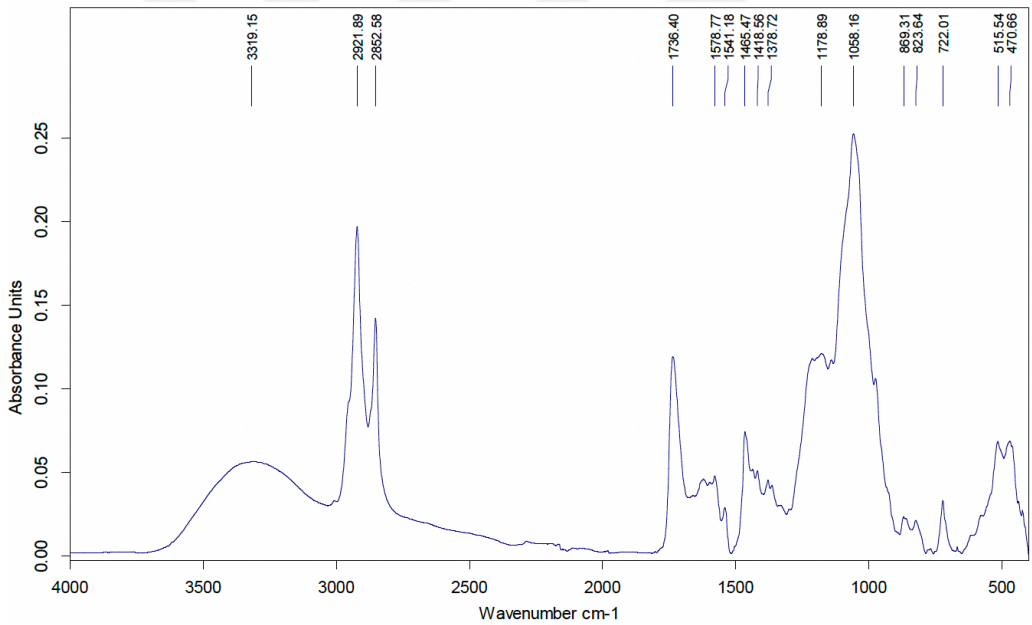
Şekil 3.40. DSC termogramları a) BER b) Fosfolipid c) Kitozan d) TPP e) BER-F3 kodlu formülasyon f) BER-KM31 kodlu formülasyon g) BER-FM3 kodlu formülasyon.

3.5.7. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

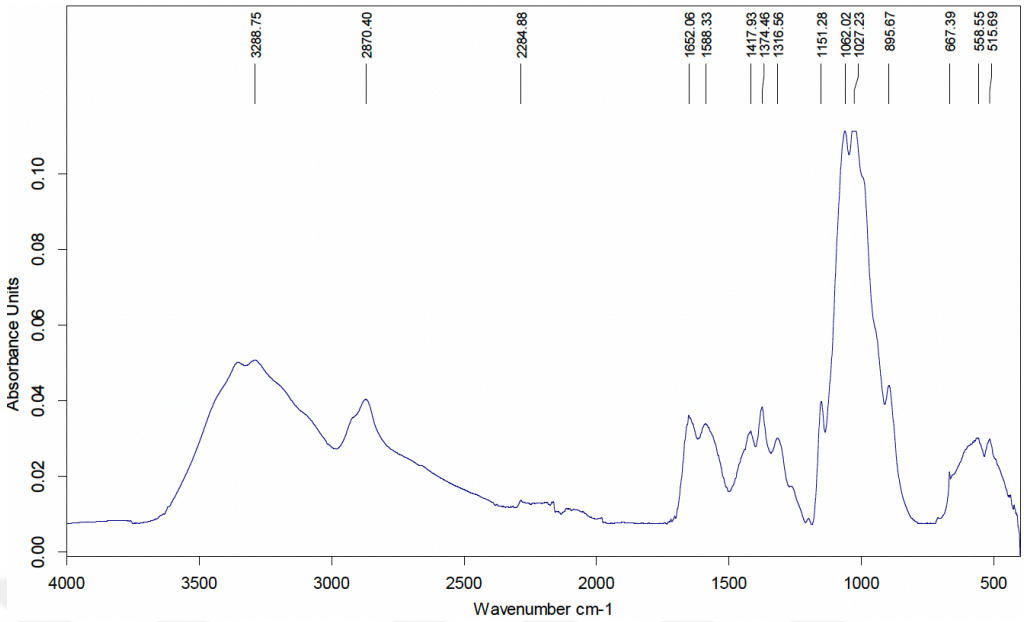
BER, fosfolipid, kitozan, TPP'nin ve BER-F3, BER-KM31, BER-FM3 kodlu formülasyonların FTIR analizi Bölüm 2.10.7'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır ve sonuçlar Şekil 3.41-3.47'de gösterilmiştir.



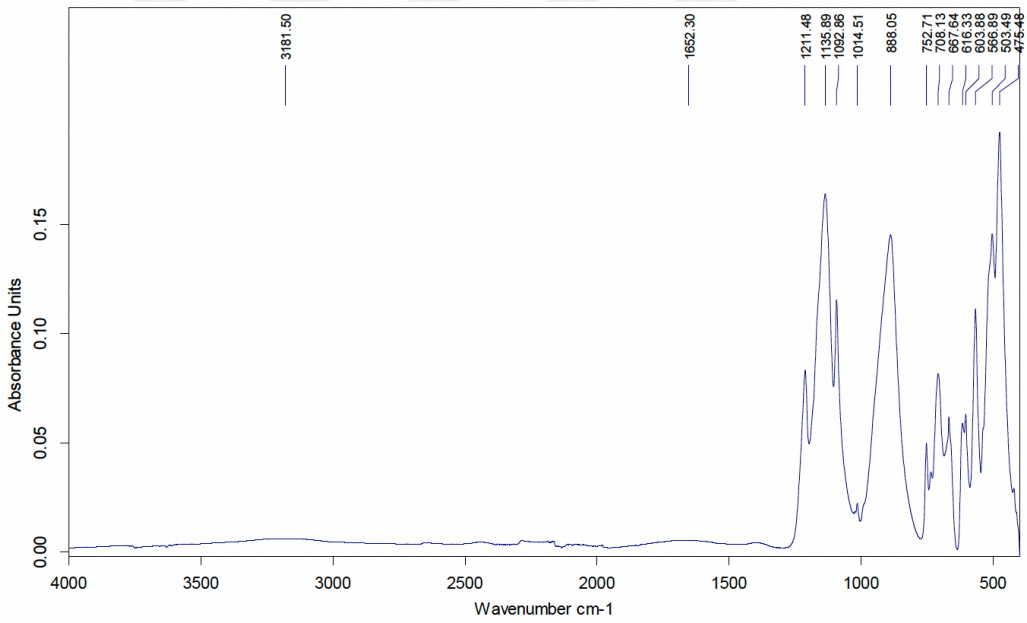
Şekil 3.41. BER'in FTIR spektrumu.



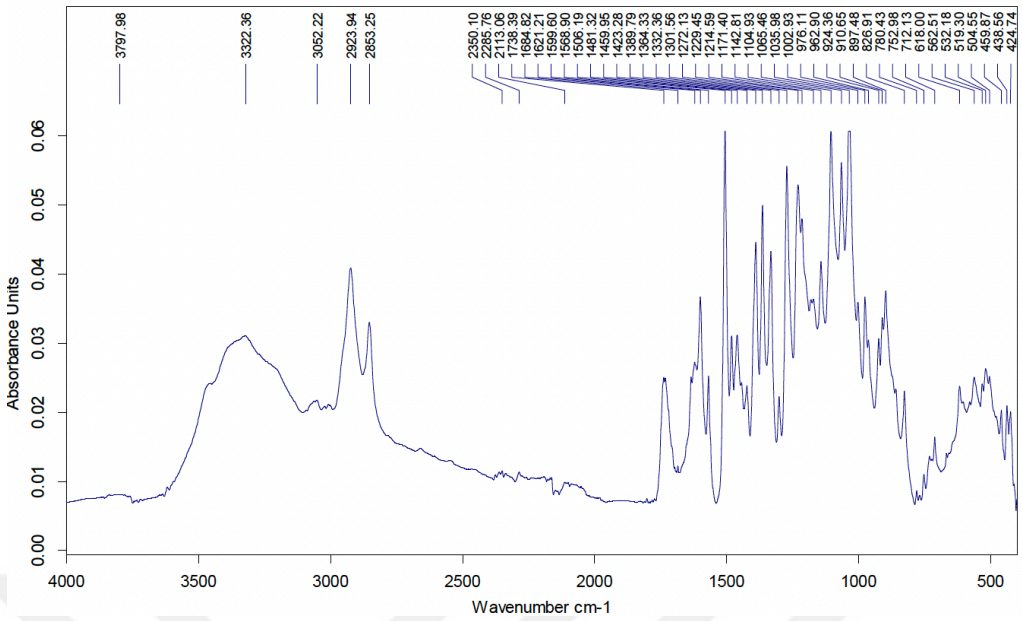
Şekil 3.42. Fosfolipid FTIR spektrumu.



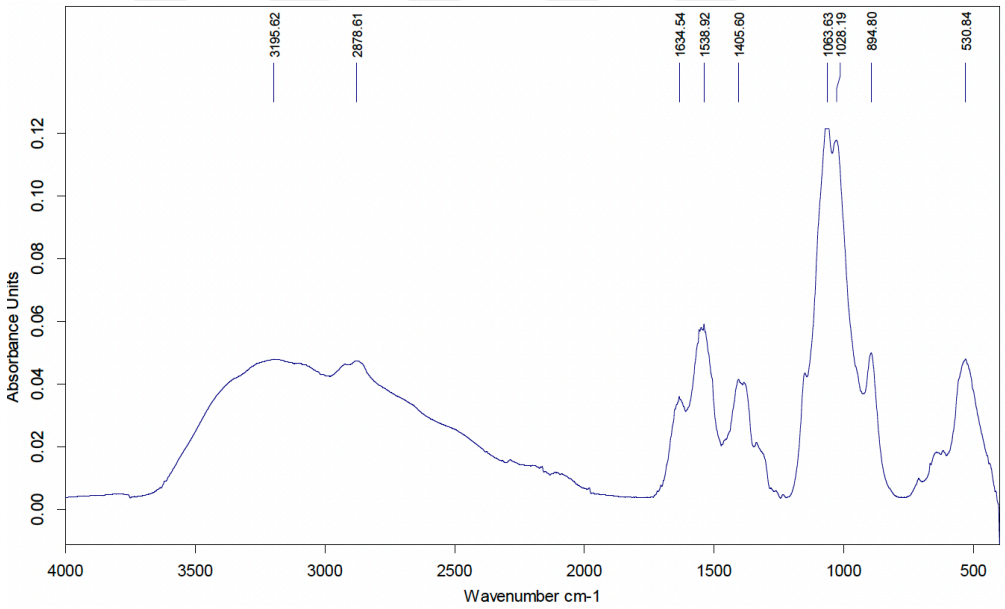
Şekil 3.43. Kitozanın FTIR spektrumu.



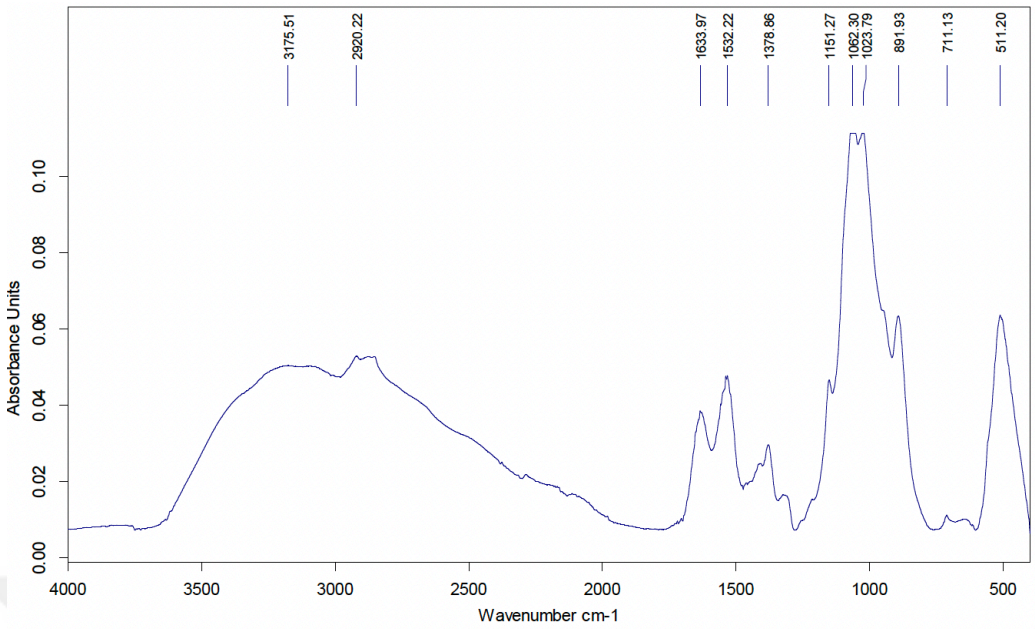
Şekil 3.44. TPP'nin FTIR spektrumu.



Şekil 3.45. BER-F3 formülasyonunun FTIR spektrumu.



Şekil 3.46. BER-KM31 formülasyonunun FTIR spektrumu.



Şekil 3.47. BER-FM3 formülasyonunun FTIR spektrumu.

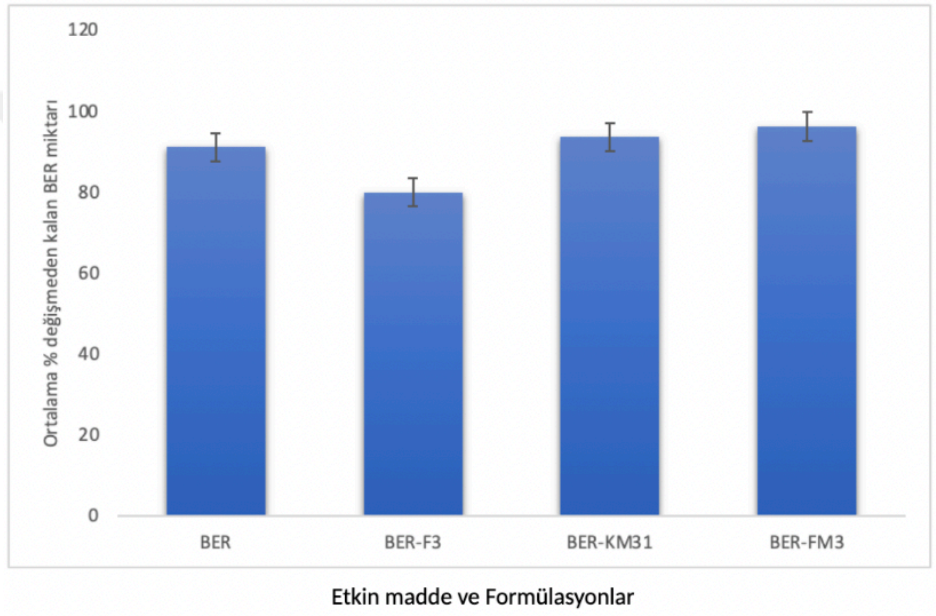
3.6. Stabilite Çalışmaları

3.6.1. Simüle Gastrik Sıvılarda Stabilite Analizleri

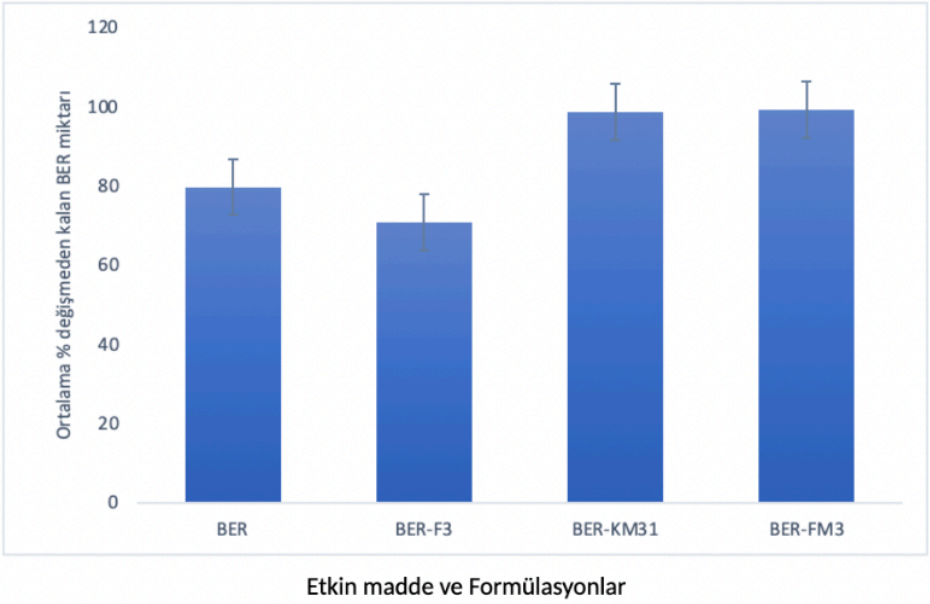
BER, BER fosfolipid kompleksi (BER-F3), BER yüklü kitozan mikropartikül (BER-KM31) ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül (BER-FM3) formülasyonlarının Bölüm 2.11.1'de anlatıldığı şekilde simüle vücut sıvılarında stabilite analizleri yapılmıştır. Simüle gastrik sıvı ortamında enzim olarak pepsin ve simüle intestinal sıvı ortamında enzim olarak pankreatin kullanılmıştır. Simüle gastrik sıvı (pH 1,2) ortamında 2 saat ve simüle intestinal sıvı (pH 6,8) ortamında 6 saat sonunda bozunmadan kalan % BER miktarları Şekil 3.48 ve Şekil 3.49'da grafiklerde sunulmuştur. BER ve formülasyonlar için simüle vücut ortamlarında parçalanmadan kalan BER miktarları Çizelge 3.27'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.27. BER ve formülasyonlarda simüle vücut ortamlarında parçalanmadan kalan BER miktarları (n=3, Ortalama±SS).

Etkin madde ve Formülasyonlar	Ortalama % değişmeden kalan BER miktarı	
	Simüle gastrik sıvı pH 1,2 ortamı	Simüle intestinal sıvı pH 6,8 ortamı
BER	91,0 ± 0,005	79,8 ± 0,041
BER-F3	79,9 ± 0,004	70,7 ± 0,047
BER-KM31	93,6 ± 0,011	98,6 ± 0,002
BER-FM3	96,1 ± 0,004	99,3 ± 0,001



Şekil 3.48. Simüle gastrik sıvı (pH 1,2) ortamında % değişmeden kalan BER miktarları (n=3).



Şekil 3.49. Simüle intestinal sıvı (pH 6,8) ortamında % değişmeden kalan BER miktarları (n=3).

3.6.2. Buzdolabı ve Oda Sıcaklığında Uzun Süreli Stabilite Analizleri

BER fosfolipid kompleksi, BER yüklü kitozan mikropartikül ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropatikül formülasyonlarının stabiliteleri Bölüm 2.11.2'de anlatıldığı şekilde farklı sıcaklık koşulları altında incelenmiştir. 1., 3., ve 6. ayların sonunda formülasyonların % enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüş ve Çizelge 3.28-3.30'da sunulmuştur.

Çizelge 3.28. BER-F3 formülasyonuna ait stabilite bulguları (Ortalama±SS).

Stabilite koşulları	Süre	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu (nm)	Polidispersite indeksi	% Enkapsülasyon etkinliği
	Başlangıç	-23,0 ± 0,265	245 ± 7,91	0,380 ± 0,06	81,5 ± 2,56
5 °C ± 3 °C	**1. Ay**	-24,1 ± 1,10	291 ± 45,5	0,405 ± 0,05	78,9 ± 3,35
	3. Ay	-24,5 ± 2,33	300 ± 12,3	0,489 ± 0,08	77,7 ± 4,76
	6. Ay	-27,7 ± 0,0821*	312 ± 22,0*	0,566 ± 0,02	76,3 ± 1,45
25 °C ± 2 °C, % 60 BN ± % 5	**1. Ay**	-22,4 ± 1,20	238 ± 18,0	0,489 ± 0,14	78,0 ± 5,67
	3. Ay	-28,7 ± 1,45**	276 ± 15,4	0,506 ± 0,11	77,2 ± 3,24
	6. Ay	-29,8 ± 2,48***	401 ± 38,2***	0,721 ± 0,093**	76,8 ± 2,56

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001, Başlangıç değerinden önemli derecede farklılık gösteren parametreler.

Çizelge 3.29. BER-KM31 formülasyonuna ait stabilite bulguları (Ortalama±SS).

Stabilite koşulları	Süre	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu (nm)	Polidispersite indeksi	% Enkapsülasyon etkinliği
	Başlangıç	40,8 ± 0,541	410 ± 15,2	0,451 ± 0,136	32,0 ± 0,453
5 °C ± 3 °C	**1. Ay**	41,1 ± 1,91	476 ± 23,3	0,508 ± 0,0768	31,5 ± 0,384
	3. Ay	44,6 ± 0,23	546 ±17,4*	0,568 ± 0,0621	28,7 ± 2,08
	6. Ay	47,3 ± 0,137*	547 ± 43,7*	0,614 ± 0,0522	28,1 ± 1,23
25 °C ± 2 °C, % 60 BN ± % 5	**1. Ay**	42,5 ± 1,45	442 ± 45,9	0,532 ± 0,154	31,1 ± 2,29
	3. Ay	45,6 ± 2,34	478 ± 65,1	0,540 ± 0,0810	29,0 ± 2,43
	6. Ay	51,4 ± 4,50***	566 ± 78,3**	0,547 ± 0,125	27,5 ± 1,67*

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001, Başlangıç değerinden önemli derecede farklılık gösteren parametreler.

Çizelge 3.30. BER-FM3 formülasyonuna ait stabilite bulguları (Ortalama±SS).

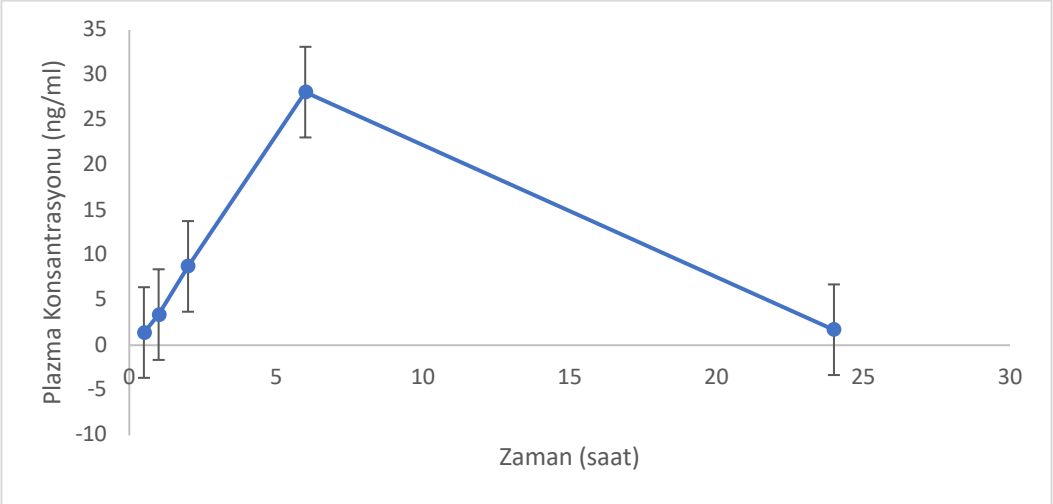
Stabilite koşulları	Süre	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu (nm)	Polidispersite indeksi	% Enkapsülasyon etkinliği
	Başlangıç	7,20 ± 0,651	658 ± 90,2	0,554 ± 0,0481	58,2 ± 1,248
5 °C ± 3 °C	**1. Ay**	6,28 ± 1,24	720 ±141	0,624 ± 0,132	55,7 ± 1,93
	3. Ay	5,85 ± 0,561	732 ± 120	0,615 ± 0,0874	54,2 ± 2,12
	6. Ay	5,43 ± 0,206*	951 ± 356	0,729 ± 0,0729	52,8 ± 4,93
25 °C ± 2 °C, % 60 BN ± % 5	**1. Ay**	6,91 ± 1,21	682 ± 125	0,523 ± 0,169	57,2 ± 1,04
	3. Ay	4,52 ± 0,0812**	715 ± 98,2	0,662 ± 0,0763	53,4 ± 2,74
	6. Ay	3,24 ± 0,107***	814 ± 98	0,845 ± 0,0602	50,5 ± 3,24*

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001, Başlangıç değerinden önemli derecede farklılık gösteren parametreler.

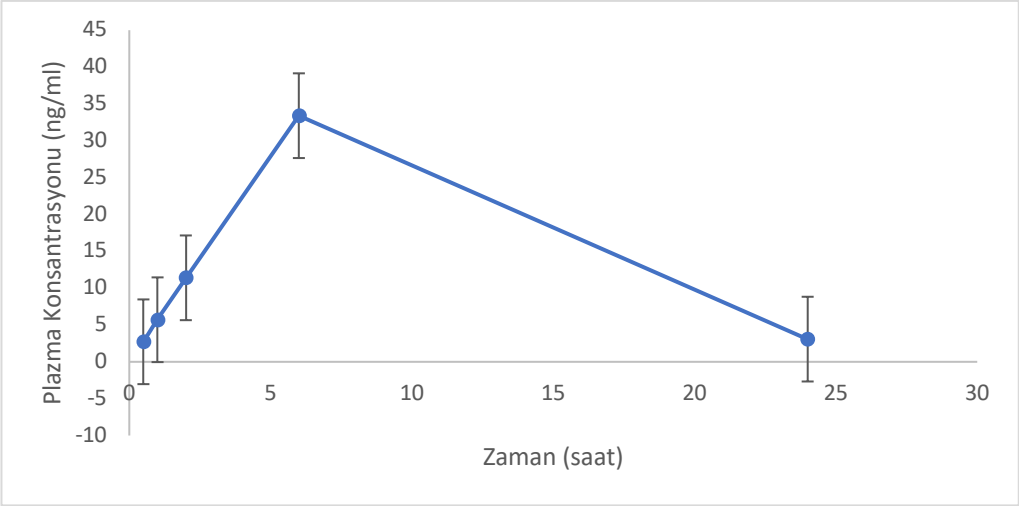
3.7. Formülasyonların *İn Vivo* Etkinliğinin İncelenmesine Ait Bulgular

İn vivo hayvan deneylerinde BER, uygulanan BER fosfolipid kompleksi, BER yüklü kitozan mikropartikül ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları için C_{max} değerleri ve t_{max} plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi üzerinden tespit edilmiştir. *İn vivo* çalışmalar Bölüm 2.12'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Plazma konsantrasyonu-zaman eğrilerinin altında kalan alanlar ($AUC_{0\rightarrow24}$) trapezoidal yöntem ile hesaplanmıştır. Deney sonucunda elde edilen değerlerin istatistiksel karşılaştırılması GraphPad Prism (GraphPad Prism Version 9.3.1) programında t testi ve tek yönlü ANOVA testi kullanılarak yapılmıştır.

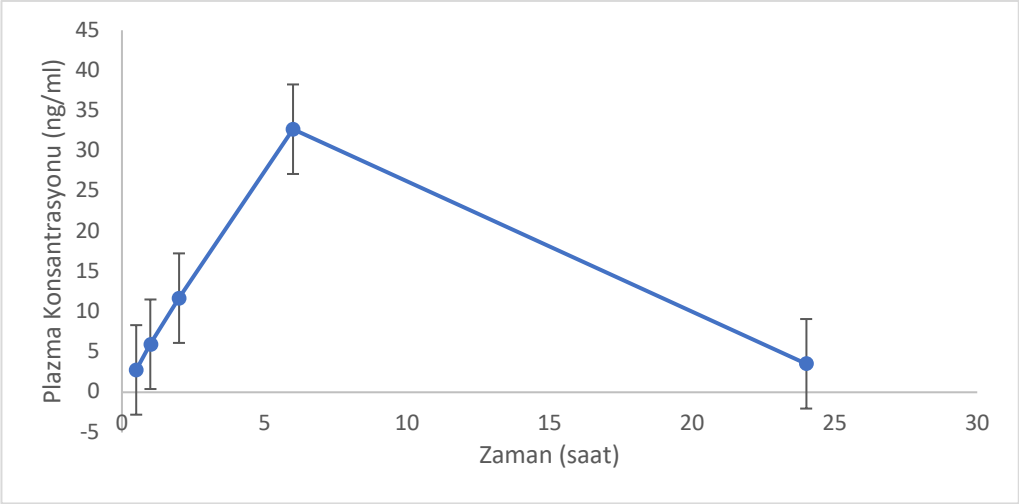
BER ve formülasyonlar için oral verilişten sonra farklı zamanlarda alınan kan örnekleri analiz edilerek plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri oluşturulmuştur ve Şekil 3.50, 3.51, 3.52, 3.53'de gösterilmiştir. Tüm eğriler aynı grafik üstünde Şekil 3.54'te gösterilmiştir. BER, BER fosfolipid kompleksi, BER yüklü kitozan mikropartikül ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarına ait farmakokinetik parametre değerleri Çizelge 3.31'de verilmiştir.



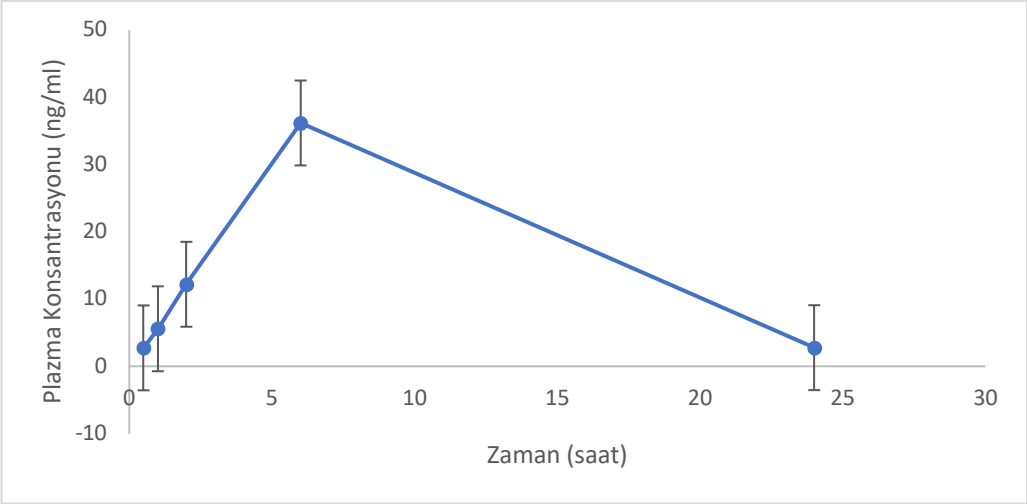
Şekil 3.50. BER'e ait ortalama plazma konsantrasyonu- zaman profili (n=8).



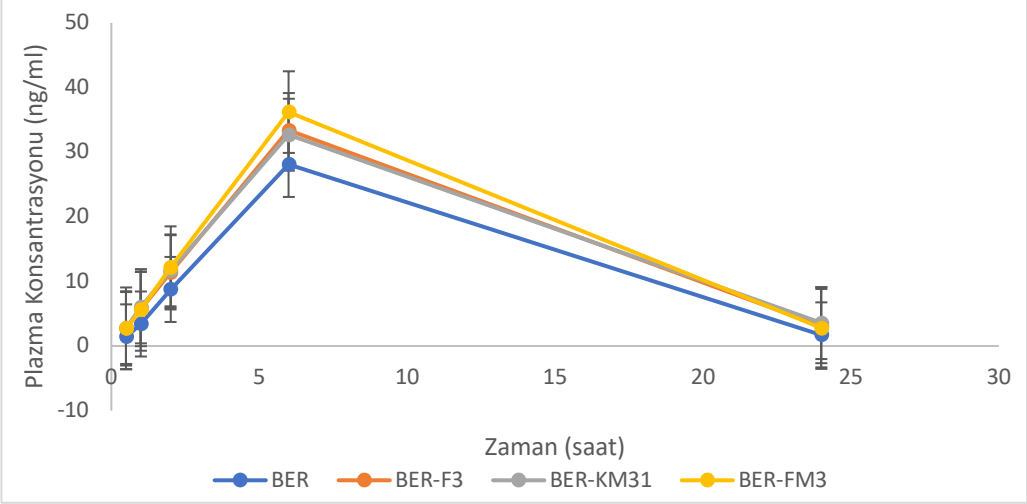
Şekil 3.51. BER-F3 formülasyonuna ait ortalama plazma konsantrasyonu- zaman profili (n=8).



Şekil 3.52. BER-KM31 formülasyonuna ait ortalama plazma konsantrasyonu- zaman profili (n=8).



Şekil 3.53. BER-FM3 formülasyonuna ait ortalama plazma konsantrasyonu- zaman profili (n=8).



Şekil 3.54. BER ve BER-F3, BER-KM31, BER-FM3 formülasyonlarının plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri (n=8).

Çizelge 3.31. BER ve formülasyonlara ait farmakokinetik parametreler (n=8, Ortalama±SS).

Gruplar	t_{max} (saat)	C_{max} (ng/ml)	$AUC_{0\rightarrow24}$ (saat.ng/ml)
BER	6	28,1 ± 0,931	349,5 ± 10,009
BER fosfolipid kompleksi	6	33,4 ± 1,36*	429,5 ± 14,9*
BER yüklü kitozan mikropartikül	6	32,7 ± 3,03*	426,6 ± 30,7*
BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül	6	36,2 ± 3,42*	459,6 ± 38,2*

*p<0,05, BER grubu değerlerinden anlamlı derecede farklılık gösteren değerler.

3.8. Karaciğer Dokularında Antioksidan Aktivite Tayinine Ait Bulgular

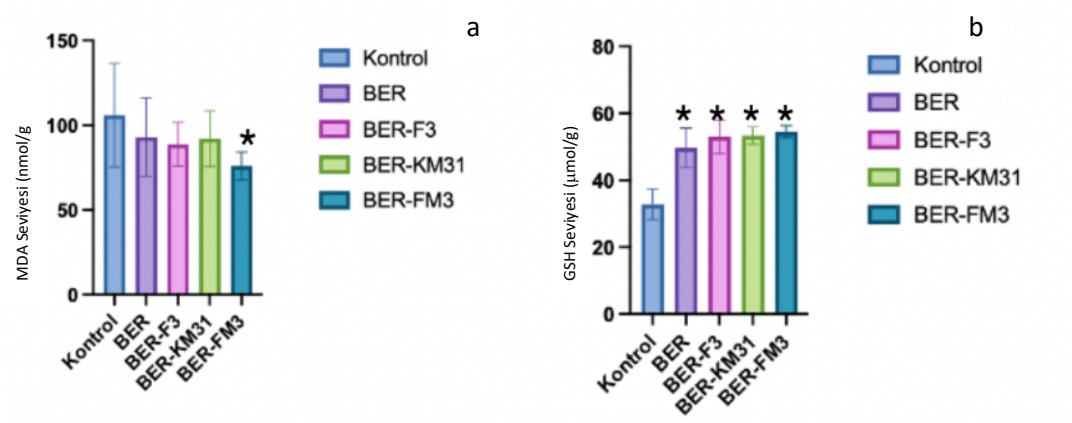
Karaciğer dokularından anitoksidan aktivite tayini Bölüm 2.13'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde verilen eşitliklerden yararlanılarak hesaplanan MDA ve GSH seviyeleri Çizelge 3.32'de verilmiştir.

Çizelge 3.32. BER'in oksidatif strese etkisi (n=8, Ortalama ± SS).

Gruplar	MDA Seviyesi (nmol/g)	GSH Seviyesi (µmol/g)
Kontrol grubu	105,9 ± 30,6	32,8 ± 4,60
BER uygulama grubu	93,0 ± 23,1	49,8 ± 5,85*
BER-F3 uygulama grubu	88,8 ± 12,9	53,0 ± 5,08*
BER-KM31 uygulama grubu	92,1 ± 16,5	53,4 ± 2,60*
BER-FM3 uygulama grubu	75,9 ± 8,25*	54,5 ± 1,83*

*p<0,05, kontrol grubu değerlerinden anlamlı derecede farklılık gösteren değerler.

Kontrol, BER, BER fosfolipid kompleksi, BER yüklü kitozan mikropartikül ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülayonları uygulama gruplarına ait MDA ve GSH seviyelerini gösteren grafikler Şekil 3.55'te verilmiştir.



Şekil 3.55. Kontrol, BER ve formülasyon gruplarının MDA (a) ve GSH (b) seviyeleri (n=8, Ortalama ± SS).

4. TARTIŞMA

4.1. BER'in Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

4.1.1. BER'in Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile Analizi

BER'in Şekil 3.1'de verilen DSC termogramı incelendiğinde 191,71 °C'de endotermik erime piki verdiği ve bunun literatürlerde yer alan termogramlar ile benzerlik gösterdiği görülmüştür (Battu ve ark., 2010; Jia ve ark., 2019; Loo ve ark., 2020).

4.1.2. BER'in Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Spektrumunun Alınması

Çalışmamızda etkin madde olarak son yıllarda birçok farmakolojik amaç için yararlanılan BER kullanılmıştır. FTIR spektroskopisi ile BER'in tanımlaması yapılmıştır. BER'in FTIR analizi sonucunda elde edilen spektrumu Şekil 3.2' de gösterilmiştir. BER'e ait FTIR spektrumunda 1036, 1105, 1269, 1362, 1388, 1504, 1598 cm^{-1} civarlarında görülen pikler BER'e ait karakteristik piklerdir ve literatür ile uyum göstermektedir. Literatür verileri ile uyumlu olarak 1036 cm^{-1} civarında =C-H bükülmesi, 1105 cm^{-1} civarında C-O bağı, 1269 cm^{-1} civarında C-O-C gerilimi, 1362 ve 1388 cm^{-1} civarında C=C gerilimi, 1504 ve 1598 cm^{-1} civarında ise aromatik C=C gerilimi görülmektedir (Battu ve ark., 2010; Ghobadi-Oghaz ve ark., 2022; Mahya ve ark., 2021).

4.1.3. BER'in SEM ile Görüntülenmesi

BER'in SEM görüntüsü Şekil 3.3'te verilmiştir. BER tek başına prizmatik şekiller olarak görüntülenmiştir. BER'in SEM görüntülerinin literatür ile uyumluluk gösterdiği görülmüştür (Djebbi ve ark., 2016; Jia ve ark., 2018).

4.2. BER'in Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

BER'in miktar tayininin yapılması amacıyla HPLC cihazından yararlanılmıştır ve uygun bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. BER'in analizinin yapılacağı ortamlar olan su, pH 1,2 ve pH 6,8 tampon ortamlarında maksimum absorbans gösterdiği dalga boyları belirlenmiştir. Analizlerde tüm ortamlar için 346 nm dalga boyu kullanılmıştır. Kullanılan dalga boyu literatür verileriyle de uyum göstermektedir (Pasrija ve ark., 2010).

Hareketli faz bileşimi, hareketli faz konsantrasyonu, akış hızı ve kolon fırın sıcaklığı gibi parametreler değiştirilerek seçici bir analitik yöntem geliştirilme çalışmaları yürütülmüştür. Çalışmamızda BER gibi alkaloidlerin analizinde yüksek ayırma kapasitesi nedeniyle sıklıkla kullanılan Zorbax Eclipse Plus C18 (100 mm x 4.6 mm x 3.5 μm) kolonu kullanılmıştır (Kim ve ark., 2011).

Çalışmamızda hareketli faz içeriğindeki tampon çözeltisi olarak alkaloidlerin HPLC ile ayrılmasında sıklıkla kullanılan amonyum asetat tamponu kullanılmıştır (Kim ve ark., 2011). Amonyum asetat tampon çözeltisinin konsantrasyonu 10 mM, 20 mM ve 30 mM olarak değiştirildiğinde konsantrasyon azaldıkça piklerdeki kuyruk oluşumunun arttığı görülmüştür ve bu nedenle 30 mM amonyum asetat tamponu analizlerde kullanılmıştır.

Hareketli faz bileşiminde metanol gibi organik solvanların kullanılması alkaloidlerin analizinde alıkonma zamanını uzattığı ve kolon basıncını yüksek tuttuğu

için tercih edilmezken; bunun yerine asetonitril kullanılması sıklıkla tercih edilmektedir (Andola, 2012). Bu nedenle çalışmamızda 30 mM amonyum asetat tamponu ve asetonitril bileşimi hareketli faz olarak kullanılmıştır.

Farklı oranlarda hareketli faz bileşimleri analizde denenmiştir. Hareketli faz bileşiminde asetonitril miktarı arttırıldıkça alıkonma zamanının kısaldığı görülmüştür ancak belli bir noktada piklerin şeklinin bozulması nedeniyle uygun oran olan 67:33 oranı kullanılması tercih edilmiştir.

Hareketli fazın akış hızı olarak 0,5 ml/dakika ve 1 ml/dakika denenmiştir ve analiz süresinin daha kısa olması nedeniyle 1 ml/dakika kullanılması tercih edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan akış hızı literatür verilerine de uygunluk göstermektedir (Pasrija ve ark., 2010).

Kolon fırını sıcaklığı 25 ve 40 °C aralığında değiştirildiğinde sıcaklık artışı ile pik şekillerinde bir miktar bozulma gözlenmiştir. Sıcaklığın 30 °C'de sabit tutulması uygun görülmüştür.

Yapılan denemeler sonucunda analizlerin Çizelge 3.1'de verilen koşullar altında gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

4.3. BER'in Miktar Tayini Yöntemlerinin Analitik Validasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Analizlerden elde edilen kalibrasyon denklemleri kullanılarak ICHQ2R1 kılavuzuna göre doğrusallık ve aralığı, doğruluk ve geri elde, kesinlik (tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik), özgünlük, teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) parametreleri değerlendirilerek miktar tayini yöntemlerinin validasyonları yapılmıştır.

Farklı ortamlarda gerçekleştirilen HPLC analizlerinde su, pH 1,2 ve pH 6,8 ortamları için elde edilen kalibrasyon denklemlerinin R^2 değerlerinin sırasıyla 0,9998, 1 ve 0,9999 olduğu görülmektedir (Şekil 3.5, Şekil 3.6 ve Şekil 3.7). Determinasyon katsayısı değerlerinin 1'e oldukça yakın olması elde edilen pik alanlarından konsantrasyon değerlerinin hesaplanmasında doğrusal bir ilişki olduğunu ve sonuçların güvenilir olduğunu göstermektedir (International Center of Harmonization, 1995).

Doğruluk ve geri elde parametresini değerlendirebilmek amacıyla Bölüm 2.6.2'de anlatıldığı şekilde düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda çözeltilerin analizleri Çizelge 2.1'de gösterildiği gibi yapılmıştır. Su, pH 1,2 ve pH 6,8 ortamlarında yapılan doğruluk ve geri elde analizinin sonuçlarına göre hesaplanan % geri elde değerlerinin bağıl standart sapmalarının %2'nin altında olması hesaplanan konsantrasyon sonuçlarının doğruluğunu göstermiştir (Çizelge 3.5, Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7).

Kesinlik parametresi tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik ölçülerek değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik için düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda hazırlanan numuneler 6 kez analiz edilmiştir. Hesaplanan konsantrasyon değerlerinden elde edilen bağıl standart sapma değerleri su, pH 1,2 ve pH 6,8 ortamları için %2'den düşük bulunmuştur (Çizelge 3.8, Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10). Ara kesinliği tayin etmek amacıyla farklı konsantrasyonlardaki BER çözeltileri su, pH 1,2 ve pH 6,8 ortamlarında farklı günlerde Bölüm 2.6.3'te anlatıldığı şekilde analiz edilmiştir. Hesaplanan konsantrasyon değerlerinden elde edilen bağıl standart sapma sonuçları tüm ortamlar için %2'den düşük bulunmuştur (Çizelge 3.11).

Özgünlük analizi Bölüm 2.6.4'te anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddeler ve BER tek tek ve karışım halinde cihaza enjekte edildikten sonra elde edilen kromatogramlar değerlendirildiğinde BER piki ile hiçbir maddenin pikinin girişim yapmadığı görülmüştür. Geliştirilen yöntemin BER analizi için seçici özellikte olduğu görülmüştür.

BER'in üç farklı ortam için hesaplanan teşhis (LOD) ve tayin sınırları (LOQ) (Çizelge 3.12) çalışmamızda kullandığımız en düşük konsantrasyonun altında kalmıştır. Bu durum BER'in tayin edilebileceği sınırlar içinde çalıştığımızın kanıtı olarak gösterilebilir.

BER için geliştirilen miktar tayini yönteminin değerlendirilen tüm validasyon parametreleri açısından uygun olduğu görülmüştür. Geliştirilen miktar tayini yöntemlerinin BER'i doğru ve kesin olarak tayin etmek amacıyla kullanılabilir olduğu gösterilmiştir.

4.4. Formülasyon Geliştirme Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

4.4.1. BER Fosfolipid Kompleksi Formülasyonları

BER çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olmasına rağmen, zayıf oral emilimi ve buna bağlı olarak da düşük biyoyararlanım göstermesi nedeniyle vücuda uygulanmasında sıkıntılar yaşanan bir etkin maddedir (Caliceti ve ark., 2016). Sistemik dolaşıma etkili biçimde iletilebilmesi için etkin bir taşıyıcı sisteme ihtiyaç duyulmaktadır. Fito-fosfolipid kompleks sistemleri bitkisel aktif bileşen ve fosfolipidin çeşitli koşullarda kompleks haline getirildiği patentli bir teknolojidir ve son yıllarda bitkisel aktif bileşenler için sıklıkla tercih edilmektedir. Fito-fosfolipid kompleksler nano boyutlu olmaları ve lipit içeren hücre membranlarına yüksek afinite göstermeleri nedeniyle etkin maddelerin absorbsiyonlarını önemli ölçüde artırmaktadırlar (Raju ve ark., 2019). Çalışmamızda BER'in vücuda iletiminde etkin maddenin oral absorbsiyonu ve biyoyararlanımını artırma gibi öne çıkan özellikleri sebebiyle BER fosfolipid kompleksleri hazırlanmıştır.

Fito-fosfolipid komplekslerinin bu üstün özelliklerinin yanı sıra bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Formülasyonların hazırlanma aşamasında ve

formülasyonların bekletilmesi esnasında bazı stabilite problemleri ortaya çıkabilmektedir. Bunun yanı sıra bazı çalışmalarda bildirilen etkin maddenin kompleks yapıdan sızması, partiküller arasında şekil/boyut farklıları olması gibi durumlar da fito-fosfolipid kompleksleriyle ilgili karşılaşılan sorunlar olmuştur (Raju ve ark., 2019). Çalışmamızın devamında fito-fosfolipid kompleksi formülasyonlarının avantajlarından yararlanmak ve bildirilen dezavantajlarının üstesinden gelmek amacıyla BER-fosfolipid kompleksleri kitozan mikropartiküllere yüklenmiştir.

BER fosfolipid komplekslerinin hazırlanmasında fito-fosfolipid kompleks hazırlanmasında sıklıkla tercih edilen çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır (Huang ve ark., 2020; Komeil ve ark., 2021). BER'in fizikokimyasal özellikleri ve çalışmada hedeflenen partikül büyüklüğü, enkapsülasyon etkinliği gibi parametreler göz önünde bulundurulduğunda en uygun yöntemin bu olduğu görülmüştür. Fito-fosfolipid komplekslerinin hazırlanmasında formülasyonların optimizasyonunu sağlamak amacıyla bitkisel aktif bileşen:fosfolipid oranı, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi gibi formülasyon parametreleri çeşitlendirilmektedir (Huang ve ark., 2020; Telange ve ark., 2017). Çalışmamızda BER fosfolipid kompleks formülasyonları Bölüm 2.7.1'de verildiği biçimde hazırlanmıştır. Çizelge 2.2'de verilen formülasyon parametreleri kullanılarak farklı BER fosfolipid kompleksi formülasyonları hazırlanmıştır. Önformülasyon çalışmalarında etkili görülmeyen BER:fosfolipid oranı, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi değerleri çalışmaya dahil edilmemiştir.

BER fosfolipid kompleks hazırlama çalışmalarına BER:fosfolipid oranı olarak 1:1 ve reaksiyon süresi olarak 1 saat kullanılarak başlanmıştır. Reaksiyon sıcaklığı 40°C olduğunda partikül büyüklüğünün beklenenin çok üstünde olduğu görülmüş (BER-F1) ve reaksiyon sıcaklığı 60 °C yapılarak BER-F2 formülasyonu hazırlanmıştır (Çizelge 2.2). Formülasyon sıcaklığının 60 °C'ye çıkmasının partikül büyüklüğünü düşürmediği ancak enkapsülasyon etkinliğini istatistiksel olarak anlamlı oranda artırdığı görülmüştür ($p<0,05$). Reaksiyon sıcaklığı olarak 60 °C ve reaksiyon süresi olarak 1 saat kullanılarak sırasıyla 1:2, 1:3 ve 1:5 BER:fosfolipid oranlarında formülasyonlar hazırlanmıştır (BER-F3, BER-F4, BER-F5). Bu formülasyonlar

arasında zeta potansiyelinin yüksek olması (-24,3 mV), partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımının düşük olması (244,3 nm, 0,305) ve enkapsülasyon etkinliğinin (%81,17) diğerlerine göre yüksek olması nedeniyle BER:fosfolipid oranı 1:2 olan BER-F3 formülasyonunun diğerlerinden daha uygun olduğu bulunmuştur.

Reaksiyon süresini artırmanın formülasyonlar üzerine etkisini görmek amacıyla reaksiyon süresi olarak 2 saat kullanılarak BER-F6 ve BER-F7 formülasyonları hazırlanmıştır (Çizelge 2.2). Ancak formülasyonların karakterizasyonları incelendiğinde (Çizelge 3.13) BER-F6 ve BER-F7 formülasyonlarında enkapsülasyon etkinliklerinin sırasıyla % 52,6 ve % 51,2 olduğu görülmüştür. Bu formülasyonlarda enkapsülasyon etkinliğinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p<0,05$) düşmesi nedeniyle çalışmamızda reaksiyon süresi olarak 1 saat kullanılmasına karar verilmiştir.

Reaksiyon sıcaklığının formülasyonun karakterizasyonu üzerine etkisini incelemek amacıyla reaksiyon sıcaklığı olarak 70 °C kullanılarak sırasıyla 1:1, 1:2 ve 1:5 BER:fosfolipid oranlarında BER-F8, BER-F9 ve BER-F10 formülasyonları hazırlanmıştır. Farklı BER:fosfolipid oranları kullanılarak hazırlanan bu formülasyonlarda BER-F8, BER-F9 ve BER-F10 için zeta potansiyeller sırasıyla -0,45 mV, -0,03 mV ve -0,69 mV olarak bulunmuştur (Çizelge 3.13). Zeta potansiyel değerlerinin çok düşük olması nedeniyle stabil formülasyonlar hazırlanamadığı anlaşılmıştır.

Hazırlanan formülasyonların karekterizasyon sonuçları değerlendirildiğinde enkapsülasyon etkinliği, zeta potansiyel, partikül büyüklüğü ve polidispersite değerleri açısından hedefimize en uygun formülasyonun BER-F3 olduğu anlaşılmıştır. Formülasyonların Şekil 3.11'de verilen partikül büyüklüğü dağılım grafikleri incelendiğinde BER-F3 formülasyonunun monodispers bir dağılım gösterdiği görülmektedir. Bu formülasyonu optimum hale getirebilmek için Bölüm 2.7.1'de anlatıldığı şekilde prob sonikasyon ve ultrasonik banyo uygulaması yapılmıştır (Çizelge 2.3).

BER-F3 formülasyonu istediğimiz özellikleri taşımasına rağmen, başka bir formülasyon içine yükleneceğinden daha iyi bir çekirdek materyal elde etmek amacıyla bu işlemler uygulanmıştır. Daha küçük bir partikül büyüklüğü ve dağılımı ve daha yüksek enkapsülasyon etkinliği elde edileceği düşünülmüştür. Ancak çalışma sonucunda prob sonikasyon işleminin BER-F3 formülasyonunun 244,3 nm olan partikül büyüklüğünü BER-F3I (2 dakika) ve BER-F3II (4 dakika) formülasyonları için sırasıyla 489,1 nm ve 515,1 nm'ye yükselttiği ayrıca enkapsülasyon etkinliklerini %30,3 ve %29,4'e düşürdüğü görülmüştür. Ultrasonik banyo uygulamasının ise BER-F3 formülasyonunun 244,3 nm olan partikül büyüklüğünü BER-F3III (5 dakika) ve BER-F3IV (10 dakika) formülasyonları için sırasıyla 625,2 nm ve 865,3 nm'ye yükselttiği ayrıca enkapsülasyon etkinliklerini %41,7 ve %39,7'ye düşürdüğü görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre uygulanan işlemlerin BER-F3 formülasyonunun partikül büyüklüğünü istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselttiği ($p<0,05$) ve enkapsülasyon etkinliğini istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı görülmüştür ($p<0,05$). Bu durumun uygulamalar esnasında partiküllerin yük kazanması nedeniyle agregasyon eğilimi göstermeleri ve yapının bir miktar bozulması sonucu BER sızması nedeniyle meydana geldiği düşünülmüştür. Prob sonikasyon ve ultrasonik banyo uygulamalarının BER fosfolipid kompleks formülasyonlarında kullanılmamasına karar verilmiştir.

Hazırlanan BER fosfolipid kompleksi formülasyonları arasından seçilen BER-F3 formülasyonu üretimin tekrarlanabilirliği açısından değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik çalışmasında hazırlanan BER-F3 formülasyonlarına ait karakteristik özellikler Çizelge 3.15'te ve formülasyonların partikül büyüklüğü dağılım grafikleri Şekil 3.12'de gösterilmiştir. Hesaplanan % BSS değerleri Çizelge 3.15'te gösterilmiştir ve bu değerler kullanılarak yöntemin tekrar edilebilirliği değerlendirilmiştir. BER-F3 formülasyonu için yöntemin enkapsülasyon etkinliği, zeta potansiyel, partikül büyüklüğü ve polidispersite değerleri açısından tekrar edilebilir olduğu görülmüştür (% BSS <5).

4.4.2. BER Yüklü Kitozan Mikropartikül Formülasyonları

Kitozan birçok farklı uygulama için kullanılabilen doğal polisakkarit yapısında bir polimerdir. Biyoparçalanabilir, biyouyumlu yapısı ve antibakteriyel özelliği nedeniyle ilaç formülasyonu uygulamalarında kullanımı sıklıkla tercih edilir (Wang ve Zhuang, 2022). Kitozan pozitif yüke sahip olması nedeniyle negatif yüklü membranlar ile etkileşime girerek mukoadezif özellik göstermektedir (Başaran ve Yazan, 2012). Kitozan ayrıca toksik olmayan ve tahriş edici olmayan bir polimer olarak kabul edilir. Bu üstün özelliklerinden dolayı çalışmamızda polimer olarak kitozan kullanmaya karar verilmiştir.

İyonik jelasyon yöntemi mikropartikül üretiminde sıklıkla kullanılan pozitif yüklü kitozan ve negatif yüklü çapraz bağlayıcıların etkileşimine dayanan bir yöntemdir. Üretimde toksik kimyasalların kullanılmaması ve zaman tasarrufu sağlanması bu yöntemin avantajları arasındadır (Yanat ve Schroën, 2021).

BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının hazırlanması ve optimize edilmesi amacıyla ilk olarak mikropartikül karakterizasyonu üzerine formülasyon parametrelerinin etkisini araştırmak amacıyla BER içermeyen boş mikropartiküller hazırlanmıştır (Çizelge 2.4). Hazırlanan bu boş mikropartikül formülasyonları zeta potansiyel değerleri Çizelge 3.16'da verilmiştir ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Diğer formülasyon parametreleri sabit tutularak %TPP çözeltisi konsantrasyonunun etkisi (%0,5, %1 ve %2) değerlendirildiğinde hazırlanan formülasyonların zeta potansiyel değerleri arasında anlamlı fark görülmüştür ($p<0,05$) ve %0,5 TPP çözeltisi konsantrasyonu formülasyonun stabilitesi açısından diğerlerine göre daha uygun bulunmuştur (N-KM1). Kitozan çözeltisi sıcaklığı 25 °C, 40 °C ve 50 °C'ye ayarlanarak sırasıyla N-KM6, N-KM7 ve N-KM8 formülasyonları hazırladığında formülasyonların zeta potansiyel değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p <0,05$) ve zeta potansiyellerinin artan sıcaklık ile giderek arttığı görülmüştür. Literatürde kitozan çözeltisi sıcaklığının arttığında kitozanın içsel viskozitesinin azaldığı bilgisi yer almaktadır. İçsel viskozitenin azalmasının sebebi ise kitozan çözeltisi sıcaklığı arttıkça dönme yarıçapının azalması ve hidrojen bağlı

kitozan hidrasyon suyunun azalması sonucu kitozanın zincir esnekliğinin artmasıdır (Chen ve Tsaih, 1998). Diğer formülasyon parametreleri sabit tutularak kitozan çözeltisin pH değerinin (pH 4 ve pH 4,7) formülayonların zeta potansiyelleri üzerine etkisi değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$).

Ayrıca formülasyon parametrelerinin formülasyonların şekilleri üzerine etkilerini incelemek amacıyla farklı formülasyonlar hazırlanmış ve optik mikroskop altında incelenmiştir. İncelenen birçok formülasyonda mikropartikül yapısı gözlenmiştir. Kitozan:TPP oranı 3:1 olan formülasyonda (MBER-KM11) diğerlerine göre daha düzgün küresel mikropartiküller görülmüştür.

Formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri üzerine BER'in çözücü tipinin etkili olacağı düşünülerek çalışmanın devamında çözücü tipi formülasyon parametresi olarak incelenmiştir. Hazırlanan diğer BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının tümünün (BER-KM1 – BER-KM33) enkapsülasyon etkinliği, zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi değerleri ölçülerek değerlendirilmiştir. BER'in metanoldeki çözünürlüğü suya göre daha yüksektir (Yan ve ark., 2022). BER'i çözmek için kullanılan çözücünün tipinin formülasyonun partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği üzerine anlamlı etkisi olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Distile su, distile su:etanol karışımı ve metanol çözücü olarak kullanılarak formülasyonlar hazırlanmıştır. Bu formülasyonlar kendi arasında değerlendirildiğinde BER'i çözmek için metanol kullanıldığında daha yüksek enkapsülasyon etkinliği elde edildiği görülmüştür. Bu nedenle formülasyonlarda BER'i çözmek için metanol kullanılmasına karar verilmiştir.

BER yüklü kitozan mikropartiküllerin hazırlanmasında incelenen bir diğer parametre olan % TPP çözeltisi konsantrasyonunun formülasyonların zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü ve % enkapsülasyon etkinliği değerleri üzerinde anlamlı etkisi olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (Şekil 3.20, Şekil 3.21, Şekil 3.22). Bu özelliklere etkisi bakımından değerlendirildiğinde %0,5 TPP çözeltisi konsantrasyonunun, boş

mikropartiküllerde de elde edilen sonuçlara benzer olarak, formülasyonlarda kullanılmasının daha uygun olduğuna karar verilmiştir.

Formülasyonlar üzerinden etkisi incelenen bir diğer formülasyon parametresi kitozan çözeltisi pH değeridir. Kitozan çözeltisi pH değerinin formülasyonların % enkapsülasyon etkinliği üzerine anlamlı etkisi olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (Şekil 3.23). Kitozan çözeltisinin pH değerinin 4,7 olmasının daha uygun olduğu görülmüştür ve optimum formülasyon çalışmalarında bu değer kullanılmıştır (Fan ve ark., 2012).

Kitozan çözeltisi sıcaklığının formülasyonların özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Kitozan çözeltisi sıcaklığının formülasyonların zeta potansiyelleri ve % enkapsülasyon etkinliği değerleri üzerine anlamlı etkisi olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (Şekil 3.24, Şekil 3.25). Kitozan çözeltisi sıcaklığı 25 °C olduğunda formülasyonların zeta potansiyellerinin daha yüksek olduğu ve daha kararlı formülasyonlar elde edildiği görülmüştür. Bu nedenle kitozan çözeltisi sıcaklığının 25 °C olması çalışmada tercih edilmiştir. Boş mikropartiküllerin aksine BER yüklü mikropartiküllerde sıcaklık artışı ile zeta potansiyelinde artış görülmemesi ortama etkin madde eklenmesiyle kitozan çözeltisinin viskozitesinin değişmesine bağlanmıştır.

Homojenizasyon işleminin BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları üzerine etkisini incelemek amacıyla diğer formülasyon parametreleri değiştirilmeden formülasyonlar hazırlanmıştır. Homojenizasyon işleminin formülasyonların partikül büyüklüğü ve % enkapsülasyon etkinlikleri üzerinde istatiksel olarak anlamlı etkisi olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Homojenizasyon işlemi yapılan formülasyonlarda partikül büyüklüğünün arttığı ve % enkapsülasyon etkinliğinin azaldığı görülmüştür. Bunun homojenizasyon esnasında uygulanan enerjiden dolayı partiküllerin yük kazanması nedeniyle agregasyon eğilimi göstererek birleşmeleri ve mikropartikül yapısının zarar görmesi sonucu etkin maddenin formülasyondan sızması nedeniyle olabileceği düşünülmüştür. Formülasyonun hazırlanmasında homojenizasyon işleminin kullanılmamasına karar verilmiştir.

Hazırlanan BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları arasından seçilen BER-KM31 formülasyonu üretimin tekrarlanabilirliği açısından değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik çalışmasında hazırlanan BER-KM31 formülasyonlarına ait karakteristik özellikler Çizelge 3.19'da gösterilmiştir. Elde edilen % BSS değerleri Çizelge 3.19'da verilmiştir ve bu değerler kullanılarak yöntemin tekrar edilebilirliği değerlendirilmiştir. BER-KM31 formülasyonu için yöntemin enkapsülasyon etkinliği, zeta potansiyel, partikül büyüklüğü ve polidispersite değerleri açısından tekrar edilebilir olduğu görülmüştür (% BSS <5).

4.4.3. BER Fosfolipid Kompleksi Yüklü Kitozan Mikropartikül Formülasyonları

Çalışmamızda BER fosfolipid kompleksleri BER'in vücutta kalış süresini uzatmak, formülasyonun stabilitesini sağlamak gibi amaçlarla polimerik mikropartiküller içine yüklenmiştir. Kitozan sahip olduğu üstün özellikler nedeniyle çalışmamızda polimer olarak kullanılmıştır. Biyolojik olarak parçalanabilir, biyouyumlu, polikatyonik olması ve mukoadezif özellik göstermesi nedeniyle çalışmamız için kitozanın kullanımı uygun görülmüştür (Dash ve ark., 2011). Ayrıca kitozan epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların açılmasını sağlayarak etkin maddelerin emilimini artırabilmektedir. Ayrıca kitozan pozitif yüklü olması nedeniyle negatif yüklü BER fosfolipid kompleksleriyle bir araya getirilmesi uygun bir polimerdir (Zhang ve ark., 2013).

BER fosfolipid komplekslerinin kitozan mikropartiküllere yüklenmesiyle lipid-polimer kombine ilaç taşıyıcı yapılarına benzer sistemler elde edilmektedir. Polimerik sistemlerin yüksek stabilitesi, yüksek ilaç yükleme kapasitesi gibi üstün özellikleri ile lipidlerin biyolojik olarak uyumlu, parçalanabilir, düşük toksisiteye sahip olma gibi özelliklerinin birleştirilmesiyle yüksek nitelikli ilaç taşıyıcı sistemler tasarlanabilmektedir (Leng ve ark., 2018; Zeng ve ark., 2019).

İyonik jelasyon yönteminde kitozan ve TPP'nin etkin olarak birleşebilmesinde kitozanın iyonize amin gruplarının ve tek değerlikli tuzun ortamda bulunan miktarları etkilidir. Dolayısıyla bu yöntemde kitozan çözeltisi konsantrasyonu, TPP çözeltisi konsantrasyonu, çözeltilerin pH değerleri gibi parametrelerin formülasyonlar üzerine etkileri incelenmektedir. Bu formülasyon parametrelerinin formülasyonların zeta potansiyelleri, partikül büyüklükleri, polidispersite indeksleri ve enkapsülasyon etkinliği değerleri üzerinde etkili oldukları bilinmektedir (Di Santo ve ark., 2021; Huang ve ark., 2015).

BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının hazırlanması sırasında anlamlı görülen % TPP çözeltisi konsantrasyonu, kitozan çözeltisi pH değeri, sonikasyon ve ultrasonik banyo uygulaması işlemlerinin mikropartiküllerin karakteristik özellikleri üzerine etkileri istatistiksel olarak incelenmiştir.

Kitozan çözeltisi pH değeri ayarlanmadan (pH 3,79) BER-FM1 formülasyonu hazırlanmıştır. Bu formülasyonun % enkapsülasyon etkinliği çok düşük bulunmuştur. İyonik jelasyon yönteminde mikropartiküllerin oluşumunda kitozan çözeltisin pH değerinin önemli olduğu görülmüştür. Ortam pH'sının kitozanın protonasyon derecesi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada pH değerinin 4,5'dan 8'e yükseltildiğinde kitozanın protonasyon derecesinin % 100'den % 0'a düştüğü gözlenmiştir. En yüksek protonasyon ise pH 4,7'de gözlenmiştir (Su ve Zhu, 2002). Fan ve ark., kitozan çözeltisi pH değerinin partiküllerin oluşumu üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada pH 4,5'un altında dar partikül boyutu dağılımı elde edilemediği ve pH 5,2'nin üstünde ise partiküllerin birleşme eğilimi gösterdikleri görülmüştür (Fan ve ark., 2012). Buradan yola çıkılarak çalışmamızda diğer formülasyonlarda kitozan çözeltisi pH değeri 4,7 olarak ayarlanmıştır. BER-FM2 formülasyonunda diğer formülasyon parametreleri değiştirilmeden kitozan çözeltisinin pH değerinin 4,7 olarak ayarlandığında enkapsülasyon etkinliğinin % 10,7'den % 42,8'e çıktığı görülmüştür. Bu da kitozan çözeltisi pH değerinin 4,7 ye ayarlanmasının uygun olduğunu göstermiştir.

% TPP çözelti konsantrasyonunun formülasyonların karakteristik özellikleri üzerine etkileri incelendiğinde formülasyonların zeta potansiyeli ve % enkapsülayon etkinliği üzerinde anlamlı etkisi olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Öncelikle BER-FM2 (%0,5) ve BER-FM3 (%1) formülasyonları arasında %TPP çözeltisi konsantrasyonunun etkisi karşılaştırıldığında konsantrasyonun artmasının zeta potansiyelinde düşüşe ve % enkapsülayon etkinliğinde anlamlı derecede artışa neden olduğu görülmüştür. BER-FM8 (%2) ve BER-FM9 (%1,5) formülasyonlarının karakteristik özelliklerine bakıldığında ise %2 konsantrasyonda enkapsülasyon etkinliği ve zeta potansiyel değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. BER-FM3 formülasyonunda diğerlerine göre daha yüksek enkapsülasyon etkinliği elde edilmiştir. Düşük %TPP çözeltisi konsantrasyonunda kitozan ve TPP arasındaki bağlanma ısısının 0'a yakın olduğu ve %TPP çözeltisi konsantrasyonu arttıkça kitozan-TPP arasındaki etkileşimin de giderek arttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Desai, 2016). İyonik jelasyon yönteminde pozitif yüklü polimerler ile negatif yüklü çapraz bağlayıcılar arasındaki etkileşim partiküllerin oluşumunu etkileyen en önemli parametrelerden biridir (Naskar ve ark., 2019; Shu ve Zhu, 2002). Bu nedenle pozitif yüklü kitozan ve negatif yüklü TPP arasındaki etkileşimin yüksek olması çalışmamızda mikropartiküllerin hazırlanabilmesi için çok önemlidir. Çalışmamızda da artan % TPP çözeltisi konsantrasyonunun kitozan-TPP arasında daha iyi etkileşim sağladığı görülmüştür. Artan % TPP çözeltisi konsantrasyonuyla formülasyonların partikül büyüklüklerinin ve polidispersite indekslerinin de arttığı görülmüştür. Bu açıdan % 1 TPP çözeltisi konsantrasyonu diğerlerine göre daha uygun bulunmuştur. Kullanılan kitozan:TPP oranının da formülasyonun karakteristik özelliklerinde etkili olduğu bilinmektedir. BER-FM3 formülasyonunda kullanılan kitozan:TPP oranı 1,5:1 dir. Yapılan çalışmalarda bu oranın 1:1'den 5:1'e kadar artan oranlarda hazırlandığında formülasyonların partikül büyüklüklerinin giderek arttığı gösterilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda bulunan oran literatür ile uyumludur (Algharib ve ark., 2022).

BER-FM3 formülasyonuna 2 dakika sonikasyon işlemi uygulanarak BER-FM4 formülasyonu hazırlanmıştır. Bu uygulama ile partikül büyüklüğünün bir miktar düşürülerek daha dar partikül büyüklüğü dağılımına sahip partiküller elde edilmesi

amaçlanmıştır. Ancak formülasyonların özellikleri karşılaştırıldığında % enkapsülasyon etkinliğinin önemli derecede düştüğü ve partikül büyüklüğünün arttığı görülmüştür. Bu durum açığa çıkan ısı ve oluşan enerjiden dolayı partiküllerin arasındaki etkileşimin artması ve agregasyona meyilli hale gelmelerinden kaynaklamış olduğu düşünülmektedir. Behbahani ve ark tarafından yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar da bu konudaki düşüncemizi desteklemektedir (Behbahani ve ark., 2017). Bu nedenle bu işlemin çalışmada kullanılmamasına karar verilmiştir. Aynı amaçlarla ultrasonik banyo uygulaması yapılmasına karar verilmiştir. 2 dakika, 5 dakika ve 8 dakika ultrasonik banyo uygulaması yapılarak formülasyonlar hazırlanmıştır (BER-FM5, BER-FM6 ve BER-FM7) (Çizelge 2.8). Bu formülasyonlarda da % enkapsülasyon etkinliği değerinin bir miktar düştüğü, zeta potansiyelinin azaldığı ve polidispersite indeksi değerlerinin arttığı gözlenmiştir (Çizelge 3.20). Bu nedenle çalışmada bu işlemin kullanılmamasına karar verilmiştir.

Yapılan formülasyon çalışmaları sonunda BER-FM3 formülasyonu % enkapsülasyon değerinin diğer formülasyonlara göre belirgin derecede yüksek olması (% 59,1), partikül büyüklüğünü ve polidispersite indeksinin (624 nm, 0,576) küçük olması nedeniyle optimum formülasyon olarak seçilmiştir. Bu formülasyon üzerinde tekrarlanabilirlik çalışması yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik çalışmasında hazırlanan BER-FM3 formülasyonlarına ait karakteristik özellikler Çizelge 3.22'da gösterilmiştir. Elde edilen % BSS değerleri Çizelge 3.22'de verilmiştir ve bu değerler kullanılarak yöntemin tekrar edilebilirliği değerlendirilmiştir. BER-FM3 formülasyonu için yöntemin enkapsülasyon etkinliği, zeta potansiyel, partikül büyüklüğü ve polidispersite değerleri açısından tekrar edilebilir olduğu görülmüştür (% BSS <5).

4.5. Optimum Formülasyonların Seçilmesi

Hazırlanan tüm formülasyonların % enkapsülasyon etkinliği, zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi değerleri ölçülerek değerlendirildiğinde BER-F3, BER-KM31 ve BER-FM3 kodlu formülasyonların özellikleri uygun

bulunarak optimum formülasyonlar olarak seçilmişlerdir. Bu formülasyonların *in vitro* karakterizasyonları yapılarak (çözünürlük, partisyon katsayısı, *in vitro* salım tayini, DSC, FTIR ve TEM analizleri) *in vivo* hayvan deneylerinde kullanılmışlardır. Ayrıca bu formülasyonların stabiliteleri simüle vücut sıvılarında ve uzun süreli olarak buzdolabı ve oda sıcaklığında analiz edilerek değerlendirilmiştir.

4.6. Optimum Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

4.6.1. Çözünürlük Tayinine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Yapılan çalışmalarda BER'in fosfat tamponundaki çözünürlüğünün borat ve ftalat gibi farklı tampon ortamlarından 20 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla çalışmamızda pH 6,8 fosfat tampon ortamı tercih edilmiştir (Raju ve ark., 2019). BER'in ve optimum olarak seçilen BER fosfolipid kompleksi (BER-F3) formülasyonunun çözünürlük analizi sonuçlarına göre (Çizelge 3.24) BER'in ve BER-F3 formülasyonunun çözünürlüklerinin sıcaklık artışı ile arttığı görülmüştür. Su ve pH 6,8 fosfat tampon ortamlarında yapılan analizlerde 37 °C'deki çözünürlükleri 25 °C'ye göre yüksek bulunmuştur. Elde edilen veriler literatürler ile uyumluluk göstermektedir. BER'in su ve pH 6,8 fosfat tamponu ortamlarında 25 °C ve 37 °C'de bulunan çözünürlük değerleri Çizelge 3.24'te verilmiştir ve bulunan değerler literatür verileri ile uyum göstermektedir (Battu ve ark., 2010). BER'in ve BER-F3 formülasyonunun pH 6,8 fosfat tamponu ortamındaki çözünürlüğünün su ortamındakinden daha fazla olduğu görülmüştür.

Çözünürlük sonuçlarına göre BER-F3 formülasyonunun çözünürlüğü BER'e göre azalmıştır. BER'in suda çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle fosfolipid kompleksi hazırlandığında sudaki ve fosfat tamponundaki çözünürlüğü bir miktar azalmıştır. Zhang ve ark., yaptıkları çalışmada BER' in sudaki çözünürlüğünü 1,64 ± 0,21 mg/ml ve BER fosfolipid kompleksinin sudaki çözünürlüğünü ise 0,59 ± 0,14

mg/ml olarak bulmuşlardır (Zhang ve ark., 2014). Çalışmamızda elde ettiğimiz değerler bu veriler ile uyum göstermektedir. Telange ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada apigenin fosfolipid kompleksi hazırlanmıştır. Apigeninin hidrofobik bir etkin madde olması nedeniyle fosfolipid kompleksinin sudaki çözünürlüğünü arttırdığı görülmüştür. Apigenin fosfolipid kompleksinin sudaki çözünürlük değeri 0,022 mg/ml olarak bulunmuştur (Telange ve ark., 2017). BER hidrofilik bir maddedir. Çalışmamızda BER fosfolipid kompleksinin 25 °C'de sudaki çözünürlüğü 0,708 mg/ml olarak bulunmuştur. Bu durumda elde ettiğimiz formülasyonla uygun çözünürlük değerleri elde edilmiştir.

4.6.2. Partisyon Katsayısı Tayinine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

BER, fiziksel karışım ve BER fosfolipid kompleksine (BER-F3) ait partisyon katsayıları Bölüm 2.10.2'de anlatıldığı şekilde ölçülerek değerlendirilmiştir. Partisyon katsayısı değerleri Çizelge 3.25'te verilmiştir. BER'in partisyon katsayısı 0,0246 bulunmuştur. BER fosfolipid kompleksinin partisyon katsayısı 0,674 bulunmuştur ve BER'in partisyon katsayısını önemli derecede artırdığı görülmüştür. BER suda yüksek çözünürlük gösteren bir madde olduğu için yağda çözünen fosfolipid yapılarıyla kompleksleştirilmesi sonucu partisyon katsayısı ($P_{y/s}$) önemli derecede artış göstermiştir. Zhang ve ark., yaptıkları çalışmada BER fosfolipid kompleksinin BER'in partisyon katsayısını neredeyse 35 kat artırdığını göstermişlerdir (Zhang ve ark., 2014). Çalışmamızda da BER-F3 formülasyonu BER'in partisyon katsayısını yaklaşık 27 kat artırmıştır. Elde edilen sonuçlara göre BER-F3 formülasyonunun lipid membranlardan BER'in emilimi üzerinde etkili olacağı anlaşılmaktadır.

4.6.3. *İn Vitro* Çözünme Hızı Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

BER-F3, BER-KM31 ve BER-FM3 kodlu formülasyonlar enkapsülasyon etkinliği, zeta potansiyel, partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi verilerine göre

optimum seçilmiş ve bu formülasyonlar üzerinde *in vitro* çözünme hızı çalışmaları yapılmıştır. *İn vitro* çözünme hızı deneyi pH 6,8 fosfat tampon ortamında yapılmıştır. BER'in çözünürlüğünün ve emiliminin bu ortamda yüksek olması nedeniyle tercih edilmiştir (Battu ve ark., 2010; Raju ve ark., 2019). BER ve formülasyonlara ait çözünme hızı grafikleri Şekil 3.36'da gösterilmiştir. Elde edilen çözünme hızı profilleri incelendiğinde formülasyonlarda başlangıçta hızlı bir salım gözlenmiştir (burst effect).

Mikropartikül formülasyonlarında bu hızlı salımın sebebi partikül yüzeyine adsorbe olan BER'in salım ortamında aniden çözünmesi olduğu düşünülmektedir. 24 saat boyunca formülasyonlarda tutulan BER'in polimerden salım ortamına difüze olmasıyla salım devam etmiştir. Çalışmada sink koşulunun sağlandığı görülmüştür.

24 saat içinde BER-F3 formülasyonundan salınan BER % 67, BER-KM31 formülasyonundan salınan BER % 43,25 ve BER-FM3 formülasyonundan salınan BER ise % 21 olarak hesaplamıştır. Formülasyonların salım profilleri birbirine benzerlik göstermektedir. BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonunda salımın BER fosfolipid kompleksine göre belirgin derecede düşük olmasının negatif yüklü BER fosfolipid kompleksi ile pozitif yüklü kitozan arasındaki çekim gücünden dolayı mikropartikülden BER'in salımının gecikmesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. BER-FM3 formülasyonundan BER salımının iki aşamada olduğu düşünülmektedir. Öncelikle BER fosfolipid kompleksleri mikropartiküllerden salınarak çözünme ortamına geçmekte ve sonrasında BER fosfolipid kompleksinden ayrılarak çözünme ortamına geçmektedir. Bu da salımın diğer formülasyonlara göre daha yavaş gerçekleşmesini açıklamaktadır (Zhang ve ark., 2013).

4.6.4. Formülasyonlardan Etkin Madde Salım Kinetiklerine Ait Verilerin Değerlendirilmesi

Etkin maddelerin dozaj formundan salımı etkin maddenin çözünürlüğü, moleküler ağırlığı ve matrisin şişme derecesi gibi bazı özelliklere bağlı olarak değişir. Difüzyon, su ile uyarılan salım (şişme) ve degradasyon/erozyon mekanizmaları fiziksel salım mekanizmaları arasında en önemlileridir. Etkin maddenin sudaki çözünürlüğü veya çözünme hızı düşükse difüzyon ile ortama geçen madde miktarı çok az olmaktadır (Permanadewi ve ark., 2019). *İn vitro* çözünme hızı testleri ilaç geliştirme sürecinde ilacın biyoyararlanımını etkileyen formülasyon faktörlerinin belirlenmesinde yararlanılan en önemli kalite ve performans ölçütlerinden biridir (Shah, 2005). *İn vitro* çözünme hızı testlerinin temel amacı dozaj formunun *in vivo* performansını tahmin edebilmektir. Bazen *in vivo* davranışın tahminini sağlayan *in vitro* çözünme hızı ortamlarının kullanılması gerekebilir.

Çalışmamızda hazırlanan formüllerin *in vitro* çözünme hızı verileri kinetik modellere uyumları açısından incelenmiştir. Farklı kinetik modellere ait salım kinetiği hız sabitleri, r^2 değerleri, MSC ve AIC değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir. AIC verilerin büyüklüğünün yanı sıra veri noktalarının sayısına bağlı bir parametredir. İki model farklı sayıda parametre içeriyorsa AIC değeri düşük olan modele uyum daha yüksektir. Farklı salım modelleri arasında MSC değeri yüksek olanın seçilmesinin de daha uygun olacağı bilinmektedir. Farklı etkin madde salım kinetik modelleri program ile değerlendirildikten sonra r^2 ve MSC değeri yüksek, AIC değeri düşük olan modele uyumun daha yüksek olacağı düşünülmüştür (Zhang ve ark., 2010; Yılmaz Usta ve ark., 2018).

Salım kinetik mekanizmalarına uyumları incelenen formülasyonlardan (BER-F3, BER-KM31 ve BER-FM3) BER salımının, difüzyon mekanizmasıyla etkin madde salımını destekleyen Higuchi, Peppas ve Weibull kinetik modellerine daha yüksek oranda uyum sağladıkları görülmüştür.

Analizi yapılan bu verilere göre BER fosfolipid kompleksi (BER-F3) formülasyonundan etkin maddenin salımında Korsmeyer Peppas kinetiğine uyum görülmektedir. Bu denklem dozaj formunun içindeki etkin maddenin %60'ının çıkışına kadar kullanılan bir denklemdir. Peppas kinetiğine göre küre şekilli dozaj formları için n değeri 0,43'ten küçük olduğunda Fickian difüzyon, 0,43-0,89 arasında olduğunda Fickian olmayan düzensiz difüzyon ve 0,89'den büyük olduğunda ise sıfır derece kinetik ile salım olduğu bilinmektedir (Ahmed ve ark., 2019). Çalışmamızda n değeri BER-F3 formülasyonu için 0,663 olarak bulunmuştur. Buradan yola çıkarak BER-F3 formülasyonunda Fickian olmayan difüzyon mekanizması ile salım olduğu anlaşılmıştır.

BER yüklü kitozan mikropartikül (BER-KM31) ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül (BER-FM3) formülasyonlarının salım profilleri değerlendirildiğinde en yüksek r^2 değerlerinin Higuchi kinetiğinde elde edildiği görülmüştür. Yarı katı ve katı matrislerde hapsedilmiş suda çözünür veya çözünür olmayan etkin maddelerin salımı Higuchi kinetiği ile incelenebilmektedir. Kitozan gibi biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerle hazırlanan homojen ve heterojen matrislerden etkin maddenin salımı Higuchi kinetiğine uyum gösterebilmektedir (Ahmed ve ark., 2019).

4.6.5. Formülasyonların Görüntülenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Formülasyonlar Bölüm 2.10.5'te anlatıldığı şekilde TEM ile görüntülenmiştir. BER-F3 (Şekil 3.37), BER-KM31 (Şekil 3.38) ve BER-FM3 (Şekil 3.39) formülasyonlarına ait TEM görüntüleri Bölüm 3.5.5'te gösterilmiştir. TEM görüntüleri incelendiğinde formülasyonların küresel bir yapıda oldukları ve monodispers bir dağılıma sahip oldukları görülmektedir. Şekil 3.3'te verilen BER'in SEM görüntüsünde düzensiz prizma benzeri kristal yapıda olduğu ve geniş partikül büyüklüğü dağılımı gösterdiği görülmektedir. Büyük partikül boyutu, yüksek polidispersite indeksi ve kristal yapısının BER'in gastrointestinal kanaldan emiliminin

düşük olmasında etkili olabileceği düşünülmektedir (Yu ve ark., 2016). Formülasyonlarda bu yapının tamamen değiştiği görülmektedir. Bu da formülasyonların başarılı şekilde hazırlandığının bir göstergesidir. Elde edilen görüntülerde mikropartikül formülasyonlarının partikül büyüklüklerinin dinamik ışık saçılımı yöntemi ile ölçülen partikül büyüklüğünden küçük bulunduğu görülmüştür.

Literatürler incelendiğinde buna benzer sonuçların diğer çalışmalarda da elde edildiği görülmüştür (Souza ve ark., 2016). Çalışmamızda bu farklılığın TEM analizinin liyofilize kuru tozlar üzerinden, dinamik ışık saçılımı ile ölçümünün ise formülasyonların sudaki dispersiyonları üzerinden yapılmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

4.6.6. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Kalorimetri materyallerdeki termodinamik değişimlerin ölçülmesi amacıyla kullanılan temel bir kavramdır. Malzemelerin camsı geçiş sıcaklıkları, kristalleşme ve erime gibi özelliklerinin tamamı DSC analizi yapılarak gözlenebilmektedir (Mansfield, 2015). DSC etkin maddeler ve yardımcı maddeler arasındaki geçimsizliğin ve olası etkileşimlerin anlaşılabilmesi için kullanılan güvenilir ve hızlı bir yöntemdir (Cheng ve ark., 2017).

Formülasyonlarda kullanılan fosfolipid, polimer ve etkin madde arasında etkileşim olup olmadığını belirlemek, BER'in formülasyon içindeki fiziksel durumunu saptamak amacıyla çalışmamızda Bölüm 2.10.6'da anlatıldığı şekilde DSC analizi yapılmıştır. Elde edilen termogramlar Şekil 3.40'ta gösterilmiştir. BER'in 191,71°C'de endotermik erime piki verdiği görülmüştür. BER-F3, BER-KM31 ve BER-FM3 formülasyonlarına ait termogramlar incelendiğinde BER'e ait erime pikinin bu termogramlarda görülmemesi BER'in formülasyonlar içinde amorf halde bulunduğunu göstermektedir. Formülasyonların DSC termogramları incelendiğinde

BER'in polimer içinde tutulduğu, homojen disperse olduğu ve formülasyonda geçimsizlik olmadığı tespit edilmiştir.

Ayrıca formülasyonlarda kullanılan maddelere ait termogramlar incelendiğinde kitozanın termogramında 308,41°C'de endotermik, fosfolipid termogramında ise 207,44°C'de ekzotermik pik gözlenmiştir. TPP'ye ait termogramda ise pik görülmemiştir. Bu verilerin literatürler ile uyumlu olduğu görülmüştür (Cheng ve ark., 2017; Igbal ve ark., 2021).

4.6.7. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Şekil 3.41'de verilen BER'e ait FTIR spektrumunda 1036, 1105, 1269, 1362, 1388, 1504, 1598 cm^{-1} civarlarında görülen pikler BER'e ait karakteristik piklerdir ve literatür ile uyum göstermektedir (Battu ve ark., 2010; Ghobadi-Oghaz ve ark., 2022; Mahya ve ark., 2021).

Fosfolipid spektrumunda 2921 cm^{-1}, 2852 cm^{-1} ve 1378 cm^{-1} civarındaki pikler metil gruplarının gerilimi ve deformasyonundan kaynaklanan bantlardır. 1465 cm^{-1}'de görülen pik CH_2 bükülme titreşimi bandı olarak görülmektedir (Zhang ve ark., 2013). Şekil 3.48'de verilen BER fosfolipid kompleksine ait FTIR spektrumu incelendiğinde etkin maddeye ait 1598 cm^{-1} deki pikin kaybolduğu, 1504 cm^{-1} dekinin ise yerinin değiştiği görülmüştür. Bu değişimler BER'e ait benzen halkasında bazı değişimler olduğunu göstermektedir (Zhang ve ark., 2014). Bununla birlikte fosfolipidin polar kısmını gösteren 1736 cm^{-1} deki pikin yeri değişmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda BER'in benzen halkası ve fosfolipidin polar baş kısmı arasında kompleks oluşturmak üzere etkileşimlerin olduğu düşünülmüştür.

BER-KM31 (Şekil 3.46) ve BER-FM3 (Şekil 3.47) formülasyonlarına ait FITR spektrumları incelendiğinde BER'e ait karakteristik pikler görülmemektedir. Bu spektrumlarda 1062 cm^{-1} ve 1027 cm^{-1} civarında yer alan kitozan ile ilişkili pikler

görülmektedir. Bu da BER'in partiküllerin yüzeyinde değil içerisinde tutulduğunu ve etkin maddenin formülasyon içinde amorf yapıda olduğunu göstermektedir.

4.7. Stabilite Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

4.7.1. Simüle Gastrik Sıvılarda Stabilite Analizlerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

BER ve formülasyonlar oral olarak uygulandıklarında gastrointestinal kanalın farklı bölgelerinden geçerler ve bu sırada farklı enzimatik ve pH ortamlarına maruz kalırlar. Bu durum BER'in ve formülasyonların stabilitesini önemli derecede etkilemektedir (Yu ve ark., 2016). Bu nedenle çalışmamızda farklı pH ve enzim ortamlarının formülasyonların stabiliteleri üzerine etkisi *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. pH 1,2 ortamı için pepsin ve pH 6,8 ortamı için pankreatin enzim olarak kullanılmıştır. Çalışma Bölüm 2.11.1'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

Simüle gastrik sıvı ortamında yapılan 2 saatlik çalışma sonunda elde edilen verilere bakıldığında BER fosfolipid kompleksinin bu ortamda stabilitesinin (% 79,9) diğer formülasyonlara göre önemli ölçüde ($p<0,05$) düşük olduğu görülmüştür. BER yüklü kitozan mikropartikül (% 93,6) ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül (% 96,1) formülasyonları stabiliteyi bir miktar artırarak korumuşlardır. Bu durumun kitozandan oluşan kaplama tabakası eklenmesi sonucu etkin maddenin dış çevre koşullarından korunmuş olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Simüle intestinal sıvı ortamında yapılan 6 saatlik çalışma sonuçlarına bakıldığında simüle gastrik sıvı ortamına benzer sonuçlar elde edildiği görülmektedir. BER fosfolipid komleks yapısının koruyucu bir rolü olması gerektiği düşünülmesine rağmen, gastrointestinal kanaldaki enzim ve pH ortamlarından etkilendiği ve etkin maddeyi beklenen oranda koruyamadığı görülmektedir. Buna ek olarak, çalışmamızda hazırlanan BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartiküller etkin maddeyi

enzim ve pH ortamlarından koruyarak gastrointestinal kanaldaki stabilitesini artırmıştır. Bu durum çalışmamızın amacına uygunluk göstermektedir.

Yu ve ark., simüle sıvılarda yaptıkları stabilite çalışmasında BER fosfolipid komplekslerinin enkapsülasyon etkinliği değerinin düştüğünü gözlemlemişlerdir. Yapılan çalışma sonucu BER fosfolipid kompleksinin simüle vücut sıvılarında stabil olmadığına karar vermişlerdir (Yu ve ark., 2016).

4.7.2. Buzdolabı ve Oda Sıcaklığında Uzun Süreli Stabilite Analizlerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Optimum olarak seçilen BER-F3, BER-KM31 ve BER-FM3 kodlu formülasyonlara ait uzun süreli stabilite analizleri Bölüm 2.11.2'de anlatıldığı şekilde 6 ay boyunca yapılmıştır.

Formülasyonlar buzdolabı ve oda sıcaklığı koşullarında başlangıç, 1. ay, 3. ay ve 6. ayda incelenerek zeta potansiyeli, partikül boyutu, polidispersite indeksi ve enkapsülasyon etkinliği açısından değerlendirilmiştir. Ayrıca formülasyonların görünüm, renk gibi organoleptik özellikleri incelenmiştir. Tüm formülasyonların tüm saklama koşullarında renk, koku gibi özelliklerinin başlangıç ile aynı olduğu görülmüştür. BER-F3, BER-KM31 ve BER-FM3 formülasyonlarına ait stabilite sonuçları Çizelge 3.28, Çizelge 3.29 ve Çizelge 3.30'da verilmiş ve istatiksel olarak anlamlı değişmeler gösterilmiştir. Genel olarak incelendiğinde formülasyonların buzdolabı koşullarında saklandığında polidispersite indeksi ve enkapsülasyon etkinliği değerlerinde anlamlı değişiklik olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Formülasyonların 5 °C ± 3 °C'de saklanmasının stabilite açısından uygun olduğu görülmüştür.

4.8. Formülasyonların *İn Vivo* Etkinliğinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

BER ve optimum seçilen formülasyonlar Bölüm 2.12'de anlatıldığı şekilde sıçanlara uygulanmış ve belli zamanlarda kan numuneleri alınarak zamana karşı plazma BER konsantrasyonları tayin edilmiştir. BER'in ve formülasyonların zamana karşı plazma konsantrasyonu değerleri grafiklenmiş ve Şekil 3.50 (BER), Şekil 3.51 (BER-F3), Şekil 3.52 (BER-KM31), Şekil 3.53 (BER-FM3)'de gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre BER-F3 (33,4 ng/ml), BER-KM31 (32,7 ng/ml) ve BER-FM3 (36,2 ng/ml) formüllerinin C_{max} değerini BER'e (28,1 ng/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdıkları görülmüştür ($p<0,05$). Formülasyonların BER'in emilimini artırmaları ve gastrointestinal sıvılardaki stabiliteyi korumaları nedeniyle böyle bir artışın olabileceği düşünülmüştür. Formülasyonlar kendi aralarında karşılaştırılarak değerlendirildiklerinde ise C_{max} değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). t_{max} değerleri grafikler üzerinden belirlenmiştir tüm formülasyonlarda BER'e benzer çıkmıştır (6 saat). Liu ve ark., tarafında yapılan çalışmada 90 mg/kg BER uygulaması yapılan sıçanlardan alınan numunelerden plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri çıkartılarak C_{max} ve t_{max} değerleri hesaplanmıştır. BER için C_{max} 29,2 ng/ml ve t_{max} değeri 1 saat olarak bulunmuştur (Liu ve ark., 2015). C_{max} değeri çalışmamızda bulunan değer ile benzerlik göstermektedir. t_{max} değerinin çalışmamızda 6 saat olarak literatürden uzun bulunmasının nedeninin kullanılan hayvanların fizyolojik özelliklerinden kaynaklı olabileceği düşünülmüştür.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde BER'in biyoyararlanımı tüm formülasyonlarında çözeltisine (349,5 saat.ng/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ($p<0,05$). Hesaplanan $AUC_{0\rightarrow24}$ değerleri Çizelge 3.31'de verilmiştir. BER-F3, BER-KM31 ve BER-FM3 formülasyonlarının $AUC_{0\rightarrow24}$ değerleri kendi aralarında karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$). BER'e göre bağıl biyoyararlanımı BER-F3 formülasyonu % 122,88, BER-KM31 formülasyonu % 122,06 ve BER-FM3 formülasyonu % 131,50 artırmışlardır.

BER-FM3 formülasyonunun BER-F3 formülasyonuna göre biyoyararlanımı daha fazla artırması formülasyonun tasarlanma amacına uygunluk göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonu diğer formülasyonlara göre BER'in oral absorbsiyonunu daha fazla artırmakta ve BER'in oral uygulanmasında tercih edilebilir bir taşıyıcı sistem olarak ön plana çıkmaktadır.

Chen ve ark., tarafından yapılan çalışmada BER'in farmakokinetik profili farelerde incelenmiştir. Farelere yapılan 100 mg/kg BER uygulaması sonrası ölçülen serum konsantrasyonlarından elde edilen sonuçlardan $AUC_{0\rightarrow t}$ 742,92 saat.µg/L olarak hesaplanmıştır (Chen ve ark., 2013). Yu ve ark., yaptıkları çalışmada BER'in $AUC_{0\rightarrow t}$ değerini 50 mg/kg uygulama için 384,45 saat.ng/ml olarak hesaplamışlardır (Yu ve ark., 2016). Duong ve ark., tarafından BER lipozom formülasyonu hazırlanmış ve *in vivo* olarak sıçanlarda farmakokinetik profili incelenmiştir. Çalışmada BER ve BER lipozom formülasyonu ratlara 100 mg/kg dozda uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde C_{max}'ın BER için 37,8 ng/ml olan değerininin lipozom formülasyonunda 83 ng/ml'ye yükseldiği ve BER $AUC_{0\rightarrow 36}$ için 135,6 ng.saat/ml olan değerinin lipozom formülasyonunda 852,1 ng.saat/ml'ye yükseldiği görülmüştür. Ayrıca t_{max} BER için 1,07 saat ve BER lipozom formülasyonu için 3 saat olarak bulunmuştur (Duong ve ark., 2022). Çalışmamızda BER dozu sıçanlara 50 mg/kg olarak uygulanmıştır ve elde edilen sonuçlar literatür ile uyumluluk göstermektedir.

4.9. Karaciğer Dokularında Antioksidan Aktivite Tayinine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

İn vivo hayvan deneylerinde sıçanlardan alınan karaciğer dokularında BER'in ve formülasyonların oksidatif stres üzerine etkisi araştırılmıştır. Karaciğer dokularında MDA ve GSH seviyeleri Bölüm 2.13'de anlatıldığı şekilde tayin edilmiştir. Mitokondriyal enerji metabolizmasının hasarlanması serbest oksijen radikallerinin oluşumunda ve oksidatif stresin meydana gelmesinde esas mekanizma olarak kabul edilmektedir (Liu ve ark., 2016). Serbest oksijen radikallerinin birikmesi DNA ve lipid

peroksidasyonuna neden olarak hücrelerin apoptozis veya ölümüne neden olmaktadır. MDA lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Oksidatif stresin yaratacağı hasar antioksidan mekanizmaların devreye girmesiyle önlenmeye çalışılır. GSH'da en önemli endojen antioksidan enzimlerden biridir ve antioksidan aktivitenin göstergelerinden kabul edilir.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre karaciğer dokularındaki BER'in ve formülasyonların antioksidan aktivitesi karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre BER uygulama grubu ve formülasyon uygulama gruplarının MDA seviyelerini azalttığı görülmüştür. İstatistiksel değerlendirmede ise yalnızca BER-FM3 grubunun kontrol grubuna göre MDA seviyesinde anlamlı azalma sağladığı görülmüştür. GSH seviyeleri BER, BER-F3, BER-KM31 ve BER-FM3 uygulama gruplarında kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre tüm gruplarda anlamlı artış görülmüştür ($p<0,05$). BER ve formülasyon grupları kendi aralarında karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde MDA ve GSH seviyeleri açısından aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonu kontrol grubuna kıyasla MDA seviyesini anlamlı derecede düşürmesi ve GSH seviyesini anlamlı derecede artırması nedeniyle diğer formülasyonlara göre antioksidan aktivite açısından daha etkili bulunmuştur.

Chen ve ark. tarafından balıklar üzerinde yapılan çalışmada karaciğer dokusunda BER'in antioksidan kapasitesi tayin edilmiştir. Çalışmada BER'in kontrol grubuna göre MDA seviyesini önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir (Chen ve ark., 2022). Zhou ve Zhou tarafından yapılan çalışmada BER'in antioksidan etkisini görmek amacıyla diyabetli sıçanların karaciğer dokularında MDA ve GSH seviyeleri ölçülerek değerlendirilmiştir. Sıçanlara 75 mg/kg, 150 mg/kg ve 300 mg/kg dozda BER uygulaması yapılmıştır. 150 mg/kg ve 300 mg/kg dozlarda diyabetli sıçanlara göre BER gruplarında GSH seviyesinde anlamlı olarak artış görülmüştür. Ayrıca 150 mg/kg ve 300 mg/kg dozlarda BER uygulaması sonrasında diyabetli sıçanlara göre MDA seviyesinde anlamlı derecede azalma görülmüştür (Zhou ve Zhou, 2011).

Çalışmamızda sıçanlara 50 mg/kg doza karşılık gelecek BER uygulaması yapılmıştır ve elde edilen verilerin literatürler ile uyumluluk gösterdiği görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

BER birçok farklı farmakolojik uygulama için kullanımı kanıtlanmış bitkisel bir aktif maddedir ancak bağırsak absorbsiyonu ve oral biyoyararlanımı oldukça düşüktür. BER'in oral biyoyararlanımını fosfolipid kompleksi geliştirilerek artırmak, BER fosfolipid kompleksinin kitozan mikropartiküllere yüklenmesi sonucu hibrit ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesiyle stabilitenin garanti altına alınması ve BER yüklü kitozan mikropartiküllerin geliştirilerek diğer formülasyonlarla hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak karşılaştırılması tezimizin temel amaçlarıdır. Bu amaçlarla gerçekleştirilen tez çalışmamızda aşağıda yer alan sonuçlar elde edilmiştir.

- BER'in miktar tayini yöntemleri su, pH 1,2 ve pH 6,8 ortamlarında HPLC ile hassas ve güvenilir olarak geliştirilmiş ve miktar tayini yöntemlerinin analitik validasyonları etkin bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

- Ters faz buharlaştırma yöntemi kullanılarak uygun partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımına, zeta potansiyeline ve enkapsülasyon etkinliğine sahip BER fosfolipid kompleks formülasyonları başarıyla hazırlanmıştır. İncelenen formülasyon parametlerinin etkilerinin ve elde edilen formülasyonların karakteristik özelliklerinin ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmesiyle BER-F3 formülasyonu optimum formülasyon olarak seçilmiştir.

- Optimum olarak seçilen BER-F3 formülasyonu kitozan mikropartiküllere yüklemek için kullanılan çekirdek formülasyon olmuştur.

- İyonik jelasyon yöntemiyle farklı formülasyon parametreleri denenerek yaklaşık 400 nm partikül büyüklüğüne sahip BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları başarıyla hazırlanmıştır.

- BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonları için farklı formülasyon parametrelerinin formülasyonların karakteristik özelliklerine etkisi istatiksel

olarak değerlendirilmiş ve BER-KM31 formülasyonu optimum formül olarak seçilmiştir.

- BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının hazırlanması amacıyla iyonotropik jelasyon yöntemi kullanılmış ve formülasyonlar başarıyla hazırlanmıştır.

- Hazırlanan BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartiküller farklı formülasyon parametrelerinin formüllerin karakteristik özelliklerine etkisi açısından değerlendirilmiştir ve BER-FM3 formülasyonu optimum formülasyon olarak seçilmiştir.

- BER fosfolipid kompleksinin BER'in partisyon katsayısını artırdığı ve BER'in sudaki çözünürlük değerini 25 °C ve 37 °C'de azalttığı görülmüştür.

- TEM analizi sonucu BER fosfolipid kompleksi, BER yüklü kitozan mikropartikül ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonlarının düzgün, küresel yapılar olarak oluştukları görülmüştür.

- Simüle intestinal sıvılarda yapılan stabilite çalışması sonuçlarına göre BER'in kitozan ile kaplanmasının etkin maddeyi mide ve bağırsak ortamlarındaki enzim ve pH koşullarından koruyarak stabilitesini önemli ölçüde artırdığı anlaşılmıştır.
- Buzdolabı ve oda sıcaklığı koşullarında formülasyonların 6 ay boyunca uzun süreli stabilitelerinin tayininden elde edilen sonuçlara göre formülasyonların 5 °C ± 3 °C buzdolabı sıcaklığı koşullarında saklanmasının uygun olduğu görülmüştür.

- *İn vivo* hayvan çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre optimum olarak seçilerek sıçanlara uygulaması yapılan BER-F3, BER-KM31 ve BER-FM3 kodlu formülasyonların BER'in oral biyoyararlanımını artırdıkları görülmüştür.

- Karaciğer dokularında BER'in ve hazırlanan formülasyonların antioksidan aktivite tayininden elde edilen sonuçlara göre BER'in ve formülasyon uygulama

gruplarının kontrol grubuna göre GSH seviyesini önemli ölçüde artırdıkları ve antioksidan aktivite gösterdikleri anlaşılmıştır.

Sonuç olarak hazırlanan bu formülasyonlar arasından BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonu lipit ve polimer yapılı sistemlerin avantajlarını bir arada sağlanması yönüyle ön plana çıkmıştır. BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikül formülasyonu BER'i gastrointestinal sıvı ortamlarından etkili bir şekilde korumuştur ve bağıl biyoyararlanımı diğer formülasyonlardan daha yüksek oranda artırmıştır. BER yüklü kitozan mikropartikül formülasyonunun enkapsülasyon etkinliğinin diğer formülasyonlara göre nispeten düşük olması ve lipid içermemesinden kaynaklı olarak partisyon katsayısını etkili bir şekilde artırmaması sebebiyle kullanımının sınırlı kalacağı düşünülmektedir.

Tez çalışmalarımız sırasında oluşan görüş ve öneriler doğrultusunda ek olarak gerçekleştirilmesi planlanan çalışmalar şunlardır:

- BER'in antioksidan aktivitesinin daha ayrıntılı değerlendirilmesi için beyin ve böbrek gibi farklı dokularda da incelenmesi.

- BER lipozom formülasyonlarının hazırlanarak, BER fosfolipid kompleksleri ile *in vitro* olarak karşılaştırmalı değerlendirilmesi.

BER gibi yıllardır birçok hastalık için kullanılan ancak oral biyoyararlanımı düşük olarak bilinen bitkisel aktif maddelerin vücuda etkili biçimde taşınması amacıyla ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi için bir öncü niteliğinde olan bu çalışmanın literatüre önemli katkı sağlayacağını düşünüyoruz.

ÖZET

Berberin Fosfolipid Kompleksi Yüklü Kitozan Mikropartiküllerin Hazırlanması ve İn Vitro/İn Vivo Değerlendirilmesi

Berberin (BER) antihiperglisemik, antikanser, antidepresan ve antihipertansif gibi birçok farmakolojik etki gösterdiği araştırmacılar tarafından kanıtlanan bitkisel bir alkaloittir. BER'in bağırsak ve karaciğerde ilk geçiş etkisine uğraması, P-glikoproteine bağlanması gibi özellikleri nedeniyle bağırsak membranlarından emilimi zordur ve oral biyoyararlanımı bu nedenle oldukça düşüktür. Fosfolipid kompleks sistemleri özellikle son yıllarda bitkisel kaynaklı aktif maddelerin oral emilimini ve biyoyararlanımını artırmak amacıyla hazırlanmaktadırlar. Bitkisel aktif maddelerin ideal biyoyararlanımının sağlanabilmesi amacıyla fosfolipid kompleksleri bu maddelere hidrofilik-lipofilik denge sağlamaktadır. Fosfolipid kompleks sistemleri biyolojik membranlara benzerlikleri sebebiyle özellikle absorbsiyonu artırarak etki gösterir. Bu nedenle bu çalışmada öncelikle oral biyoyararlanımı düşük olan BER'in fosfolipid kompleksi hazırlanmıştır. Ancak bu yapıların gastrointestinal sıvılardaki stabilitesinin düşük olacağı düşünülerek kompleksler kitozan mikropartiküllere yüklenmiştir. Katyonik kitozan epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların açılmasında rol oynayarak maddelerin emilimini artırması ve ayrıca negatif yüklü BER fosfolipid kompleksleriyle bir araya getirilmesi uygun olduğu için çalışmamızda polimer olarak tercih edilmiştir. Hazırlanan bu formülasyonlarla *in vitro* özelliklerini ve *in vivo* farmakokinetik parametrelerini karşılaştırmak amacıyla BER yüklü kitozan mikropartiküller de hazırlanmıştır. Hazırlanan tüm formülasyonların partikül büyüklüğü, partikül büyüklük dağılımı, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği belirlenmiştir.

Optimum seçilen formülasyonlar üzerinde *in vitro* karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Formülasyonların stabilitesi hem simüle gastrointestinal sıvılarda hem de farklı sıcaklık koşullarında uzun süreli olarak tayin edilmiştir. *İn vivo* hayvan deneyleri yapılarak formülasyonların farmakokinetik parametreleri tayin edilmiştir. Ayrıca karaciğer dokularında BER ve formülasyonların antioksidan aktiviteleri tayin edilmiştir. Bu deneyler sonunda BER çözeltisine göre bağıl biyoyararlanımı BER fosfolipid kompleksinin % 122,88, BER yüklü kitozan mikropartikülün % 122,06 ve BER fosfolipid kompleksi yüklü kitozan mikropartikülün ise % 131,05 artırdıkları görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Berberin, Biyoyararlanım, Fosfolipid kompleks, Kitozan, Mikropartikül

SUMMARY

Preparation and In Vitro/In Vivo Evaluation of Chitosan Microparticles Loaded with Berberine Phospholipid Complex

Berberine (BER) is a herbal alkaloid that has been proven by researchers to have many pharmacological effects such as antihyperglycemic, anticancer, antidepressant and antihypertensive. Due to its properties such as first-pass effect in the intestine and liver and binding to P-glycoprotein, BER is difficult to absorb from intestinal membranes and its oral bioavailability is therefore very low. Phospholipid complex systems have been prepared in recent years to increase the oral absorption and bioavailability of plant-derived active substances. In order to ensure the ideal bioavailability of herbal active substances, phospholipid complexes provide a hydrophilic-lipophilic balance to these substances. Phospholipid complex systems act especially by increasing absorption due to their similarity to biological membranes. Therefore, in this study, first of all, the phospholipid complex of BER, which has low oral bioavailability, was prepared. However, considering that the stability of these structures in gastrointestinal fluids would be low, the complexes were loaded in chitosan microparticles. Cationic chitosan was chosen as a polymer in our study because it plays a role in the opening of tight junctions between epithelial cells and increases the absorption of substances, and also because it is convenient to combine with negatively charged BER phospholipid complexes. In order to compare the *in vitro* properties and *in vivo* pharmacokinetic parameters with these prepared formulations, BER loaded chitosan microparticles were also prepared. Particle size, particle size distribution, zeta potential and encapsulation efficiency of all prepared formulations were determined.

In vitro characterization studies were performed on selected formulations. The stability of the formulations has been determined both in simulated gastrointestinal fluids and over a long period of time under different temperature conditions. Pharmacokinetic parameters of the formulations were determined by *in vivo* animal experiments. In addition, antioxidant activities of BER and formulations were determined in liver tissues. At the end of these experiments, it was observed that the relative bioavailability of BER phospholipid complex increased by 122.88%, BER loaded chitosan microparticle by 122.06% and BER phospholipid complex loaded chitosan microparticle by 131.05% compared to BER solution.

Keywords: Berberine, Bioavailability, Chitosan, Microparticle, Phospholipid complex

KAYNAKLAR

ACİKGOZ M, KAS HS, ORMAN M, HİNCAL AA (1996). Chitosan microspheres of diclofenac sodium: I. Application for factorial design and evaluation of release kinetics. *J Microencapsul.,* **13:**141–160.

ADEPU S, RAMAKRİSHNA S (2021). Controlled drug delivery systems: current status and future directions. *Molecules*, **26**(19):5905.

AGARWAL A, CHAKRABORTY P, CHAKRABORTY DD, SAHARAN VA (2012). Phytosomes: complexation, utilisation and commerical status. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, **2**(2):65-77.

AGNİHOTRİ SA, MALLİKARJUNA NN, AMİNABHAVİ TM (2004). Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of controlled release*, **100**(1):5-28.

AHMED L, ATİF R, ELDEEN TS, YAHYA I, OMARA A, ELTAYEB M (2019). Study the using of nanoparticles as drug delivery system based on mathematical models for controlled release. *International Journal of Latest Technology in Engineering, Management & Applied Science-IJLTEMAS*, **8**(5):52-56.

AHMED TA, ALJAEİD BM (2016). Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug design, development and therapy*, **10:**483.

AKBUGA J, BERGİSADİ N (1996). 5-fluorouracil-loaded chitosan microspheres: preparation and release characteristics. *J Microencapsul*., **13:**161–168.

ALAM MA, AL-JENOOBİ FI, AL-MOHİZEA AM (2013). Commercially bioavailable proprietary technologies and their marketed products. *Drug Discovery Today*, **18**(19-20):936-949.

ALEXANDER A, PATEL RJ, SARAF S, SARAF S (2016). Recent expansion of pharmaceutical nanotechnologies and targeting strategies in the field of phytopharmaceuticals for the delivery of herbal extracts and bioactives. *Journal of Controlled Release*, **241:**110-124.

ALGHARİB SA, DAWOOD A, ZHOU K, CHEN D, Lİ C, MENG K, XİE S (2022). Preparation of chitosan nanoparticles by ionotropic gelation technique: Effects of formulation parameters and in vitro characterization. *Journal of Molecular Structure*, **1252:**132129.

AMİDON GL, LENNERNÄS H, SHAH VP, CRİSON JR (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical research*, **12**(3):413-420.

AMİT G, ASHAWAT MS, SHAİLENDRA S, SWARNLATA S (2007). Phytosome: a novel approach towards functional cosmetics. *Journal of Plant Sciences*, **2**(6):644-9.

ANAL AK, STEVENS WF, REMUNAN LOPEZ C (2006). Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. *International journal of pharmaceutics*, **312**(1-2):166-173.

ANDOLA HC (2012). Genus Berberis and berberine HPLC: an overview. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, **2(**5):256-264.

AYKAÇ G, UYSAL M, YALÇİN AS, KOÇAK TOKER N, SİVAS A, ÖZ H (1985). The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology*, **36**(1):71-76.

BABAZADEH A, ZEİNALİ M, HAMİSHEHKAR H (2018). Nano-phytosome: A developing platform for herbal anti-cancer agents in cancer therapy. *Current drug targets*, **19**(2):170-180.

BAŞARAN E, YAZAN Y (2012). Ocular application of chitosan. *Expert opinion on drug delivery*, **9**(6):701-712.

BATTU SK, REPKA MA, MADDİNENİ S, CHİTTİBOYİNA AG, AVERY MA, MAJUMDAR S (2010). Physicochemical characterization of berberine chloride: a perspective in the development of a solution dosage form for oral delivery. *Aaps Pharmscitech*, **11**(3):1466-1475.

BEHBAHANİ ES, GHAEDİ M, ABBASPOUR M, ROSTAMİZADEH K (2017). Optimization and characterization of ultrasound assisted preparation of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles: Application of central composite design, thermal analysis and X-ray diffraction techniques. *Ultrasonics sonochemistry*, **38:**271-280.

BERGER J, REİST M, MAYER JM, FELT O, PEPPAS NA, GURNY R (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, **57**(1):19-34.

BHOSALE AP, PATİL A, SWAMİ M (2016). Herbosomes as a novel drug delivery system for absorption enhancement. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **5**(1):345-355.

BOKURA H, KOBAYASHİ S (2003). Chitosan decreases total cholesterol in women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.,* **57**:721- 725.

BOMBARDELLİ E, CURRİ SB, DELLALOGGİA R, DEL NEGRO P, GARİBOLDİ P, TUBARO A (1989). Complexes between phospholipids and vegetal derivates of biological interest. *Fitoterapia,* **60**:1-9.

BOVI APD, MARCIANO F, MANDATO C, SIANO MA, SAVOIA M, VAJRO P (2021). Oxidative stress in non-alcoholic fatty liver disease. An updated mini review. *Frontiers in Medicine*, **8**:595371. doi:10.3389/fmed.2021.595371.

BUGNICOURT L, LADAVIÈRE C (2016). Interests of chitosan nanoparticles ionically cross-linked with tripolyphosphate for biomedical applications. *Progress in polymer science,* **60**:1-17.

BUKOWSKA B, DUCHNOWICZ P (2022). Molecular Mechanisms of Action of Selected Substances Involved in the Reduction of Benzo [a] pyrene-Induced Oxidative Stress. *Molecules*, **27**(4):1379.

CALICETI C, FRANCO P, SPINOZZİ S, RODA A, FG CICERO A (2016). Berberine: new insights from pharmacological aspects to clinical evidences in the management of metabolic disorders. *Current Medicinal Chemistry*, **23**(14):1460-1476.

CASINI AF, FERRALI M, POMPELLA A, MAELLARO E, COMPORTI M (1986). Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene-intoxicated mice. *The American journal of pathology*, **123**(3):520.

CHAURIO RA, JANKO C, MUÑOZ LE, FREY B, HERRMANN M, GAIPL US (2009). Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation. *Molecules*, **14**(12):4892-4914.

CHEN G, LU F, XU L, DONG H, YI P, WANG F, ZOU X (2013). The anti-diabetic effects and pharmacokinetic profiles of berberine in mice treated with Jiao-Tai-Wan and its compatibility. *Phytomedicine*, **20**(10):780-786.

CHEN RH, TSAIH ML (1998). Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosans in dilute HCl solution. *International journal of biological macromolecules*, **23**(2):135-141.

CHEN S, JIANG X, LİU N, REN M, WANG Z, LI M, LI S (2022). Effects of dietary berberine hydrochloride inclusion on growth, antioxidant capacity, glucose metabolism and intestinal microbiome of largemouth bass (Micropterus salmoides). *Aquaculture, **552*:** 738023. doi: 10.1016/j.aquaculture.2022.738023.

CHEN W, MIAO YQ, FAN DJ, YANG SS, LIN X, MENG LK, TANG X (2011). Bioavailability study of berberine and the enhancing effects of TPGS on intestinal absorption in rats. *Aaps Pharmscitech*, **12**(2):705-711.

CHENG W, Lİ, ZHANG C, CHEN W, YUAN H, XU S (2017). Preparation and in vivo-in vitro evaluation of polydatin-phospholipid complex with improved dissolution and bioavailability. *International Journal of Drug Development and Research*, **9**(1):39-43.

CHİVTE PS, PARDHİ VS, JOSHİ VA, RANİ A (2017). A review on therapeutic applications of phytosomes. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, **7**(5):17-21.

CİCERO AFG, BAGGİONİ A (2016). Berberine and its role in chronic disease. *Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases*. In: Gupta S, Prasad S, Aggarwal B. (eds). **928**:27-45. Springer, Cham.

CONTİ B, GİUNCHEDİ P, GENTA I, CONTE U (2000). The preparation and in vivo evaluation of the wound-healing properties of chitosan microspheres. *S.T.P. Pharma Sci.,* **10**:101–104.

DAS MK, KALİTA B (2014). Design and evaluation of phyto-phospholipid complexes (phytosomes) of rutin for transdermal application. *J Appl Pharm Sci*, **4**(10):051-7.

DASH M, CHİELLİNİ F, OTTENBRİTE RM, CHİELLİNİ E (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in polymer science*, **36**(8):981-1014.

DAVOODİ P, LEE LY, XU Q, SUNİL V, SUN Y, SOH S, WANG CH (2018). Drug delivery systems for programmed and on-demand release. *Advanced drug delivery reviews*, **132**:104-138.

DE QUEİROZ ANTONİNO RSCM, LİA FOOK BRP, DE OLİVEİRA LİMA VA, DE FARİAS RACHED RI, LİMA EPN, DA SİLVA LİMA RJ, LİA FOOK MV (2017). Preparation and characterization of chitosan obtained from shells of shrimp (Litopenaeus vannamei Boone). *Marine drugs*, **15**(5):141. doi:10.3390/md15050141.

DESAİ KG (2016). Chitosan nanoparticles prepared by ionotropic gelation: An overview of recent advances. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **33**(2):107-158. doi:10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2016014850.

Dİ SANTO MC, D'ANTONİ CL, RUBİO APD, ALAİMO A, PÉREZ OE (2021). Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles designed to encapsulate polyphenolic compounds for biomedical and pharmaceutical applications− A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **142**:111970.

DİNİ E, ALEXANDRİDOU S, KİPARİSSİDES C (2003). Synthesis and characterization of cross-linked chitosan microspheres for drug delivery applications. *J Microencapsul*., **20**(3):375–385.

DJEBBİ MA, ELABED A, BOUAZİZ Z, SADİKİ M, ELABED S, NAMOUR P, AMARA ABH (2016). Delivery system for berberine chloride based on the nanocarrier ZnAl-layered double hydroxide: physicochemical characterization, release behavior and evaluation of anti-bacterial potential. *International journal of pharmaceutics*, **515**(1-2):422-430.

DOSTÁL J, MAN S, SEČKÁŘOVÁ P, HULOVÁ D, NEČAS M, POTÁČEK M, MAREK R (2004). Berberine and coptisine free bases. *Journal of Molecular Structure*, **687**(1-3):135-142.

DU YZ, YİNG XY, WANG L, ZHAİ Y, YUAN H, YU RS, HU FQ (2010). Sustained release of ATP encapsulated in chitosan oligosaccharide nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, **392**(1-2):164-169.

DULBECCO P, SAVARINO V (2013). Therapeutic Potential of Curcumin in Digestive Diseases. *World Journal of Gastroenterology*, **19**(48):9256-9270.

DUONG TT, YEN TTH, NGUYEN LT, NGUYEN TD, PHAM HT, RAAL A, HEİNÄMÄKİ J (2022). Berberine-loaded liposomes for oral delivery: Preparation, physicochemical characterization and in-vivo evaluation in an endogenous hyperlipidemic animal model. *International Journal of Pharmaceutics*, **616**:121525.

ERGİN AD, BAYİNDİR ZS, OZCELİKAY AT, YUKSEL N (2021). A novel delivery system for enhancing bioavailability of S-adenosyl-l-methionine: Pectin nanoparticles-in-microparticles and their in vitro-in vivo evaluation'. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **61**:102096.

ERTAŞ ÖS, KAYALI A (2005). Analitik yöntem geçerliliğine genel bir bakış: an overview on analytical method validation. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, **34**(1):41-57.

FAN W, YAN W, XU Z, Nİ H (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, **90**:21-27.

FENG R, SHOU JW, ZHAO ZX, HE CY, MA C, HUANG M, JİANG JD (2015). Transforming berberine into its intestine-absorbable form by the gut microbiota. *Scientific reports*, **5**(1):1-15.

FENG X, SUREDA A, JAFARİ S, MEMARİANİ Z, TEWARİ D, ANNUNZİATA G, SHEN AZ (2019). Berberine in cardiovascular and metabolic diseases: from mechanisms to therapeutics. *Theranostics*, **9**(7):1923.

FLEİSHER D, Lİ C, ZHOU Y, PAO LH, KARİM A (1999). Drug, meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. *Clinical pharmacokinetics*, **36**(3):233-254.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 'APPENDIX 1 – ORA Validation and Verification Guidance for Human Drug Analytical Methods' Erişim adresi: https://www.fda.gov/media/82998/download Son erişim tarihi: 06 Mart 2022.

FUNDUEANU G, NASTRUZZİ C, CARPOV A, DESBRİERES J, RİNAUDO M (1999). Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. *Biomaterials*, **20**(15):1427-1435.

GABA S, SAİNİ A, SİNGH G, MONGA V (2021). An insight into the medicinal attributes of berberine derivatives: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **38**:116143. doi: 10.1016/j.bmc.2021.116143.

GALOGAHİ FM, ZHU Y, AN H, NGUYEN NT (2020). Core-shell microparticles: Generation approaches and applications. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, **5**(4):417-435.

GAN Q, WANG T, COCHRANE C, MCCARRON P (2005). Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **44**(2-3):65-73.

GHANBARZADEH B, BABAZADEH A, HAMİSHEHKAR H (2016). Nano-phytosome as a potential food-grade delivery system. *Food bioscience*, **15**:126-135.

GHAVİPANJE N, FATHİ NASRİ MH, FARHANGFAR SH, GHİASİ SE, VARGAS-BELLO-PÉREZ E (2021). Pre-and Post-partum Berberine Supplementation in Dairy Goats as a Novel Strategy to Mitigate Oxidative Stress and Inflammation. *Frontiers in Veterinary Science*, **8**:743455.

GHOBADİ-OGHAZ N, ASOODEH A, MOHAMMADİ M (2022). Fabrication, characterization and in vitro cell exposure study of zein-chitosan nanoparticles for co-delivery of curcumin and berberine. *International Journal of Biological Macromolecules*, **204**:576-586.

GİACALONE G, HİLLAİREAU H, CAPİAU P, CHACUN H, REYNAUD F, FATTAL E (2014). Stabilization and cellular delivery of chitosan–polyphosphate nanoparticles by incorporation of iron. *Journal of Controlled Release*, **194**:211-219.

GNANANATH K, NATARAJ KS, RAO BG (2017). Phospholipid complex technique for superior bioavailability of phytoconstituents. *Advanced pharmaceutical bulletin*, **7**(1):35.

GONG Z, CHEN Y, ZHANG R, WANG Y, GUO Y, YANG Q, ZHU X (2014). Pharmacokinetic comparison of berberine in rat plasma after oral administration of berberine hydrochloride in normal and post inflammation irritable bowel syndrome rats. *International journal of molecular sciences*, **15**(1):456-467.

GUAMÁN ORTİZ LM, LOMBARDİ P, TİLLHON M, SCOVASSİ AI (2014). Berberine, an epiphany against cancer. *Molecules*, **19**(8):12349-12367.

GUNGOR AK A, ALGAN AH, KARATAŞ A (2020). Oral Yoldan İlaç Verilişinde Yeni Taşıyıcı Sistem Olarak Fitozomlar. *Eczacılıkta Yenilikler 3*, ÖZÇELİKAY G, YILDIZ I, Editör, Ankara Üniversitesi Yayınları, Ankara, ss. 325-338.

GUNGOR AK A, KARATAS A (2020). Fitozom formülasyonundan berberin miktar tayini için HPLC yönteminin geliştirilmesi ve analitik validasyonu. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, **3**(2):154-159.

GÜNGÖR AK A, KÜPELİ AKKOL E, AKSU B, KARATAŞ A (2022). Preparation and optimization of berberine phospholipid complexes using QbD approach and in vivo evaluation for anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity. *J ResPharm.,* **26**(2):370-382

GÜNGÖR S, AKBAL DAĞISTAN Ö, ALĞIN YAPAR E, KARTAL M, ÖZSOY Y (2020). Phytosomes as Novel Carriers of herbal Extracts. In: Novel Drug Delivery Systems for Phytoconstituents Ed.: Madhu G, Chauhan DN, Sharma V, Chauhan NS, New York: CRC Press.

GÜRSOY AZ, Kontrollü salım sistemleri, Farmasötik Teknoloji- Temel Konular ve Dozaj Şekilleri. (Ed. A. Z. Gürsoy). Piksel Bilişim Matbaacılık ve Filmcilik Hizmetleri Ltd. Şti., İstanbul, s. 410-421, 2004.

HANDA M, BEG S, SHUKLA R, BARKAT MA, CHOUDHRY H, SİNGH KK (2021). Recent advances in lipid-engineered multifunctional nanophytomedicines for cancer targeting. *Journal of Controlled Release*, **340**:48-59.

HASANEİN P, GHAFARİ-VAHED M, KHODADADİ I (2017). Effects of isoquinoline alkaloid berberine on lipid peroxidation, antioxidant defense system, and liver damage induced by lead acetate in rats. *Redox Report*, **22**(1):42-50.

HAYASHİ K, MİNODA K, NAGAOKA Y, HAYASHİ T, UESATO S (2007). Antiviral activity of berberine and related compounds against human cytomegalovirus. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **17**(6):1562-1564.

HUANG Y, CAİ Y, LAPİTSKY Y (2015). Factors affecting the stability of chitosan/tripolyphosphate micro-and nanogels: resolving the opposing findings. *Journal of Materials Chemistry B,* **3**(29):5957-5970.

HUANG Z, BRENNAN CS, ZHAO H, LİU J, GUAN W, MOHAN MS, KULASİRİ D (2020). Fabrication and assessment of milk phospholipid-complexed antioxidant phytosomes with vitamin C and E: A comparison with liposomes. *Food Chemistry*, **324**:126837.

HÜSCH J, BOHNET J, FRİCKER G, SKARKE C, ARTARİA C, APPENDİNO G, ABDEL-TAWAB M (2013). Enhanced absorption of boswellic acids by a lecithin delivery form (Phytosome®) of Boswellia extract. *Fitoterapia*, **84**:89-98.

HWİSA NT, KATAKAM P, CHANDU BR, ADİKİ SK (2013). Solvent evaporation techniques as promising advancement in microencapsulation. *Vedic Res. Int. Biol. Med. Chem*, **1**:8-22.

INDENA. Erişim adresi: https://www.indena.com/indena_files/2021/10/product_list_int.pdf Erişim tarihi: 17/01/2022

INDENA. Erişim adresi: https://www.indena.com/products/ Erişim tarihi: 17/01/2022

INTERNATIONAL CENTER OF HARMONIZATION Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY (CPMP/ICH/381/95), (June/ 1995).

IQBAL O, SHAH S, ABBAS G, RASUL A, HANİF M, ASHFAQ M, AFZAL Z (2021). Moxifloxacin loaded nanoparticles of disulfide bridged thiolated chitosan-eudragit RS100 for controlled drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, **182**:2087-2096.

JAİN S, TRİPATHİ S, TRİPATHİ PK (2020). Invasomes: Potential vesicular systems for transdermal delivery of drug molecules. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 102166.

JAMEELA SR, JAYAKRİSHNAN A (1995). Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle. *Biomaterials,* **16**:769–775.

JANTOVÁ S, ČİPÁK LU, ČERŇÁKOVÁ M, KOŠT ‘ÁLOVÁ D (2003). Effect of berberine on proliferation, cell cycle and apoptosis in HeLa and L1210 cells. *Journal of pharmacy and pharmacology*, **55**(8):1143-1149.

JİA J, ZHANG K, ZHOU X, MA J, LİU X, XİANG A, GE F (2019). Berberine-loaded solid proliposomes prepared using solution enhanced dispersion by supercritical CO2: Sustained release and bioavailability enhancement. *Journal of drug delivery science and technology*, **51**:356-363.

JİA J, ZHANG K, ZHOU X, ZHOU D, GE F (2018). Precise dissolution control and bioavailability evaluation for insoluble drug berberine via a polymeric particle prepared using supercritical CO2. *Polymers*, **10**(11):1198.

JİN Y, KHADKA, DB, CHO WJ (2016). Pharmacological effects of berberine and its derivatives: a patent update. *Expert opinion on therapeutic patents*, **26**(2):229-243.

JONASSEN H, KJØNİKSEN AL, HİORTH M (2012). Stability of chitosan nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate. *Biomacromolecules*, **13**(11):3747-3756.

KARATAŞ A, SONAKİN O, KİLİÇARSLAN M, BAYKARA T (2009). Poly (ε-caprolactone) microparticles containing Levobunolol HCl prepared by a multiple emulsion (W/O/W) solvent evaporation technique: Effects of some formulation parameters on microparticle characteristics. *Journal of microencapsulation*, **26**(1):63-74.

KARATAŞ A, TURHAN F (2015). Phyto-phospholipid complexes as drug delivery system for herbal extracts/molecules. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, **12**(1):93-102.

KAUR IP, GARG A, SİNGLA AK, AGGARWAL D (2004). Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. *International journal of pharmaceutics*, **269**(1):1-14.

KEAWCHAOON L, YOKSAN R (2011). Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, **84**(1):163-171.

KETTMANN V, KOŠŤÁLOVÁ D, JANTOVA S, ČERŇÁKOVÁ M (2004). In vitro cytotoxicity of berberine against HeLa and L1210 cancer cell lines. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, **59**(7):548-551.

KHAN J, ALEXANDER A, SARAF S, SARAF S (2013). Recent advances and future prospects of phyto-phospholipid complexation technique for improving pharmacokinetic profile of plant actives. *Journal of controlled release*, **168**(1):50-60.

KHAN S, HUSSAİN A, ATTAR F, BLOUKH SH, EDİS Z, SHARİFİ M, FALAHATİ M (2022). A review of the berberine natural polysaccharide nanostructures as potential anticancer and antibacterial agents. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **146**:112531.

KHAYROVA A, LOPATİN S, VARLAMOV V (2021). Obtaining chitin, chitosan and their melanin complexes from insects. *International Journal of Biological Macromolecules*, **167**:1319-1328.

KHOR E, LİM LY (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, **24**(13):2339-2349.

KİDD PM (2009). Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts. *Alternative Medicine Review*, **14**(3):226-46.

KİM EK, JEONG EK, HAN SB, JUNG JH, HONG JK (2011). HPLC separation of isoquinoline alkaloids for quality control of Corydalis species. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **32**(10):3597-3602.

KO JA, PARK HJ, HWANG SJ, PARK JB, LEE JS (2002). Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *Int J Pharm.*, **249**(1–2):165–174.

KO WH, YAO XQ, LAU CW, LAW WI, CHEN ZY, KWOK W, HUANG Y (2000). Vasorelaxant and antiproliferative effects of berberine. *European journal of pharmacology*, **399**(2-3):187-196.

KOMEİL IA, EL-REFAİE WM, GOWAYED MA, EL-GANAİNY SO, EL ACHY SN, HUTTUNEN KM, ABDALLAH OY (2021). Oral genistein-loaded phytosomes with

enhanced hepatic uptake, residence and improved therapeutic efficacy against hepatocellular carcinoma. *International Journal of Pharmaceutics*, **601**:120564.

KULKARNİ SK, DHİR A (2010). Berberine: a plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders. *Phytother Res*., **24**(3):317-324.

KUMAR A, CHOPRA K, MUKHERJEE M, POTTABATHİNİ R, DHULL DK (2015). Current knowledge and pharmacological profile of berberine: an update. *European journal of pharmacology*, **761**:288-297.

KUMAR S, PANDEY AK (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*, *2013*. doi: 10.1155/2013/102750

KÜPELİ E, KOŞAR M, YEŞİLADA E, BAŞER KHC (2002). A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish Berberis species. *Life sciences*, **72**(6):645-657.

LAU CW, YAO XQ, CHEN ZY, KO WH, HUANG Y (2001). Cardiovascular actions of berberine. *Cardiovascular Drug Reviews*, **19**(3):234-244.

LENG D, THANKİ K, FATTAL E, FOGED C, YANG M (2018). Engineering of budesonide-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles using a quality-by-design approach. *International journal of pharmaceutics*, **548**(2):740-746.

Lİ Y, REN G. WANG YX, KONG WJ, YANG P, WANG YM, JİANG JD (2011). Bioactivities of berberine metabolites after transformation through CYP450 isoenzymes. *Journal of translational medicine*, **9**(1):1-10.

LİANG Y, XU X, YİN M, ZHANG Y, HUANG L, CHEN R, Nİ J (2019). Effects of berberine on blood glucose in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic literature review and a meta-analysis. *Endocr J.,* **66**(1):51-63.

LİU CS, ZHENG YR, ZHANG YF, LONG XY (2016). Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability. *Fitoterapia*, **109**:274-282.

LİU H, GAO C (2009). Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles. *Polymers for Advanced Technologies*, **20**(7):613-619.

LİU L, SUN Q, WANG R, CHEN Z, WU J, XİA F, FAN XQ (2016). Methane attenuates retinal ischemia/reperfusion injury via anti-oxidative and anti-apoptotic pathways. *Brain Research*, **1646**:327-333.

LİU M, SU X, Lİ G, ZHAO G, ZHAO L (2015). Validated UPLC–MS/MS method for simultaneous determination of simvastatin, simvastatin hydroxy acid and berberine in rat plasma: Application to the drug–drug pharmacokinetic interaction study of simvastatin combined with berberine after oral administration in rats. *Journal of Chromatography B*, **1006**:8-15.

LİU Q, JİANG H, LİU Z, WANG Y, ZHAO M, HAO C, SHAO C (2011). Berberine radiosensitizes human esophageal cancer cells by downregulating homologous recombination repair protein RAD51. *PloS one*, **6**(8):e23427.

LİU Y, HAO H, XİE H, LV HU A, LİU C, WANG G (2009). Oxidative demethylenation and subsequent glucuronidation are the major metabolic pathways of berberine in rats. *Journal of pharmaceutical sciences*, **98**(11):4391-4401.

LİU Y, LUO X, XU X, GAO N, LİU X (2017). Preparation, characterization and in vivo pharmacokinetic study of PVP-modified oleanolic acid liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, **517(**1-2):1-7.

LİVNEY YD (2008). Complexes and conjugates of biopolymers for delivery of bioactive ingredients via food. *Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals*, In Garti N (eds), 234-250.

LOO YS, MADHESWARAN T, RAJENDRAN R, BOSE RJ (2020). Encapsulation of berberine into liquid crystalline nanoparticles to enhance its solubility and anticancer activity in MCF7 human breast cancer cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **57**: 101756.

LÓPEZ LEÓN T, CARVALHO ELS, SEİJO B, ORTEGA VİNUESA JL, BASTOS GONZÁLEZ D (2005). Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *Journal of colloid and interface science*, **283**(2):344-351.

LU M, QİU Q, LUO X, LİU X, SUN J, WANG C, SONG Y (2019). Phyto-phospholipid complexes (phytosomes): A novel strategy to improve the bioavailability of active constituents. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **14**(3):265-274.

LUO Y, WANG Q (2014). Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *International journal of biological macromolecules*, **64**:353-367.

LUPO B, MAESTRO A, GUTİÉRREZ JM, GONZÁLEZ C (2015). Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms. *Food Hydrocolloids*, **49**:25–34.

MA Y, LEE G, HEO SY, ROH YS (2021). Oxidative stress is a key modulator in the development of nonalcoholic fatty liver disease. *Antioxidants*, **11**(1):91.

MADAN PL, JANİ RK, BARTİLUCCİ AJ (1978). New method of preparing gelatin microcapsules of soluble pharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical sciences*, **67**(3):409-411.

MAHALE NB, THAKKAR PD, MALİ RG, WALUNJ DR, CHAUDHARİ SR (2012). Niosomes: novel sustained release nonionic stable vesicular systems—an overview. *Advances in colloid and interface science*, **183**:46-54.

MAHYA S, Aİ J, SHOJAE S, KHONAKDAR HA, DARBEMAMİEH G, SHİRİAN S (2021). Berberine loaded chitosan nanoparticles encapsulated in polysaccharide-based hydrogel for the repair of spinal cord. *International Journal of Biological Macromolecules*, **182**:82-90.

MANSFİELD E (2015). Recent advances in thermal analysis of nanoparticles: Methods, models and kinetics. *Modeling, Characterization, and Production of Nanomaterials*, 167-178.

MANSOOR S, KONDİAH, PP, CHOONARA YE, PİLLAY V (2019). Polymer-based nanoparticle strategies for insulin delivery. *Polymers*, **11**(9):1380.

MARÍ M, DE GREGORİO E, DE DİOS C, ROCA-AGUJETAS V, CUCARULL B, TUTUSAUS A, COLELL A (2020). Mitochondrial glutathione: recent insights and role in disease. *Antioxidants*, **9**(10):909.

MAZDA F, ÖZER AY (1993). Kozmetoloji ve Dermatolojide Lipozom ve Niozomlar. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, **18**:121-128.

MİRZAEİ H, SHAKERİ A, RASHİDİ B, JALİLİ A, BANİKAZEMİ Z, SAHEBKAR A (2017). Phytosomal curcumin: A review of pharmacokinetic, experimental and clinical studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **85**:102-112.

MİŠÍK V, BEZÁKOVÁ L, MÁLEKOVÁ Ľ, KOŠŤÁLOVÁ D (1995). Lipoxygenase inhibition and antioxidant properties of protoberberine and aporphine alkaloids isolated from Mahonia aquifolium. *Planta medica*, **61**(04):372-373.

MORİN CRİNİ N, LİCHTFOUSE E, TORRİ G, CRİNİ G (2019). Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. *Environmental Chemistry Letters*, **17**(4):1667-1692.

MOTA AH, RİJO P, MOLPECERES J, REİS CP (2017). Broad overview of engineering of functional nanosystems for skin delivery. *International journal of pharmaceutics*, **532**(2):710-728.

MUXİKA A, ETXABİDE A, URANGA J, GUERRERO P, DE LA CABA K (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, **105**:358-1368.

MÜDERRİSOĞLU AE, ÇOMOĞLU T (2010). An overview of polymeric particulate drug delivery system formulations. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, **39**(4):343-368.

NAGPAL K, SİNGH SK, MİSHRA DN (2010). Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **58**(11):1423-1430.

NASKAR S, SHARMA S, KUOTSU K (2019). Chitosan-based nanoparticles: An overview of biomedical applications and its preparation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **49**:66-81.

OYENİHİ AB, SMİTH C (2019). Are polyphenol antioxidants at the root of medicinal plant anti-cancer success?. *Journal of ethnopharmacology*, **229**:54-72.

OZKAN G, FRANCO P, DE MARCO I, XİAO J, CAPANOGLU E (2019). A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food chemistry*, **272**:494-506.

PADHYE T, MARAVAJJALA KS, SWETHA KL, SHARMA S, ROY A (2021). A comprehensive review of the strategies to improve oral drug absorption with special emphasis on the cellular and molecular mechanisms. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **61**:102178.

PAN GY, HUANG ZJ, WANG GJ, FAWCETT JP, LİU XD, ZHAO XC, XİE YY (2003). The antihyperglycaemic activity of berberine arises from a decrease of glucose absorption. *Planta medica*, **69**(07):632-636.

PAN GY, WANG GJ, LİU XD, FAWCETT JP, XİE YY (2002). The involvement of P-glycoprotein in berberine absorption. *Pharmacology & toxicology*, **91**(4):193-197.

PARK SJ, KANG JY (2005). Preparation and characterization of calcium alginate microcapsules by emulsification-internal gelation. *Polymer Korea*, **29**(4):369-374.

PASRİJA A, SİNGH R, KATİYAR CK (2010). Validated HPLC-UV method for the determination of berberine in raw herb Daruharidra (Berberis aristata DC), its extract, and in commercially marketed ayurvedic dosage forms. *International Journal of Ayurveda Research*, **1**(4):243.

PAWAR HA, BHANGALE BD (2015). Phytosome as a novel biomedicine: a microencapsulated drug delivery system. *Journal of Bioanalysis&Biomedicine*, **7**(1):06-12.

PEKER H, ARSLAN S (2011). Mikroenkapsülasyon ve süt teknolojisinde kullanım alanları. *Akademik Gıda*, **9**(6):70-80.

PERMANADEWİ I, KUMORO AC, WARDHANİ DH, ARYANTİ N. (2019). Modelling of controlled drug release in gastrointestinal tract simulation. *Journal of Physics: Conference Series*, **1295**(1):012063.

POVOLO C, AVOLİO R, DORİA E, MARRA A, NERESİNİ M (2022). Development and validation of an analytical method to ensure quality requirements of hydrolysed proteins intended for agricultural use as biostimulants. *Talanta Open*, **5**:100082.

PRABAHARAN M, MANO JF (2004). Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. *Drug delivery*, **12**(1):41-57.

PRAJAPATİ VD, JANİ GK, KAPADİA JR (2015). Current knowledge on biodegradable microspheres in drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, **12**(8):1283-1299.

RAJU M, KULKARNİ YA, WAİRKAR S (2019). Therapeutic potential and recent delivery systems of berberine: A wonder molecule. *Journal of Functional Foods*, **61**:103517.

RAPOSO F, IBELLİ-BİANCO C (2020). Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *Trends Anal. Chem.*, **129**:115913. doi: 10.1016/j.trac.2020.115913.

REİS CP, NEUFELD RJ, VİLELA S, RİBEİRO AJ, VEİGA F (2006). Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *Journal of microencapsulation*, **23**(3):245-257.

SACCOP, PEDROSO SANTANA S, KUMAR Y, JOLY N, MARTİN P, BOCCHETTA P (2021). Ionotropic Gelation of Chitosan Flat Structures and Potential Applications. *Molecules*, **26**(3):660.

SAHA S, SARMA A, SAİKİA P, CHAKRABARTY T (2013). Phytosome: A brief overview. *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, **2**(1): 12-20.

SANTAMARÍA-AGUİRRE J, ALCOCER-VALLEJO R, LÓPEZ-FANÁRRAGA M (2018). Drug nanoparticle stability assessment using isothermal and nonisothermal approaches. *Journal of Nanomaterials*, **2018**:3047178.

SANTİLLİ F, D'ARDES D, DAVİ G (2015). Oxidative stress in chronic vascular disease: from prediction to prevention. *Vascular pharmacology*, **74**:23-37.

SANTOS AC, RODRİGUES D, SEQUEİRA JA, PEREİRA I, SİMÕES A, COSTA D VEİGA F (2019). Nanotechnological breakthroughs in the development of topical phytocompounds-based formulations. *International journal of pharmaceutics*, 118787.

SELLAMİ M, SLİMENİ O, POKRYWKA A, KUVAČİĆ G, HAYES LD, MİLİC M, PADULO J (2018). Herbal medicine for sports: a review. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, **15**(1):14. doi: 10.1186/s12970-018-0218-y

SHABİR GA (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of chromatography A*, **987**(1-2):57-66.

SHAH VP (2005). The Role of Dissolution Testing in the Regulation of Pharmaceuticals: The FDA Perspective. *Pharmaceutical Dissolution Testing*. In J. Dressman and H. Lennernas, New York: Taylor & Francis Group, LCC, 81-97.

SHİGEMASA Y, MİNAMİ S (1998). Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.,* **13**:383-420.

SHU XZ, ZHU KJ (2002). The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **54**(2):235-243.

SINDHUMOL PG, THOMAS M, MOHANACHANDRAN PS (2010). Phytosomes: a novel dosage form for enhancement of bioavailability of botanicals and neutraceuticals. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2**(4):10-14.

SINGH RP, GANGADHARAPPA HV, MRUTHUNJAYA K (2017). Phospholipids: unique carriers for drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **39**:166-179.

SİNHA N, KUMAR DABLA P (2015). Oxidative stress and antioxidants in hypertension–a current review. *Current hypertension reviews*, **11**(2):132-142.

SOUZA TG, CİMİNELLİ VS, MOHALLEM NDS (2016). A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles. *Journal of physics: conference series*, **733**(1):012039.

SUT S, FAGGIAN M, BALDAN V, POLONİATO G, CASTAGLİUOLO I, GRABNAR I, PERON G (2017). Natural deep eutectic solvents (NADES) to enhance berberine absorption: an in vivo pharmacokinetic study. *Molecules,* **22**(11):1921.

TALWARE NS, DIAS RJ, GUPTA VR (2018). Recent approaches in the development of phytolipid complexes as novel drug delivery. *Current drug delivery*, **15**(6):755-764.

TAN XS, MA JY, FENG R, MA C, CHEN WJ, SUN YP, JIANG JD (2013). Tissue distribution of berberine and its metabolites after oral administration in rats. *PloS one*, **8**(10):e77969.

TANG ZX, SHI LE (2007). Adsorption of neutral proteinase on chitosan nano-particles. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **21**(2):223-228.

TAYLOR CT, WINTER DC, SKELLY MM, O'DONOGHUE DP, O'SULLIVAN GC, HARVEY BJ, BAİRD AW (1999). Berberine inhibits ion transport in human colonic epithelia. *European journal of pharmacology*, **368**(1):111-118.

TELANGE DR, PATIL AT, PETHE AM, FEGADE H, ANAND S, DAVE VS (2017). Formulation and characterization of an apigenin-phospholipid phytosome (APLC) for improved solubility, in vivo bioavailability, and antioxidant potential. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **108**:36-49.

THIMMA RT, TAMMISHETTI S (2001). Barium chloride crosslinked carboxymethyl guar gum beads for gastrointestinal drug delivery. *Journal of applied polymer science*, **82**(12):3084-3090.

TSAİ ML, BAI SW, CHEN RH (2008). Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan–sodium tripolyphosphate nanoparticle. *Carbohydrate Polymers*, **71**(3):448-457.

TSAİ PL, TSAI TH (2004). Hepatobiliary excretion of berberine. *Drug Metabolism and Disposition*, **32**(4):405-412.

TUNÇAY M, ÇALIS S (1999). Biyoparçalanabilir Sentetik ve Doğal Polimerler. *FABAD J. Pharm. Sci*., **24**:109-123.

TYAGI VV, KAUSHİK SC, TYAGI SK, AKİYAMA T (2011). Development of phase change materials based microencapsulated technology for buildings: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, **15**(2):1373-1391.

USTA DY, DEMIRTAŞ Ö, OKÇELIK C, USLU A, TEKSIN ZS (2018). Evaluation of in vitro dissolution characteristics of flurbiprofen, a BCS class IIa drug. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, **43**(2):27-34.

VAN BEERS EH, HUİGH D, BOSMAN L, DE BEST L, KUİPER R, SPAAN M, VAN VLİET MH (2021). Analytical validation of SKY92 for the Identification of high-risk multiple myeloma. *The Journal of Molecular Diagnostics*, **23**(1):120-129.

VAN HOOGEVEST P (2017). Review–An update on the use of oral phospholipid excipients. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **108**:1-12.

VERMA P, THAKUR AS, DESHMUKH K, JHA AK, VERMA S (2010). Routes of drug administration. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, **1**(1):54-59.

VILOS C, VELASQUEZ LA (2012). Therapeutic strategies based on polymeric microparticles. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2012**:672760. doi: 10.1155/2012/672760.

VU HT, HOOK SM, SİQUEİRA SD, MÜLLERTZ A, RADES T, MCDOWELL A. (2018). Are phytosomes a superior nanodelivery system for the antioxidant rutin?. *International journal of pharmaceutics*, **548**(1):82-91.

WANG H, DENG H, GAO M, ZHANG W (2021). Self-assembled nanogels based on ionic gelation of natural polysaccharides for drug delivery. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **9**:703559.

WANG J, ZHUANG S (2022). Chitosan-based materials: Preparation, modification and application. *Journal of Cleaner Production*, **355**:131825.

WANG W, MENG Q, Lİ Q, LİU J, ZHOU M, JİN Z, ZHAO K (2020). Chitosan derivatives and their application in biomedicine. *International journal of molecular sciences*, **21**(2):487.

WANG YH, SATO H, ADACHİ I, HORİKOSHİ I (1996). Optimisation of the formulation design of chitosan microspheres containing cisplatin. *J Pharm Sci.*, **85**:1204.

WANG ZC, WANG J, CHEN H, TANG J, BİAN AW, LİU T, YANG F (2020). Synthesis and anticancer activity of novel 9, 13-disubstituted berberine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.,* **30**(2):126821.

WAROWİCKA A, NAWROT R, GOŹDZİCKA-JÓZEFİAK A (2020). Antiviral activity of berberine. *Archives of virology*, **165**(9):1935-1945.

WHO guidelines on good acricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants, (2003). http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42783/9241546271.pdf;jsessionid=AE4BC9600856A44713EAD3D4706C93C6?sequence=1, Erişim tarihi: 28.01.2022

WONG CY, AL-SALAMİ H, DASS CR (2018). Microparticles, microcapsules and microspheres: a review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin. *International journal of pharmaceutics*, **537**(1-2):223-244.

XİAO Z, LİU W, ZHU G, ZHOU R, NİU Y (2014). A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **94**(8):1482–1494.

XU J, SHEN J, YUAN R, JİA B, ZHANG Y, WANG S, WANG T (2021). Mitochondrial Targeting Therapeutics: Promising Role of Natural Products in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers in pharmacology*, **12**:796207-796207. Doi: 10.3389/fphar.2021.796207.

YAN Z, SUN M, LV Y (2022). Novel berberine-based pharmaceutical salts with fatty acid anions: Synthesis, characterization, physicochemical properties. *Journal of Molecular Liquids*, 119397. doi: 10.1016/j.molliq.2022.119397.

YANAT M, SCHROËN K (2021). Preparation methods and applications of chitosan nanoparticles; with an outlook toward reinforcement of biodegradable packaging. *Reactive and Functional Polymers*, **161**:104849.

YEŞİLADA E, KÜPELİ E (2002). Berberis crataegina DC. root exhibits potent anti-inflammatory, analgesic and febrifuge effects in mice and rats. *Journal of ethnopharmacology*, **79**(2):237-248.

Yİ L, XU X (2004). Study on the precipitation reaction between baicalin and berberine by HPLC. *Journal of Chromatography B*, **810**(1):165-168.

YU F, Lİ Y, CHEN Q, HE Y, WANG H, YANG L, CHEN XD (2016). Monodisperse microparticles loaded with the self-assembled berberine-phospholipid complex-based phytosomes for improving oral bioavailability and enhancing hypoglycemic efficiency. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **103**:136-148.

ZENG C, ZHENG R, YANG X, DU Y, XİNG J, LAN W (2019). Improved oral delivery of tilianin through lipid–polymer hybrid nanoparticles to enhance bioavailability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **519**(2):316-322.

ZENG XH, ZENG XJ, Lİ YY (2003). Efficacy and safety of berberine for congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *The American journal of cardiology*, **92**(2):173-176.

ZHANG J, TANG Q, XU X, Lİ N (2013). Development and evaluation of a novel phytosome-loaded chitosan microsphere system for curcumin delivery. *International journal of pharmaceutics*, **448**(1):168-174.

ZHANG P, MA D, WANG Y, ZHANG M, QİANG X, LİAO M, ZHANG Y (2014). Berberine protects liver from ethanol-induced oxidative stress and steatosis in mice. *Food and chemical toxicology*, **74**:225-232.

ZHANG X, GU L, Lİ J, SHAH N, HE J, YANG L, ZHOU M (2010). Degradation of MDM2 by the interaction between berberine and DAXX leads to potent apoptosis in MDM2-overexpressing cancer cells. *Cancer research*, **70**(23):9895-9904.

ZHANG X, WEİ Y, CAO Z, XU Y, LU C, ZHAO M, WANG Y (2020). Aprepitant Intravenous Emulsion Based on Ion Pairing/Phospholipid Complex for Improving Physical and Chemical Stability During Thermal Sterilization. *AAPS PharmSciTech*, **21**(3):75.

ZHANG Y, HUO M, ZHOU J, ZOU A, Lİ W, YAO C, XİE S (2010), DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles, *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, **12**(3):263-271.

ZHANG Z, CHEN Y, DENG J, JİA X, ZHOU J, LV H (2014). Solid dispersion of berberine–phospholipid complex/TPGS 1000/SiO2: preparation, characterization and in vivo studies. *International journal of pharmaceutics*, **465**(1-2):306-316.

ZHAO D, YU S, SUN B, GAO S, GUO S, ZHAO K (2018). Biomedical applications of chitosan and its derivative nanoparticles. *Polymers*, **10**(4):462. doi:10.3390/polym10040462.

ZHAO Z, WEİ Q, HUA W, LİU Y, LİU X, ZHU Y (2018). Hepatoprotective effects of berberine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Biomed Pharmacother*., **103**:1319-1326.

ZHOU JY, ZHOU SW (2011). Protective effect of berberine on antioxidant enzymes and positive transcription elongation factor b expression in diabetic rat liver. *Fitoterapia*, **82**(2):184-189.

ZHOU Y, LİU S, MİNG J, Lİ Y, DENG M, HE B (2017). Sustained release effects of berberine-loaded chitosan microspheres on in vitro chondrocyte culture. *Drug development and industrial pharmacy*, **43**(10):1703-1714.

ZHU R, WANG Y, ZHANG L, GUO Q (2012). Oxidative stress and liver disease. *Hepatology Research*, **42**(8):741-749.

ZIRH GÜRSOY A, İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler. Kontrollü Salım Sistemleri. (Ed. A.Z. Gürsoy). Aktif Matbaa ve Reklam Hizmetleri San. Tic. Ltd. Şti., İstanbul, 2014. s. 65-80.

ZUO F, NAKAMURA N, AKAO T, HATTORİ M (2006). Pharmacokinetics of berberine and its main metabolites in conventional and pseudo germ-free rats determined by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition*, **34**(12):2064-2072.

EKLER

Ek-1: Etik Kurul Kararı

T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

TOPLANTI TARİHİ : 10.01.2019
TOPLANTI NO : 2019/01

1- Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2019-01-10/01 Protokol no'lu "Berberin Fosfolipid Kompleksi Yüklü Kitozan Mikropartiküllerin Hazırlanması ve *in vitro/in vivo* Değerlendirilmesi" konulu çalışmanın Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. Emine YILMAZ SİPAHİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı

Zonguldak B.E.Ü. HADYEK , 67600 Kozlu/ZONGULDAK, Tel:0 372 261 3135-3136-3260 Fax: 0 372 261 02 65