T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

β-(1,3 -1,6) GLUKAN İLE SIVI DOZAJ FORMU GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Yüksek Lisans Tezi

Biyolog

Simge UFACIK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ercüment KARASULU

İZMİR

2015

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

β-(1,3 -1,6) GLUKAN İLE SIVI DOZAJ FORMU GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Yüksek Lisans Tezi

Biyolog

Simge UFACIK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ercüment KARASULU

İZMİR

2015

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Adı Soyadı **(İmza)**

Başkan **:** Prof. Dr. Ercüment KARASULU

(Danışman)

Üye **:** Prof. Dr. Levent KIRILMAZ

Üye **:** Yrd.Doç.Dr. İbrahim Eren AKÇİÇEK

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih : .....

ÖNSÖZ

Yüksek lisansa başladığım daha ilk günden beri beni anlayan, bana inanan, beni sınayan, sınarken de hayatı öğreten, öğrendiklerimle kendi yolumu bulmamı sağlayan, düştüğümde beni ayağa kaldıran kıymetli hocam Prof. Dr. Ercüment KARASULU'ya,

Her zaman sorulama derman olan, sıkılmadan yorulmadan bana cevap veren ve yardımcı olan Prof. Dr. Levent KIRILMAZ'a,

Gerek çalışmalarımda gerekse hayatla ilgili sıkıntıya düştüğümde beni dinleyen, yardımcı olan, arkadaşlıklarını esirgemeyen Tuğçe TURGAY ve Gülbeyaz YILDIZ TÜRKYILMAZ'a,

ARGEFAR'a başladığım ilk günden beri bana destek veren değerli çalışma arkadaşlarım Tuğba KESKİN KUL, Oğuz GÜLDAŞ, Cezminur YILMAZ, Selim GİRGİN, ekstra yardımları için Mine DİRİL ve Serkan PEKTAŞ'a, analiz için bana laboratuvarlarını açan ve yardım eden Çinel KÖKSAL KARAYILDIRIM ve Ebru Şancı'ya, teknik desteklerini hiç esirgemeyen Tanju TOP ve Özge KILIÇ'a,

İşe başladığım andan itibaren sevgilerini, desteklerini ve yardımlarını hiç esirgemeyen Çevre ve Gıda Laboratuvarı çalışanlarına ve tüm ARGEFAR ailesine,

Bütün bu zamanları geçirdiğim dönemlerde iyi ve kötü her halimi bilen, dinleyen, anlayan, bana moral veren kıymetli dostlarım Betül KAHYAOĞLU, Saliha AKGÜN, Sevinç KÜÇÜK ve Merve TOPALOĞLU'na

Sevgisini ve desteğini koşulsuz veren, iyi ve kötü her anımda yanımda olduğunu bildiğim, hissettiğim, her anımı paylaştığım ve ondan çok şey öğrendiğim Veysel Umut ÇELENK'e,

Benim hep iyi ve mutlu olmamı isteyen, koşulsuz sevgi ve desteklerini her zaman hissedeceğim, bana her türlü imkanı sağlayacaklarını bildiğim biricik ailem İlkay UFACIK, Behiç UFACIK ve Cahit UFACIK'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Simge UFACIK

İZMİR, 2015

ÖZET

β-(1,3-1,6) GLUKAN İLE SIVI DOZAJ FORMU GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Biyo. Simge UFACIK

Yüksek Lisans Tezi, Biyofarmasötik ve Farmakokinetik B.D.

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Ercüment KARASULU

Eylül 2015, 119 sayfa

Yapılan bu çalışmada, hem doğal hem de adaptif bağışıklık sistemine desteklemek amacıyla kullanılan β-(1,3-1,6) glukan, süspansiyon formunda çörek otu yağı içerisinde hazırlanmıştır. Dünya çapında tüketilen ve genellikle tablet, toz formda sert jelatin kapsül içersinde veya şurup olarak piyasada bulunan bu besin desteğinin, yerel pazara yenilikçi bir dozaj formu ile sunulması amaçlanmıştır.

Hazırlanan ürünün içerdiği etkin madde olan β-(1,3-1,6) glukan için yapılan kalite kontrol çalışmalarının güvenilirliği analitik metot validasyonuyla desteklenmiş ve söz konusu kalite kontrol çalışmalarının nasıl yapıldığına ilişkin özgün yöntemler tanımlanmıştır.

Süspansiyon formunda hazırlanan ürünün, 40 °C ± 2 °C ve 75 % ± 5 % nem oranına ayarlanmış inkübatörde 6 aylık kısa süreli kimyasal stabilite testi ile etkin madde olarak kullanılan β-(1,3-1,6) glukan'ın kimyasal stabilitesi ispatlanmıştır.

Ayrıca, süspansiyon ürünün süspansiyon testlerine yönelik partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, viskozite, sedimentasyon hacmi, çökme hızı ve mikrobiyolojik analizleri yapılmıştır.

Anahtar sözcükler : beta-(1-3)-(1-6)-glukan; Çörek Otu Yağı; Süspansiyonlar; Besin Takviyeleri

e-mail: simgeufacik@gmail.com

ABSTRACT (İNGİLİZCE ÖZET)

LIQUID DOSAGE FORM DEVELOPMENT and CHARACTERIZATION WITH β-(1,3 -1,6) GLUCAN

Bio. Simge UFACIK

Master Thesis in Department of Biopharmaceutic and Pharmacokinetic

Supervisor : Prof. Dr. Ercüment KARASULU

September 2015, 119 pages

In this study, β-(1,3-1,6) glucan has been prepared in suspension form and black cumin oil so as to support natural and adaptive immune system. This nutrition support, consumed around the world and generally ranked in the market as tablet - granulated hard gelatine capsule- or syrup, is determined to be presented to local market in the form of an innovative dosage.

Quality control studies' reliability conducted for β-(1,3-1,6) glucan, which is the drug substance of prepared product content, has been supported with analytical method validation and specific methods on how to do aforesaid quality control studies has been defined.

β-(1,3-1,6) glucan chemical stability used as drug substance and prepared in suspension form has been proven in incubation calibrated to humidity rate of 40 °C ± 2 °C and 75 % ± 5 % with 6 month-short term chemical stability test.

Besides, particle size of suspension product in suspension tests, zeta potantial, viscosity, sedimentation volume, settling velocity and microbiological analyses have been conducted.

Key words : β-(1-3)-(1-6)-glucan; Nigella sativa oil; Suspensions; Dietary Supplements

e-mail: simgeufacik@gmail.com

İçindekiler

ÖNSÖZ ..... İİ

ÖZET ..... İİİ

ABSTRACT (İNGİLİZCE ÖZET) ..... İV

ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİİ

TABLOLAR LİSTESİ XV

DENKLEMLER LİSTESİ ..... XVİİ

BÖLÜM I 1

1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER 1

1.1 GİRİŞ 1

1.2 GENEL BİLGİLER 2

1.2.1 Bağışıklık Sistemi 2

1.2.1.1 Bağışıklık Sistemi Organları 3

1.2.1.2 Bağışıklık Sistemi Hücreleri 3

1.2.1.2.1 Myeloid Hücreler 5

1.2.1.2.1.1 Monosit/Makrofaj 5

1.2.1.2.1.2 Polimorf Çekirdekli Lökositler 5

1.2.1.2.1.2.1 Nötrofiller 6

1.2.1.2.1.2.2 Eozinofiller 6

1.2.1.2.1.2.3 Mast Hücreleri ve Bazofiller 6

1.2.1.2.1.2.4 Dentritik Hücreler 7

1.2.1.2.1.2.5 Trombositler 7

1.2.1.2.2 Lenfoid Hücreler 7

1.2.1.2.2.1 Doğal Öldürücü Hücreler(NK) 7

1.2.1.2.2.2 B Lenfosit Hücreleri 8

1.2.1.2.2.3 T Lenfosit Hücreleri 9
1.2.1.2.2.3.1 Th1, Th2 ve Th17 Hücreleri 11
1.2.1.2.2.3.2 T Regülatör (Treg) Hücreler 12
1.2.1.3 Doğal Bağışıklık Sistemi 13
1.2.1.4 Adaptif Bağışıklık Sistemi 14
1.2 GLUKANLAR 17
1.2.1 Glukanların Kimyasal Yapı ve Özellikleri 17
1.2.1.1 Bazı Alfa Glukan Örnekleri 19
1.2.1.2 Bazı Beta Glukan Örnekleri 20
1.2.2 β-1,3-D-glukanın Keşfi 25
1.2.3 β-glukanların Elde Edildiği Kaynaklara Göre Kimyasal Yapıları ve Fizikokimyasal Özellikleri 25
1.2.4 β-1,3-1,6-glukanın İmmün Sistem Üzerindeki Etkisi 27
1.2.4.1 β-1,3-1,6-glukanların Doğal Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi . 30
1.2.4.2 β-1,3-1,6-glukanların Adaptif Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi 31
1.2.5 β-1,3-1,6-glukanın Farmakodinami Mekanizması 32
1.2.5.1 β-glukan Reseptörleri 33
1.2.5.1.1 Dektin-1 33
1.2.5.1.2 CR3 Reseptörü 34
1.2.5.1.3 Radikal Temizleyici Reseptörler 34
1.2.5.1.4 Laktosilseramid(LacCer) 34
1.2.5.1.5 Toll-like Reseptörleri 35
1.1.2 ÇÖREK OTU TOHUMU YAĞI 36
1.1.2.1 Çörek Otu Tohumunun özellikleri 36
1.1.2.2 Çörek Otu Tohumu Yağının Biyokimyasal Özellikleri 36

1.1.2.3 Çörek Otu Yağının Elde Edilme Yöntemlerine Göre Fizikokimyasal ve İçerik Özellikleri 36

1.4 SÜSPANSİYONLAR 42

1.4.1 Süspansiyonların Sınıflandırılmaları 44

1.4.1.1. Oral Süspansiyonlar 44

1.4.1.2. Topikal Süspansiyonlar: 44

1.4.1.3. Parenteral Süspansiyonlar 45

1.4.1.4. Oftalmik Süspansiyonlar 45

1.4.1.5. Aerosol Süspansiyonlar 45

1.4.2 Süspansiyonlarda İstenen Özellikler 46

1.4.3 Süspansiyon Formülasyonlarının Bileşenleri 46

1.4.4 Süspansiyon Formülasyonlarının Hazırlanması 48

1.3.4.3 Partikül Büyüklüğü 49

1.4.4.2 Süspande Partiküllerin Yüzeylerarası Özellikleri 49

1.4.4.3 Kontrollü Flokülasyon, Flokülasyon-Deflokasyon-Agregasyon-Kekleşme 52

1.4.4.4 Partiküllerin Islanması 53

1.4.4.5 Viskozite 54

1.4.5 Süspansiyonlarda Aranan Özellikler 54

1.4.5.1 Çökme Hacmi (F) 56

1.4.5.2 Çökme Hızı 56

1.4.5.3 Zeta Potansiyel 57

1.4.5.4 Yeniden Dağılabilirlik 57

1.4.5.5 Reolojik Tayinler 57

1.4.5.6 Mikrobiyolojik Testler 58

1.4.5.6.1 Toplam Bakteri Bakteri Sayımı 58
1.4.5.6.2 Maya-Küf Sayımı 58
1.4.5.6.3 Escherichia coli Sayımı 58
1.4.6 Süspansiyonların Ambalajlanması ve Saklanması 59
1.4.7 Süspansiyonların Biyoyararlanımı 59
1.4.8 Türkiye İlaç Piyasasında Bulunan β-glukan Preparatları 60
BÖLÜM II 63
2 GEREÇ VE YÖNTEM 63
2.1 Kullanılan Gereçler 63
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler 63
2.1.2 Kullanılan Ekipman ve Cihazlar 65
2.2 Kullanılan Yöntemler 66
2.2.1 β-1,3-1,6-glukan'ın Spektrofotometrik Miktar Tayini Analiz Yöntemi 66
2.2.1.1 β-1,3-1,6- glukan Ana Stok Standardının Hazırlanması 66
2.2.1.2 Standart Kör Çözeltisi Hazırlanması 68
2.2.1.3 β-glukanın Kalibrasyon Standart Çözeltilerinin Hazırlanması .. 68
2.2.1.4 β-glukanın Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi 70
2.2.2 Hazırlanan Formülasyon için Miktar Tayini Analiz Yöntemi 70
2.2.3 Analitik Metot Validasyonu 71
2.2.3.1 Seçicilik 71
2.2.3.2 Doğrusallık 71
2.2.3.3 Kesinlik 72
2.2.3.3.1 Tekrar elde edilebilirlik 72
2.2.3.3.2 Tekrarlanabilirlik 72
2.2.3.4 Ekstraksiyon Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanım 72

2.2.4 Formülasyonun Hazırlanması 73

2.2.5 Formülasyonun Süspansiyon Testleri 74

2.2.5.1 Fiziksel Testler 74

2.2.5.1.1 Görünüş 74

2.2.5.1.2 Renk 74

2.2.5.1.3 Koku 75

2.2.5.1.4 Tat 75

2.2.5.1.4 Partikül Büyüklüğü 75

2.2.5.1.5 Çökme Hacmi 76

2.2.5.1.6 Çökme Hızı 77

2.2.5.1.7 Zeta Potansiyel 78

2.2.5.1.8Viskozite 79

2.2.5.2 Kimyasal Stabilite Testi 80

2.2.5.3 Mikrobiyolojik Testler 81

2.2.5.3.1 TEMPO® TVC Testi ile Toplam Bakteri Sayımı 81

2.2.5.3.2 TEMPO® YM Testi ile Maya-Küf Sayımı 81

2.2.5.3.1 TEMPO® EC Testi ile Escherichia coli Sayımı 82

2.2.6 Çörek Otu Yağı için Yapılan Kalite Kontrol Analizleri 85

2.2.6.1 Yağ asitleri kompozisyonunun belirlenmesi 85

Tablo 14: Yağ asitleri kompozisyonunun belirlenmesi için kullanılan cihaz parametreleri 85

2.2.6.2 Tokoferol Analiz Yöntemi 86

BÖLÜM III 87

3. BULGULAR 87

3.1 Analitik Metot Validasyonu 87

3.1.1 Seçicilik 87
3.1.2 Doğrusallık 88
3.1.3 Kesinlik 90
3.1.3.1 Tekrar elde edilebilirlik 90
3.1.3.2 Tekrarlanabilirlik 91
3.1.4 Ekstraksiyon Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanım 92
3.2 Formülasyonun Süspansiyon Testleri Sonuçlari 94
3.2.1 Fiziksel Stabilite Test Sonuçları 94
3.2.1.1 Görünüş 94
3.2.1.2 Renk 94
3.2.1.3 Koku 94
3.2.1.4 Tat 94
3.2.1.5 Partikül Büyüklüğü 95
3.2.1.6 Çökme Hacmi 97
3.2.1.7 Çökme Hızı 99
3.2.1.8 Zeta Potansiyel 100
3.2.1.9 Viskozite 101
3.2.2 Kimyasal Stabilite Test Sonuçları 102
3.2.3 Mikrobiyolojik Test Sonuçları 104
3.3 Çörek Otu Yağı İçin Yapılan Kalite Kontrol Analizleri 105
3.3.1 Yağ Asitleri Kompozisyonunu Analizi Sonuçları 105
3.3.2 Tokoferol Analizi Sonuçları 108
BÖLÜM IV 110
4. TARTIŞMA 110
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 113

KAYNAKLAR.....114

EK-1.....118

ÖZGEÇMİŞ 118

Şekiller Listesi

Şekil 1: İmmün sistem hücreleri 4

Şekil 2: B hücre farklılaşması 9

Şekil 3: T hücrelerinin Farklılaşması 11

Şekil 4 : T yardımcı hücreleri 13

Şekil 5: Doğal Bağışıklık ve Adaptif Bağışıklık 16

Şekil 6: α-D-glukoz ve β-D-glukoz moleküllerinin yapısı 17

Şekil 7 : α-glikozidik bağ yapısı 18

Şekil 8 : β-glikozidik bağ yapısı 18

Şekil 9: α-1,4 glikozidik bağ yapısı 23

Şekil 10:α-1,4-1,6-glukan bağ yapısı 23

Şekil 11: β-1,3-D-glukan formu 24

Şekil 12: β-1,4-glukan formu 24

Şekil 13: β-1,3-1,4-glukan formu 24

Şekil 14: β-(1,3-1,6)-D-glukanın kimyasal yapısı 26

Şekil 15: β-glukanın immün sistem üzerine etkisi 29

Şekil 16: β-glukanın mekanizması 32

Şekil17: Süspansiyon içindeki partiküllerin partikülarası uzaklıklarına (angstrom olarak)karşı potansiyel enerjisi 51

Şekil 18: β-glukan standardının hazırlanması (a) β-glukanın çözündürülmesi (b) β-glukanın jelleşmesi 68

Şekil 19: Renk analizinin yapıldığı Lovibond Tintometre cihazı 74

Şekil 20: Partikül boyutu ölçüm cihazı (Mastersizer 3000) 75

Şekil 21: Çökme hacminin hesaplanması için falcon tüp içinde hazırlanan formülasyon 76

Şekil 22: Zetametre (Zetasizer Nano ZSP) 78

Şekil 23: Brookfield viskozimetre ve formülasyonun viskozite ölçümü 79

Şekil 24: Kimyasal stabilite için iklim kabinine konulan örnekler 80

Şekil 25: TEMPO® doldurucu ve okuyucu. 83

Şekil 26: TEMPO® kitleri ve besiyerleri 83

Şekil 27: Stomacher cihazı ve tartım işlemi 84

Şekil 28: TEMPO® torbasına tartılan formülasyon..... 84

Şekil 29: Seçicilik parametresine ilişkin kör numune spektrumu 87

Şekil 30: Seçicilik parametresine ilişkin kör numune ve standart spektrumu 87

Şekil 31: β-1,3-1,6 glukanın için doğrusallık grafiği..... 89

Şekil 32: Formülasyonun 6. Ayda partikül büyüklüğü ölçümüne ilişkin cihazdan alınan spektrum 96

Şekil 33: Hazırlanan formülasyonun 6. Ay stabilitesindeki zeta potansiyel ölçümünü gösteren grafik 101

Şekil 34: Formülasyonun 0. Gün Spektrumu 102

Şekil 35: Formülasyonun 3. ay kimyasal stabilitesi sonucu alınan spektrum 103

Şekil 36: Formülasyonun 6. ay kimyasal stabilitesi sonucu alınan spektrum 103

Şekil 37 : Çörek otu yağının GC-FID cihazında yapılan yağ asitleri kompozisyonunun 0. Güne ilişkin kromatogramı 106

Şekil 38: Çörek otu yağının GC-FID cihazında yapılan yağ asitleri kompozisyonunun 3. aya ilişkin kromatogramı 106

Şekil 39: Çörek otu yağının GC-FID cihazında yapılan yağ asitleri kompozisyonunun 6. aya ilişkin kromatogramı 107

Şekil 40: Çörek otu yağının HPLC-FLD cihazında yapılan tokoferol analizinin 0. güne ilişkin kromatogramı 108

Şekil 41: Çörek otu yağının HPLC-FLD cihazında yapılan tokoferol analizinin 3. aya ilişkin kromatogramı 109

Şekil 42: Çörek otu yağının HPLC-FLD cihazında yapılan tokoferol analizinin 6. aya ilişkin kromatogramı 109

Tablolar Listesi

Tablo 1: α-glukan çeşitleri, elde edildikleri kaynaklar ve yapıları 19

Tablo 2: β-glukan çeşitleri, elde edildikleri kaynaklar ve yapıları 22

Tablo 3: Doğal bağışıklık hücre reseptörleri ve bağışıklık yanıta etkileri 35

Tablo 4: Çörekotu yağının farklı ekstraksiyon yöntemleri ile değişen fizikokimyasal özellikleri 38

Tablo 5: Ekstraksiyon yöntemlerine göre çörekotu tohumu yağının Yağ asitleri (%),profili 39

Tablo 6: Ekstraksiyon yöntemlerine göre çörekotu tohumu yağının Tokoferol (mg/kg) miktarları 40

Tablo 7: Ekstraksiyon yöntemlerine göre çörekotu tohumu yağının Sterol (%) profili 41

Tablo 8: Türkiye piyasasında bulunan β- glukan tablet preperatları 60

Tablo 9: Türkiye piyasasında bulunan β- glukan kapsül preperatları 61

Tablo 10: Türkiye piyasasında bulunan β- glukan şurup preperatları 62

Tablo 11: Kullanılan kimyasallar ve tedarik edilen firmalar 64

Tablo 12: Formülasyonun hazırlanması ve miktar tayini belirlenmesi için gerekli ekipman ve cihazlar 65

Tablo 13: β-1,3-1,6 glukanın kalibrasyon eğrisi için hazırlanan derişimler ve seyreltme faktörleri 69

Tablo 14: Yağ asitleri kompozisyonunun belirlenmesi için kullanılan cihaz parametreleri 85

Tablo 15: Tokoferol Analizi için kullanılan cihaz parametreleri 86

Tablo 16: β-1,3-1,6 glukan için doğrusallık değerleri 88

Tablo 17: β-1,3-1,6 glukan tekrar elde edilebilirlik sonuçları 90

Tablo 18: β-1,3-1,6 glukan tekrarlanabilirlik sonuçları 91

Tablo 19: β-1,3-1,6 glukan için ekstraksiyon tekrarlanabilirliği ve geri kazanım değerleri 92

Tablo 20: Renk tayini analiz sonuçları..... 94

Tablo 21: Formülasyonun partikül boyutu analiz sonuçları 95

Tablo 22: Süspansiyonun 0., 3., ve 6. ay stabilite sonrası çökme hacmi değerleri 97

Tablo 23: Süspansiyonun 0., 3., ve 6. Aylardaki stabilitesi sonrası zeta potansiyel ölçüm değerleri 100

Tablo 24: Süspansiyonun 0., 3., ve 6. Aylardaki stabilitesi sonrası viskozite ölçüm değerleri 101

Tablo 25:β-1,3-1,6 glukan için kimyasal stabilite sonuçları 102

Tablo 26: Son ürünün mikrobiyolojik testlerinin sonuçları..... 104

Tablo 27: Çörek otu yağının GC-FID cihazında yapılan yağ asitleri kompozisyonuna ilişkin 0. gün, 3. ay, 6. ay stabilite test sonuçları 105

Tablo 28: Çörek otu yağının HPLC-FLD cihazında yapılan tokoferol analizine ilişkin sonuçlar 108

Denklemler Listesi

Denklem 1: β-1,3-1,6 glukanın okunan absorbansa karşılık gelen derişimini hesaplamak için kullanılan eşitlik 70

Denklem 2: Geri kazanım hesaplamasında kullanılan eşitlik 72

Denklem 3: Süspansiyona ilişkin çökme hacmini veren eşitlik 76

Denklem 4: Süspansiyona ilişkin çökme hızını veren eşitlik 77

KISALTMALAR LİSTESİ

β-glukan	Beta glukan
α-glukan	Alfa glukan
NK	Natural Killer-Doğal Öldürücü Hücreler
IL-	İnterlökin
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
IFN- α	İnterferon Alfa
DH	Dentritik Hücreler
MHC	Major Histocompatibility Complex
Ig	İmmünglobulin
ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity-antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksite
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue- mukoza ilişkili lenfoid dokular
BHR	B hücre reseptörü
THR	T hücre reseptörü
Th	T helper- Tyardımcı
Tc	T cytotoxic- T sitotoksik
Ts	T supresör
HLA	Human Leukocyte Antigen-İnsan Lökosit Antijeni
ASH	Antijen Sunan Hücreler
Treg	T regülatör hücreler
foxp3	forkhead box P3
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta- Dönüştürücü Büyüme Faktörü

GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor- Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör
KR3	Komplement reseptörü 3
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PRR	Pattern Recognition Receptors
TLR	Toll-like Reseptör
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of Activated B cells
MIP	Makrofaj enflamatuvar proteini
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (Low Density Lipoprotein)
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (High Density Lipoprotein)
MAE	Mikrodalga-destekli ekstraksiyon
Å	Amstrong
HLB	Hidrofilik-Lipofilik Balans
EtOH	Etanol
NaOH	Sodyum Hidroksit
HCl	Hidroklorik Asit
cP	Centipoise
TVC	Toplam Bakteri (Total Viable Count)
EC	Escherichia coli
YM	Maya & Küf (Yeast & Mold)
Kob	Koloni oluşturan birim
KOH	Potasyum Hidroksit

HPLC	High Performance Liquid Chromatography-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
FLD	Floresans Dedektör
RSD	Relative Standard Deviation- Göreceli Standart Sapma
GC	Gas Chromatography-Gaz Kromatogram
FID	Alev İyonizasyon Dedektörü
CDER	The Center for Drug Evaluation and Research-İlaç Değerlendirme ve Araştırma Merkezi

BÖLÜM I

1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

1.1 Giriş

β-Glukanlar, β-glikozidik bağlarla birbirine bağlanmış D-glukoz monomerlerinden oluşan polisakkaritlerdir. Yaygın olarak bitkilerde, tahıl tohumlarında, ekmek mayasının hücre duvarında, bazı fungus, mantar ve bakterilerde bulunur. Bazı beta-glukan türleri besin maddesi olarak faydalı, bazı beta glukanlar metabolik direnci arttırmada faydalıdır.

Formülasyonda kullanılan diğer bir madde olan çörek otu tohumu bileşenleri ise kozmetik preperatların ve takviye gıda ürünlerin hazırlanmasında kullanılabilmektedir. Çörekotu tohumu yağının antitümör aktivitesi, antioksidan aktivitesi, antiinflamatuvar aktivitesi, antibakteriyel aktivite ve bağışıklık sistemi üzerinde uyarıcı etkisi olduğu gösterilmiştir.

Bizim amacımız kullanacağımız β-(1,3-1,6)-glukanın ve çörek otu yağının bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinden faydalanarak sıvı dozaj formunun geliştirilmesini sağlamaktır. Geliştirilen sıvı dozaj formunun piyasadaki bağışıklık sistemini destekleme amaçlı kullanılan diğer β-Glukan ürünlerine kıyasla biyoyararlanımının daha yüksek olması hedeflenmektir.

1.2 GENEL BİLGİLER

1.2.1 Bağışıklık Sistemi

Bağışıklık (immünite), insan vücudunun kendi doku ve organlarına zarar verebilecek enfeksiyonlara karşı özgül veya özgül olmayan bir direnç gösterme yeteneğidir(1,2).

Vücudumuz patojen mikroorganizmalarla ya da yabancı maddelerle karşılaştığında karşı direnç sağlayan hücrelerin, dokuların ve moleküllerin tümüne ise bağışıklık sistemi (immün sistem) denir(1,2).

Bağışıklık sistemi (immün sistem) elemanları birbiriyle düzenli bir etkileşim sağlayarak immün yanıt oluşturmaktadırlar. Bu immün yanıt bireyi enfeksiyonlardan korumakta ve yabancı maddeleri tanıyarak yok etmektedir(2,3).

İmmün yanıtı başlatan yabancı maddeler antijen veya immünojen olarak adlandırılmaktadırlar. İmmünojen; immün yanıt oluşturma yeteneğinde olan herhangi bir maddedir. Antijen ise vücuda girdiklerinde spesifik ya da spesifik olmayan bir immün yanıt oluşturan yabancı maddelerdir. Bütün immünojenlerin antijen olduğu ifade edilir, ancak bunun aksi her zaman geçerli olmayabilir. Bunun yanında, tek başına antikor yanıtı oluşturamayan, fakat taşıyıcı ile birlikte olduğunda immün yanıt oluşmasını sağlayan hapten adı verilen kimyasal moleküller bulunmaktadır(1,3).

Antijenlerin immünojenitesini belirleyen pek çok özellik vardır. Bu özellikler; kimyasal yapı ve heterojenite, konak için yabancı olma, konakta kalıcı olma, moleküler ağırlık, elektriksel yük, antijenin dozu ve giriş yoludur.

Antijenin özgüllüğünü belirleyen ve kendisine özgül olan antikorları ile birleşmesini sağlayan kimyasal gruplara epitop (antijenik determinant) adı verilir. Bir antijen molekülünün birden fazla epitopu bulunabilir(1,2,3,4).

1.2.1.1 Bağışıklık Sistemi Organları

İmmün sistem organları iki gruptan oluşur.

- **Santral lenfoid organlar:** Kemik iliği ve timus, lenfositlerin tüm özelliklerini kazanarak olgunlaştığı organlardır.
- **Periferik lenfoid organlar:** Dalak, lenf bezi, mukozal lenfoid doku (mucosa associated lymphoid tissue, MALT), adaptif immün yanıtın başladığı organlardır. İmmün sistem hücreleri santral organlarda olgunlaşmaktadırlar, periferik organlarda görevlerini gerçekleştirmektedirler.

1.2.1.2 Bağışıklık Sistemi Hücreleri

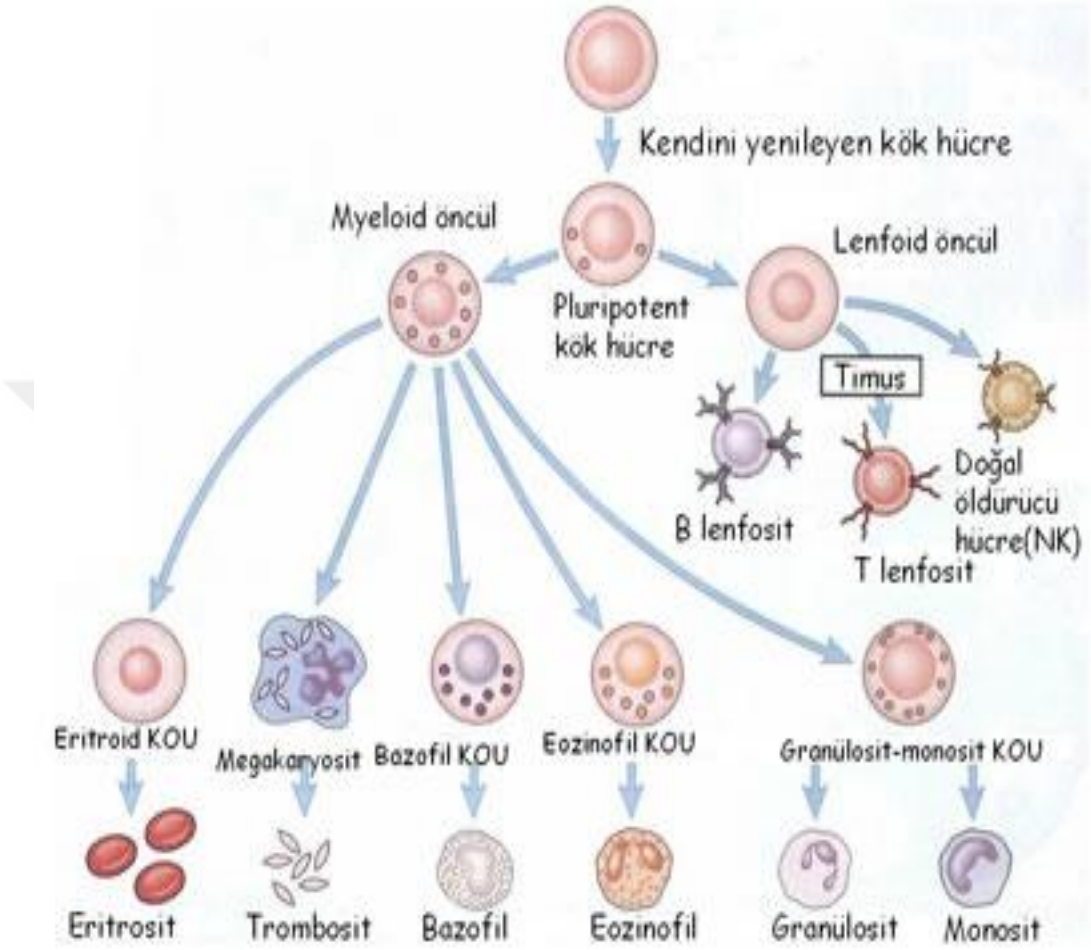
İmmün sistem hücreleri iki grupta incelenir.

- **Lenfoid hücreler:** B ve T lenfositler, doğal öldürücü hücreler(NK)
- **Miyeloid hücreler**:

  Fagositler: Monosit, Makrofaj hücreleri, Polimorf çekirdekli lökositler (Nötrofil, Bazofil ve Eozinofil hücreleri)

  Yardımcı hücreler: Mast hücreleri, dentritik hücreler ve Trombositler

Yabancı bir madde vücuda girdiğinde doğal bağışıklık sistemi elemanlarının öncüleri olan fagositler ve makrofajlar müdahale etmektedirler. Daha sonra ise korumayı arttırmak için adaptif bağışıklık sisteminin temel hücreleri olan B ve T lenfositler devreye girmektedirler(1,2,5).



Şekil 1: İmmün sistem hücreleri(6)

1.2.1.2.1 Myeloid Hücreler

1.2.1.2.1.1 Monosit/Makrofaj

Periferik kanda tek çekirdekli kısa ömürlü fagositik hücrelerdir. Kandan dokulara göç eden monositler, farklılaşarak makrofaj hücrelerini oluşturmaktadırlar. Makrofajlar tüm vücut dokularına yayılarak, yerleştiği yerde özel isimleri ile anılmaktadırlar; karaciğerde 'kupffer', deride "Langerhans" hücreleri, alveollerde "alveolar makrofajlar", beyinde "mikroglial hücreler", böbrekte "mezenşimal hücreler" ve kemikte "osteoklastlar" olarak adlandırılmaktadırlar(3,5).

Monositler ve makrofajlar profesyonel fagositik hücreler olup doğal bağışıklıkta önemli rol oynamaktadırlar. Antikor ile tanımlanmış bakteri ve tümor hücrelerinin yıkımı ve parçalanması gibi etkili görevleri vardır. Yabancı ve zararlı olan maddelerin reseptör ve ligandlara bağlanmasının ardından fagozom ve lizozomun birleşmesiyle yabancı ve zararlı maddeler makrofajların içine alınır, fagolizozom içinde parçalanıp zararsız hale getirilmektedir.

Makrofajlar, karbonhidratlar için yüzey reseptörlerine sahiptirler ve bu nedenle yabancı ve kendi molekülleri arasında ayırım yapabilmektedirler. Ayrıca makrofajlar antikor ve kompleman yüzey reseptörlerine de sahiptirler. Böylece antikor, kompleman veya her ikisi ile tanımlanmış mikroorganizmaların fagositozu artabilmektedir(3).

Makrofajlar sitokin üretimi ile hem doğal, hemde adaptif bağışıklıkta önemli görev yapmaktadırlar. Proinflamatuar sitokinlerin (IL-1, TNF-α) üretimi ile inflamasyonda, IL-1(interlökin) ve IL-6 gibi sitokinler aracılığıyla T ve B hücrelerinin antijene bağlı aktivasyonunda temel rol almaktadırlar. IL-12 ile hücresel bağışıklık yanıtta rol oynamaktadırlar ve IFN-α(interferon-α) salınımı ile de antiviral etki sağlamaktadırlar(3,5).

1.2.1.2.1.2 Polimorf Çekirdekli Lökositler

Kan dolaşımında bulunan alyuvarların %60-70'ini bu hücreler oluşturmaktadır. Lökositlerin fagositoz yeteneği nedeniyle vücut savunmasında çok önemli görevleri vardır. Antijene özgüllük göstermezler. Antikor ve komplemanla sinerjik etki yaratmaktadırlar. Bu sayede antikor ve komplemanlar ile birlikte hücre dışı

mikroorganizmaların temizlenmesinde çok etkili, akut enflamasyonda önemli görevler almaktadırlar(3,5).

1.2.1.2.1.2.1 Nötrofiller

Lökositler içinde kanda en yüksek oranda (%60-70) bulunan granüllü hücrelerdir. Yaşam sürelerinin kısa olduğu tespit edilmiştir(birkaç saat - birkaç gün). Kendini çeken, kemotaksis yapan maddelere karşı hareketlerini o yöne kaydırmaktadırlar. İnflamasyon bölgesine ilk ulaşan hücrelerdir. İnflamasyon sırasında sayıları 2-3 kat arttığı belirlenmiştir(1,3).

Profesyonel olarak fagositoz yeteneğine sahip olan bu hücreler fagosite ettikleri maddeleri granüllerinde bulunan enzimlerle parçalama veya öldürme işlemini gerçekleştirmektedirler. Nötrofillerin yüzeylerinde bulunan C3b reseptörleri ile komplemanlara, Fc reseptörleri ile immunglobulinlere bağlanabilmektedirler. Fagosite edilecek hedefin, kompleman ya da antikor ile tanımlanmış olması (opsonizasyon) nötrofil içine alınmalarını kolaylaştırmaktadır(3,5).

1.2.1.2.1.2.2 Eozinofiller

Tüm lökositlerin %2.3'ünü oluşturmaktadırlar. Parazitik hastalıklarda ve alerjik reaksiyonlarda görev alan hücrelerdir. Fagositik hücreler tarafından fagosite edilemeyecek derecede büyük parazitlerin parçalanması aktif eozinofiller tarafından toksik proteinlerin dış ortama salgılanmasıyla gerçekleştirilmektedir(1,3).

1.2.1.2.1.2.3 Mast Hücreleri ve Bazofiller

Kandaki lökositlerin % 0.2’den azını oluşturmaktadırlar. Bazofiller çoğunlukla kanda, mast hücreleri ise çoğunlukla mukozada ve bağ dokularında yer almaktadırlar. Mukozal mast hücrelerinin aktiviteleri T hücrelerine bağımlıdır. Bağ dokusunda bulunan hücreler ise T hücrelerine bağımlı değildirler ve çok sayıda bazofilik granül içermektedirler(1,3).

Bu hücreler yangısal ve alerjik reaksiyonlara karşı bağışıklıkta görev almaktadırlar. Fagositoz yaparak bakterileri öldürebildiği bilinse de bu etkisi fagositlerden daha azdır(3).

1.2.1.2.1.2.4 Dentritik Hücreler

Dendritik hücreler (DH) kemik iliğinden köken alan, yüzeyinde yüksek düzeyde HLA sınıf II ve adezyon moleküllerine sahip olan, immün cevabın düzenlemesinde önemli rol oynayan ve antijen sunumu yapan bir hücre grubudur. Lenfoid ve lenfoid olmayan dokuların (kalp, akciğer gibi) hücreler arası alanında yaygın olarak bulunmaktadırlar(1,2).

Dentritik hücreler fonksiyonlarını gerçekleştirebilmek için antijeni yakalama, işleme tabi tutma ve uygun kostimülan moleküllerle hücre yüzeyinde sunma yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir. Antijenleri yakalayıp CD4+ T hücrelerine sunarak primer bağışıklık yanıtının oluşmasında önemli ve etkin rol almaktadırlar. Aynı zamanda DH'ler B hücre fonksiyonlarının oluşumunda da etkili olduklarından humoral immünitenin gelişiminde de önemli rol oynamaktadırlar(3,4).

1.2.1.2.1.2.5 Trombositler

Kanda bulunan trombositler büyük megakaryositlerden oluşmaktadırlar. Trombositler kan pıhtılaşmasındaki rolleri dışında immün cevapta ve iltihap oluşmasında rol oynamaktadırlar(1,5).

1.2.1.2.2 Lenfoid Hücreler

1.2.1.2.2.1 Doğal Öldürücü Hücreler(NK)

Lenfositlerin % 15'ini oluşturmaktadırlar. Morfolojik olarak büyük granüllü lenfositler olarak tanımlanmaktadırlar. Virüsle enfekte olmuş hücrelere veya kanser hücrelerine herhangi bir spesifik tanıma olmadan doğrudan saldırabilen hücreler olduğu saptanmıştır. NK Hücresinin antijenik özgüllüğü ve MHC molekülüne bağlı tanıma özelliği bulunmamaktadır. Özellikle hematopoetik tümör hücrelerine karşı litik etki göstermektedirler(1,2).

Hücre içindeki yabancı hücrelere cevap olarak hücrelerin ölümüne neden olan ve makrofajları aktive eden IFN salgılayan lenfosit hücre sınıfıdırlar. Bu hücreler hedeflerini ya yüzeyindeki IgG'yi(immünglobulin) bağlayan Fc reseptörleri yoluyla veya yüzeyinde bulunan öldürmeyi aktive eden ve öldürmeyi inhibe eden reseptörleri yoluyla tanıyarak yok ettikleri saptanmıştır. IgG ile tanımlanmış hedef hücreye bağlanarak öldürmektedirler. Buna ADCC (Antibody dependent cellular

cytotoxicity- antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksite) denmektedir. Ayrıca antikor ile tanımlanmış hücreleri de öldürme özellikleri bulunmaktadır(2,3,4).

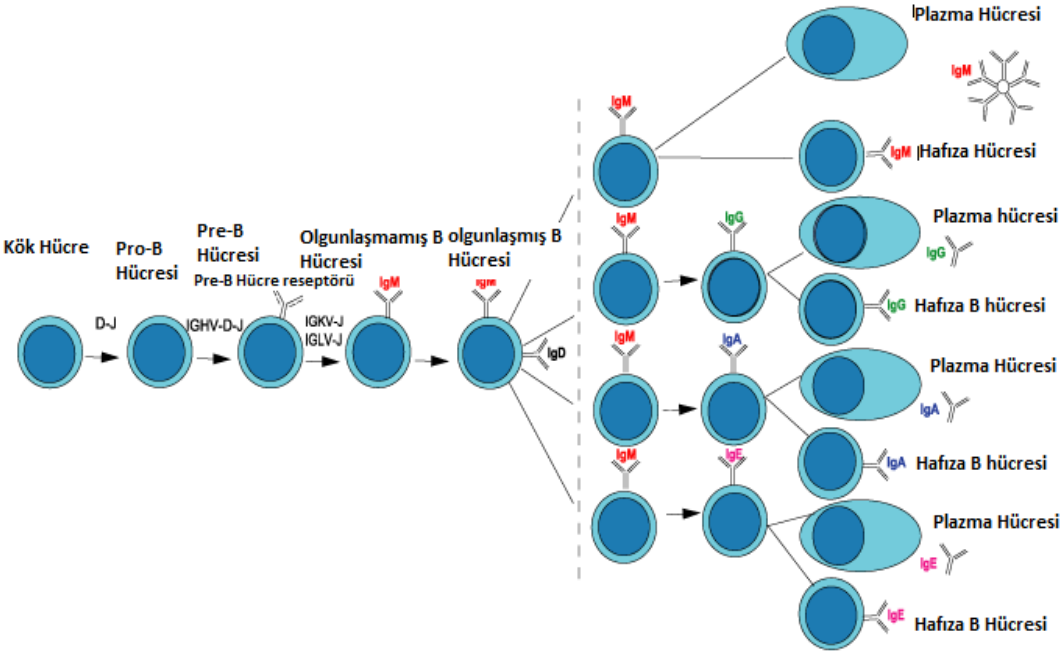
1.2.1.2.2.2 B Lenfosit Hücreleri

B lenfositler, kan dolaşımında bulunan lenfositlerin % 5-15'ini oluşturmaktadırlar. Bu lenfositler sentezledikleri immünglobulin(Ig) moleküllerini yüzeylerinde taşımaktadırlar. Bu moleküller antijenlere karşı özgül reseptörlerdir. İnsanda periferik dolaşımda bulunan B lenfositlerin çoğunda IgM ve IgD molekülleri beraberce bulunmaktadır. Bununla beraber çok az B lenfositte IgG, IgA ve IgE bulunmaktadır(2,5).

Hematopoetik kök hücrenin bir alt kolu olan lenfoid progenitör hücreden köken alan B lenfositlerin gelişmeleri antijenik bir uyarı olmadan kemik iliğinde başlamaktadır. Erken progenitör hücrelerden immatür B lenfositleri gelişinceye kadar çeşitli farklılaşma (pre-B, immatür B, matür B) dönemleri geçirmektedirler. İmmatür B lenfositleri kemik iliğinde iken fonksiyonel yüzey immünglobulin M molekülü oluşmaktadır ve bu aşamadan sonra olgun hücreler olarak periferik kana geçmektedirler. Bu hücreler henüz antijenle uyarılmamış 'naif' hücrelerdir. Periferik dolaşımdan periferik lenfoid dokulara (lenf bezi, dalak ve mukoza ilişkili lenfoid dokular=(MALT) göç etmektedirler ve onlar için özel ayrılmış bölgelere yerleşmektedirler(lenfoid folliküllerde, dalak beyaz pulpada)(1,3,4).

Antijenik uyarım sonucu B lenfositler, plazma hücrelerine farklılaşmaktadırlar. Bunun sonucu antijene özgül Ig sentezlemeye başlamaktadır. Plazma hücrelerine farklılaşmayan bir grup B lenfositi ise özgül antijenik uyarıyı tanıyıp saklayan bellek hücrelerine dönüşmektedir(3,4).

Her bir B hücresi yüzeyinde antijene spesifik bir reseptör olan B hücre reseptörü (BHR) taşımaktadır. BHR, antijen bağlayan membran immunglobulinidir ve antijen için primer reseptör olup, B hücre aktivasyonunda anahtar protein olarak görev almaktadır(2,4).



Şekil 2: B hücre farklılaşması

1.2.1.2.2.3 T Lenfosit Hücreleri

T lenfositler Timus'ta olgunlaşmaktadırlar. Kemik iliğinden timusa gelen timositler gelişme sürecinde; antijen reseptörü olan T hücre reseptörünü(THR) yapılandırmaktadırlar. Bu hücreler özgül antijeni tanıyıp yanıt vermeyi sağlayan T hücre reseptörleridir. Pozitif ve negatif seleksiyon (self antijenleri yabancı olandan ayırt etme yeteneği) safhalarını geçirdikten sonra olgun T hücreler olarak periferik dolaşıma geçmektedirler. THR1 ve THR2 olmak üzere iki türlü THR bulunmaktadır(2.

T lenfositlerinin çesitli fonksiyonları vardır ve bu fonksiyonlar farklı alt gruplar tarafından yapılmaktadır. Bu alt gruplar yüzey işareti tanımlamasıyla ayrılmaktadırlar. T yardımcı(Th), T sitotoksik(Tc) ve T supresör(Ts) hücreler olmak üzere üç tipi bulunmaktadır. Th hücreleri yüzey işareti olarak CD4+, Ts ve Tc hücreleri ise belirleyici yüzey işareti olarak CD8+ taşımaktadırlar. Periferik kanda

total kan lenfositlerinin yaklaşık %70 kadarı CD4+T yardımcı hücreleri (Th, T helper), %25 kadarı ise CD8+T sitotoksik hücreler (Tc) olarak bulunmaktadır(1,3.

T supresör hücrelerinin(Ts) B ve T hücreleri üzerinde baskılayıcı etkileri bulunmaktadır. Diğer hücrelerin etkinliklerini de düzenleyerek immün cevabın vücuda zarar verebilecek aşırı reaksiyonlar oluşturmasını engellemektedirler. Bu hücreler Ts1 ve Ts2 olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Ts1 hücreleri antijene bağlanan faktörleri sentezlerken, Ts2 hücreleri Th aktivitelerini engellemektedir(1,3,4).

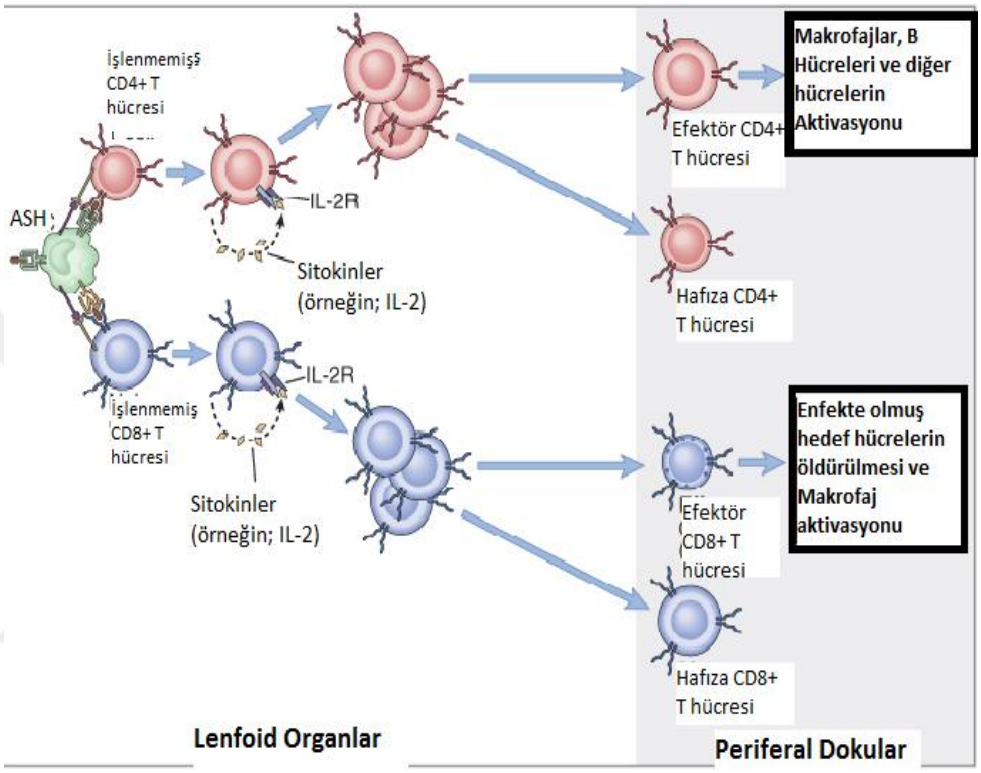
T sitotoksik hücreler, kanserleşmiş hücreleri, virüsle enfekte olmuş kendi vücut hücrelerini ve yabancı dokuları sitotoksik maddeler salgılayarak öldürmektedirler. CD8 yüzey antijeni taşımakta ve MHC sınıf 1 antijenleri taşıyan hücrelerle ilişki kurmaktadırlar(1,3,4).

ASH(antijen sunan hücreler), fagositoz veya pinositoz yolu ile içlerine aldıkları antijeni sitoplazmadaki endositik vakuol içinde parçalara ayırmaktadırlar. Hücre içinde işlenmiş küçük parçalar halindeki antijenik yapılar (13-25 amino asit uzunluğunda bir peptid) hücre içindeki HLA molekülünün antijen bağlama bölgesine bağlanıp hücre yüzeyine taşınarak T hücrelerine sunulmaktadırlar. Böylece HLA molekülleri immün sistemin efektör hücrelerinden T lenfositlerine antijen sunumu yaparak immün yanıtın başlaması için ilk uyarıyı gerçekleştirmiş olurlar. T lenfositlerin aktivasyonu, inflamasyona yakın lenf düğümlerinde gerçekleşmektedir(3,4).

T hücrelerine antijen sunulmasında ve antijenin tanınmasında, antijen sunan hücrelerin(ASH), THR ve MHC molekülleri önemli rol oynamaktadır. T lenfositler, antijeni THR ile yalnızca protein yapısındaki antijenleri (Timus veya T lenfosit bağımlı antijen) tanıyabilmektedirler. Bu reseptörler belli bir antijene özgü yanıt gelişmesini sağlar. Antijenik peptidler CD8+ T hücre reseptörlerine MHC Sınıf 1 ile, CD4+ T hücre reseptörlerine ise MHC sınıf 2 molekülleriyle sunulmaktadır(3,4.

Aktive olan CD4+ T hücreler başlıca IL-2 olmak üzere çeşitli sitokinleri üretmektedirler. Ürettikleri sitokinlerle bir taraftan ASH'leri aktive ederek fagositozu kuvvetlendirmekte ve hücre içi mikroorganizmaların yok edilmesine katkı

sağlamaktadırlar. Diğer taraftan IL-2; T yardımcı hücrelerinin ve T sitotoksik hücrelerinin aktivasyonunu ve proliferasyonun sağlayarak CD8+ (sitotoksik) T hücrelerinin öldürme kapasitelerini arttırmaktadır(1,4).



Şekil 3: T hücrelerinin Farklılaşması(3)

1.2.1.2.2.3.1 Th1, Th2 ve Th17 Hücreleri

T yardımcı hücrelerinin(Th) salgıladıkları sitokinlere ve bununla ilişkili fonksiyonlarına göre Th1 ve Th2 olmak üzere iki alt tipi bulunmaktadır. Doğal immün yanıt sürecinde üretilen sitokinler, naif Th hücrelerinin efektör T hücrelerine farklılaşma sürecini etkilemektedir. Salgılanan interferon gamma (IFN-γ) ve IL-12 gibi sitokinler naif T hücrelerinin Th1 hücrelerine farklılaşmasını başlatmaktadır.

Th1 hücrelerinin yüksek miktarlarda ürettiği IFNγ, interlökin-2 (IL-2) ve Tümor nekrozis faktör (TNF); makrofaj aktivasyonunu, fagositozu ve bakteriyel öldürme fonksiyonlarını etkileyerek hücre içi patojenlerin temizlenmesini sağlamaktadırlar. Ortamda IL-4 varlığında ise, naif Th hücrelerinin Th2 hücreleri yönünde farklılaşması gerçekleşmektedir.

Th2 hücreleri ise IL-4, IL-5, IL-6,IL-10, IL-13 salgılamaktadırlar. Bunlardan IL-4 ve IL-13, IgE antikor üretimini uyarmakta, IL-5 ise eozinofilleri aktive ederek parazitlerin öldürülmesini sağlamaktadır. Böylece Th2 hücrelerinin, hücre dışı patojenlere karşı konakçı savunmasında ve allerjik durumlarda önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

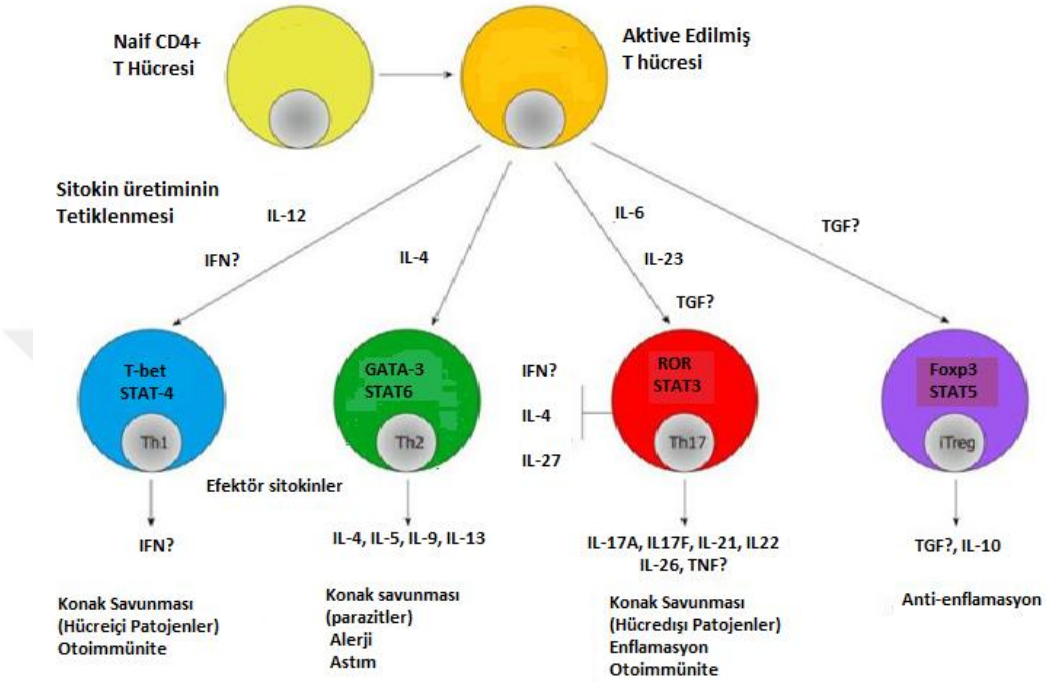
B lenfosite yönelik sitokinler ise B hücrelerini aktive ederek antikor üretiminde B hücrelerine yardımcı olmaktadırlar. Sonuç olarak T yardımcı hücreleri Th1 alt tipi ile gecikmiş tip hipersensitivite yanıtı sağlarken, Th2 hücreleri antikor yanıtını düzenlemektedirler. Her iki hücre grubu da ürettikleri sitokinlerle karşılıklı birbirlerini kontrol altında tutmaktadırlar.

Son yıllarda, IL-17 üreten ve fonksiyonu Th1 ve Th2 hücrelerinden farklı olan üçüncü bir efektör Th hücresi (Th17) keşfedilmiştir. Bu hücrenin başlıca fonksiyonu Th1 ve Th2 tarafından tam olarak kontrol altına alınamamış patojenlerin yok edilmesini sağladığı saptanmıştır. Ancak Th17 hücreleri doku inflamasyonunun temel tetikleyecilerinden olmaktadır. İnsanlarda ve çoğu deneysel çalışmalarda inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların patogenezinde rolü olduğu belirlenmiştir.

1.2.1.2.2.3.2 T Regülatör (Treg) Hücreler

Bağışıklık sistemi, organizmanın kendisine karşı reaksiyon oluşturmaması için bazı kontrol mekanizmaları geliştirmiştir. Supresör T hücreleri olarak bilinen hücrelerin günümüzde T regülatör hücreler (Treg) olduğu anlaşılmıştır. Periferik kanda CD4+ T lenfositlerin %5-10'u IL-2R (CD25) zinciri taşımaktadır ve Treg hücre olarak isimlendirilen bu hücreler self antijenlere karşı toleransın devamlılığını sağlamaktadırlar. Regülator T hücreler hem farelerde hemde insanlarda Th ve B lenfositleri baskılamaktadırlar. İmmunsupresif bir sitokin olan TGF-β'a maruz kalan naif T hücreleri foxp3 (forkhead box P3) eksprese etmekte ve regülator T

hücrelerinin indüksiyonunu sağlamaktadır. IL-6 ise TGF-β aracılı Foxp3+ regülator hücre indüksiyonunu inhibe etmektedir.



Şekil 4 : T yardımcı hücreleri(8)

1.2.1.3 Doğal Bağışıklık Sistemi

Doğal bağışıklık sistemi, savunmanın ilk adımı ve spesifik olmayan immün sistem olarak adlandırılmaktadır. Hiçbir enfekte durumu yaşanmadan doğum anından itibaren mevcut olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle dışarıdan gelebilecek herhangi yabancı organizmalar için hemen tepki verir. Vücut diğer organizmalar tarafından enfekte olduğunda ise hızlı bir savunma sağlamak üzere hücre ve mekanizmaları içeren genel bağışıklığın önemli bir alt sistemini oluşturmaktadır(2,3,4).

Doğal bağışıklık sistemi hücreleri, patojenleri tanır ve spesifik olmayan bir şekilde immün yanıt oluşturur. Bu hücreler yabancı madde olarak bilinen sadece sınırlı sayıda antijenleri tanımaktadırlar. Bu antijenler birçok farklı organizmada bulunmaktadır. Adaptif bağışıklığın aksine doğuştan bağışıklık, vücudun yabancı organizmayla karşılaştığı anda hiçbir anısı yoktur. Bilinen yabancı antijenleri hatırlayamaz ve daha sonra gerçekleşebilecek enfeksiyonlara karşı sürdürülebilir bir koruma sağlayamaz(3,4).

Doğal bağışıklık sistemi, enfeksiyon bölgesinde her zaman var olan, harekete geçmeye ve yabancı maddelerle savaşmaya hazır hücre ve proteinler içermektedir. Bu sistemin ana bileşenleri; epitel bariyerleri, fagositik lökositler, dentritik hücreler, doğal öldürücü hücreler(NK), plazma proteinleri ve sitokinlerdir(2,4).

1.2.1.4 Adaptif Bağışıklık Sistemi

Adaptif bağışıklık, antijenlere özgü olarak yanıt verilen bir bağışıklık sistemini kapsamaktadır. Adaptif bağışıklığın yanıtı doğal bağışıklık yanıtından daha karmaşıktır(3).

Antijen öncelikle işlenmeli ve tanımlanmalıdır. Bu antijen bir kere tanımlandıktan sonra, adaptif bağışıklık sistemi özellikle bu antijene saldırmak için tasarlanmış bağışıklık hücrelerini üretebilmektedir. Bu hücreler bağışıklık sistemi yanıtını koordine etmek üzere beyaz kan hücrelerinin daha özelleşmiş hali olan lenfositlerdir. Lenfositler, adaptif yanıt boyunca ve enfeksiyon sırasında hassasiyetle mikropları hedef alan, kan yoluyla hareket eden çok sayıda antikor denilen moleküller üretmektedirler. Adaptif bağışıklık sistemi aynı zamanda hafıza hücreleri de oluşturmaktadır. Bu hücreler bir sonraki savunma için daha hızlı, doğru ve etkilidirler(2,3).

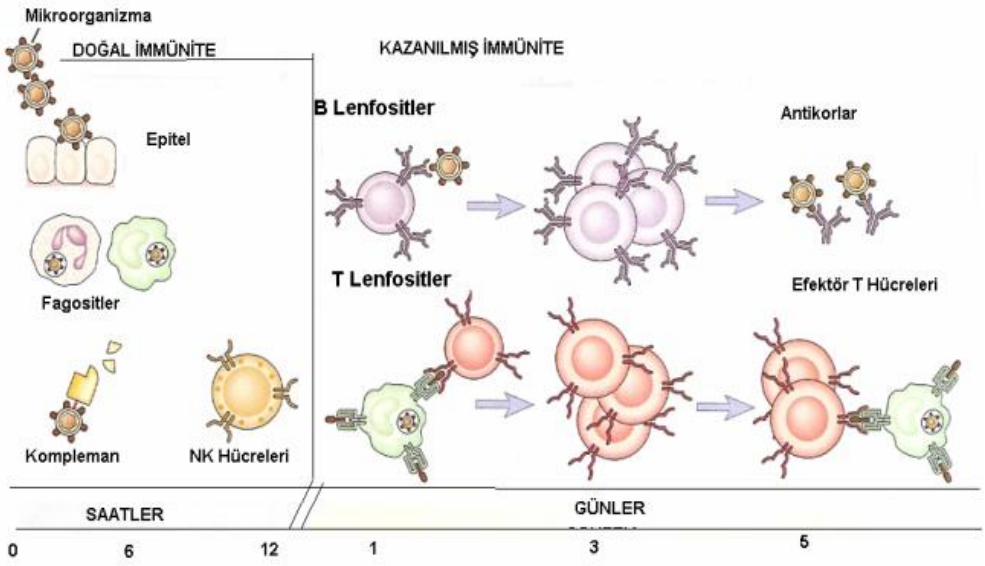
Adaptif bağışıklık başlıca humoral (B hücre aracılı) ve hücresel (T hücre aracılı) bağışıklık olarak incelenmektedir. Humoral bağışıklık yanıtında, B lenfositlerin plazma hücrelerine dönüşerek ürettikleri, antijen spesifik moleküller olan antikorlar başlıca rol oynamaktadırlar. B hücre aracılığı ile antijenlere karşı antikor üretimi humoral bağışıklık sisteminin en temel görevidir. Hücre dışı yerleşen mikroorganizmaları ve onların toksinlerine karşı savunmada etkin olup bu yabancı

maddelere bağlanarak nötralize etmekte ve ortadan kaldırılmalarını sağlamaktadırlar. Ancak dolaşan antikorların hücre içi yerleşim gösteren mikroorganizmalara (viruslar, mantarlar ve bazı bakteriler gibi) etkileri olmadığı düşünülmektedir. T lenfositler ise daha güçlü bir savunma oluşturabilmek için gelişmişlerdir. Buna ek olarak da aynı patojen vücuda bir kez daha girdiğinde o patojene karşı artan bir savunma sağlamaktadırlar.

Adaptif bağışıklığın başlamasında anahtar rol oynayan hücrelerden bir tanesi de makrofajlardır. T lenfositler için antijen sunan hücreler (ASH)'dir. Fagosite ettikleri yabancı antijenleri küçük parçalara ayrılmış peptidler halinde MHC (Major Histocompatibility Complex) sınıf II antijenleri ile kompleks oluşturarak T yardımcı hücrelerine sunmaktadırlar.

B lenfositler de antijen sunan hücre(ASH) görevi yapmaktadırlar. İşledikleri antijeni MHC sınıf II reseptörü ile birlikte T yardımcı hücrelerine sunarak onları aktive etmektedirler(2,3,4).

Makrofajlar B hücrelerine kıyasla bazı sitokinleri (örneğin IL-1 gibi) fazla miktarlarda salgılayarak T hücrelerini daha kolay aktive edebilmektedirler. B lenfositlerinin bellek T hücrelerini uyarabilmesi için gerekli olan antijen miktarı, makrofajların uyarabilmesi için gerekli olandan daha az olduğu saptanmıştır. Bu nedenle B lenfositlerin sekonder immün yanıtta daha önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. B lenfositleri T yardımcı hücrelerine antijen sunumunda, T yardımcı hücreleri de B hücre proliferasyonu ve farklılaşması için gerekli olan sitokinleri salgılamaktadırlar. Sonuçta bir kısım B lenfositleri plazma hücrelerine dönüşerek antikor üretmekte diğer bir kısım B lenfositler ise bellek hücresi olarak kalmakta ya da yok edilmektedirler(2,3).



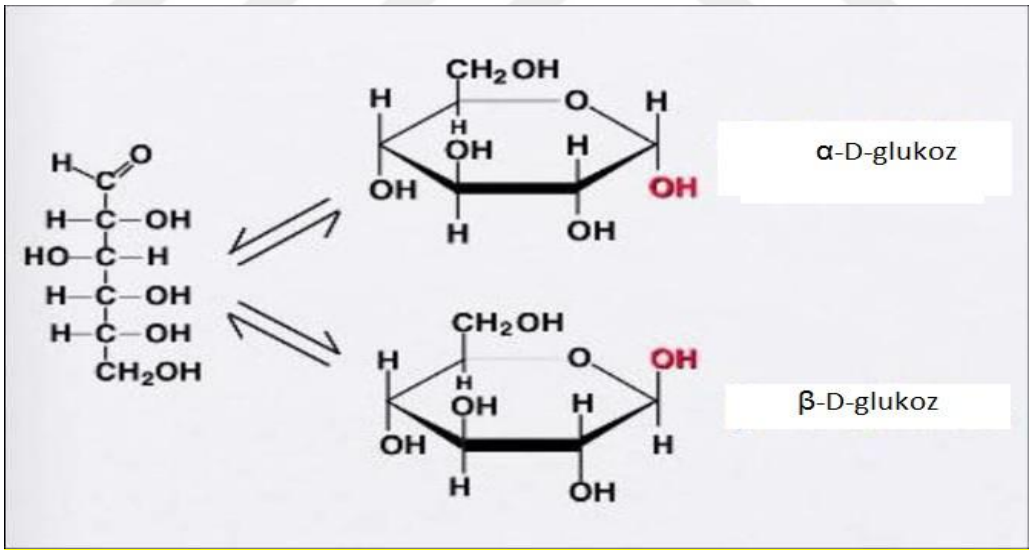
Şekil 5: Doğal Bağışıklık ve Adaptif Bağışıklık

1.2 GLUKANLAR

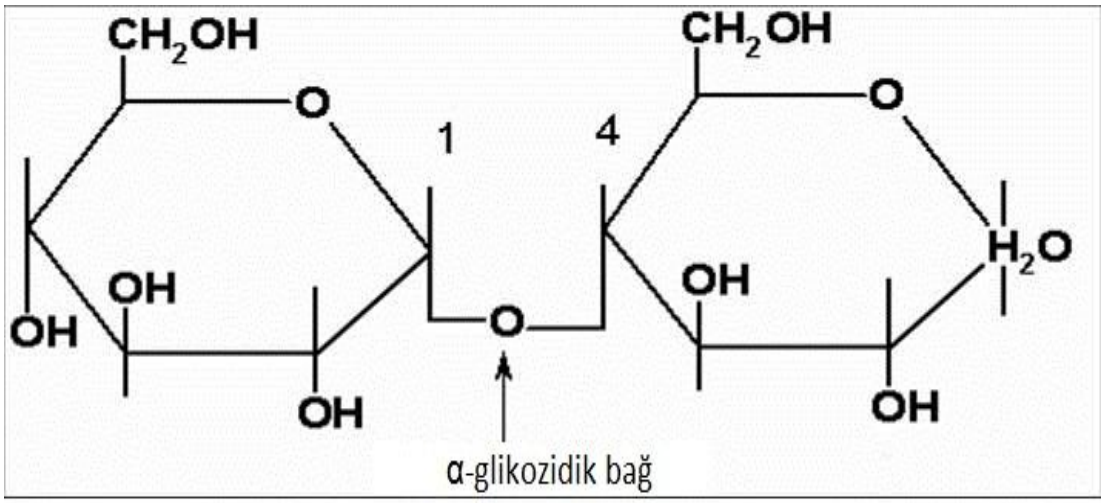
1.2.1 Glukanların Kimyasal Yapı ve Özellikleri

Glukanlar kendi aralarında α-glukan (α-1,6- bağıyla dekstran, α-1,4- ve α-1,6-glikozidik bağlarıyla nişasta, glikojen, pullulan) ve β-glukan (β-1,4 bağıyla selüloz, β-1,3 bağıyla zymosan, β-1,3 ve β-1,6 ile laminarin, β-1,3 ve β-1,4 glikozidik bağları ile liken) olmak üzere temel sınıflandırılması yapılan glukoz polimerleridir.

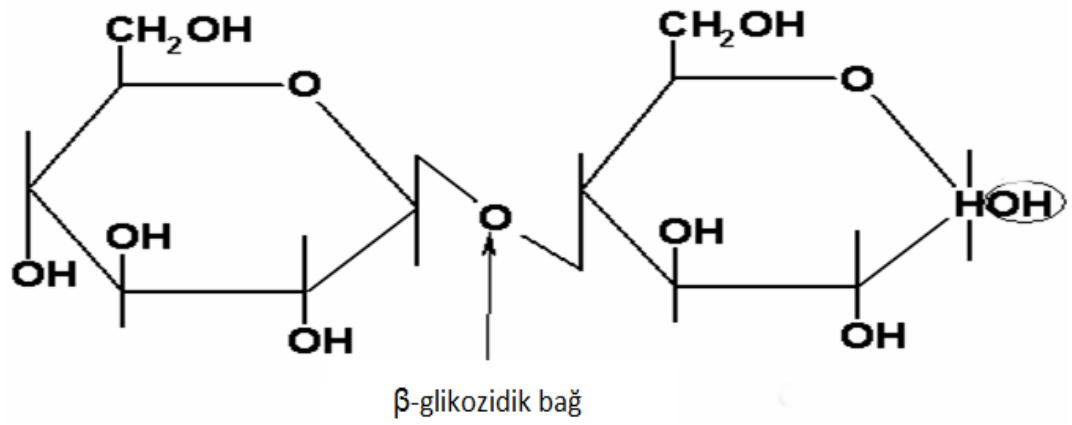
Alfa ve beta glukanlar stereokimya açısından farklılıklar göstermektedirler. Alfa glikozidik bağlar eksenel bir pozisyonda yer alırken beta glikozidik bağlar ekvatoral pozisyonda yer almaktadırlar. Hem alfa hem de beta glukanların numaralandırılması, üzerlerinde bulunan glikozidik bağlardaki karbon atomlarının sayısıyla ilgilidir. Dolayısıyla, β-1,3-glukanın glikozidik bağları, glukoz çemberindeki birinci ve üçüncü karbonlarda yer alır(9).



Şekil 6: α-D-glukoz ve β-D-glukoz moleküllerinin yapısı(10)



Şekil 7 : α-glikozidik bağ yapısı(11)



Şekil 8 : β-glikozidik bağ yapısı(11)

1.2.1.1 Bazı Alfa Glukan Örnekleri

Dekstran: α-1,3-1,6-glukan formudur ve laktik asit bakterileri tarafından sentezlenir. Dental plaklarda bol miktarda bulunur.

Glikojen: α-1,4- ve α-1,6-glukan formudur. Genellikle hayvan nişastası olarak bilinir. Hayvanlarda ve mantarlarda uzun süre karbonhidrat olarak depo edilir.

Pullulan: α-1,4- ve α-1,6-glukan formudur. Aureobasidium pullulans gibi yaygın olan mantarlarda nişastanın parçalanması sırasında oluşur. Nefes ferahlatıcı olarak kullanılan ince ve yenilebilir filmlerin imalatında kullanılmaktadır.

Nişasta: α-1,4- ve α-1,6-glukan formudur. Bütün yeşil bitkilerde karbonhidrat olarak depolanır. Yediğimiz hemen hemen tüm tahıllarda, meyvelerde ve sebzelerde mevcuttur(11).

α-Glukan Çeşitleri	Kaynak	Yapı
Dekstran	*Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus mutans*	Lineer α-(1 --> 3) zincirine bağlı (1 --> 6) glukan yapısı
Glikojen	Hayvanlarda, Mantarlarda ve Bakterilerde	α-(1 --> 4)-(1 --> 6) glukan yapısı
Pullulan	*Aureobasidium pullulans* (fungus)	Her bir lineer (1 --> 6)-glukana bağlı α-(1 --> 4)-glukan yapısı
Nişasta	Bitkilerde	Lineer α-(1 --> 4)-glukan ve dallanmış α-(1 --> 4)-(1 --> 6) glukan yapısı

Tablo 1: α-glukan çeşitleri, elde edildikleri kaynaklar ve yapıları

1.2.1.2 Bazı Beta Glukan Örnekleri

Selüloz: β-1,4-glukan formudur. Bu form bazı mantarların ve bitkilerin hücre duvarının yapısını oluşturur. Biyofilm oluşturan bazı bakteriler tarafından salgılanır.

Kurdlan: β-1,3-glukan formudur. *Agrobacterium biobar* tarafından üretilir ve elastik jeller oluşturmak için endüstriyel olarak kullanılır.

Laminarin: β-1,3-1,6-glukan formudur. Kahverengi alglerde karbonhidrat olarak depolanır.

Krisolaminarin: β-1,3-1,6 glukan formudur. Sarı-kahverengi alglerde (fitoplankton) karbonhidrat olarak depolanır.

Lentinan: Saflaştırılmış β-1,3-1,6-glukan formudur. *Lentinula edodes* (şitake mantarı)'den elde edilir. Bu form medikal tedavilerde anti-kanser ajanı olarak damar içine uygulanır.

Likenin: β-1,3-1,4-glukan formudur. Özellikle İzlanda yosunu olarak adlandırılan bazı likenlerde bulunur.

Pleuran: β-1,3-1,6-glukan formudur. Yenilebilir mantar olan *Pleurotus ostreatus*'dan elde edilir. Lentinan gibi anti-kanser ve immünstimülatör özelliklere sahiptir.

Zimosan: β-1,3-glukan formudur. Maya hücre duvarlarından izole edilir.

Maya kaynaklı β- glukan patikülleri: β-1,3-1,6-glukan formudur. Maya hücre duvarlarından izole edilir. Makrofaj aktivasyonunu uyarıcı bir enflamatuvar ajanıdır.

Grifolan: β-1,3-1,6-glukan formudur. *Grifola frondosa*'da bulunur. Maitake mantarı olarak da adlandırılır. Maitake mantarlarının ve çözünür diyet lifi hücre duvarının bir bileşenidir.

Schizophyllan(Sizofiran): β-1,3-1,6-glukan formudur. *Schizophyllum commune*'nun ürettiği bir polisakkarittir. kurdlan ile kimyasal yapısı aynıdır. Bazı nanofibrillerin içinde ve bazı ilaçlarla beraber kullanıldığı bilinmektedir.

Skleroglukan: β-1,3-1,6-glukan formudur. *Sclerotinia sclerotiorum* ve *Sclerotium rolfsii* funguslarının ürettiği bir glukan türüdür.

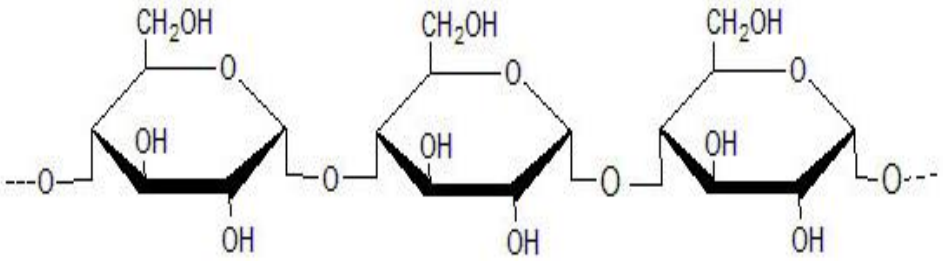
Krestin: Protein bağlı β-1,3-glukan formudur. *Trametes versicolor*'dan elde edilir. Bazı bölgelerde anti-kanser immünolojik adjuvan olarak kullanılır.

Pestolotan: β-1,3-1,6-glukan formudur. *Pestalotia sp. 815*'den elde edilir.

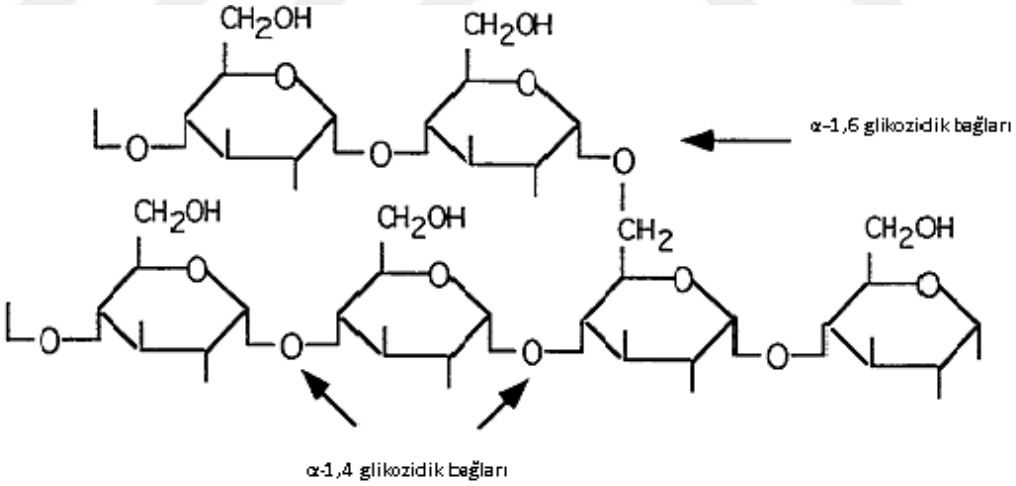
Epiglucan: β-1,3-1,6-glukan formudur. *Epicoccum nigrum*'dan elde edilir(11).

Glukan	Kaynak	Yapı
Selüloz	Bitkilerin hücre duvarında	Lineer β-(1 --> 4) glukan yapısı
Kurdlan	Alcaligenes faecalis (bakteriyal)	Lineer β-(1 --> 3) glukan yapısı
Laminarin	Kahverengi alglerde	Her üç β-(1 --> 3) glikoz iskeletine bağlı bir β-(1 --> 6) bağlı glikoz yapısı
Krisolaminarin	Sarı-kahverengi alglerde (fitoplankton)	Her on bir β-(1 --> 3) glikoz iskeletine bağlı bir β-(1 --> 6) glikoz yapısı
Lentinan	Lentinula edodes	Her iki β-(1 --> 3) glikoz iskeletine bağlı bir β-(1 --> 6)glikoz yapısı
Likenin	Sarı-yeşil algler ve Kahverengi algler	β-(1 --> 3) glikoz iskeletine bağlı β-(1 --> 6) glikoz yapısı
Pleuran	Pleurotus ostreatus	β-(1 --> 3) glikoz iskeletine bağlı β-(1 --> 6) glikoz yapısı
Zimosan	Saccharomyces cerevisiae	β-(1 --> 3)(1 --> 6) glukan ve mannoz karışımının hücre duvarı ekstraktı
Maya kaynaklı β-glukan patikülleri	Saccaromyces cerevisiae	β-(1 --> 3) glikoz iskeletine bağlı β-(1 --> 6) glikoz yapısı
Grifolan	Grifola frondosa (maitake mantarı)	Her beş β-(1 --> 3) glikoz iskeletine bağlı iki β-(1 --> 6) glikoz yapısı
Schizophyllan(Sizofiran)	Schizophyllum commune	Her üç β-(1 --> 3) glikoz iskeletine bağlı bir β-(1 --> 6) glikoz yapısı
Scleroglucan	Sclerotinia sclerotiorum ve Sclerotium rolfsii	Her üç β-(1 --> 3) glikoz iskeletine bağlı β-(1 --> 6) glikoz yapısı
Krestin	Trametes versicolor	Protein bağlı β-(1 --> 3) glukan yapısı
Pestolotan	Pestalotia sp. 815	Her beş β-(1 --> 3) glikoz iskeletine bağlı üç β-(1 --> 6) glikoz yapısı
Epiglucan	Epicoccum nigrum	Her üç β-(1 --> 3) glikoz iskeletine bağlı iki β-(1 --> 6) glikoz yapısı

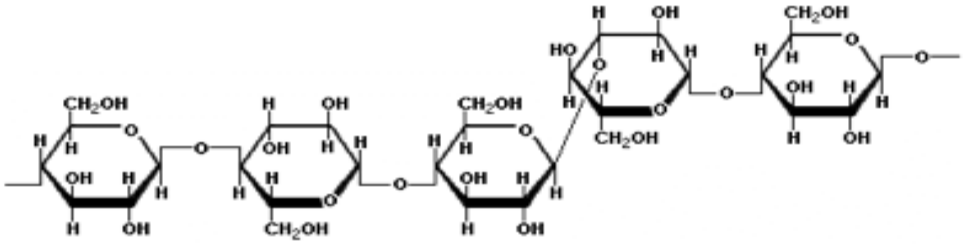
Tablo 2: β-glukan çeşitleri, elde edildikleri kaynaklar ve yapıları(12)



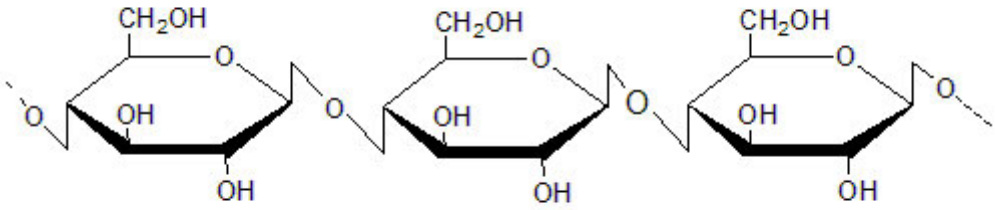
Şekil 9: α-1,4 glikozidik bağ yapısı(13)



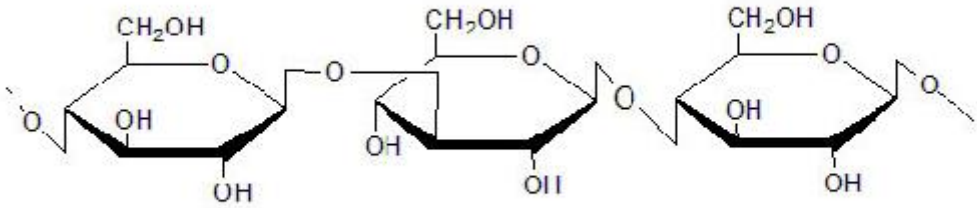
Şekil 10:α-1,4-1,6-glukan bağ yapısı(13)



Şekil 11: β-1,3-D-glukan formu(14)



Şekil 12: β-1,4-glukan formu(13)



Şekil 13: β-1,3-1,4-glukan formu (13)

1.2.2 β-1,3-D-glukanın Keşfi

1940'lardan beri bilimadamları etkin bir şekilde bağışıklık yanıtı aktive etmek için mayadan elde edilen basit bir maddenin olağanüstü yeteneklerini bilimsel olarak kanıtlayan çalışmalarda bulunmuşlardır. Bu madde vücudumuzun savaştığı kansere, ülsere, radyasyona, enfeksiyona ve travmalara karşı bağışıklık yanıtın doğal destek potansiyeliyle çalıştığı düşünülmektedir.

Beta glukanın hikayesi avrupada ilaç olarak kullanılan zimosanın çalışılmasıyla başlamaktadır. İmmün uyarıcı olan zimosan, hastalar için pek çok etki gösterdiği düşünülerek sentezlenen bir ilaçtır olmuştur. Proteinleri, lipidleri ve polisakkaritleri içeren maya hücre zarı maddelerinin ham karışımından oluşmaktadır.

Dr. Louis Pillemer ve arkadaşları 1940'larda ilk olarak zimosan maddesi üzerine çalışmışlar ve zymosanın spesifik olmayan bir şekilde immün sistemi modüle ettiğini keşfetmişlerdir. Zimosan, virüsleri, bakterileri, mantarları, parazitleri ve tümörleri içeren ne tür istilacı ya da patojen olursa olsun immün yanıtı aktive etmektedir.

1960'larda Dr. Nicholas DiLuzio ek araştırmalar yaparak, daha önce bilinen toksisitesi veya yan etkisi bulunmayan, zimosan bileşeni içinde, bağışıklığı aktive edici madde olarak düşünülen uzun zincirli polisakkarit β-1,3-D-glukanı keşfetmiştir. Dr DiLuzionun ortaya çıkardığı bu bulgulardan sonra araştırmacılar, beta glukanın makrofaj bağışıklık hücrelerini nasıl aktive ettiğini ve bunu nasıl immün yanıta çevirdiğini açıklamışlardır(15).

1.2.3 β-glukanların Elde Edildiği Kaynaklara Göre Kimyasal Yapıları ve Fizikokimyasal Özellikleri

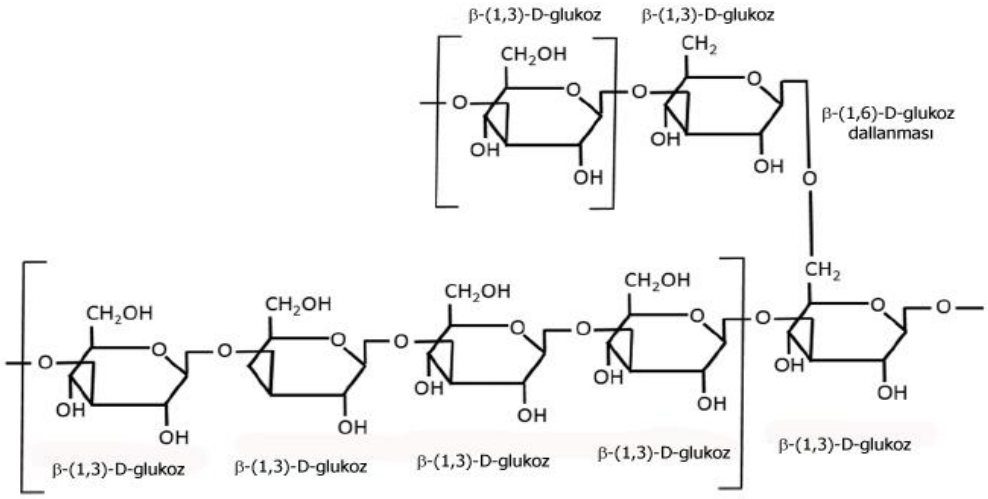
β-glukanlar, β glikozidik bağlarla bağlanmış D-glukoz monomerlerini içeren heterojen, nişasta yapısında olmayan polisakkarit gruplarıdır. β-glukanın makromoleküler yapısı hem elde edildiği kaynağa hem de izolasyon metoduna göre değişmektedir(16). En basit β-glukan formu, prokaryot ve ökaryotlarda bulunan, düz zincirli ve yapısal bir dallanma göstermeyen β-(1,3)-D-glukandır (17).

Basit yapılı başka bir tip ise, daha çok tahıl tanelerinin odun yapısında olmayan hücre duvarlarında bulunan ve düz zincirli β-(1,3;1,4)-D-glukan yapısıdır. Arpa, yulaf,

veya buğdaydan elde edilen bu glukan tipleri endospermin hücre duvarında bulunmaktadırlar.

β-glukanın en çok tüketilen iki kaynağı tahıllar ve mayalardır. Farklı kaynaklardan elde edilen β-glukanlar farklı kimyasal yapılara sahiptirler. Yulaf ve arpa % 2-6 (kuru ağırlık) oranında lineer zincirli β-(1,3-1,4)-D-glukan içermektedir(9,17). Glikoz alt birimlerinin bağlantılarına iki farklı türde bağlanan bu β-glukan, kolestrolü ve kan şekeri seviyesini düşürmektedir(17). Buna karşın yaygın olarak ekmek mayası *Saccharomyces cerevisiae*'dan elde edilen β-(1,3)-D-glukan ana iskeletine bağlı β-(1,6)-D-glukan zinciri glukanlar arasında en önemlisi olduğu düşünülmektedir. Güçlü bir immünostimülant ve hem maling hem de belign tümörlere karşı güçlü bir antogonist olduğu bilinmektedir.

β-glukanın elde edildiği diğer kaynaklardan olan şitake mantarı(Lentinus edodes), maytake mantarı(Grifola frondosa), şizofilan(Schizophillum commune) ve SSG(Sclerotinia sclerotiorum) gibi mantarlar, β-(1,3)-D-glukan ana iskeletine bağlı kısa β-(1,6)-D-glukan zincirlerine sahiptirler. Bu yapısal farklılıklar, ekstraksiyonunun ve biyolojik aktivitelerinin farklılıklarını göstermektedir(9).



Şekil 14: β-(1,3-1,6)-D-glukanın kimyasal yapısı(18)

β-glukanlar, dallanma sıklığı ve uzunluğu, glikozidik bağların pozisyonu, dallanma derecesi, polimerlerin moleküler ağırlığı (10^{2}'den 10^{6} daltona kadar), polimer yükü, partikül büyüklüklüğü, çözeltideki yapısı (rastgele bobin veya üçlü ya da tek sarmal) ve suda çözünürlüğü bakımından çok fazla çeşitlilik göstermektedir. Bu karakteristik özelliklerin her biri, belirli bir uygulama için partiküler β-glukanın uygunluğunu etkilemekte ve β-glukan ilişkili biyolojik faaliyetleri şekillendirmede rol oynamaktadır(16,17,19).

β-glukanın çözünürlüğü polimerizasyon derecesiyle(PD) ilgilidir. PD>100 olduğunda β-glukan suda tamamen çözünmez. PD düştüğünde çözünürlük de artar. β-glukanlar kendi çözünme özelliklerine göre; (a) alkali ortamda çözünmeyen, asetik asitte çözünmeyen (1,3)-β-glukan; (b) alkali ortamda çözünebilen (1,3)-β-glukan ve (c) yüksek dallanma gösteren (1,6)-β-glukan olarak sınıflandırılabilmektedirler(16).

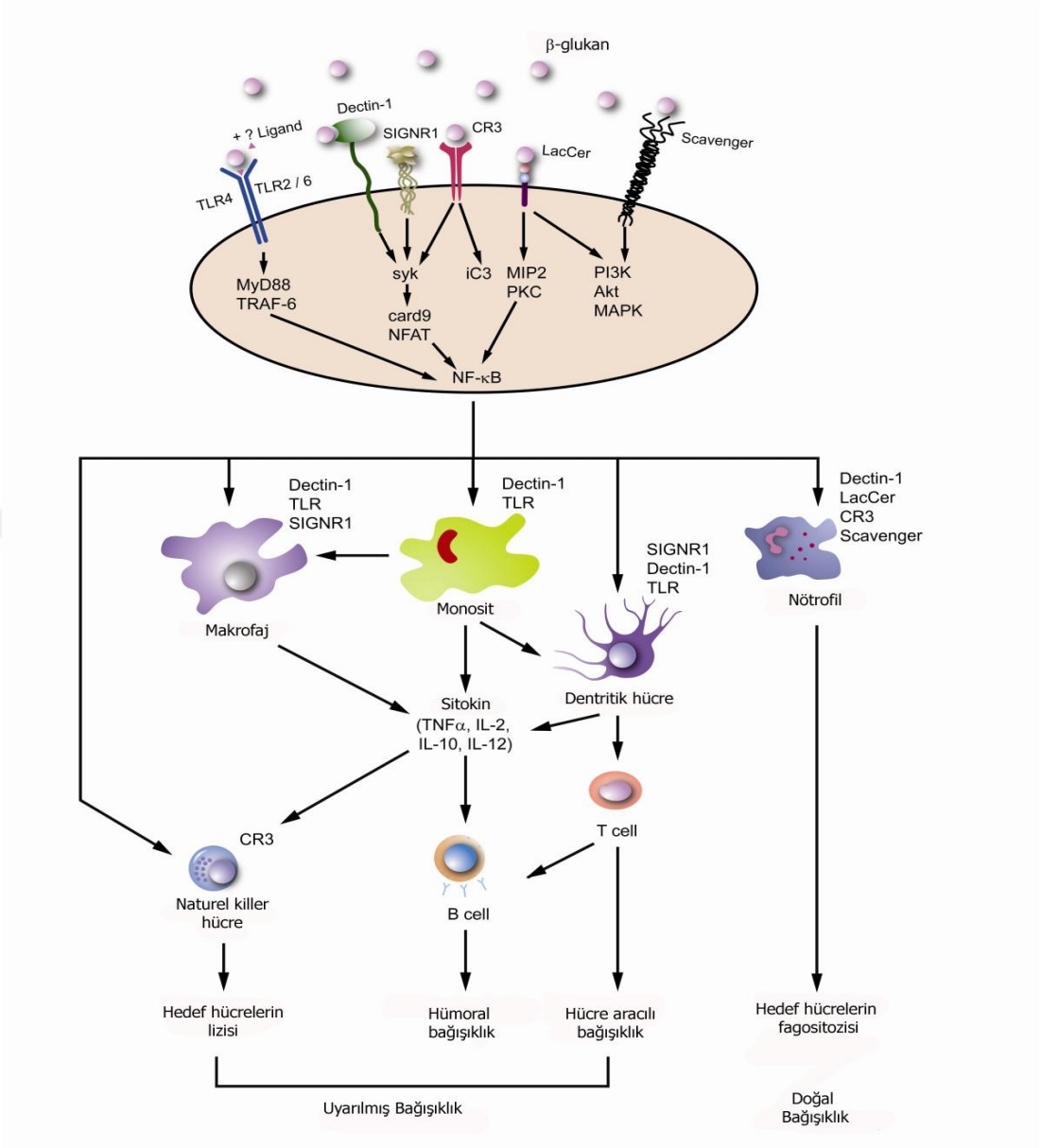
1.2.4 β-1,3-1,6-glukanın İmmün Sistem Üzerindeki Etkisi

β-glukanlar yaygın olarak mayalarda (Saccharomyces cerevisiae), tahıllarda (örn; buğday, arpa), su yosunlarında (Laminaria digitata), bakterilerde (örn; Alcaligenes faecalis) ve mantarlarda (örn; Sclerotium glucanicum ve diğerleri) bulunmaktadırlar(17,20). Bu kaynaklardan elde edilen bütün β-glukanların, immün sistem hücreleri üzerinde pro- ya da anti-inflamatuar etkileri olduğu gösterilmiştir(20). β-glukanların daha etkili immünolojik aktivite gösteren formunun β-(1,3)-D-glukan olduğu yapılan araştırmalar doğrultusunda onaylanmıştır(14,17).

Genellikle, in vitro çalışmalarda büyük molekül ağırlıklı veya partiküler β-glukanların (zimosan gibi) direkt olarak lökositleri aktive edebildiği, lökositlerin fagositozunu, sitotoksisitesini uyardığı, antimikrobiyal aktivitesini stimüle ettiği düşünülmektedir. Düşük molekül ağırlıklı β-glukanların in vivo şartlarda biyolojik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir fakat, hücresel etkileri tam olarak netleştirilememiştir. Kısa zincir uzunluklarına sahip β-glukanlar (laminarin gibi, <5000-10000 moleküler ağırlıklı) genellikle inaktif kabul edilmektedir(21).

İmmün sistemimizin belirgin uyarıcısı olarak kabul edilen β-glukanlar, karsinogenezden, çevresel toksinlerin zararlı etkilerinden ve patojenik mikropların saldırısından bizi korumakta ve hem doğal hem de adaptif bağışıklık sistemi

fonsiyonlarının aktivasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. İn vivo ve in vitro çalışmalar göstermiştir ki bu fonksiyonlar β-glukanın, immünostimülatör aktivitesi yapısına, moleküler ağırlığına ve dallanma sayısına bağlıdır(14,16). β-glukanlar insan vücudu tarafından sentezlenememektedir. Dolayısıyla bağışıklık sistemi bu bileşikleri, doğal ve adaptif bağışıklık tepkilerini uyaran kendisinin üretmediği moleküller olarak tanımaktadır(22).



Şekil 15: β-glukanın immün sistem üzerine etkisi(23)

1.2.4.1 β-1,3-1,6-glukanların Doğal Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi

Son zamanlardaki veriler β-glukanların, doğal ve adaptif bağışıklık üzerindeki etkileri sebebiyle güçlü immünomodülatörler olduğunu göstermektedir. Beta glukanların, makrofajlara ve diğer beyaz kan hücrelerine direkt olarak bağlanarak ve onları aktive ederek bağışıklık sistemini koruma, iyileştirme ve olası hastalıklara karşı optimum direnç sağlamak gibi önemli etkileri olduğu ortaya konmuştur(23,24).

β-1,3-1,6-glukanlar, makrofaj hücrelerinin β-glukan reseptörlerine bağlandığında; fagositozu, IL-1, IL-6 ve GM-CSF gibi bazı sitokinlerin salınmasını, antijen sunum sürecini içeren sistem fonksiyonlarının aktive olmasını sağlamaktadırlar. Salınan bu sitokinler, yeni beyaz kan hücrelerinin oluşumunu tetiklemektedir. Böylece bu hücrelerin reseptörlerine daha çok β-glukan bağlanmakta ve bağışıklık yanıtın daha güçlü bir uyarımı sağlanmaktadır(23,25).

Doğal bağışıklık sisteminin patojenlere karşı çabuk tanıma ve yanıt oluşturma yeteneği, enfeksiyonu kontrol etmek için gerekli olmaktadır. β-1,3-1,6-glukanların bağlandığı, tip II transmembran protein reseptörlerinden olan dektin-1, doğal bağışıklık yanıtını başlatıp düzenlemektedir. Dektin-1, makrofajlar, nötrofiller ve dentritik hücreler gibi doğal bağışıklık yanıttan sorumlu hücreler üzerinde eksprese edilmektedir. Bu reseptör aktive edildiğinde IL-12, IL-6, IL-10 ve tümör nekrozis faktör(TNF-α) gibi sitokinlerin salınması gerçekleşmektedir.

Doğal bağışıklık hücrelerinden bir tanesi de komplement reseptörü 3(KR3)'tür. Bu reseptör herhangi bir yabancı hücreye bağlandığında bağışıklık sistemi hücreleri onları tanımaktadır. İki bağlanma bölgesi bulunmaktadır. İlki, özel antikorlarla hedeflenen patojenlerin ve bağışık hücrelerinin bağlanmasından sorumlu olan KR3(iK3b)'dir. İkincisi ise, doğal bağışıklık hücrelerinin tanıdığı maya ve mantar hücrelerindeki karbonhidratlara bağlanmaktadır. β-glukanlar bir yandan da komplementer reseptör 3 aracılığıyla lenfositleri, nötrofilleri ve doğal öldürücü hücreleri aktive edebilmektedir. Bu reseptör, fagositoz ve lizisi teşvik eden β-glukanın opsonik tanınmasından sorumlu olabilmektedir. Enfekte olmuş hücrelerin yüzeyi etkisiz hale getirilmiş komplement 3b(iK3b) kaplanmaktadır. β-glukanlar bu reseptörlere bağlanmakta ve enfekte olmuş hücreler nötrofiller ve doğal öldürücü hücreler tarafından yok edilmek üzere işaretlenmektedir(23,24,25).

Radikal temizleyici ve laktosilseramid olarak bilinen iki adet reseptör daha bulunmaktadır. β-glukan bu reseptörlere de bağlanır ve bir dizi yanıt oluşturmaktadır. Bazı canlılarda TNF üretimini azaltarak radikal temizleyiciler aracılığıyla endotoksin açıklığını arttırmaktadır. Laktosilseramid reseptörüne bağlanarak da miyeloid öncül hücrelerinin çoğalmasını, nötrofillerin oksidatif patlama cevabını ve lökositlerin antimikrobiyal aktivitesinde bir artışa sebep olmakta ve aynı zamanda nötrofillerdeki NF-KB ile de ilişkili olmaktadır(23).

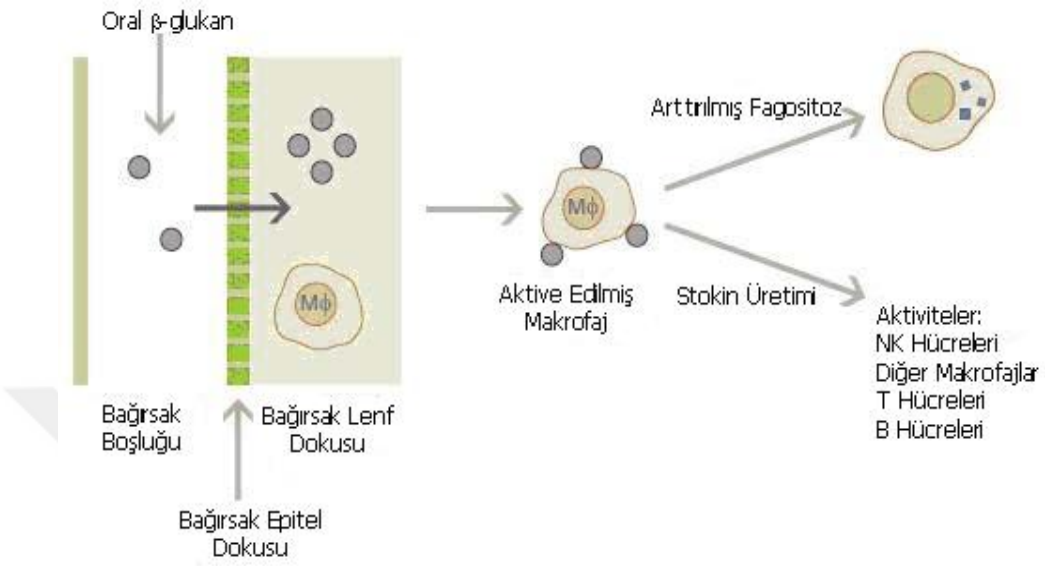
1.2.4.2 β-1,3-1,6-glukanların Adaptif Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi

β-glukanların adaptif bağışıklık sistemini düzenleyici özellikleri olduğu da belirtilmiştir. Örneğin Th-1 ve Th-17 hücresel cevaplarını stimüle etmekte ve CD8 T-hücresi üzerinde güçlü bir adjuvan etki sergilemektedirler. Ayrıca β-glukanlar IL-10 ve GF-β gibi anti-enflamatuvar sitokinlerin üretimini de teşvik etmekte ve DH'leri aktive ederek CD4 ve CD8 T-hücrelerinin antijen-spesifik yanıtlarını oluşturmaktadırlar(23,25,26).

β-glukanın vücuda girip tanınmasından sonra dektin-1 reseptör sinyali adaptif bağışıklığı tetiklemektedir. Dektin-1'in de aktive ettiği dentritik hücreler, Th1 ve Th17 CD4 T hücrelerinin farklılaşmasını, cevap olarak yabancı organizmalara iletmektedir(25,26).

Th 1 yanıtının başlaması CD11b reseptöründen bağımsız olarak dektin-1 reseptör yolağıyla gerçekleşmektedir. Th1 ise doğal CD4 T-hücresi farklılaşmasını teşvik edebilmektedir. CD4 T hücresi farklılaşmasından hemen sonra, dektin-1 stimülasyonu CD8 T hücresinin yanıtını yönlendirmektedir. Sonuç olarak dektin-1'in antikor aracılığıyla hedeflenmesi, sitotoksik T hücre yanıtının başlamasının yanısıra CD4 T hücresi ve antikor yanıtıyla da sonuçlanmaktadır(23).

1.2.5 β-1,3-1,6-glukanın Farmakodinami Mekanizması



Şekil 16: β-glukanın mekanizması

Partikül halindeki beta glukan yutulduktan sonra ince bağırsağa ulaşır. Gastrointestinal makrofajlar beta glukanı parçalar ve simültan olan beta glukanın(yaklaşık 25kDa) küçük, bioaktif parçaları salınırken vücudun belli bölgelerine(örn; lenf nodülleri, dalak, kemik iliği) taşınırlar. Beta glukan granülleri, makrofajların tutması için en ideal boy olan yaklaşık 1-3 mikron çaptadır. Makrofajlar ve diğer immün sistem hücreleri beta glukanı dectin-1, tamamlayıcı reseptör 3(CR3) ve toll reseptörleri gibi hücre yüzeyindeki çeşitli reseptörlerden tanırlar. Beta glukanın parçalanmasından sonra, makrofajlar aktive olur ve daha hızlı saldırabilir ve yabancı hücreleri daha kolay parçalayabilir hale gelirler. Buna ek olarak, makrofajlar tarafından beta glukanın parçalanması, doğrudan fagositoz oranlarının artırılması, tümör nekroz faktör(TNF)-α ve çok sayıda interlökin(IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12)gibi sitokinlerin salınmasını tetikler. Sitokinler T hücreleri, B hücreleri, natural killer(NK) hücreleri ve diğer makrofaj hücrelerini içeren spesifik

immün hücreleri ve diğer doğal immün hücrelerinin aktivasyonu ve üretimini sonradan desteklenen downstream yolaklarının aktivasyonunu yapan sinyal moleküleridir(24,26).

1.2.5.1 β-glukan Reseptörleri

Çok hücreli canlılar, kendilerinin üretemediği yapıları tanımlamak amacıyla "model tanıma reseptörleri" adı verilen reseptörlere sahiptirler. Dolayısıyla β-glukanların, hücresel yanıtlarını başlatan bir veya daha fazla hücre yüzeyi reseptörleri ile birlikte belirli bir etkileşimde olduğu düşünülmektedir(9,21).

β-glukanların, makrofajlar, nötrofiller ve doğal öldürücü hücrelerin membranlarındaki reseptörlerle etkileşimi aracılığıyla bağışıklık yanıtını desteklediği belirlenmiştir. Makrofajların patojenleri tanıması, patojen ilişkili moleküler reseptörler (PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern, PRR: Pattern Recognition Receptors) gibi bazı yüzey molekülleri ile olmaktadır(9,22).

β-glukan reseptörleri, ilk olarak, alternatif kompleman aktivasyon yolağının parçacık aktivatörleri için opsonin bağımsız reseptörler olarak, 1985 yılında Czop ve Austen tarafından monositlerin yüzeylerinde tanımlanmıştır(9,21).

Beş adet β-glukan reseptörü tanımlanmıştır. Bunlar; komplementer reseptör 3 (CR3; CD11b/CD18), laktosilseramid, radikal temizleyici reseptörler, toll-like reseptörü ve dektin-1(βGR)'dir(9,21,22).

1.2.5.1.1 Dektin-1

Dektin-1(beta glukan reseptörü, βGR), bir hücre dışı karbonhidrat tanıma alanı, bir sap, transmembran bölgesi ve bir hücre içi sitoplazmik kuyruk bileşenlerinden oluşan bir lektindir. CR3 ve anti-Dectin-1 antikorlarına karşı bloke edici bir monoklonal antikor kullanılarak tanımlanmıştır. Makrofajların doğal bağışıklık yanıtının aktivasyonundaki en önemli reseptör olduğu belirlenmiştir.

Dektin-1, makrofajlar ve nötrofillerde sentezlenmektedir. T hücreleri ve dentritik hücrelerde ise daha az miktarlarda sentezlenmektedir. β-1,3 ve/veya β-1,6 glukan bağlantılarını içeren karbonhidratları tanımaktadır(9,20,21,22).

1.2.5.1.2 CR3 Reseptörü

Birbirlerine kovalent olmayan bir şekilde bağlanan CD11b ve CD18 bölgelerini içeren, β_2-integrin ailesine ait, heterodimerik transmembran glikoproteindir.

CD11b'nin iki adet bağlanma bölgesi mevcuttur. Bir tanesi β-glukanlar içindir ve C-terminalde bulunmaktadır. Diğeri ise, iC3b içindir ve N-terminalde bulunmaktadır.

β-glukanın CR3 reseptörüne bağlanması, mikrobial hücrelere yapışmasını arttırır.

Doğal öldürücü hücrelerde, monositlerde ve nötrofillerde yüksek oranda sentezlenmektedir. Makrofajlarda ise daha az miktarda sentezlenmektedir(9,21,22).

1.2.5.1.3 Radikal Temizleyici Reseptörler

Temizleyici reseptörler; iki transmembran bölgesi, iki hücre içi ve bir hücredışı etki alanı ile birlikte heterojenik protein gruplarını içeren miyeloid ve endoteliyal hücrelerde bulunan reseptörlerdir.

Lentinanların bu reseptörlere bağlanmasına rağmen β-glukanlara özgü temizleyici reseptörler henüz bulunamamıştır.

β-glukanlar aracılığıyla gerçekleşebilecek bir biyolojik etkisi ve ne kadar önemli olabileceği konusunda bilgi bulunmamaktadır(9,22).

1.2.5.1.4 Laktosilseramid(LacCer)

Nötrofillerde ve endoteliyal hücrelerinde bulunan LacCer, bir hidrofobik seramid lipit ve bir hidrofilik şeker kısmı içeren glikolipittir.

Makrofaj enflamatuvar proteinini(MIP)-2 ve NFKB'nin aktivasyonunu uyarmakta, nötrofillerin oksidatif patlamasını ve antimikrobiyal fonksiyonlarını geliştirmektedir(9,21,22).

1.2.5.1.5 Toll-like Reseptörleri

Yeni protein ailesinin transmembran reseptörleridir. Bu reseptörler mantarlar, bakteriler, virüsler ve protozoaları içeren çeşitli mikrobial grupların varlığına yanıt vermektedirler.

β-glukanlar TLR-2 ve 4'e bağlanmaktadırlar ve doğal bağışıklık yanıtını aktive etmektedirler. TLR-2, TNF-α ve IL-12 gibi sitokinlerin üretiminin ve NF-KB seviyesinin artmasına sebep olmaktadır(21,22).

Reseptör Tipi	Kimyasal Yapısı	Bulunduğu Hücre	Bağışıklık Yanıta Etkisi	Diğer Ligantlar
Dektin-1	Glikoprotein	Monositler, Maktofajlar, Nütrofiller, DC hücreleri, T-hücreleri	Fagositoz, Endositoz, ROS üretimi, Sitokinez (TNF-α, IL-2, 10, 12), MIP-2	Bütün mantar, T-hücreleri
CR3	CD11b ve CD18 zincirleri içeren heterodimer	Myeloid, NK, Nötrofiller, Lenfositler	Tümör sitotoksisitesi	Çeşitli patojenler
Radikal Temizleyici	Heterojenik protein grupları	Miyeloid, Endotelyal	İmmünite	LDL, HDL, Polianyonik, Mikroplar
Laccer	Glikofosfingolipit içeren hidrofobik seramid yağı ve hidrofilik şeker	Nötrofiller, Epitelyal	ROS, Anti-mikrobiyal Sitokinler, NF-KB Lyn kinaz	Çeşitli mikroplar
TLR	MyD88 proteini ile ilişkili yeni protein ailesi	Makrofajlar, DH, Lenfositler, Epitelyal	Sitokinler (NF-KB, TNF-α, IL-12)	Mikroorganizmaların geniş bir spekturumu

Tablo 3: Doğal bağışıklık hücre reseptörleri ve bağışıklık yanıta etkileri(22)

1.1.2 ÇÖREK OTU TOHUMU YAĞI

1.1.2.1 Çörek Otu Tohumunun özellikleri

Çörek otu (Nigella sativa; Ranunculaceae ailesinden), büyüme alanı güney ülkelerinden, İran, Pakistan ve Hindistan gibi Akdeniz'in doğusuna kadar uzanan tek yıllık otsu bir bitkidir (27). Yenilebilir olan bu bitkinin tohumları tıbbi uygulamalar için dünya çapında kullanılmaktadır (28). Çörek otu tohumu serttir ve acı bir tada sahiptir (29). Ayrıca N. sativa tohumu bileşenleri kozmetik preperatların ve takviye gıda ürünlerin hazırlanmasında kullanılabilir (28).

Bu tohum, astım, hipertansiyon, şeker hastalığı, enflamasyon, öksürük, bronşit, baş ağrısı, egzama, ateş, baş dönmesi, grip, gastrointestinal bozuklukların yanı sıra deri veya solunum rahatsızlıklarını tedavi etmek için doğal bir ilaç olarak kullanılır. Ayrıca tohumların gaz giderici, uyarıcı, idrar söktürücü, emenagog ve galaktogog olduğu bilinmektedir(29).

1.1.2.2 Çörek Otu Tohumu Yağının Biyokimyasal Özellikleri

Çörekotu tohumu yağının antitümör aktivitesi, antioksidan aktivitesi, antiinflamatuvar aktivitesi, antibakteriyel aktivite ve bağışıklık sistemi üzerinde uyarıcı etkisi olduğu gösterilmiştir(30).

Çörek otu tohumu yağı, biyolojik olarak aktif sterol ve tokoferollerce, ayrıca da linoleik ve oleik asit gibi esansiyel yağ asitleri açısından da zengindir (28). Bu otsu bitkinin tohumlarından elde edilen uçucu yağ da tıbbi açıdan kullanılabilir. Örneğin timol ve ditimokinon gibi ilgili bileşikler ve yüksek derişimlerde timokinon içeren bu yağın, iltihabın önlenmesi, reaktif oksijen türlerinin söndürülmesi gibi antioksidan aktiviteleri, fare modellerinde romatoid artrit önlenmesi, antimikrobiyel, antikanserojen, antidiyabetik, antiülser aktivitesinde rol oynadığı bulunmuştur (29).

1.1.2.3 Çörek Otu Yağının Elde Edilme Yöntemlerine Göre Fizikokimyasal ve İçerik Özellikleri

Alternatif tedavilere ilgi arttıkça yaygın ve kolaylıkla kullanılabilen biyoaktif lipidler ve doğal antioksidanlar için doğan ihtiyaç hızla artmaktadır. Dolayısıyla yağların elde edilmesi için farklı ekstraksiyon metodları geliştirilmiştir. Bu geliştirilen

farklı metodlar fonksiyonel özelliklere sahip ve oksidasyon stabilitesine katkıda bulunan minör bileşenleri değiştirebilir(28).

N. sativa(çörek otu) yağı çoğunlukla geleneksel solvent ekstraksiyonu ile üretilmiştir. Bununla birlikte, soğuk presin kullanılmaya başlanması, solvent ekstraksiyonunun zararlarını uzak tutmak amacıyladır. Son birkaç yılda, soğuk preslenmiş yağlara ilginin artmasıyla birlikte, çalışmaların yapılmasıyla bu yağların yüksek besin özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Soğuk pres prosedürü doğal ve güvenli gıda özelliği taşıdığı için tüketicilerin istekleri üzerine geleneksel uygulamalara ilginç bir alternatif haline geliyor(28).

Çörek otu yağı genellikle soxhlet cihazı kullanılarak, 40-60°C'lerde hatta 70°C'lere varan sıcaklıklarda solvent ekstraksiyonuyla üretilir. Bu sıcak metod ekstraksiyonu yağın kimyasal özelliklerini etkiler ve çok işlevli antioksidan ve pro-oksidatif etkilere sahip bileşenlerin çoğunluğunun değişimini indükleyebilir(30).

Mikrodalga-destekli ekstraksiyon (MDE), tedavi edici fonksiyonel gıdaların (nutrasötikler) ekstraksiyonu için kullanılan, klasik çözücü ekstraksiyonu ve mikrodalga kombinasyonuna dayanan yeni bir teknolojidir. Uçucu bitki yağı ekstresinde kullanılan bu teknik kısa bir sürede gerçekleşmesiyle, daha az çözücü kullanımıyla ve daha yüksek bir ekstraksiyon verimiyle avantajlı hale gelmektedir.

Soğuk preste ise ekstraksiyon sırasında ısıl işlem veya kimyasal işlem içermeden yapılan bir teknolojidir. Ayrıca, soğuk preste arıtma işlemi yapılmaz(28). Doğal antioksidanları ve lipofilik fitokimyasalları yüksek düzeyde içeren bu yağlarda ısıl ve kimyasal işlem uygulanmadığı için metabolik sistemlerin sağlıklı çalışmasını sağlayan Omega 3, Omega 6 ve Omega 9 esansiyel yağ asitleri doğal olarak yağa geçer. Ayrıca soğuk pres uygulanan yağların yapısında A, D, E ve K bulunur ve bu yüzden antioksidan özelliğini kaybetmezler(31).

Fizikokimyasal özellikler	Ekstraksiyon metodları		
	Soğuk presleme	MDE	Soxhlet
Serbest yağ asitleri (Oleik Asit Cinsinden)	7.49±0.96	9.51±0.36	9.28±0.63
Peroksit Değeri (meq O_2/kg yağda)	31.32±0.74	21.45±0.79	25.23±1.56
Kırılma indisi (20˚C'de)	1.47326±0.00	1.47176±0.00	1.47142±0.00
K_{232}	3.71±0.12	3.17±0.07	3.11±0.06
K_{270}	0.66±0.05	0.58±0.05	0.66±0.06
Klorofil (mg/kg)	0.30±0.00	0.43±0.00	0.81±0.01
Karotenoid (mg/kg)	0.18±0.00	0.24±0.00	0.40±0.00

Tablo 4: Çörekotu yağının farklı ekstraksiyon yöntemleri ile değişen fizikokimyasal özellikleri(28)

Soğuk presle elde edilmiş çörek otu tohumu yağının serbest yağ asitleri değeri (%7.49), solvent ve mikrodalga destekli ekstraksiyonla elde edilen yağdaki serbest yağ asitleri değerinden(sırasıya % 9.28 ve % 9.51) daha düşüktür. Çörek otu yağının PD (peroksit değeri) soğuk presle elde edilmesi, mikrodalga destekli elde edilmesi ve solvent ekstraksiyonuyla elde edilemesine göre sırasıyla 31.32, 21.45, 25.23 olarak değişir. Refraktif indeks değeri, soğuk presle elde edilen çörek otu tohumu yağında (1.47326) en yüksektir. Bunu takiben ekstraksiyon metodlarına göre değişen değerler, mikrodalga destekli ekstraksiyonda 1.47176 ve solvent ekstraksiyonunda ise 1.47142'dir. Çörek otu tohumu yağının spesifik absorbans değerleri (K_{232} ve K_{270})

benzerdir. K_{232} değerleri 3.11 ile 3.71 arasında değişir. K_{270} değerleri ise 0.58 ile 0.66 arasındadır(28).

Yağ Asitleri Kompozisyonu	Ekstraksiyon Metodları		
	Soğuk presleme	Mikrodalga destekli ekstraksiyon	Soxhlet ekstraksiyonu
C14:0	0.13±0.00	0.14±0.00	0.14±0.01
C16:0	12.01±0.09	11.85±0.07	11.84±0.06
C16:1	0.25±0.01	0.23±0.01	0.24±0.00
C17:0	0.06±0.00	0.07±0.00	0.07±0.00
C17:1	0.03±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00
C18:0	2.77±0.09	2.95±0.04	2.81±0.02
C18:1	23.95±0.12	24.13±0.11	23.85±0.07
C18:2	57.49±0.08	57.18±0.07	57.52±0.07
C18:3	0.25±0.00	0.23±0.00	0.27±0.01
C20:0	0.15±0.00	0.16±0.01	0.16±0.00
C20:1	0.27±0.01	0.29±0.00	0.31±0.01
C20:2	2.33±0.04	2.45±0.01	2.49±0.01
C24:0	0.31±0.02	0.28±0.02	0.26±0.02

Tablo 5: Ekstraksiyon yöntemlerine göre çörekotu tohumu yağının Yağ asitleri (%),profili (28)

Tablo 2'de çörek otu tohumu yağının yağı asidi kompozisyonu gösterilmektedir. Çörek otu tohumu yağının doymamış yağ asitlerinden en önemlileri linoleik asit (C18:2) ve oleik asittir (C18:1). Doymuş yağ asitlerinden en önemlisi ise palmitik asittir (C16:0).

Çörek otu tohumu yağı çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) ve tekli doymamış yağ asitlerinin (TDYA) nispeten yüksek değerleriyle karakterize olur. TDYA, kötü LDL (düşük yoğunluklu lipoproteinler) kolestrolünü düşürmek ve iyi HDL (yüksek yoğunluklu lipoproteinler) kolesterolünü korumak için gösterilir. Yağ asitleri profili ve ÇDYA'nın yüksek miktarı çörekotu tohumu yağını beslenmede önemli bir bileşen haline getirir(28).

Tokoferol Miktarları	**Ekstraksiyon Metodları**		
	Soğuk presleme	**Mikrodalga destekli ekstraksiyon**	**Soxhlet ekstraksiyonu**
α-tokoferol	7.30±0.46	4.80±0.36	5.33±0.12
β-tokoferol	15.47±0.29	8.00±0.36	7.80±0.17
ɣ-tokoferol	34.23±0.21	9.57±0.51	8.57±0.21
δ-tokoferol	8.37±0.12	1.80±0.10	1.63±0.06

Tablo 6: Ekstraksiyon yöntemlerine göre çörekotu tohumu yağının Tokoferol (mg/kg) miktarları (28)

Tokokromanoller (E vitamini) yağda çözünen antioksidanların en önemlileridir ve insan sağlığı için değerlidir. Bu moleküller biyolojik membranlardaki serbest radikallerin ve lipid peroksidasyonunun engellenmesini sağlarlar. Tokokromanoller , tokoferoller ve tokotrienoller içinde sekiz kimyasal bileşik içerirler. Tokoferoller tümüyle doymuş kuyruklar içerirken, tokotrienoller üç adet doymamış çift bağ içerirler. Alfa(α), beta(β), gama(ɣ), delta(δ) olmak üzere çeşitli tokoferol ve tokotrienol izomerleri kromanol halkası üzerindeki metil gruplarının yerleri ile ayırt edilirler.

Çörek otu tohumu yağının içerdiği tokoferol miktarları tablo 3 ‘de verilmiştir. Soğuk presleme ile elde edilen yağda, ɣ-tokoferol (34.23 mg/kg) ve β-tokoferol (15.47 mg/kg) miktarı diğer ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen yağlardan daha yüksektir. Tokoferol miktarları gösteriyor ki soğuk presleme yönteminde ısı ve kimyasal etmenler kullanılmadığı için yağda radikalik oksidasyon başlamamıştır(28).

Sterol Kompozisyonu	**Ekstraksiyon Metodları**		
	Soğuk presleme	**Mikrodalga destekli ekstraksiyon**	**Soxhlet ekstraksiyonu**
Campesterol	14.88±0.19	13.47±0.43	14.71±0.34
Stigmasterol	17.48±0.54	17.49±0.43	18.70±0.59
β-sitosterol	58.05±1.01	57.49±0.82	57.41±0.17
Δ^5-Avenasterol	7.27±0.74	8.80±0.23	7.34±0.58
Δ7-Stigmasterol	1.24±0.10	1.14±0.26	0.89±0.09
Δ7-Avenasterol	1.62±0.31	1.28±0.25	1.58±0.34

Tablo 7: Ekstraksiyon yöntemlerine göre çörekotu tohumu yağının Sterol (%) profili (28)

Bütün yağ örneklerinde bulunan en önemli sterol β-sitosteroldür. (% 58.05, % 58.49 ve % 57.41). Diğer sterollerden stigmasterol ve kampesterol dağılımları sırasıyla % 17.48 - %17.49 ve 18.70 dir. Bunların yanında bütün örneklerde Δ^5-Avenasterol, Δ^7-Stigmasterol ve Δ^7-Avenasterol içerikleri de bulunmaktadır(28).

1.4 SÜSPANSİYONLAR

Süspansiyonlar, çözünmeyen katı partiküllerin bir sıvı ortam içerisinde dağılmış halde bulunduğu iki fazlı heterojen kaba dispersiyonlardır. Dış faz (devamlı faz, sürekli faz, dispers faz) sıvı veya bir yarı-katı halde, iç faz (dağılan faz) ise dış fazda çözünmeyen katı partikül halde bulunur(32,33).

Dispers fazı meydana getiren katı partiküllerin çapı 0,1 µm'den daha büyüktür.

Dispersiyon ortamını oluşturan sıvı faz, su ya da yağ olabilir. Bu durumdaki süspansiyonlara, sulu ya da yağlı süspansiyon denir. Bazen ise dispers faz toz halinde bulunur, kullanılacağı zaman sulandırılır. Daha çok stabil olamayan maddelerin süspansiyonları bu şekilde hazırlanır(33).

Süspansiyonlar günlük hayatta pek çok alanda karşımıza çıkmaktadır. Örneğin ilaç, kozmetik ve gıda sanayiinde pek çok ürün tablet, kapsül, losyon, oral yol ile dahilen veya haricen farmasötik ilaç şekillerinden biri kullanılabilir(32).

Süspansiyonların, farmasötik bir ilaç şekli olarak hazırlanmasının diğer ilaç şekillerine göre üstünlükleri vardır(32,33):

- Hiçbir çözücüde çözünmeyen maddeler, süspansiyon şeklinde hazırlanıp uygulanabilir.
- Sıvı oluşları nedeniyle dozaj tekdüzeliği (homojenliği) sağlanabilir.
- Çözelti içinde kimyasal olarak dayanıksız olan bazı etkin maddelerin süspansiyonu hazırlanarak kimyasal stabiliteleri artırılabilir.(Örneğin; bazı antibiyotik içeren yapımlarda, kullanılacakları zaman sulandırılmak üzere kuru toz halinde hazırlanırlar ve böylece kimyasal yönden stabil olarak uzun süre bekletilebilirler.)
- İlacın kendisi ya da türevi kullanılabilir ve eklenen yardımcı maddeler ile kötü tat ve kokular maskelenebilir. (Örneğin; kloramfenikolün ester şekli olan kloramfenikol palmitat suda çözünmez. Bu madde kullanılarak kötü tadı düzeltilmiş süspansiyon şeklinde ilaç şekli hazırlanabilir.)
- Bebeklerde, çocuklarda veya yutma güçlüğü çeken hastalarda sıvı ilaç şekillerinin kullanımı, yutma kolaylığı açısından, katı ilaç şekillerine göre tercih edilir.

- Dağıtılmış (disperse edilmiş) etkin maddenin yüzey alanının artmasına bağlı olarak, kapsül, tablet gibi diğer katı ilaç şekillerine göre mideden emilimi daha hızlıdır ve daha fazladır.
- Çözünmeyen maddeler süspansiyon şeklinde formüle edilerek parenteral yolla (i.m, subkutan yol ile ancak i.v. ve intratekal olarak kesinlikle verilmemelidir) uygulanabilir.

Her formülasyonun avantajı olduğu gibi dezavantajları da vardır (32):

- Doz homojenliği ve doğruluğu katı ilaç şekillerine göre daha azdır.
- Partiküllerin çökmesi ve topaklanması problem yaratır.
- Etkili, görünüş ve tat olarak uygun bir süspansiyon formülasyonunun hazırlanması katı ilaç şekillerine göre daha güçtür.

Hemen hemen bütün süspansiyon sistemleri, bekleme aşamalarında fazlarına ayrılır. Bu nedenle, süspansiyonlar hazırlanırken, fazların ayrılmasını önlemeye çalışılmamalıdır. Bunun yerine çökme hızını düşürmeyi ve çöken partiküllerin kolayca tekrar süspande hale gelmesi sağlanmalıdır (33).

1.4.1 Süspansiyonların Sınıflandırılmaları

Farmasötik süspansiyonlar, kullanım alanlarına göre başlıca 5 grupta incelenebilirler: (32,33)

1. Oral süspansiyonlar
2. Topikal süspansiyonlar
3. Parenteral süspansiyonlar
4. Oftalmik süspansiyonlar
5. Aerosol süspansiyonlar

1.4.1.1. Oral Süspansiyonlar

Bu süspansiyon şekli, oral yolla kullanılan tablet, kapsül, draje gibi diğer katı ilaç şekillerine kıyasla daha çok tercih edilir. Özellikle, katı ilaç şeklini alabilme güçlüğü bulunan çocuk ve yaşlılarda süspansiyonun alım kolaylığı bir avantajdır. Ayrıca biyoyararlanımları, katı ilaç şekillerinin biyoyararlanımından daha fazladır.

Oral süspansiyon formülasyonu yardımcı madde olarak, koruyucu, boya, koku ve tad verici içerir. Ambalaj da bu gruba (adjuvant) girer.

Taşıyıcı olarak sorbitol, (susuz) dekstroz ya da içinde süspande edici ajan bulunan su kullanılabilir.

Dispers sistemlerde süspande edici ajan olarak, sentetik polimerik polielektrolitler, doğal zamklar (xanthan gum, arap zamkı, kitre zamkı) ya da killer (bentonit, Veegum, aktif attapulgit, kolloidal silika) kullanılabilir(33).

1.4.1.2. Topikal Süspansiyonlar:

Bu tip süspansiyonlar dermatolojik, kozmetik veya koruyucu amaçlarla kullanılırlar(32,33). Deri ve mukoz membran üzerine sürülebilme özelliği formülasyonu kullanışlı hale getirir.

Katı madde oranı % 20'den fazladır. Katı maddenin partikül büyüklüğü, preparat deriye sürüldüğünde, pürtüklü hissi vermeyecek kadar küçük olmalıdır(33).

Kozmetik amaçlı süspansiyonlara örnek olarak güneş preparatları (sinamik asit ve benzoik asit türevleri), bazı antiperspiran ürünler (alüminyum tuzları), bazı

şampuanlar, losyonlar, diş macunları ve renkli makyaj ürünleri örnek olarak verilebilir(32)

1.4.1.3. Parenteral Süspansiyonlar

Genel olarak % 0.5-5 oranında katı partikül içerirler(32). Parenteral süspansiyonlarda, partikül büyüklüğü ve viskozite büyük önem taşır. Bu iki faktör, parenteral süspansiyonların biyoyararlanımını ve enjeksiyon kolaylığını etkiler(33).

Bir parenteral süspansiyon, enjektör iğnesini tıkamamalı ve süspansiyonun akışı kolay olmalıdır(33).

Parenteral süspansiyonlarda kullanılan yardımcı maddeler güvenli olmalı, toksik olmamalı, pirojenik, antijenik, iritan ve hemolitik etki göstermemelidir. Ayrıca düşük derişimlerde bile etkili olmalıdırlar.

İM (kas içi), subkütan (derialtı), intralezyonal (lezyon içi) ve intraartiküler (kıkırdak içi) olarak uygulanabilirler. Partikül büyüklüğü çok küçültülse bile, süspansiyon şeklindeki preparatlar kesinlikle IV (damar içi) veya intratekal (omurilik içi) olarak uygulanamaz(32).

1.4.1.4. Oftalmik Süspansiyonlar

Antienflamatuvar amaçlı ve glakomda kullanılan süspansiyon tipleridir.

Oftalmik süspansiyonlarda en önemli özellik sterilitedir. Ayrıca süspansiyonun partikül büyüklüğü ve dağılımı, partiküllerin çözünme hızı ve kullanılan yardımcı maddeler önem taşır. Çok dozlu olarak hazırlanırlar ve mutlaka antimikrobiyal bir ajan ilavesiyle mikrobiyolojik üreme önlenmiş olmalıdır(32).

1.4.1.5. Aerosol Süspansiyonlar

Aerosol süspansiyonlar çabuk etki göstermektedir ve ilk geçiş etkisinin aştığı düşünülmesi sebebiyle tedavide avantajlıdır. Bu tip süspansiyonlar etkin madde partiküllerinin sıvılaştırılmış itici gaz içinde süspande hale getirilmesi ile hazırlanırlar. Aerosol süspansiyonlarına örnek olarak epinefrin bitartarat, steroidler ve bronkodilatörler (salbutamol, fenilefrin, disodyum kromoglikat) verilebilir(32).

1.4.2 Süspansiyonlarda İstenen Özellikler

- Katı partiküller homojen şekilde dağılmalı ve hızlı çökmemelidir.
- Çöken partiküller katı bir kekleşme tabakası oluşturmamalıdır. Çökelti, şişe çalkalandığında yeniden homojen şekilde dağılabilecek hale gelmelidir.
- Süspansiyonun viskozitesi, dispers fazın yeniden dağılmasını, şişeden akmasını ve parenteral olarak kullanılabilecek olanlar için enjektör iğnesinden geçmesini engellemeyecek viskozitede olmalıdır. Haricen kullanılanlarda ise deriye uygulanabilir bir viskozitede olacak, fakat kolayca uzaklalaşmayacak viskozitede olmalıdır.
- Süspansiyonlar kolay bulunabilen maddelerle, bilinen araç ve yöntemlerle kolay ve ekonomik bir şekilde hazırlanabilmelidir. Dispers fazın özelliklerinin dikkatle seçimi, oluşturacağı süspansiyonun optimum fiziksel, kimyasal ve farmakolojik özelliklere sahip olması bakımından önemlidir. Güzel koku ve renkte olmalıdır.
- Partikül büyüklüğü dağılımı, spesifik yüzey alanı, kristal büyümesinin önlenmesi (inhibisyonu) ve polimorfik formlarda dönüşüm, özel önem taşır. Formülasyonun hazırlanmasından sonra bekleme sırasında bu özelliklerin olumsuz yönde etkilenmesi engellenmelidir.
- Herhangi bir mikrobiyolojik üreme olmamalıdır.
- Süspansiyon raf ömrü boyunca fiziksel ve kimyasal özelliklerini korumalıdır(32,33).

1.4.3 Süspansiyon Formülasyonlarının Bileşenleri

Etkin Madde: Süspansiyonlarda genel olarak katı maddelerin partikül büyüklüğü 1-50 µm arasında olmalıdır. Partikül büyüklüğünü küçültmek için öğütme, püskürterek kurutma, mikropulverizasyon ve sıvı-enerji değirmenleri ve kontrollü kristalizasyon yöntemlerinden biri kullanılabilir. Ayrıca formülasyon hazırlanırken etkin maddenin polimorfik özellikleri de önem taşımaktadır(32).

Taşıyıcı(Dispersiyon) Ortam: Süspansiyonlarda taşıyıcı ortam olarak genellikle su kullanılır. Kullanım amacına ve yerine göre ise alkoller, glikoller, polioller ve bitkisel yağlar kullanılabilir(32).

Islatma Ajanları: Formülasyonda Sıvı-katı arasındaki yüzey gerilimini düşüren ve değme açısını küçültmeyi sağlayan maddelerdir(33). Hidrofobik ilaçların taşıyıcı ortamında dağılmasını kolaylaştırmak için kullanılırlar. Örneğin; sodyum lauril sülfat, polisorbat 20,40,60,65,80, sorbitan monolaurat, oktoksinol-9, nonoksinol-10, Poloxamer 188, Poloxamer 235, sodyum karboksimetil selüloz (Na CMC), bentonit, aluminyum magnezyum silikattır(32).

Süspansiyon Ajanları: Viskoziteyi arttırıp çökmeyi yavaşlatmak amacıyla kullanılan maddelerdir. Bu maddelerin türüne göre oranları %0.1-10 arasında değişir. En önemli süspansiyon ajanlarından biri hidrokolloidlerdir. Avicel, aljinat, mikrokristalin selüloz da süspansiyon ajanlarındandır.

Süspansiyon ajanlarının özellikleri:

- Süspansiyonların raf ömrü boyunca taşıyıcıların kıvamlı olabilmesini ve defloküle durumundaki partiküllerin süspande olmasını sağlamalıdır.
- Floküle olmuş partikülleri tekrar süspande edebilecek viskozitede olmalı fakat süspansiyonun akışkanlığını ve çalkalanmasını engelemeyecek kadar düşük viskozitede olmalıdır(32).

Flokülasyon Ajanları: Partiküllerin topaklar halinde birbirlerine tutunmasını sağlayan maddelerdir. Kullanım oranları % 0.001-1 arasındadır.(18) Partiküllerin elektrik yüklerine bağlı olarak kullanılacak olan ajanın yükü ve özelliği değişir. Örneğin; sodyum klorür, potasyum klorür, steroid(33).

Tatlandırıcılar: Oral süspansiyonlarda etken madde veya yardımcı maddelerin kötü tadını maskelemek ve hasta tarafından kolay alınabilecek tada getirmek amacıyla kullanılan doğal veya yapay maddelerdir. Örneğin; sakkaroz, mannitol, dekstroz, aspartam (32,33).

Koku vericiler: Oral süspansiyonlarda, özellikle çocuk hastaların kullanımını kolaylaştırmak amacıyla ilave edilen doğal ve yapay maddelerdir. Çeşitli meyve ve nane kokusu kullanılabilir. Örneğin; çilek, portakal, sakız aromaları(32).

Renk vericiler: Süspansiyonun görünümünü daha ilgi çekici hale getirmek amacıyla kullanılan gıda ve ilaç boyalarıdır. Bu maddelerin diğer yardımcı

maddelerle geçimli olup olmadığına dikkat edilmelidir. Örneğin; FD+C Red No 40 ve FD+C Yellow No 6 (32,33).

Tampon ajanları: Süspansiyonların fiziksel ve kimyasal stabilitesi açısından optimum bir pH değerinde olmalıdır. Ancak formülasyona eklenen tamponun, formülasyonun yük dengesini ve stabilitesini etkileyerek deflokülasyona sebep olmamasına dikkat edilmelidir. Örneğin; sodyum sitrat, sitrik asit, fumarik asit(32,33).

Koruyucular: Formülasyonlardaki yardımcı maddelerin mikrobiyolojik üremeye elverişli ortam oluşturabilmesi sebebiyle kullanılması tavsiye edilen maddelerdir. Genel kullanım oranları % 0.1-5 arasındadır. Örneğin; butil parabenler, benzoatlar ve sorbatlar(32,33).

1.4.4 Süspansiyon Formülasyonlarının Hazırlanması

Süspansiyon formülasyonlarının hazırlanmasında genel olarak üç yaklaşım mevcuttur. Birinci yaklaşım, defloküle partikülleri yapılı taşıyıcılar içinde süspansiyon haline getirmektir. İkincisi ise, kek oluşumunun kontrollü flokülasyonla engellenmesidir. Bu iki yolun birlikte kullanılması ile, yani yapılı taşıyıcılar içinde floküle partiküllerin süspande edilmesi ile optimum fiziksel stabilite sağlanabilir. Formülasyon aşamaları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Etkin madde partiküllerinin ıslatıcı ajan içeren dispersiyon ortamında dağıtılması
- Kontrollü flokülasyonun sağlanması için flokülasyon ajanlarının ilavesi
- Floküle partiküllerin süspande olabilmesi için süspansiyon ajanlarının ilavesi
- Dağılmayı kolaylaştırmak ve süspansiyon ajanları/koruyucu kolloidlerin hidrasyonunu sağlamak amacıyla yeterince su ilavesi
- Formülasyonda yer alan diğer yardımcı maddelerin (tatlandırıcı, koruyucu, vb) suda çözülerek süspansiyona ilave edilmesi
- Uygun bir yöntemle süspansiyonun homojen olması için karıştırılması ve kolloit değirmenlerden geçirilmesi
- Süspansiyonun havasının alınması(32).

1.3.4.3 Partikül Büyüklüğü

Süspansiyonların hazırlanmasında dikkat edilmesi gereken en önemli etkenler, ortalama partikül büyüklüğü ve dağılımıdır. Bu da formülasyonun flokülasyonunda ve stabilitesinde büyük rol oynar(32,33). Kaba süspansiyonlarda partikül büyüklüğü 0.1 µm'den büyüktür(32).

Ortalama partikül büyüklüğü ve dağılımının ölçülmesi için çeşitli ölçme yöntemleri vardır:

- Mikroskop
- Elek
- Çökme-sedimantasyon
- X-ışını saçılımı
- Lazer ışık saçılımı
- Coulter Counter
- Electrozone Counter

Partikül büyüklüğü süspansiyonun görünüşünü, çökme hızını, in vivo emilimini, yeniden süspansiyon haline gelebilme özelliğini ve süspansiyonun tüm fiziksel stabilitesini etkiler(32).

Süspansiyonlarda çökme hızını etkileyen faktörler(32) ;

- Ortalama partikül çapı
- Partiküllerin dansitesi
- Dispersiyon ortamının dansitesi
- Dispersiyon ortamının viskozitesi

1.4.4.2 Süspande Partiküllerin Yüzeylerarası Özellikleri

Bir formülasyon hazırlanırken, formülasyonlardaki katı partiküllerin küçük olması ve taşıyıcı ortamda asılı halde kalması amaçlanır. Partikül büyüklüğünün küçültülmesi, serbest yüzey enerjisini ve partiküllerin yüzey alanını arttırır. Dolayısıyla partiküllerin topaklanıp kümeleşme eğilimi artar. Çünkü partiküller serbest yüzey enerjisini azaltıp termodinamik açıdan stabil hale gelmek isterler. Böyle bir durumda partiküller flokül halinde askıda kalırlar veya birlerine sıkıca

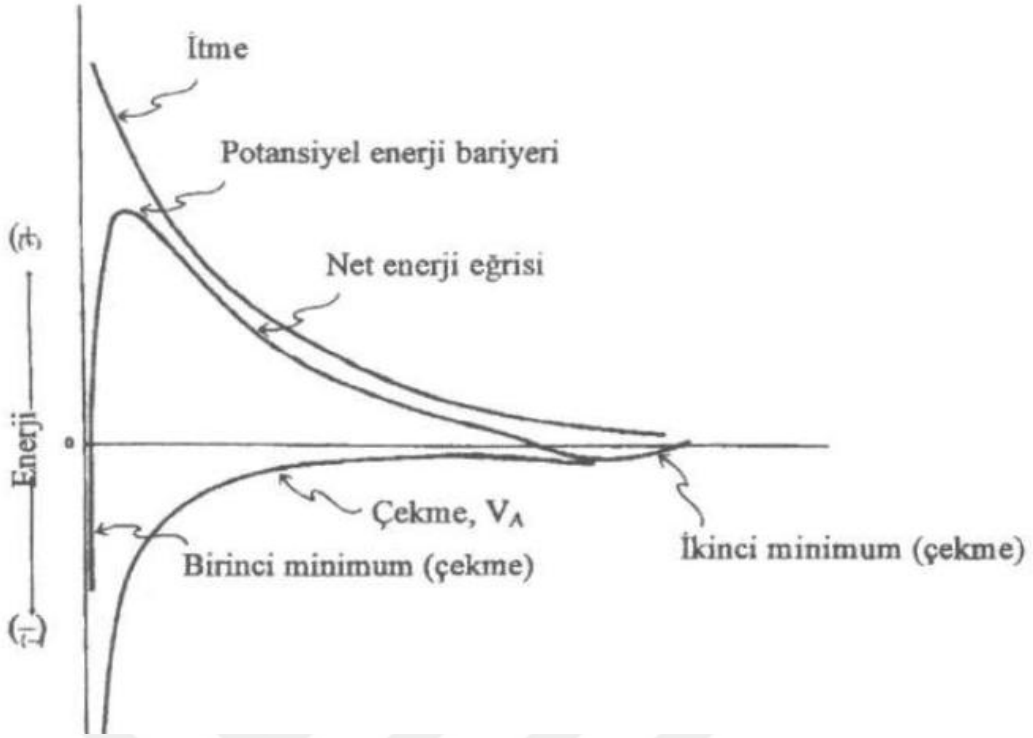
bağlanıp kekimsi, agregat bir yapı oluştururlar. Partiküller ister agregat halinde olsunlar isterse flokül halinde kalsınlar, bu durum sistemin termodinamik açıdan daha dayanıklı bir yapıda olduğunun göstergesidir.

Sistem stabil bir duruma geçmek için serbest yüzey enerjisini düşürme eğilimindedir. Bu denge hali için yüzeylerarası gerilim düşürülür veya yüzeylerarası alan küçültülür. Yüzeylerarası alanın küçültülmesiyle de flokülasyon veya agregasyon oluşabilir. Süspansiyonlarda flokülasyon kabul edilebilir fakat agregasyon istenmeyen bir durumdur.

Yüzeylerarası gerilimin düşürülmesi için yüzey etkin maddeler ilave edilebilir, ancak çoğu zaman bu gerilim sıfıra eşit olmaz(32,33) .

Süspansiyonlardaki flokülasyon ve agregasyon derecesini etkileyen diğer bir unsur partiküllerin yüzey yükleridir. Partiküller arası çekim kuvveti London-van der Waals tipi zayıf kuvvetlerdir. Partiküllerin etrafındaki elektriksel çifte tabakaların etkileşimiyle de itme kuvvetleri oluşur. Partiküllerin elektriksel yükleri, elektriksel çifte tabakalarının oluşumu ve zeta potansiyelleri her süspansiyon için ayrıdır(32,33).

Süspansiyonlardaki partiküller arası etkileşmeler partiküller arasındaki uzaklığa göre değişir. Bu uzaklıklara göre elektrostatik itme kuvvetleri ile zayıf çekme kuvvetleri oluşur. İki partikül arasındaki toplam enerji, itme ve çekme kuvvetlerinin toplamına eşittir(32).



Şekil17: Süspansiyon içindeki partiküllerin partikülarası uzaklıklarına (angstrom olarak)karşı potansiyel enerjisi (33)

Partiküller arası uzaklık çok yakın veya çok uzak ise çekme enerjisi, orta uzaklıkta ise itme enerjisi oluşur.

Partiküller birbirine çok yakınsa; çekme enerjisi çok yüksek negatif bir değere ulaşır. Bu geri döndürülemez bir enerjdir ve partiküller birbirlerine sımsıkı tutunarak çökerler.

Partiküller arası orta uzaklıkta ise; itme enerjisi artar ve bir noktada en yüksek değere ulaşır. İtme enerjisi yüksek olursa potansiyel enerji engeli de artar ve dolayısıyla partiküllerin çarpışmasını engelleyecek bir enerji oluşur. Bu durumda sistem defloküle halde kalır. Çökme tamamlandığında küçük partiküller büyük partiküllerin arasını dolmuş olur ve birbirlerine sıkıca bağlanmış halde kalırlar. Bu

yapı çalkalama ile yeniden eski haline gelmez. Partikülleri yeniden süspande edebilmek için yüksek enerji engelini ortadan kaldırmak gerekir.

Partiküller birbirine çok uzaksa; potansiyel enerji önce sıfıra yaklaşır ve daha sonra ikinci minimum değere ulaşır. Partiküller arası uzaklık 1000-2000 Å'dur. Bu uzaklık gevşek bir şekilde bağlanmış flokların oluşması için uygundur. Dolayısıyla sistem çalkalandığında yeniden dağılabilirler. Enerji engeli aşıldığı için de daha dayanıklı süspansiyonlar hazırlanmış olur(32).

1.4.4.3 Kontrollü Flokülasyon, Flokülasyon-Deflokasyon-Agregasyon-Kekleşme

Partiküller arası elektriksel itmeyi dolayısıyla zeta potansiyeli düşüren flokülasyon maddeleri eklenerek partiküllerin zayıf bağlarla flok adı verilen kümeler oluşturması sağlanmaktadır. Zayıf bağlar söz konusu olduğundan hafif bir çalkalama ile formülasyon tamamen yeniden dağılabilmektedir ve floküle süspansiyon istenilen bir preparat şeklidir(32,33).

Defloküle süspansiyonlarda ise partiküllerin birbirini kuvvetle itmesi sonucu önce büyük partiküller çökmekte daha sonra bunların arasına küçükler yerleşerek kek adı verilen sıkı yerleşmiş çökeltiler oluşmaktadır. Çökme hızının yavaş olduğu, çalkalama ile yeniden dağılamayan ve istenmeyen formülasyonlardır(32).

Kontrollü flokülasyonu sağlamak amacıyla elektrolitler, yüzey etkin maddeler veya polimerik maddeler kullanılmaktadır(32,33).

Flokülasyon: Bir süspansiyon içindeki partiküllerin zayıf van der Waals kuvvetiyle birbirlerine tutunarak hafif, yumuşak, kabarık küme oluşturmasıdır. Oluşan kümeye flokül denilir.

- Partiküller gevşek agregatlar oluştururlar.
- Çökme hızı yüksektir, partiküller flokül halinde çökerler.
- Partiküller sıkı bağlanmadığı için çökelek gevşektir. Çökelek halindeki partiküller çalkalandığında kolaylıkla yeniden dağılır ve süspansiyon eski haline döner.
- Çabuk çökmeye bağlı olarak üstte berrak sıvı bir tabaka oluşur(32).

Deflokülasyon:

- Partiküller ayrı ayrıdır.
- Çökme hızı yavaştır. Partiküller ayrı ayrı çöker.
- Partikül büyüklüğü en azdır.
- Çökelek yavaş oluşur.
- Çöken partiküller sıkı bağlarla bağlanmıştır. Oluşan çökelek kekleşmiştir ve çalkalandığında eski haline dönmesi zordur.
- Çökelek oluştuğunda üstte kalan kısım bulanıktır(32).

Agregasyon: Belirli koşullarda, ince tanecikli partiküllerin kuvvetli bağlarla tutunarak küme oluşturmasıdır. Bu kümelere agregat adı verilir.

Kekleşme: Sıkıca birbirlerine bağlanmış partiküllerden oluşan agregatın eriyerek birbirine yapışması ve büyümesidir. Bu olaya kekleşme adı verilir.

Formülasyondaki katı partiküller yeterince ıslanmışsa ve dağılmışsa kekleşmenin engellenmesi için flokülasyon ajanları kullanılabilir. Fakat kullanılan flokülasypon ajanının derişimi ve elektriksel yükü önemlidir. Çünkü bazı maddeler suda süspande edildiğinde büyük bir pozitif yük ve zeta potansiyel gösterir. Yakın partiküller birbirini iter ve partiküller defloküle olur(32,33).

1.4.4.4 Partiküllerin Islanması

Süspansiyonlarda formülasyon hazırlanırken karşılan en önemli problemlerden bir tanesi, bazı etken maddelerin hidrofobik olması sebebiyle taşıyıcı ortamla ıslanmamasıdır. Partiküllerin ıslanmama sebebi, hava tabakasının partiküllerin yüzeyine absorbe olmasıdır. Bu olay ıslanmayı zorlaştırır. Bu nedenle katı partiküller süspande hale getirilmek istendiğinde, ıslanmanın az olmasından dolayı taşıyıcı ortamın yüzeyinde toplanırlar(32).

Hidrofobik özellikte olan katı partiküllerin ıslanmasını iyileştirmek için ıslatma ajanları kullanılır. Kullanılan bu yüzey etkin maddeler, katı-sıvı arasındaki yüzey gerilimini düşürürler. Yüzey geriliminin düşmesi temas açısını azaltır ve katı partiküllerin yüzeyine adsorbe olan havanın taşıyıcı sıvı ile yer değiştirmesini sağlar. Böylelikle katı partiküllerin ıslanması kolaylaşır. Ayrıca ıslatma ajanlarının fazla miktarlarda kullanılması formülasyonda köpük oluşumuna ve kötü tada neden olabilir(32,33).

En iyi ıslatıcı ve dağıtıcı ajanlar, HLB değerleri 7-9 arasında olanlardır. Formülasyonu hazırlama aşamasında katı madde yüzey etkin maddelerle yavaş yavaş karıştırılır. Yüzey etkin maddeler genellikle % 0.05-0.5 derişimlerinde kullanılır. En çok kullanılan yüzey etkin maddeler noniyonik olanlardır. Anyonik surfaktanlardan ise en çok sodyum lauril sülfat kullanılır.

Hidrofobik sürfaktanların HLB değeri; 0-10

Hidrofilik sürfaktanların HLB değeri; 10-18 (33)

1.4.4.5 Viskozite

Viskozite süspansiyonlar için önemlidir. Çünkü formülasyonun viskozitesinin yüksek olması katı partiküllerin hızlı çökmesini engeller. Dolayısıyla süspansiyonun stabilitesi artar. Bunun yanında formülasyon içindeki katı madde miktarı arttıkça viskozite de artar.

Aynı zamanda viskozitenin çok yüksek olması süspansiyonun akış özelliklerini ve şişe çalkalandığında katı partiküllerin süspande olma durumunu olumsuz etkiler.

Bu özellikler göz önünde bulundurulduğunda viskoziteyi arttırmak için süspansiyon ajanları kullanılabilir. İyi bir süspansiyon ajanı, şişe çalkalandığında veya kullanım esnasında şişeden akarken düşük vizkoziteli olmalıdır. Psödoplastik ve ya tiksotropik özellik gösteren ajanlar bunun için daha uygundur(32).

1.4.5 Süspansiyonlarda Aranan Özellikler

Süspansiyonların stabilitesi son ambalajı içinde en az üç seri olacak şekilde test edilmelidir. Kimyasal ve fiziksel stabilite olarak ayrı ayrı incelenmelidir.

Kimyasal stabilitede, süspansiyon içindeki katı yardımcı maddelerle etken madde ayrı olarak incelenir. Yardımcı maddeler yüksek sıcaklıkta daha az bozunabilir fakat etken maddeler bu durumdan daha fazla etkilenir.

Eğer yardımcı maddeler de bozunmaya uğramışsa süspansiyonun viskozitesi değişir. Bu bozunmaya bağlı olarak pH değişiklikleri koruyucu maddelerin etkinliğini azaltır(32).

Fiziksel stabilitede ise pasif, aktif ve mikrobiyolojik olarak çeşitli testler uygulanır(32).

Pasif Analizler

- Görünüş
- Renk
- Koku
- Tat
- pH
- Özgül ağırlık (spesifik ağırlık)
- Çökme hızı
- Çökme hacmi
- Flokülasyon derecesi
- Zeta potansiyel ölçümleri
- Kap ve kapakla etkileşme
- Mikroskopik inceleme
- Kristal büyüklüğü
- Etkin madde partiküllerinin homojen dağılıp dağılmadığı

Aktif Analizler

- Tekrar disperse olabilme
- Santrifüjleme
- Reolojik özelliklerin incelenmesi
- Zorlanmış koşullarda yapılan testler (Stres testleri vibrasyonla taşınma koşullarının taklidi)
- Hızlandırılmış şok çevrimi-Dondurup çözme (-5°C +5°C arasında)

Miktobiyolojik Analizler

- Toplam bakteri sayımı
- Maya-küf sayımı
- *Escherichia Coli* sayımı

1.4.5.1 Çökme Hacmi (F)

Süspansiyonun son çökelti hacminin (V_u), başlangıç hacmine oranıdır(V_0).

$$F = \frac{Vu}{V0}$$

F <1 ise, son çökelti hacmi süspansiyonun başlangıç hacminden küçüktür; olağan durumdur.

F = 1 ise, çökelti hacmi ile başlangıç hacmi eşitse, flokülasyon dengesi vardır; ideal durumdur.

F >1 ise, son çökelek hacmi, başlangıçtan büyüktür. Çünkü flokülasyon örgüsü gevşek ve tüy gibidir. Hacim süspansiyonun başlangıç hacminden büyüktür(32,33).

1.4.5.2 Çökme Hızı

Çökme hızı ve çökme hızını etkileyen faktörler, "Stokes Yasası" eşitliği ile verilmiştir.

$$V = \frac{d^2 \ \mathrm{Ps} - \mathrm{Po} \ \mathrm{g}}{18\eta 0}$$

v : Partiküllerin çökme hızı (cm/s)

d: Partiküllerin çapı (cm)

P_s: Dispers fazın yoğunluğu

P_0: Dispersiyon ortamının yoğunluğu

g: yer çekimi ivmesi = 980.7 cm/s2

η_0: Dispersiyon ortamının viskozitesi (poise)

% 2 (g/mL)' den daha az katı madde içeren seyreltik farmasötik süspansiyonlar, kabaca bu koşullara uyar. Çökme sırasında, partiküller birbirleriyle etkileşmemelidir(32,33).

1.4.5.3 Zeta Potansiyel

Süspansiyonların değerlendirilmesinde dikkate alınan önemli bir ölçüttür. Parçacığın etrafındaki elektriksel çifte tabakanın sabit kısmı ile nötr bölge arasındaki potansiyel farkı olarak hesaplanmaktadır.

Ölçümler partiküllerin bir elektriksel alan içerisindeki elektroforetik hareketlerinden yararlanılarak zetametre adı verilen cihazlarla yapılmaktadır. Elektroforetik hareket ölçüldükten sonra ortamın viskozluğuve dielektrik sabiti biliniyorsa Helmholtz-Smoluchowski eşitliğinden yararlanılarak zeta potansiyel hesaplanmaktadır(32).

$$Z = \frac{4\pi\eta.(9.10^4)}{D} X \frac{V}{E}$$

Z= Zeta Potansiyel

V E = Elektroforetik hareketlilik

η= Viskozluk

D= Ortamın dielektrik sabiti

1.4.5.4 Yeniden Dağılabilirlik

Süspansiyon çökmeye bırakılır ve farklı testlerle yeniden tümüyle dağılması sağlanmaktadır. 360° döndürme veya 90° açı ile çalkalama hareketleriyle çökeltinin tamamen dağılması sağlanmaktadır. Burada süspansiyonun en kısa sürede yani en az çalkalama ile tamamen yeniden dağılması istenmektedir(32).

1.4.5.5 Reolojik Tayinler

Süspansiyonların reolojisi fiziksel dayanıklılık, şişeden boşaltma, deriye sürerek uygulama ve deride kalabilme gibi özelliklerin sağlanabilmesi açısından önemli bir parametredir. Reometrelerle veya farklı kayma hızlarında çalışan silindirik veya koni plak çok nokta vizkozimetreleriyle akış tipi saptanmaktadır. Çok düşük kayma hızlarında sistemin yapısındaki değişimleri ölçebilmeyi sağlayan ve Brookfield viskozimetreleriyle ortaya çıkan yapısal değişiklikler saptanabilmektedir(32,33).

1.4.5.6 Mikrobiyolojik Testler

Günlük alınan besinlerde olduğu gibi besin takviyelerinin kalitesinin belirlenmesi için mikrobiyolojik testlere ihtiyaç vardır. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan TEMPO® sisteminin toplam bakteri sayımı, maya-küf sayımı ve Escherichia coli sayımı yapılabilmesi için sırasıyla TEMPO® TVC (Total Viable Count-Toplam Bakteri), TEMPO® YM (Yeast & Mold-Maya & Küf) ve TEMPO® EC (Escherichia coli) test kitleri mevcuttur.

Yapılan her testin kitleri içerisinde o teste özel şişe besiyeri ve kart bulunmaktadır. Test edilecek besiyeri için inoküle edilen besiyeri homojen olarak üç farklı hacim içeren 48 kuyucuklu kartlara TEMPO® doldurucu tarafından aktarılır. Kart her set kuyucuk için hacim olarak 1 log farkında 16 kuyucuklu 3 set (düşük, orta ve yüksek) içerir. Kart daha sonra ileriki işlemlerde herhangi bir kontaminasyonu engellemek için hava geçirmez bir şekilde kesilip mühürlenir. İnkübasyon sırasında, karttaki mikroorganizmalar besiyerindeki substratı azaltır ve TEMPO® okuyucusunda tespit edilen florosan bir sinyal gözükmesine sebep olur.

1.4.5.6.1 Toplam Bakteri Bakteri Sayımı

Yaygın olarak kullanılan TEMPO® TVC test kitleri bu teste özel şişe besiyeri ve besiyerleriyle eşleştirilmiş kartları içermektedir. Bu kit 40-48 saatte aerobik mezofilik floranın sayımı, ürünün sıhhi kalitesini belirlemek ve tazelik ya da bozunma seviyesini göstermek için kullanılır. Toplam flora sayımı, işlenmiş ürünler için nakliye, üretim ve depolanma hakkında fikir edinmek amacıyla yapılmaktadır.

1.4.5.6.2 Maya-Küf Sayımı

TEMPO® YM test kitleri bu teste özel şişede besiyeri ve besiyerleriyle eşleştirilmiş kartları içermektedir. 72-76 saatte sonuç veren TEMPO® YM testi gıda ürünlerinin kalitesini bozan küflerin ve mayaların sayımı için tasarlanmıştır.

1.4.5.6.3 Escherichia coli Sayımı

TEMPO® EC test kitleri bu teste özel şişede besiyeri ve besiyerleriyle eşleştirilmiş kartları içermektedir. 22-27 saatte sonuç veren TEMPO® EC testi insanda ve hayvanda kommensal konakçı olan ve çok üremesi halinde gıda zehirlenmesine yol açan E.coli'nin sayımı için tasarlanmıştır.

1.4.6 Süspansiyonların Ambalajlanması ve Saklanması

Süspansiyonyonlar geniş ağızlı şişelerde, sıvının çalkalanmasına ve dökülmesine imkan sağlayacak şekilde ambalajlanmalıdır.

Donmaya, aşırı sıcağa ve ışığa maruz kalmaması için sıkıca ambalajlanmış kaplarda saklanmalıdır.

Süspansiyonlar her kullanımdan önce çalkalanmaldır. Bu taşıyıcı sıvı içindeki katı partiküllerin dağılmasını sağlayacaktır. Böylece homojen ve uygun bir dozlamayla kullanılmış olur.

Ayrıca süspansiyonların etiketine mutlaka *"Kullanmadan önce çalkalayınız"* ibaresi yazılmalıdır.

1.4.7 Süspansiyonların Biyoyararlanımı

Süspansiyonlar biyoyararlanım açısından bakıldığında çözeltiler ile tabletler arasında yer alır. Genel bir bakış açısıyla, etken maddenin partikül büyüklüğü azaldığında biyoyararlanımı artmaktadır.

İlaç şekillerini karşılaştıracak olursak da emilme hızının en çoktan en aza doğru sıralanması; çözelti, süspansiyon, kapsül, tablet, kaplı tablet şeklindedir. Bu sıralama etken maddenin özelliğine bağlı olarak her zaman geçerli olmayabilir.

Yardımcı maddeler, kişinin açlık- tokluk durumu, oftalmik süspansiyonlarda viskozitenin yüksek olması gibi faktörler biyoyararlanımı değiştirebilir(32).

1.4.8 Türkiye İlaç Piyasasında Bulunan β-glukan Preparatları

Preperat Adı	Firma Adı	Formülasyon Şekli	İçerik	Beta Glukan Miktarı
Beta 1,3 glucans	Solgar	Tablet	β-1,3-glukan	200 mg
İmmorion	Nutri-Force Nutrition	Tablet	vitamin A-C-E, kalsiyum, fosfor, çinko,maitake-shitake mantarı, beta glukan(%70), koenzim Q-10, pycnogenol sahil çamı ekstraktı, Citrus turunç bioflavonoid kompleksi	80 mg
İmmüzinc	Berko	Tablet	Beta glukan,ekinezya, elementel çinko, vitamin C	12 mg
Nutriglucan	Nutriummun	Tablet	β-D glukan fraksiyonu, çinko, Vitamin C- B6	380 mg
Sunlife İmmuvit	Sunlife Produktions	Efervesan Tablet	Beta glukan,ekinezya, vitamin C, çinko	50 mg
Youplus immuwel	Sunlife	Tablet	β-1,3-1,6-D-glukan(%80), askorbik asit(vitaminC), çinko glukonat	20mg
Ecoglucan	Orient Pharma NHA	Tablet	β-1,3-1,6-glukan, ekinezya, Cvitamini, çinko	-

Tablo 8: Türkiye piyasasında bulunan β- glukan tablet preperatları

Preperat Adı	Firma Adı	Formülasyon Şekli	İçerik	Beta Glukan Miktarı
Ps Complex	Balance Healthcare	Kapsül	Reishi-maitake-shiitake ve coriolus mantar ekstraktları, β-1,3-1,6-glukan	25 mg
İmutor	Arnet Pharmaceutical	Kapsül	β-1,3-1,6-glukan (mikronize)	100 mg
İmmuneks	Mustafa Nevzat	Kapsül	Beta glukan	10-50 mg
Beta glukan Kompleks	Solgar	Kapsül	C vitamini, β-1,3-glukan, meyve karışımı, çinko, selenyum, bakır, D3 vitamini	125 mg
Betazinc	Deva	Kapsül	Beta glukan, ekinezya, mürver, C vitamini, propolis, çinko	12 mg
İmmiflex	Hedenkamp-Medfors İlaç	Kapsül	β-1,3-1,6-glukan, inülin, pirinç kepeği ekstraktı, D3 vitamini	100-250 mg
İmmuzinc 20	Berko	Kapsül	Beta glukan, C-E vitamini, çinko, selenyum	15mg
İmmuzinc 40	Berko	Kapsül	Beta glukan, C vitamini, çinko, mürver, ekinezya, propolis	12 mg
İmmuneksplus	Mustafa Nevzat	Kapsül	β-1,3-1,6-glukan, kuşburnu ekstresi tozu, acerola meyve tozu	20 mg
İmmuneksQ10	Mustafa Nevzat	Kapsül	β-1,3-1,6-glukan, koenzim Q 10	20 mg
İmunol	Orzaks	Kapsül	β-1,3-1,6-glukan, C vitamini	50 mg
Life time Q-beta glucan	Life time-B.E.K sağlık ürünleri	Kapsül	β-1,3-1,6-glukan, C vitamini, kalsiyum	10 mg
Vitaglukan	Okopharm GmbH-Allergo	Kapsül	β-1,3-1,6-glukan, C vitamini	50 mg

Tablo 9: Türkiye piyasasında bulunan β- glukan kapsül preperatları

Preperat Adı	Firma Adı	Formülasyon Şekli	İçerik	Beta Glukan Miktarı
Agavit Propolis	Aga Sağlık	Şurup	Beta glukan, ekinezya ekstresi, propolis, C vitamini, çinko	20mg
Betazinc	Deva	Şurup	Ekinezya, mürver, beta glukan, propolis, çinko	10 mg
Cormix	Aes Farma	Şurup	β-1,3-1,6-glukan, kuşburnu ve siyah üzüm çekirdeği ekstraktı, C-B1-B6 vitaminleri, çinko	10 mg
Ecoglucan	Orient Pharma NHA	Şurup	β-1,3-1,6-glukan, Ekinezya, C vitamini, çinko	50 mg
İmmun-up	Alfafarma	Şurup	β-1,3-1,6-glukan, C vitamini	10 mg
İmmusept	Medicure	Şurup	β-1,3-1,6-glukan, C vitamini, propolis, çinko sülfat	30 mg
İmmuzinc	Berko	Şurup	Beta glukan, C vitamini, ekinezya, çinko	10mg
İmmuneks	Mustafa Nevzat	Şurup	β-1,3-1,6-glukan, natürel C vitamini	10 mg
İmunol	Orzaks	Şurup	Beta glukan, ekinezya ve propolis ekstraktı, C vitamini, çinko	10 mg
Omnivit İmmunty	Sanofi Aventis	Şurup	Beta glukan, ekinezya, C vitamini, çinko	10 mg
Vitaglucan	Allegro	Şurup	β-1,3-1,6-glukan, C vitamini, çinko	50 mg

Tablo 10: Türkiye piyasasında bulunan β- glukan şurup preperatları

BÖLÜM II

2 GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan Gereçler

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kalite kontrol analizleri için kullanılan %90 saflıktaki β-1,3-1,6 glukan (alkali çözünürlükte) standardı Megazyme (Megazyme International Ireland Co.) firmasından alındı.

Süspansiyonun hazırlanması için kullanılan % 70 saflıktaki β-1,3-1,6 glukan ham maddesi Kuzey Kimya'dan temin edildi.

Süspansiyonun hazırlanması için kullanılan soğuk pres çörek otu yağı Zade Vital firmasından temin edildi.

Diğer kimyasallar ve tedarikçileri aşağıdaki tabloda verildi.

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Tedarik edilen firmalar
β-1,3-1,6 glukan (% 90 salıkta)	Megazyme
β-1,3-1,6 glukan (% 70 salıkta)	Kuzey Kimya
Çörek Otu Tohumu Yağı (soğuk pres)	Zade vital
Etanol (%95 saflıkta)	Sigma-Aldrich
Sodyum Hidroksit (%99 saflıkta)	Sigma-Aldrich
Hidroklorik Asit (%37 saflıkta)	Sigma-Aldrich
Toluen (%99 saflıkta)	Sigma-Aldrich
Dietil eter (%99 saflıkta)	Sigma-Aldrich
pH İndikatör Strip	Merck
TEMPO® TVC (Toplam Bakteri Sayımı) besiyeri	BioMérieux,
TEMPO® YM (Maya & Küf Sayımı) besiyeri	BioMérieux
TEMPO® EC (*Escherichia coli*) besiyeri	BioMérieux
Peptonlu su	BioMérieux

Tablo 11: Kullanılan kimyasallar ve tedarik edilen firmalar

2.1.2 Kullanılan Ekipman ve Cihazlar

β-1,3-1,6 glukan içeren formülasyonun hazırlanması, miktar tayininin belirlenmesi ve kalite kontrol çalışmalarının yapılması için kullanılan ekipman ve cihazlar ;

Kullanılan cihazlar	**Marka-Model**
Spektrofotometre (UV-vis)	Shimadzu-UV 1800
Santrifüj	Nüve-NF 800
Stabilite Kabini	Nüve ID 501
Zetametre	Zetasizer Nano ZSP
Partikül Boyutu Ölçüm Cihazı	Mastersizer 3000
Viskozimetre	Brookfield DV II pro
Vorteks	Heidolph-Multi Reax
Hassas terazi	Mettler Toledo
Otomatik Mikropipet	Brand
+4 ˚C buzdolabı	Uğur
Ultrasonik Su Banyosu	Bandelin-Sonorex
Tintometre	Lovibond PFX 880
TEMPO® TVC (Toplam Bakteri) kartları	BioMérieux
TEMPO® YM (Maya & Küf) kartları	BioMérieux
TEMPO® EC (*Escherichia coli*) kartları	BioMérieux
TEMPO® Torbaları	BioMérieux
TEMPO® Okuyucu	BioMérieux
TEMPO® Doldurucu	BioMérieux
Stomacher	İnterscience
İnkübatör	BioMérieux
Otomatik Pipet (1.0 mL'lik)	BioMérieux

Tablo 12: Formülasyonun hazırlanması ve miktar tayini belirlenmesi için gerekli ekipman ve cihazlar

2.2 Kullanılan Yöntemler

2.2.1 β-1,3-1,6-glukan'ın Spektrofotometrik Miktar Tayini Analiz Yöntemi

2.2.1.1 β-1,3-1,6- glukan Ana Stok Standardının Hazırlanması

Derişimi 10000 µg/mL olacak şekilde bir ana stok hazırlamak için aşağıdaki formülde gösterildiği gibi hesaplama yapılarak, 100 mg'a denk gelecek şekilde 111.1 mg %90 saflıktaki β-1,3-1,6 glukan standardı 10 mL'lik balonjojeye tartıldı.

Hesaplama: % 90 saflıktaki β-1,3-1,6 glukanın 100 mg'a eş değer tartım hesabı

Gereken miktar x Potens = 100 x $\frac{100}{90}$ = 111,1 mg β-1,3-1,6 glukan

Tartımın üzerine 0.2 mL EtOH eklendi. Üzerine 1.0 M NaOH'ten 1.0 mL eklendi. Standart madde çözelti içinde çözünene kadar elde çalkalandı. Daha sonra çözeltinin üzerine 7 mL tip 1 su eklendi. Yaklaşık 10-15 dk ultrasonik su banyosunda tutuldu ve homojen hale gelmesi sağlandı. Alkali pH'da olan çözeltinin pH'sı 7'ye ayarlandı. Jelleşme görülene kadar 1.0 M HCl'den yaklaşık 1.5 mL eklendi. Mikrobiyolojik aktiviteyi engellemek için ana stok çözelti içine 2-3 damla toluen eklendi. Çözelti tip 1 su ile 10 mL hacme tamamlandı (34). Elde edilen çözelti +4 ^{0}C 'de bir sonraki analize kadar saklandı.

1.0 Molar NaOH hazırlanması: % 99 saflıktaki NaOH 100 mL'lik balon jojeye 4.04 gr tartıldı. Üzerine tip 1 su eklenerek 100 mL hacme tamamlandı (NaOH M_a:40).

Hesaplama:

$M = \frac{n}{V}$ $1.0\ M = \frac{n}{\frac{0.1\ L}{(100\ mL)}}$ n = 0.1 mol NaOH

$n = \frac{m}{Ma}$ $0.1\ mol\ NaOH = \frac{m}{40\ g/mol}$ m = 4 g NaOH

%99 saflıktaki NaOH için ; $4\ g \times \frac{100}{99} = 4.04\ g\ NaOH$

1.0 Molar HCl hazırlanması: % 37 saflıktaki HCl 100'lik balon jojeye 8.28 mL alındı. Üzerine tip 1 su eklenerek 100 mL hacme tamamlandı. ($d_{(HCl)}$:1.19 g/mL)

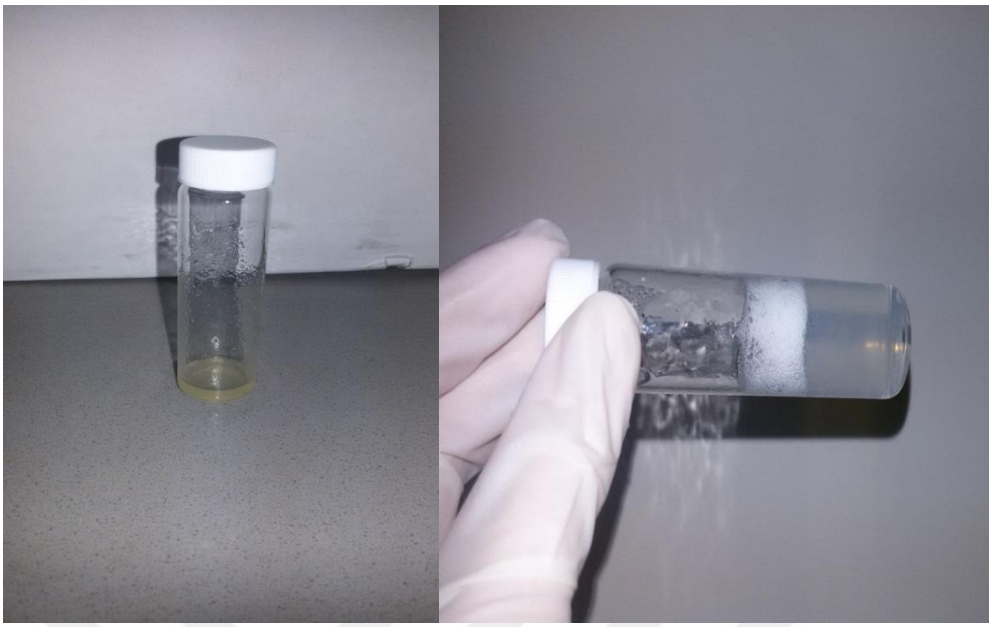
Hesaplama:

$M = \frac{n}{V}$ $1.0\ M = \frac{n}{\frac{0.1\ L}{(100\ mL)}}$ n = 0.1 mol HCl

$n = \frac{m}{Ma}$ $0.1\ mol\ HCl = \frac{m}{36.5\ g/mol}$ M = 3.65 g HCl

%37 saflıktaki HCl için; $3.65\ g \times \frac{100}{37} = 9.86\ g\ HCl$

$d = \frac{m}{V}$ $1.19\ g/mL = \frac{9.86\ g}{V}$ V = 8.28 mL HCl



(a) **(b)**

Şekil 18: β-glukan standardının hazırlanması **(a)** β-glukanın çözündürülmesi **(b)** β-glukanın jelleşmesi

2.2.1.2 Standart Kör Çözeltisi Hazırlanması

100 mL'lik balon jojeye 2 mL EtOH, 10 mL 1.0 M NaOH ve 70 mL tip 1 su eklendi. Çözeltinin pH'sı 7'ye gelene kadar 1.0 M HCl'den yaklaşık 15 mL eklendi. Son olarak 3-4 damla toluen konularak çözeltinin hacmi tip 1 su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2.2.1.3 β-glukanın Kalibrasyon Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Tablo 13'te gösterildiği gibi kalibrasyon eğrisini çizmek için standart çözeltileri 125 ile 2000 µg/mL arasında 5 farklı derişim olacak şekilde hazırlandı.

S1 derişimi için 10 mL'lik balon jojeye ana stok standardından 0.125 mL alındı, tip 1 su ile balon jojede 10 mL hacme tamamlandı.

S2 derişimi için 10 mL'lik balon jojeye ana stok standardından 0.250 mL alındı, tip 1 su ile balon jojede 10 mL hacme tamamlandı.

S3 derişimi için 10 mL'lik balon jojeye ana stok standardından 0.500 mL alındı, tip 1 su ile balon jojede 10 mL hacme tamamlandı.

S4 derişimi için 10 mL'lik balon jojeye ana stok standardından 1.0 mL alındı, tip 1 su ile balon jojede 10 mL hacme tamamlandı.

S5 derişimi için 10 mL'lik balon jojeye ana stok standardından 2.0 mL alındı, tip 1 su ile balon jojede 10 mL hacme tamamlandı.

	Seyreltme	**Teorik Derişim (µg/mL)**
S1	0.125 mL Ana Stok Standart → Tip 1 su ile 10 mL'lik balon jojede hacmine tamamlanır.	125
S2	0.250 mL Ana Stok Standart → Tip 1 su ile 10 mL'lik balon jojede hacmine tamamlanır.	250
S3	0.500 mL Ana Stok Standart → Tip 1 su ile 10 mL'lik balon jojede hacmine tamamlanır.	500
S4	1.0 mL Ana Stok Standart → Tip 1 su ile 10 mL'lik balon jojede hacmine tamamlanır.	1000
S5	2.0 mL Ana Stok Standart → Tip 1 su ile 10 mL'lik balon jojede hacmine tamamlanır.	2000

Tablo 13: β-1,3-1,6 glukanın kalibrasyon eğrisi için hazırlanan derişimler ve seyreltme faktörleri

2.2.1.4 β-glukanın Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi

Başlık 2.2.1.3'te anlatıldığı şekilde hazırlanan S1, S2, S3, S4, S5 standart çözeltilerinin spektrofotometrede 510 nm'de absorbansları okutuldu. Okutulan absorbans değerleri y eksenine, derişimleri x eksenine gelecek şekilde regresyon analizi uygulandı ve y = mx+b doğru denklemi oluşturuldu.

Ortalama Absorbans (mAU*s) 'a karşı çizilen Teorik Derişim (µg/mL) grafiğinden elde edilen temsili denklem;

y = m x + b

y : Ortalama Alan (mAU*s)

m : Eğim

x : Teorik Derişim (mg/ml)

b : Kayım

2.2.2 Hazırlanan Formülasyon için Miktar Tayini Analiz Yöntemi

Başlık 2.2.4'te anlatıldığı şekilde hazırlanan ve homojen hale getirilen süspansiyondan 1.0 g tartılıp, 4000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Üstte kalan yağ fazı atıldı. Daha sonra β-glukan partikülleri arasında kalan yağı almak için 1 mL dietil eter eklendi. Vortekste 5 dakika çalkalandı. Çalkalanan karışım 4000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Çöken numune üzerindeki eter fazı atıldı. Yağdan arındırılan numune, başlık 2.2.1.1'de anlatılan β-glukan standart hazırlama prosedürüne göre hazırlanıp UV-spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda absorbansı okutuldu.

β-1,3-1,6 glukan için çizilen kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denklemine göre matriks ortamındaki β-1,3-1,6 glukan için hesaplama yapıldı.

$$X = \frac{y-b}{m}$$

Denklem 1: β-1,3-1,6 glukanın okunan absorbansa karşılık gelen derişimini hesaplamak için kullanılan eşitlik

Numuneden elde edilen Ortalama Alan (mAU*s) değeri, kalibrasyon denkleminde y parametresi yerine yazılarak, x (Teorik Derişim (µg/mL)) hesaplandı.

2.2.3 Analitik Metot Validasyonu

β-1,3-1,6 glukan analizinin güvenirliğinin ispatlanması amacıyla;

- ✓ Seçicilik,
- ✓ Doğrusallık,
- ✓ Kesinlik,
  - * Tekrar elde edilebilirlik
  - * Tekrarlanabilirlik
- ✓ Ekstraksiyon Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanım,

kriterleri aşağıdaki basamaklar ile incelenerek yapıldı.

2.2.3.1 Seçicilik

Başlık 2.2.1.2'de anlatıldığı gibi hazırlanan kör çözeltisi ve % 100 derişime denk gelen 500 µg/mL β-1,3-1,6 glukan içeren standart çözeltisi spektrofotometrede aynı şartlar altında ve aynı metot ile okutuldu, etken madde ile aynı absorbans değerinde girişim olup olmadığına bakıldı. Cihazdan alınan spektrumlar bulgular bölümü şekil 29 ve şekil 30'da verilmiştir.

2.2.3.2 Doğrusallık

Doğrusallık kriteri, başlık 2.2.1.3'te belirtildiği gibi 5 ayrı derişimde hazırlanan standart çözeltileri ile ölçüldü. β-1,3-1,6 glukan miktarının belirlenmesine yönelik olan metot için, β-1,3-1,6 glukan etkin maddesi 125 µg/mL – 2000 µg/mL derişim aralığında valide edildi. Her bir derişim basamağında elde edilen standart absorbans değeri üzerinden doğrusallık hesaplaması yapıldı. Elde edilen değerler bulgular bölümündeki tablo 16'da, doğrusallık grafiği ise bulgular bölümündeki şekil 31'de yer almaktadır.

2.2.3.3 Kesinlik

2.2.3.3.1 Tekrar elde edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik kriteri için miktar tayininde çalışılan % 100'lük derişime eşdeğer 500 µg/mL derişiminde 6 adet ve birbirinden bağımsız olarak numune çözeltileri hazırlandı ve spektrofotometrede bu çözeltilere karşılık gelen absorbanslar okundu. % geri kazanım ve geri kazanımların istatistiksel sapması bulgular bölümü tablo 17'de verilmiştir.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan derişim değeri}}{\text{Beklenen derişim değeri}} \text{ x } 100$$

Denklem 2: Geri kazanım hesaplamasında kullanılan eşitlik

2.2.3.3.2 Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik kriteri için ise aynı çalışma şartlarındaki tekrarlanan analizlerde elde edilen sonuçların birbiriyle uyumunu ve kullanılan cihazın tekrarlanabilirliğini test etmek amacıyla % 100'lük derişime denk gelen 500 µg/mL standart çözeltisi ardı ardına 5 kere spektrofotometrede okutuldu. Sonuçların istatistiksel değerlendirmesi yapıldı. Elde edilen sonuçlar bulgular bölümü tablo 18'de sunulmuştur.

2.2.3.4 Ekstraksiyon Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanım

Elde edilen deneysel değerlerin gerçek değere ne kadar yakın olduğunu tespit etmek amacıyla teorik madde miktarının % 80'i 400 µg/mL'ye, % 100'ü 500 µg/mL'ye, % 120'si 600 µg/mL'ye karşılık gelecek şekilde hazırlanan test çözeltileri analiz edildi.

Her bir derişim için 3 paralel numune çalışıldı. Elde edilen sonuçlardan ortalama geri kazanım hesaplandı. Elde edilen sonuçlar bulgular bölümü tablo 19'da yer almaktadır.

2.2.4 Formülasyonun Hazırlanması

β-glukan için yaptığımız literatür çalışmalarında 100 mg ve üzeri dozların tedavi edici, 100 mg altındaki dozların ise tedaviyi destekleyici olarak kullanıldığı tespit edilmiştir. Bu durum göz önüne alınarak kullanıma göre (5 mL/gün-10 mL/gün) destekleyici ya da tedavi edici doz seçilmesine olanak sağlamak için 50 mg/5 mL β-1,3-1,6-glukan içeren preperatlar hazırlandı. Bir tüp içerisine % 70 saflıktaki β-1,3-1,6- glukan 50 mg'a denk gelecek şekilde 71,42 mg tartıldı ve üzerine 5.0 g çörek otu yağı eklendi. Karıştırıcıda 30 dk karıştırılarak süspansiyon haline getirildi. Hazırlanan karışım 6 mL'lik oral flakonların içine doldurulduu.

Hesaplama: % 70'lik β-1,3-1,6-glukan 50 mg'a eş değer tartım hesabı

Tartılacak miktar = İstenen Doz x Potens

Tartılacak miktar = 50 mg x $\frac{100}{70}$ = 71.42 mg β-1,3-1,6-glukan

2.2.5 Formülasyonun Süspansiyon Testleri

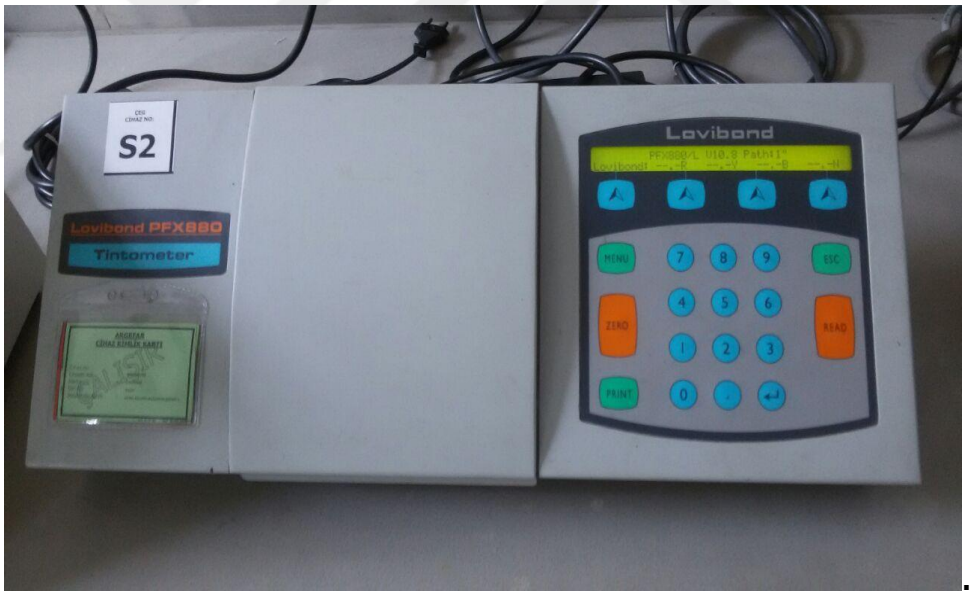
2.2.5.1 Fiziksel Testler

2.2.5.1.1 Görünüş

Hazırlanan formülasyonun 40°C ± 2°C ve 75% ± 5% nem oranında 6 aylık stabilitesi sonucu görünüşünün değişimi izlendi.

2.2.5.1.2 Renk

Hazırlanan formülasyonun 40°C ± 2°C ve 75% ± 5% nem oranında 6 aylık stabilitesi sonucu renk değişimi Lovibond Tintometresi ile Kırmızı, Mavi, Sarı ve Nötr dalga boylarında test edildi. Elde edilen sonuçlar bulgular bölümü tablo 20'de gösterilmiştir.



Şekil 19: Renk analizinin yapıldığı Lovibond Tintometre cihazı

2.2.5.1.3 Koku

Hazırlanan formülasyonun 40°C ± 2°C ve 75% ± 5% nem oranında 6 aylık stabilitesi sonucu koku değişimi izlendi.

2.2.5.1.4 Tat

Hazırlanan formülasyonun 40°C ± 2°C ve 75% ± 5% nem oranında 6 aylık stabilitesi sonucu tad değişimi izlendi.

2.2.5.1.4 Partikül Büyüklüğü

Partikül boyutu ölçümü için Malvern Mastersizer 3000 kullanıldı. Cihazın sıvı haznesine, hazırlanmış olan formülasyondan yaklaşık 5 g konularak 'Laser Obscuration' değeri % 50'den yüksek olduğu noktada okutma işlemi yapıldı. Elde edilen analiz sonuçları bulgular bölümü tablo 21'de, cihazdan alınan spektrum ise bulgular bölümü şekil 32'de verildi.

Şekil 20: Partikül boyutu ölçüm cihazı (Mastersizer 3000)

2.2.5.1.5 Çökme Hacmi

Hazırlanmış olan formülasyonlar 50 mL'lik ölçekli bir tüpe alındı. Çalkalandıktan sonra homojen olan formülasyonun hacmi ölçüldü (V_0). Daha sonra formülasyonun çökmesi izlendi ve çöken kısmın hacmi ölçüldü (V_u). Çökme hacmini hesaplamak içinse son çökelti hacmi (V_u) başlangıç hacmine (V_0) aşağıda belirtilen formüldeki gibi oranlandı. Elde edilen sonuçlar bulgular bölümü tablo 22'de verildi.

$$F = \frac{Vu}{Vo}$$

Denklem 3:Süspansiyona ilişkin çökme hacmini veren eşitlik

Şekil 21: Çökme hacminin hesaplanması için falcon tüp içinde hazırlanan formülasyon

2.2.5.1.6 Çökme Hızı

Stokes eşitliğinde yer alan bütün parametreler için analizler ve hesaplamalar yapıldı. Bulunan parametre sonuçları eşitlikte yerine konuldu ve çökme hızı hesaplandı.

$$V = \frac{d^2\ Ps - Po\ g}{18\eta 0}$$

v : Partiküllerin çökme hızı (cm/s)

d: Partiküllerin çapı (cm)

P_s: Dispers fazın yoğunluğu

P_0: Dispersiyon ortamının yoğunluğu

g: yer çekimi ivmesi = 980.7 cm/s2

η_0: Dispersiyon ortamının viskozitesi (poise)

Denklem 4:Süspansiyona ilişkin çökme hızını veren eşitlik

2.2.5.1.7 Zeta Potansiyel

Hazırlanmış olan formülasyon enjektör yardımıyla zeta potansiyel cihaz tüplerine yaklaşık 2 mL konuldu ve cihaza yerleştirildi. Hesaplamalar için gerekli olan parametreler girildikten sonra ardarda 10 tekrarla okutuldu ve sonuçlar tespit edildi. Elde edilen sonuçlar bulgular bölümü tablo 23'de, cihazdan alınan spektrum ise bulgular bölümü şekil 33'de yer almaktadır.

Şekil 22: Zetametre (Zetasizer Nano ZSP)

2.2.5.1.8 Viskozite

200 mL'lik beher içerisine hazırlanmış olan formülasyonlardan konuldu. Farklı uzunluklardaki uçlar kullanılarak torku yüksek olan uygun viskozite değeri tespit edildi. Elde edilen sonuçlar bulgular bölümü tablo 24'de yer almaktadır.

Şekil 23: Brookfield viskozimetre ve formülasyonun viskozite ölçümü

2.2.5.2 Kimyasal Stabilite Testi

Hazırlanan formülasyonlar, 40°C ± 2°C ve 75% ± 5% nem oranına ayarlanmış inkübatörde 6 aylık kısa süreli kimyasal stabilite testine tabi tutuldu (35). Söz konusu etkin maddelerin hazırlanan bu sıvı dozaj formu içersindeki miktarlarının değişimine yönelik elde edilen sonuçlar bulgular bölümü tablo 25'de ve 0., 3., 6. aylarda cihazdan alınan spektrumlar bulgular bölümü şekil 34, 35 ve 36'da verilmiştir.

Şekil 24: Kimyasal stabilite için iklim kabinine konulan örnekler

2.2.5.3 Mikrobiyolojik Testler

Hazırlanan formülasyonun, toplam bakteri sayımı, maya-küf sayımı, ve *Escherichia coli* sayımı analizleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar tablo 26'de yer almaktadır.

2.2.5.3.1 TEMPO® TVC Testi ile Toplam Bakteri Sayımı

TEMPO® torbasına tartılan 10 g formülasyon üzerine 90 mL peptonlu su eklendi ve stomacher cihazında homojenize edildi. İlk dilüsyonun homojenizasyonu ile örneğin TEMPO® kartlarına transferi arasındaki süre 45 dakikayı geçmemesi sağlandı.

Oda sıcaklığındaki TEMPO® TVC besiyeri şişelerine 3.9 mL saf steril su ilave edildikten sonra steril bir pipet ile TEMPO® torbasının filtreli kısmından 0.1 mL numune alındı ve sulandırılmış besiyerine eklendi. Ardından besiyeri vorteks tipi karıştırıcı ile homojenize edildi. TEMPO® TVC kartları barkod okuyucu yardımıyla sisteme okutulduktan sonra kartın transfer tüpü şişenin içine girecek şekilde tablaya oturtuldu. Tabla TEMPO® doldurucusuna yerleştirildi ve doldurma başlatıldı. Doldurma işlemi sona erdikten sonra cihaz, transfer tüplerini kesti ve mühürledi.

Doldurma tablası TEMPO® doldurucusundan alındı ve inkübasyon tablasına yerleştirildi. Kartların üzerindeki etiketler kullanıcıya bakacak şekilde 40-48 saat 30 ^{0}C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında okunacak olan kartlar okuyucuya yerleştirildi. Okuyucu her kartın barkodunu tarar ve kuyulardaki florosan ışımayı yorumlar. Otomatik olarak numunenin adı ile test tipini, dilüsyonu ve sonuç sayısını eşleştirir(36).

2.2.5.3.2 TEMPO® YM Testi ile Maya-Küf Sayımı

TEMPO® torbasına tartılan 10 g formülasyon üzerine 90 mL peptonlu su eklendi ve stomacher cihazında homojenize edildi. İlk dilüsyonun homejenizasyonu ile bunun TEMPO® kartlarına transferi arasındaki süre 45 dakikayı geçmemelidir.

Oda sıcaklığındaki TEMPO® YM besiyeri şişelerine 3.0 mL saf steril su ilave edildikten sonra steril bir pipet ile TEMPO® torbasının filtreli kısmından 1.0 mL numune alındı ve sulandırılmış besiyerine eklendi. Ve ardından vorteks tipi karıştırıcı ile homojenize edildi. TEMPO® YM kartları barkod okuyucu yardımıyla sisteme

okutulduktan sonra kartın transfer tüpü şişenin içine girecek şekilde tablaya oturtuldu. Tabla TEMPO® doldurucusuna yerleştirildi ve doldurma başlatıldı. Doldurma işlemi sona erdikten sonra cihaz transfer tüplerini kesti ve mühürledi.

Doldurma tablası TEMPO® doldurucusundan alındı ve inkübasyon tablasına yerleştirildi. Kartların üzerindeki etiketler kullanıcıya bakacak şekilde 72-76 saat 25 ^{0}C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında okunacak olan kartlar okuyucuya yerleştirildi. Okuyucu her kartın barkodunu tarar ve kuyulardaki florosan ışımayı yorumlar. Otomatik olarak numunenin adı ile test tipini, dilüsyonu ve sonuç sayısını eşleştirir(37).

2.2.5.3.1 TEMPO® EC Testi ile Escherichia coli Sayımı

TEMPO® torbasına tartılan 10 g formülasyon üzerine 90 mL peptonlu su eklendi ve stomacher cihazında homojenize edildi. İlk dilüsyonun homejenizasyonu ile bunun TEMPO® kartlarına transferi arasındaki süre 45 dakikayı geçmemelidir.

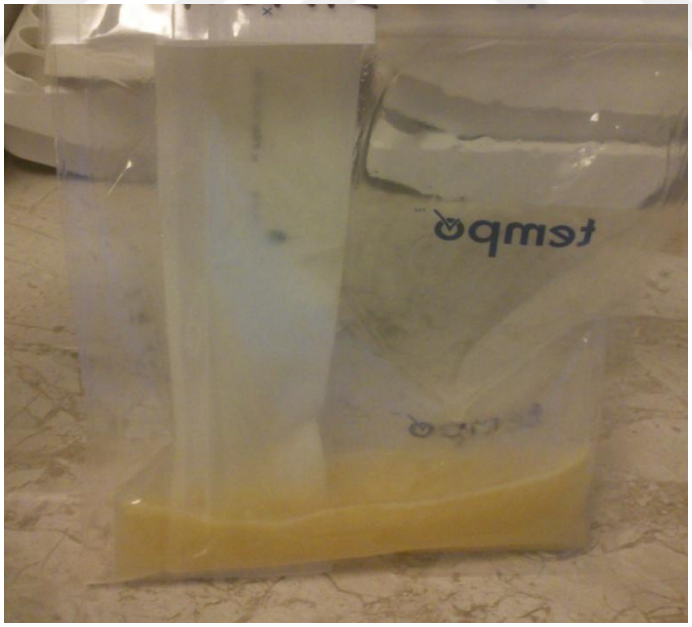
Oda sıcaklığındaki TEMPO® EC besiyeri şişelerine 3.0 mL saf steril su ilave edildikten sonra steril bir pipet ile TEMPO® torbasının filtreli kısmından 1.0 mL numune alındı ve sulandırılmış besiyerine eklendi. Ve ardından vorteks tipi karıştırıcı ile homojenize edildi. TEMPO® EC kartları barkod okuyucu yardımıyla sisteme okutulduktan sonra kartın transfer tüpü şişenin içine girecek şekilde tablaya oturtuldu. Tabla TEMPO® doldurucusuna yerleştirildi ve doldurma başlatıldı. Doldurma işlemi sona erdikten sonra cihaz transfer tüplerini kesti ve mühürledi.

Doldurma tablası TEMPO® doldurucusundan alınır ve inkübasyon tablasına yerleştirildi. Kartların üzerindeki etiketler kullanıcıya bakacak şekilde 22-27 saat 35 ^{0}C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında okunacak olan kartlar okuyucuya yerleştirildi. Okuyucu her kartın barkodunu tarar ve kuyulardaki florosan ışımayı yorumlar. Otomatik olarak numunenin adı ile test tipini, dilüsyonu ve sonuç sayısını eşleştirir(38).

Şekil 25: TEMPO® doldurucu ve okuyucu.

Şekil 26: TEMPO® kitleri ve besiyerleri

Şekil 27: Stomacher cihazı ve tartım işlemi



Şekil 28: TEMPO® torbasına tartılan formülasyon

2.2.6 Çörek Otu Yağı için Yapılan Kalite Kontrol Analizleri

2.2.6.1 Yağ asitleri kompozisyonunun belirlenmesi

Tüp içersine yaklaşık 10 mg tartılan yağ örneğinin üzerine 2 mL izooktan ve 2 mL Metanolik KOH (2 N) eklenip 10 dk çalkalandı. Faz ayrımı gerçekleştikten sonra üst faz viallendi ve gaz kromatografisi cihazına enjekte edildi. Sonuç yağ asitleri metil esterleri cinsinden yüzde dağılım olarak elde edildi. Elde edilen sonuçlar bulgular bölümü tablo 27'de ve 0., 3., 6. aylarda yapılan analiz sonuçlarından alınan kromatogramlar ise bulgular bölümü şekil 37, 38 ve 39'da yer almaktadır.

Cihaz	GC-FID SİSTEMİ
Kolon	SUPELCO SP TM-2560 Uzunluk: 100 m İç Çap: 0.25 mm Film Kalınlığı: 0.20 µm
Isı Programı	Başlangıç 140 °C, dakikada 4 °C ile 240 °C'ye, 5dakika isotermik
Split Oranı	1:100
Çalışma Modu	SCAN
Dedektör Isısı	260 °C
Dedektör	FID
Taşıyıcı gaz	Helyum, 20 cm/sn
Enjektör	HP 6890 serisi
Enjeksiyon Hacmi	1 µL

Tablo 14: Yağ asitleri kompozisyonunun belirlenmesi için kullanılan cihaz parametreleri

2.2.6.2 Tokoferol Analiz Yöntemi

10 mL lik bir balon jojeye 0.5 g yağ örneği tartıldı. Hekzan ile 10 mL ye tamamlanıp vortekslendi. Yaklaşık 1 mL numune çözeltisi viale aktarıldı. HPLC-FLD cihazında analizlenen tokoferol içeriği mg/kg cinsinden hesaplandı. Elde edilen sonuçlar bulgular bölümü tablo 28'de ve 0., 3., 6. aylarda yapılan analizler sonucu alınan kromatogramlar ise bulgular bölümü şekil 40, 41 ve 42'de yer almaktadır.

Cihaz	HPLC/FLD SİSTEMİ
Kolon	LICHROSORB SI 60 5.0 um 250mm x 4.0 mm
Çalışma Dalga Boyu	Excitation: 290 nm Emission: 330 nm
Kolon Sıcaklığı	25 °C ± 0.1 °C
Dedektör	FLD
Hareketli Faz	Hekzan/2-Propanol (99.5/0.5) (v/v)
Akış Hızı	0.800 ml/min
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Kromatogram Kayıt Süresi	40 dk

Tablo 15: Tokoferol Analizi için kullanılan cihaz parametreleri

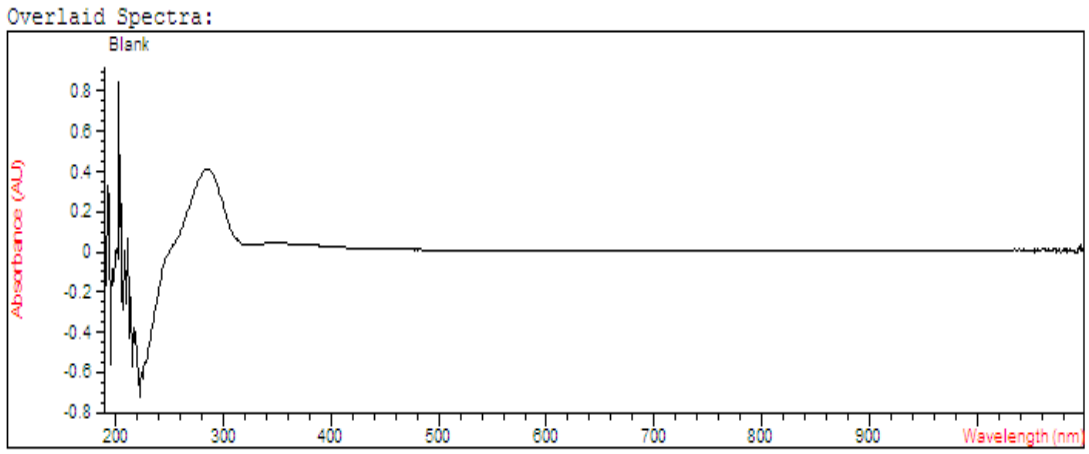
BÖLÜM III

3. BULGULAR

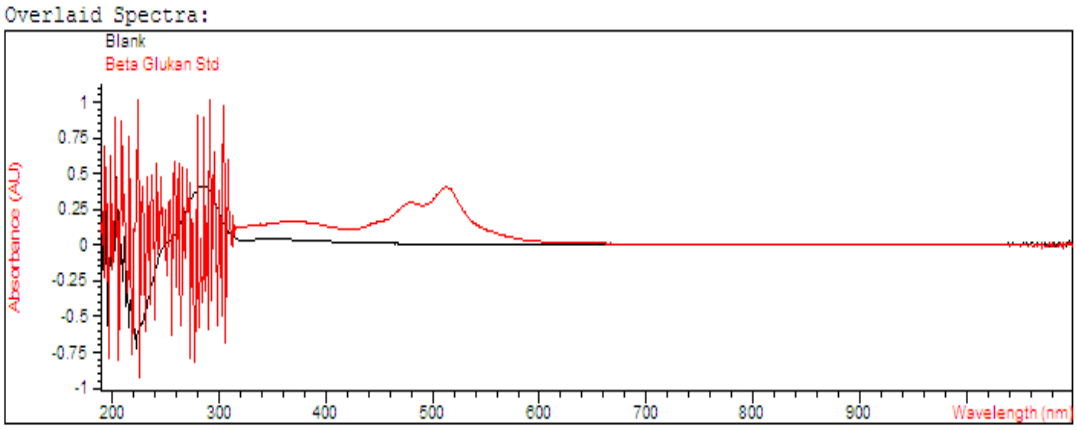
3.1 Analitik Metot Validasyonu

3.1.1 Seçicilik

Hazırlanan formülasyonun %100'lük derişimine denk gelen 500 µg/mL β-1,3-1,6 glukan standardı ile kör numune spektrofotometrede aynı şartlar altında ve aynı metotla okutuldu, etken madde ile aynı dalga boyunda absorbans gözlenmedi.



Şekil 29: Seçicilik parametresine ilişkin kör numune spektrumu



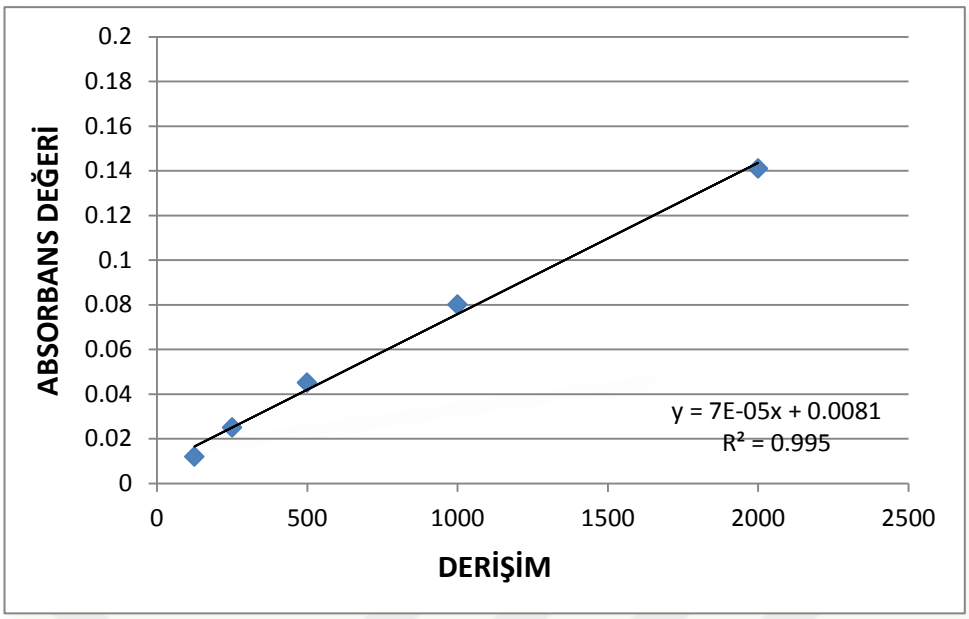
Şekil 30: Seçicilik parametresine ilişkin kör numune ve standart spektrumu

3.1.2 Doğrusallık

Başlık 2.2.1.3'de belirtildiği çalışılarak β-1,3-1,6 glukan standardı ile hazırlanan 125, 250, 500, 1000 ve 2000 µg / mL derişimlerinden çizilen kalibrasyon eğrisinde regrasyon katsayısı 0,995 ve doğru denklemi y = 0.00007 + 0,0081 bulunmuştur. % RSD değerleri ise her bir derişim için sırasıyla % 4.9, % 4.0, % 3.8, % 3.3, % 0.8 bulundu.

Numune No	Derişim (µg / mL)	Absorbans Değerleri	Ortalama Absorbans Değerleri	% RSD
1	125	0.012	0.012	4.9
		0.012		
		0.011		
2	250	0.025	0.025	4.0
		0.026		
		0.024		
3	500	0.047	0.045	3.8
		0.044		
		0.044		
4	1000	0.077	0.08	3.3
		0.081		
		0.082		
5	2000	0.140	0.141	0.8
		0.140		
		0.142		

Tablo 16: β-1,3-1,6 glukan için doğrusallık değerleri



Şekil 31: β-1,3-1,6 glukanın için doğrusallık grafiği

3.1.3 Kesinlik

3.1.3.1 Tekrar elde edilebilirlik

Kesinlik parametresinin içinde değerlendirilen tekrar elde edilebilirlik kriterinde, ortalama absorbans değeri 0.041, % ortalama geri kazanım değeri, % 94 ve % RSD'si 4.1 bulundu.

NumuneNo	Derişim (µg/mL)	Absorbans	Ortalama Absorbans	% Ortalama Geri Kazanım	% RSD
1	500	0.038	0.041	94	4.1
2	500	0.041			
3	500	0.041			
4	500	0.043			
5	500	0.041			
6	500	0.042			

Tablo 17: β-1,3-1,6 glukan tekrar elde edilebilirlik sonuçları

Hesaplama: % Geri Kazanım hesaplaması

Doğrusallıktan elde edilen kalibrasyon eğrisi denklemi : y= 0.00007 x + 0.0081

y= 0.00007x + 0.0081

0.041 = 0.00007x + 0.0081

x (derişim) = 470 µg/mL

% Geri Kazanım : $\frac{470}{500}$ x100 = % 94

3.1.3.2 Tekrarlanabilirlik

Kesinlik parametresinin içinde değerlendirilen tekrarlanabilirlik kriterinde, 500 µg/mL derişimindeki standart çözeltisi ardarda 5 kez okutuldu.

β-1,3-1,6 glukan için ortalama absorbans değeri 0.041 ve % RSD değeri ise 2.0 bulundu.

Ölçüm Sayısı	Absorbans
1. Ölçüm	0.041
2. Ölçüm	0.042
3. Ölçüm	0.040
4. Ölçüm	0.042
5. Ölçüm	0.041
Ortalama	0.041
% RSD	2.0

Tablo 18: β-1,3-1,6 glukan tekrarlanabilirlik sonuçları

3.1.4 Ekstraksiyon Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanım

β-1,3-1,6 glukan için 250, 500 ve 1000 µg/g olmak üzere her bir derişim seviyesi için 3 paralel numune çalışıldı. Elde edilen sonuçlar ortalama geri kazanım ve % RSD cinsinden hesaplandı.

250, 500 ve 1000 µg / g derişimlerinde hazırlanan formülasyonlarda bulunan % geri kazanım değerleri sırasıyla % 96.4, % 94 ve % 95.6'dir. Paralel çalışmalar arasındaki % RSD değerleri her üç derişim seviyesi için sırasıyla % 2.3, % 1.4, % 1.3 bulundu.

Numune No	Derişim (µg / g)	Absorbans	Ortalama Absorbans	% Geri Kazanım	% RSD
1	250	0.025	0.025	96.4	2.3
2	250	0.024			
3	250	0.025			
4	500	0.040	0.041	94	1.4
5	500	0.041			
6	500	0.041			
7	1000	0.074	0.075	95.6	1.3
8	1000	0.075			
9	1000	0.076			

Tablo 19: β-1,3-1,6 glukan için ekstraksiyon tekrarlanabilirliği ve geri kazanım değerleri

Hesaplama: β-1,3-1,6 glukan için ekstraksiyon tekrarlanabilirliği ve % geri kazanım değerlerinin hesaplanması

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan derişim değeri}}{\text{Beklenen derişim değeri}} \times 100$$

Doğrusallıktan elde edilen kalibrasyon eğrisi denklemi : y= 0.00007 x + 0.0081

250 µg / g için ;

y= 0.00007x + 0.0081 % Geri Kazanım = $\frac{241}{250}$ x 100

0.025 = 0.00007x + 0.0081

x (derişim) = 241 µg/mL % Geri Kazanım = % 96.4

500 µg / g için;

y= 0.00007x + 0.0081 % Geri Kazanım = $\frac{470}{500}$ x100

0.041 = 0.00007x + 0.0081

x (derişim) = 470 µg/mL % Geri Kazanım = % 94

1000 µg / g için;

y= 0.00007x + 0.0081 % Geri Kazanım = $\frac{956}{1000}$ x 100

0.075 = 0.00007x + 0.0081

x (derişim) = 956 µg/mL % Geri Kazanım = % 95.6

3.2 Formülasyonun Süspansiyon Testleri Sonuçları

3.2.1 Fiziksel Stabilite Test Sonuçları

3.2.1.1 Görünüş

Hazırlanan formülasyon süspande halde iken sarı ve bulanık görünümdedir. 0., 3. ve 6. aylardaki stabilitesi sonucu görünüşünde bir değişiklik gözlenmedi.

3.2.1.2 Renk

Hazırlanan formülasyon sarı renktedir. 0., 3. ve 6. Aylardaki stabilitesi sonucu renginde bir değişiklik gözlenmedi. Analizi sonuçları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

	0. Gün	3. ay	6.ay
Kırmızı	1.3	1.2	1.3
Sarı	46.0	46.0	46.1
Mavi	0.0	0.0	0.0
Nötr	0.1	0.1	0.1

Tablo 20: Renk tayini analiz sonuçları

3.2.1.3 Koku

Hazırlanan formülasyonun 0., 3. ve 6. aydaki stabilitesi sonucunda kokusunda bir değişiklik gözlenmedi.

3.2.1.4 Tat

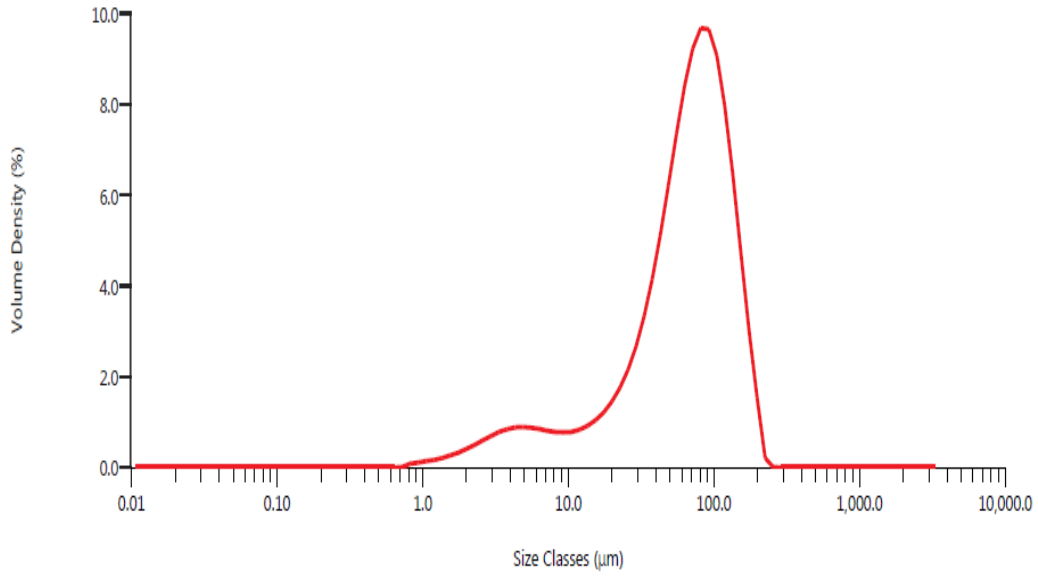
Hazırlanan formülasyon sert ve acı bir tada sahiptir. 0., 3. ve 6. aylardaki stabilitesi sonucu tadında bir değişiklik gözlenmedi.

3.2.1.5 Partikül Büyüklüğü

Hazırlanan formülasyonun 0., 3. ve 6. aydaki partikül boyutu ölçümleri Malvern Master Sizer 3000 cihazında yapıldı. Partikül büyüklüğü analizi sonuçlarının ortalama değerleri sırasıyla 137.0 µm, 138.0 µm ve 136.0 µm bulundu.

	0.gün	**3. Ay**	**6. Ay**
1. ölçüm	137.0	138.2	136.3
2. ölçüm	137.3	138.0	136.1
3. ölçüm	136.8	137.8	135.8
4. ölçüm	137.0	138.0	136.0
5. ölçüm	136.9	138.1	136.0
Ortalama Partikül boyutu	137.0 µm	138.0 µm	136.0 µm

Tablo 21: Formülasyonun partikül boyutu analiz sonuçları



Şekil 32: Formülasyonun 6. Ayda partikül büyüklüğü ölçümüne ilişkin cihazdan alınan spektrum

3.2.1.6 Çökme Hacmi

Hazırlanan formülasyonun 0., 3. Ve 6. aylardaki çökme hacmi değerleri hesaplandı ve ortalama çökme hacmi değerleri sırasıyla 0.023, 0.023, 0.023 olarak bulundu.

	0.gün	3. Ay	6. Ay
1. ölçüm	0.023	0.023	0.022
2. ölçüm	0.023	0.022	0.023
3. ölçüm	0.023	0.023	0.023
Ortalama Çökme Hacmi	0.023	0.023	0.023

Tablo 22: Süspansiyonun 0., 3., ve 6. ay stabilite sonrası çökme hacmi değerleri

Hesaplama : Süspansiyonun 0., 3. ve 6. aydaki çökme hacmi hesaplamaları

$$F = \frac{Vu}{Vo}$$

0.Gün için;

1. Ölçüm;

F (Çökme Hacmi) = $\frac{1.174\ \mathrm{mL}}{51\ \mathrm{mL}}$ = 0.023

2. Ölçüm;

F (Çökme Hacmi) = $\frac{1.178\ \mathrm{mL}}{51\ \mathrm{mL}}$ = 0.023

3. Ölçüm;

F (Çökme Hacmi) = $\frac{1.175\ \mathrm{mL}}{51\ \mathrm{mL}}$ = 0.023

3. ay için;

1. Ölçüm;

F (Çökme Hacmi) = $\frac{1.173\ \mathrm{mL}}{51\mathrm{mL}}$ = 0.023

2. Ölçüm;

F (Çökme Hacmi) = $\frac{1.172\ \mathrm{mL}}{51\mathrm{mL}}$ = 0.022

3. Ölçüm;

F (Çökme Hacmi) = $\frac{1.174\ \mathrm{mL}}{51\mathrm{mL}}$ = 0.023

6.ay için;

1. Ölçüm;

F (Çökme Hacmi) = $\frac{1.172\ \mathrm{mL}}{51\ \mathrm{mL}}$ = 0.022

2. Ölçüm;

F (Çökme Hacmi) = $\frac{1.173\ \mathrm{mL}}{51\mathrm{mL}}$ = 0.023

3. Ölçüm;

F (Çökme Hacmi) = $\frac{1.173\ \mathrm{mL}}{51\mathrm{mL}}$ = 0.023

3.2.1.7 Çökme Hızı

Hazırlanan formülasyonun çökme hızı 115,5 cm/s olarak bulundu.

0. Gün için;

$$V = \frac{d^2 \ Ps-Po \ g}{18\eta 0}$$

$$V = \frac{137^2 \ 0{,}9197-0{,}9075 \ 980{,}7}{18*107.3}$$

V =116,2 cm/s

3. Ay İçin;

$$V = \frac{d^2 \ Ps-Po \ g}{18\eta 0}$$

$$V = \frac{138^2 \ 0{,}9197-0{,}9075 \ 980{,}7}{18*108}$$

V = 117,2 cm/s

6. Ay için;

$$V = \frac{d^2 \ Ps-Po \ g}{18\eta 0}$$

$$V = \frac{136^2 \ 0{,}9197-0{,}9075 \ 980{,}7}{18*108}$$

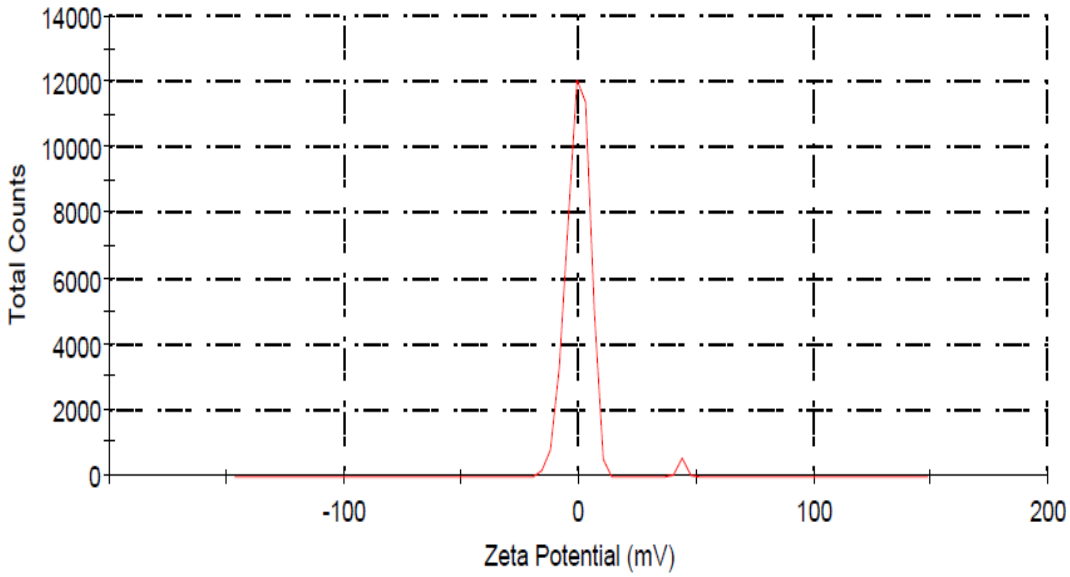
V = 113,8 cm/s

3.2.1.8 Zeta Potansiyel

Hazırlanan formülasyonun 0., 3. ve 6. aydaki zeta potansiyel ölçümleri Zetasizer Nano ZSP cihazında yapıldı. Yapılan ölçümler sonucu formülasyonun ortalama zeta potansiyel değerleri sırasıyla 0.296 mV, 0.294 mV ve 0.295 mV olarak bulundu.

	0. gün	**3. ay**	**6. ay**
1. Ölçüm	0.296	0.294	0.295
2. Ölçüm	0.295	0.294	0.296
3. Ölçüm	0.296	0.294	0.294
Ortalama Zeta potansiyel	0.296 mV	0.294 mV	0.295 mV

Tablo 23: Süspansiyonun 0., 3., ve 6. Aylardaki stabilitesi sonrası zeta potansiyel ölçüm değerleri



Şekil 33: Hazırlanan formülasyonun 6. Ay stabilitesindeki zeta potansiyel ölçümünü gösteren grafik

3.2.1.9 Viskozite

Hazırlanan formülasyonun 200 rpm'de torque değeri %10,8, viskozite değerleri sırasıyla 107.3 cP, 108.0 cP ve 108,0 cP olarak bulundu.

	0. gün	3. ay	6. ay
1. Ölçüm	108.0	108.0	107.8
2. Ölçüm	107.0	108.3	108.1
3. Ölçüm	107.0	107.9	108.0
Ortalama Viskozite Değerleri(cP)	107.3	108.0	108.0

Tablo 24: Süspansiyonun 0., 3., ve 6. Aylardaki stabilitesi sonrası viskozite ölçüm değerleri

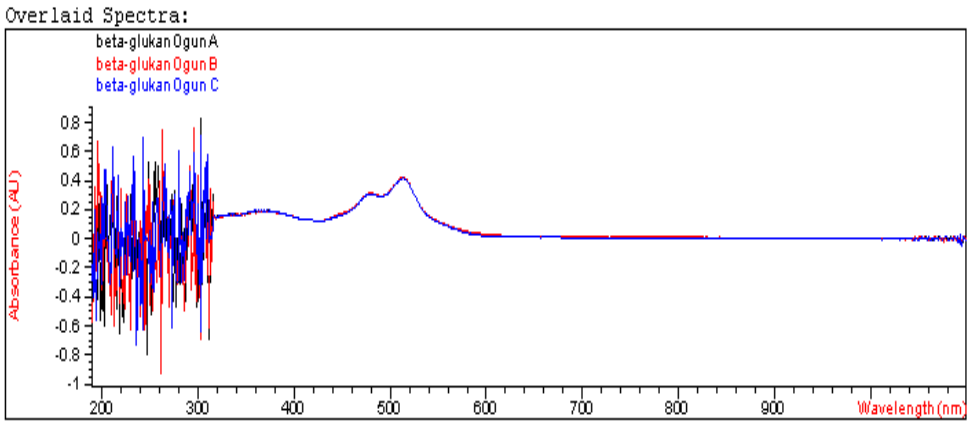
3.2.2 Kimyasal Stabilite Test Sonuçları

5.0 g çörek otu yağı, 50 mg β-1,3-1,6 glukan içeren süspansiyonun 40 derecede, % 75 nem oranında ve ışık geçirmeyen bir ortamda yapılan kısa süreli kimyasal stabilite testi sonuçları aşağıda verilmiştir.

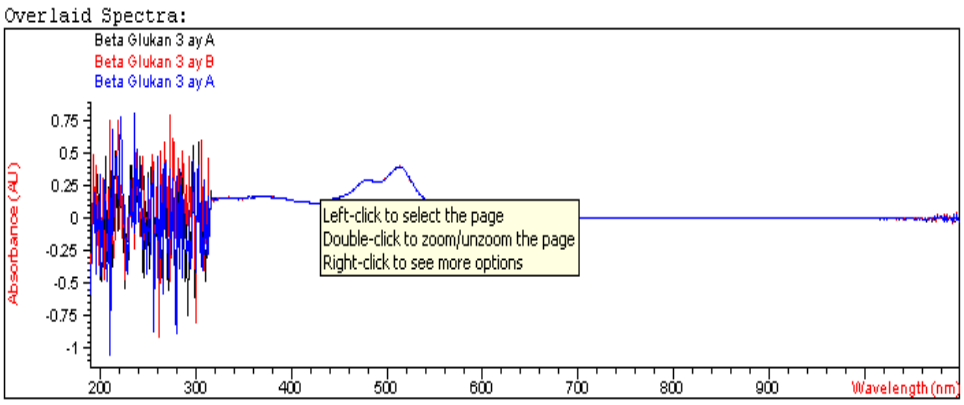
β-1,3-1,6 glukanın 0., 3. ve 6. Ay sonunda yapılan miktar tayini analiz sonuçları sırasıyla 10.1 mg, 10.0 mg, 9.9 mg olarak belirlendi. % kayıp 3. ay sonunda 0.0, 6. ay sonunda ise 0.7 bulundu.

Süre	İçerik (mg/g)	Ortalama İçerik (mg/g)	% Kayıp
0.Gün	10.1	10.1	0.0
	10.2		
	10.0		
3.Ay	10.2	10.0	0.0
	10.0		
	9.8		
6.Ay	10.0	9.9	0.7
	10.0		
	9.8		

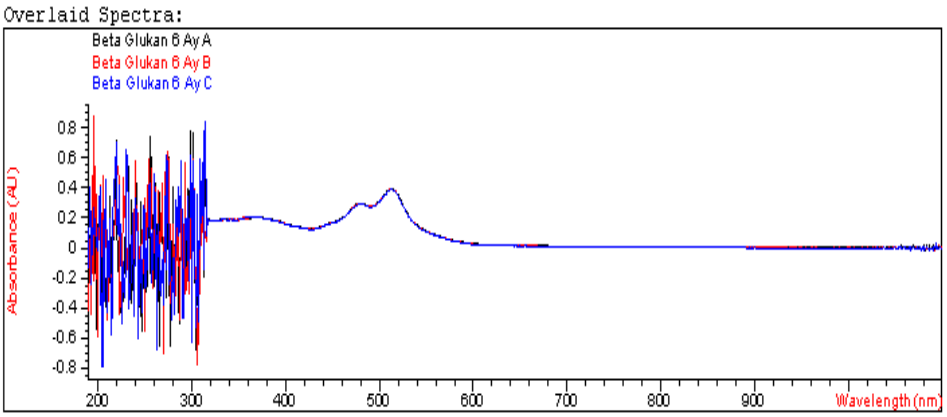
Tablo 25:β-1,3-1,6 glukan için kimyasal stabilite sonuçları



Şekil 34: Formülasyonun 0. Gün Spektrumu



Şekil 35: Formülasyonun 3. ay kimyasal stabilitesi sonucu alınan spektrum



Şekil 36: Formülasyonun 6. ay kimyasal stabilitesi sonucu alınan spektrum

3.2.3 Mikrobiyolojik Test Sonuçları

Hazırlanan formülasyonun mikrobiyolojik testlerine ilişkin sonuçlar Tablo 19' da verilmiştir. Üründe 0., 3., ve 6. aylardaki aerobik mezofilik bakteri sayımı < 100 kob/g ve küf-maya sayımı < 10 kob/g olarak bulunurken, *Escherichia coli* tespit edilmedi.

Analizler	**Sonuç (kob/g) 0.Gün**	**Sonuç (kob/g) 3.Ay**	**Sonuç (kob/g) 6.Ay**
Aerobik Mezofilik Bakteri Sayımı	< 100	< 100	< 100
Küf-Maya Sayımı	< 10	< 10	< 10
***Escherichia coli* Sayımı**	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi

Tablo 26: Son ürünün mikrobiyolojik testlerinin sonuçları

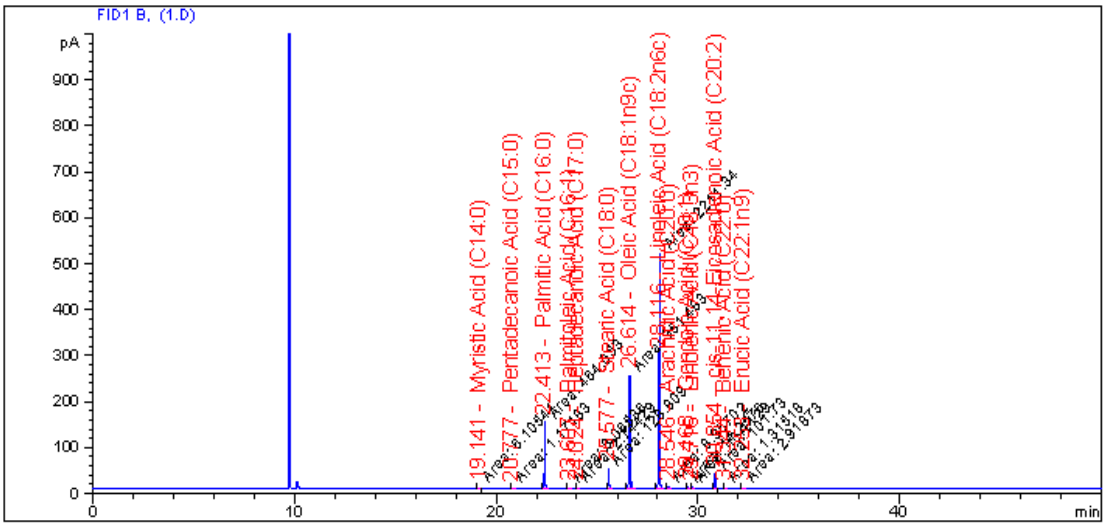
3.3 Çörek Otu Yağı için Yapılan Kalite Kontrol Analizleri

3.3.1 Yağ Asitleri Kompozisyonunu Analizi Sonuçları

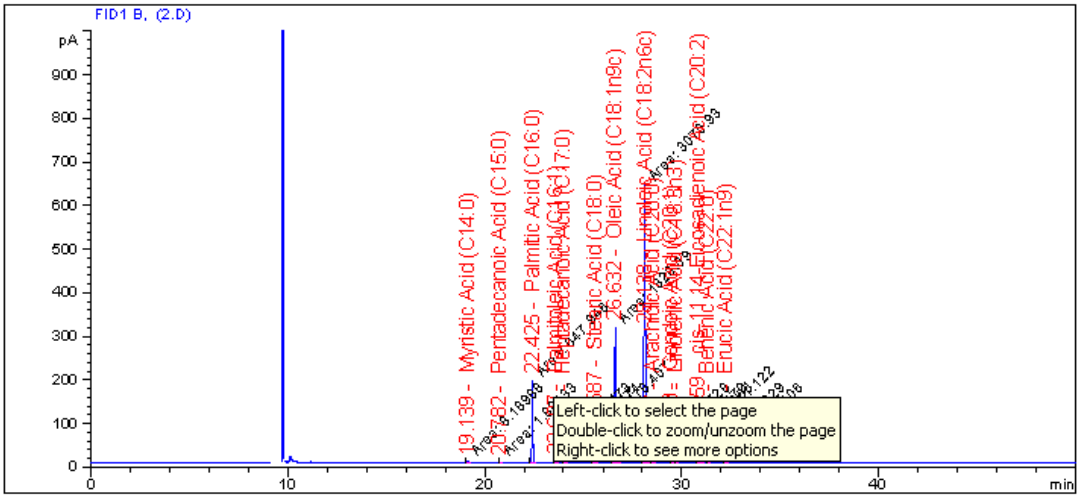
Çörek otu yağının GC-FID cihazında yapılan Yağ Asitleri Kompozisyonu aşağıdaki gibidir.

	% Alan Değerleri			
Yağ Asitleri	**0. Gün**	**3. Ay**	**6. Ay**	**% RSD**
Miristik asit (C14:0)	0.16	0.15	0.14	6.67
Pentadekanoik asit (C15:0)	0.03	0.03	0.02	21.65
Palmitik asit (C16:0)	11.86	11.92	11.80	0.51
Palmitoleik asit (C16:1)	0.21	0.21	0.20	2.79
Heptadekanoik asit (C17:0)	0.07	0.06	0.07	8.66
Stearik asit (C18:0)	3.29	3.28	3.30	0.30
Oleik asit (omega-9)(C18:1n9c)	24.32	24.30	24.35	0.10
Linoleik asit (omega-6)(C18:2n6c)	56.51	56.52	56.53	0.02
Gondoik asit (omega-9)(C20:1)	0.36	0.35	0.37	2.78
Linolenik asit (omega-3)(C18:3n3)	0.26	0.24	0.25	4.00
cis-11,14-eicosadienoik asit (omega-6)(C20:2)	2.60	2.59	2.60	0.22
Erusik asit (omega-9)(C22:1n9)	0.07	0.06	0.07	8.66
cis-13,16-dokasadienoik asit (omega-6)(C22:2)	0.05	0.05	0.04	12.37
cis-4,7,10,13,16,19-dokasahekzaenoik asit (omega-3)(C22:6)	0.03	0.03	0.05	31.49

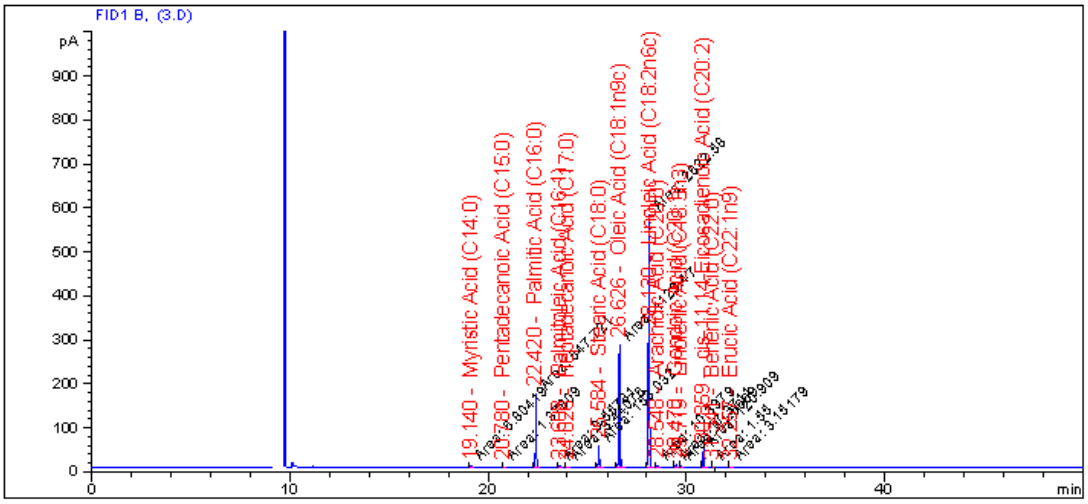
Tablo 27: Çörek otu yağının GC-FID cihazında yapılan yağ asitleri kompozisyonuna ilişkin 0. gün, 3. ay, 6. ay stabilite test sonuçları



Şekil 37 : Çörek otu yağının GC-FID cihazında yapılan yağ asitleri kompozisyonunun 0. Güne ilişkin kromatogramı



Şekil 38: Çörek otu yağının GC-FID cihazında yapılan yağ asitleri kompozisyonunun 3. aya ilişkin kromatogramı



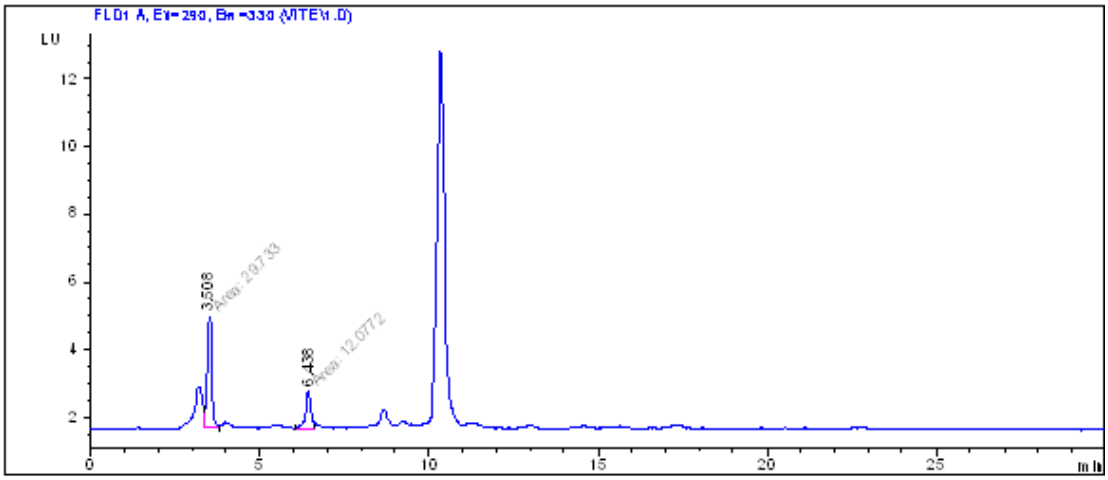
Şekil 39: Çörek otu yağının GC-FID cihazında yapılan yağ asitleri kompozisyonunun 6. aya ilişkin kromatogramı

3.3.2 Tokoferol Analizi Sonuçları

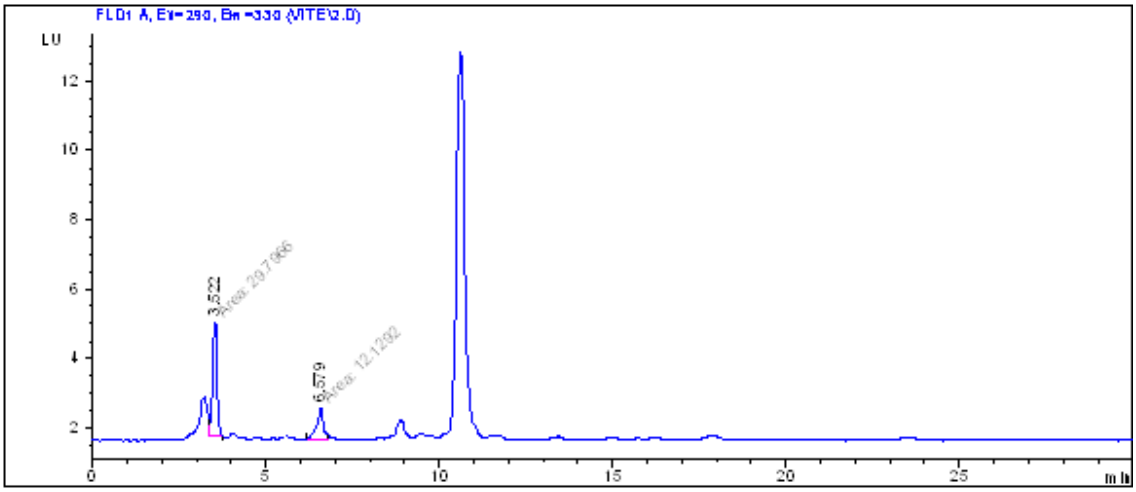
Çörek otu yağının HPLC-FLD cihazında yapılan tokoferol analizi sonuçları aşağıdaki gibidir.

	0.gün	3.Ay	6.Ay	% RSD
Alfa Tokoferol (mg/kg)	103.0	102.3	100.2	1.43

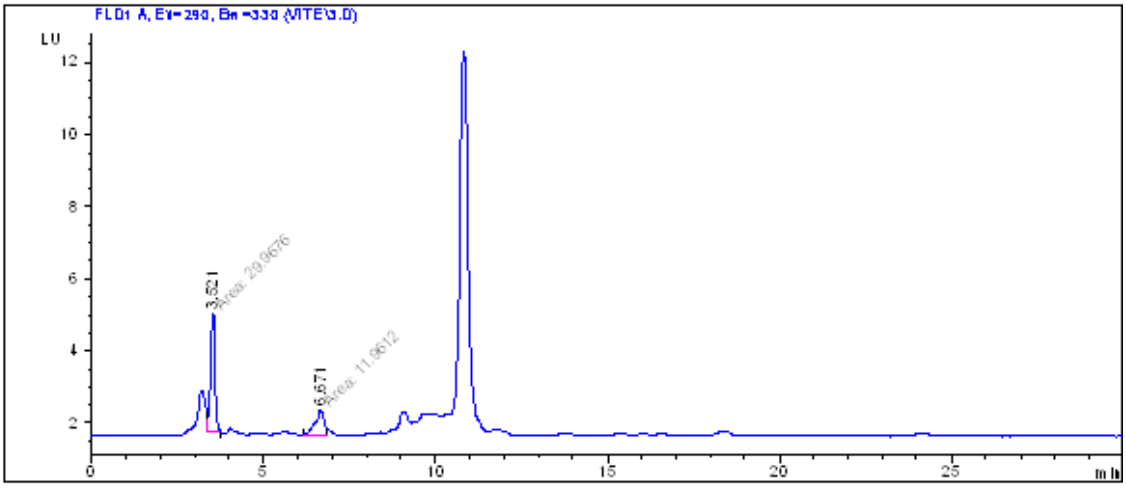
Tablo 28: Çörek otu yağının HPLC-FLD cihazında yapılan tokoferol analizine ilişkin sonuçlar



Şekil 40: Çörek otu yağının HPLC-FLD cihazında yapılan tokoferol analizinin 0. güne ilişkin kromatogramı



Şekil 41: Çörek otu yağının HPLC-FLD cihazında yapılan tokoferol analizinin 3. aya ilişkin kromatogramı



Şekil 42: Çörek otu yağının HPLC-FLD cihazında yapılan tokoferol analizinin 6. aya ilişkin kromatogramı

BÖLÜM IV

4. TARTIŞMA

Hazırlanan formülasyon için yapılan kalite kontrol analizleri kapsamında optimize edilenen analitik metot validasyonunda, seçicilik, doğrusallık, tekrarlanabilirlik, tekrar elde edilebilirlik, ekstraksiyon tekrarlanabilirliği ve geri kazanım kriterleri incelenerek elde edilen sonuçlar CDER (The Center for Drug Evaluation and Research - İlaç Değerlendirme ve Araştırma Merkezi) kriterleri göre değerlendirilmiştir(39).

Seçicilik kriteri için yapılan çalışma sonucu ise β-(1,3-1,6) glukan standardı ile kör numune cihaza aynı şartlar altında ve aynı metotla verilmiş, etkin madde ile aynı dalga boyunda absorbans gözlenmemiştir. CDER kriterlerine göre seçicilik kriteri için standart ve kör numunenin aynı şartlarda girişim yapmamış olması beklenmektedir. Bu nedenle elde ettiğimiz bu değer CDER kriterleri için uygundur.

Doğrusallık kriteri için hesaplanan regrasyon katsayısı R^2 = 0.995'dir ve en düşük limit değer olan 0.95'den büyüktür. 125, 250, 500, 1000, 2000 µg/mL derişimlerine karşılık gelen % RSD değerleri sırasıyla **%** 4.9, % 4.0, % 3.8, % 3.3, % 0.8'dir. Bu değerler, % RSD limiti %15 olan CDER kriterleri için uygundur.

Tekrar elde edilebilirlik için 500 µg/mL derişime karşılık gelen % ortalama geri kazanım % 94, % RSD % 4.1 bulunmuştur. CDER kriterlerinde geri kazanım limitleri % 80 ile % 120 arasında, % RSD değeri limiti %15'tir. Bulunan değerler CDER kriterlerine uygundur.

Tekrarlanabilirlik için etkin maddelerine ilişkin bulunan % RSD değeri % 2.0'dir. Bulunan bu değer, CDER kriteri limiti olan % 15'in altındadır. Bu sonuçla kullanılan UV-Spektrofotometre cihazının tekrarlanabilirliği istenilen kriterleri karşılamaktadır.

Analitik validasyonda önemli bir kriter olan ekstraksiyon tekrarlanabilirliği ve geri kazanım için elde edilen sonuçlarda, β-(1,3-1,6) glukan için % geri kazanım, 250, 500 ve 1000 µg/g derişimleri için sırasıyla % 96.4, % 94 ve % 95.6 bulunmuştur. Bu değerlerin limit değerler olan % 80 - % 120 sınırları arasında olduğu görülmüştür. Ayrıca yine aynı kritere ilişkin % RSD değerleri sırasıyla % 2.3, % 1.4, % 1.3'tür ve CDER kriterlerine göre % 15'den küçük olması uygundur.

Yapılan fiziksel stabilite test sonuçlarına bakıldığında hazırlanan formülasyonun 0., 3. ve 6. ay stabiliteleri sonunda görünüş, renk, koku ve tadında bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir.

Son ürün için yapılan süspansiyon testleri sonucunda hazırlanan formülasyonun zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü, viskozitesi, çökme hızı ve çökme hacminde önemli bir değişim olmadığı görülmüştür.

Partikül büyüklüğü ile ilgili 0., 3. ve 6. ay stabiliteleri sonunda yapılan analiz sonuçları sırasıyla 137.0 µm, 138.0 µm ve 136.0 µm'dir. Ek-1'de verilmiş olan bulk madde sertifikasındaki partikül boyutu sonuçlarıyla uyumludur. Bu sonuçlar 6 aylık stabilite sonucunda etken maddenin partikül boyutunda bir değişiklik olmadığını göstermektedir.

Çökme hacmi ile ilgili 0., 3. ve 6. ay stabiliteleri sonunda yapılan analizlerin ortalama sonuçları 0.023 bulunmuştur. Normal bir süspansiyonun F değeri birden küçük olmalıdır (32,33). Bizim sonuçlarımız bu kriteri karşılamaktadır.

Çökme hızı eşitliği (stokes eşitliği), madde miktarı % 0.5 ile % 2 (g/mL) arasında olan süspansiyonlar için kullanılmaktadır (32,33). Çökme hızı ile ilgili 0., 3. ve 6. ay stabiliteleri sonunda yapılan analiz ortalama sonuçları sırasıyla 116,2 cm/s, 117,2 cm/s ve 113,8 cm/s bulunmuştur.

Floküle ve kekleşmeyen bir süspansiyonun zeta potansiyeli 25 mV'un altında olmalıdır (32). Zeta potansiyel ile ilgili 0., 3. ve 6. ay stabiliteleri sonunda yapılan analiz sonuçları sırasıyla 0.296 mV, 0.294 mV ve 0.295 mV bulunmuştur. Bulunan değerler kriterlere uygundur.

Viskozite ile ilgili 0., 3. ve 6. ay stabiliteleri sonunda yapılan analiz sonuçları sırasıyla 107.3 cP, 108.0 cP, 108.0 cP bulunmuştur.

Son ürün için yapılan 6 aylık kısa süreli kimyasal stabilite testi sonucunda hazırlanan formülasyonun içerdiği etkin madde miktarının en az 6 ay boyunca stabil kaldığı ispatlanmıştır. Yapılan kimyasal stabilite ile 3. ve 6. ay sonunda β-(1,3-1,6) glukan için % kayıp sırasıyla, % 0.00 ve % 0.7 bulunmuştur. Diğer bir deyişle CDER normlarına göre limit değer olan % 5 sınırının altında kalmıştır.

Son ürün için yapılan mikrobiyolojik testler sonucu aerobik mezofilik bakteri sayımı < 100 kob/g ve küf-maya sayımı < 10 kob/g olarak bulunurken *Escherichia coli* tespit edilememiştir. Elde edilen sonuçlar Avrupa Farmakopesi(40)'ndeki steril olmayan dozaj formları için mikrobiyolojik kabul kriterleri (aerobik mezofilik bakteri sayımı < 10^5 kob/g, küf-maya sayımı < 10^4 kob/g ve *Escherichia coli* = bulunmamalı) ile uyumludur(40).

Çörek otu yağı için 0., 3. ve 6. aylarda yapılan yağ asitleri komposizyonu analiz sonuçlarında % RSD değerleri, palmitik asit için 0.51, stearik asit için 0.30, oleik asit için 0.10, linoleik asit için 0.02 ve cis-11,14-eicosadienoik asit için 0.22 bulunmuştur. CDER'e göre % RSD değerleri % 5'ten küçük olmalıdır. Bulunan sonuçlar bu kriterlere uygundur.

Tokoferol için 0., 3. ve 6. aylarda yapılan analizler sonucunda değerler sırasıyla 103.0, 102.3 ve 100.2 bulunmuştur. Bulunan bu değerlerin % RSD'si % 1.43'tür. Bulunan % RSD değeri, limiti % 5 olan CDER kriterlerine uygundur.

BÖLÜM V

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hazırlanan formülasyon ile günlük yaşamda önemi gittikçe artan besin desteklerine bir alternatif sunulmuştur. İmmün sisteme olan pozitif etkisi göz önüne alındığında uygun dozajda hazırlanan bu ürünün sektöre yenilikçi bir ürün fikir verilmesi amaçlanmıştır.

Sonuç olarak kalite kontrol analizleri ve stabilite testleri yapılan bu süspansiyon formunun piyasada ithal olarak bulunan β-(1,3-1,6) glukan içeren ürünlere alternatif olabileceği düşünülmektedir.

İlerleyen dönemlerde süspansiyon dozaj formunda çörek otu yağı içinde hazırlanan β-(1,3-1,6) glukan etkin maddesinin hayvan denemeleri yapılarak immüniteye olan etkinin araştırılması planlanmaktadır.

.

KAYNAKLAR

1. Lydia Woods Schindler. Understanding the Immune System(e-book). U.S. Department of Health and Human Services. NIH Publication No. 92-529 Resvised October 1991

2. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Basic Immunology. Functions and Disorders of the Immune System(e-book). Elsevier Saunders Inc. 2014 Library of Congress Cataloging-in-Publication Data 978-1-4557-0707-2

3. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Cellular and Molecular Immunology(e-book). Elsevier Saunders Inc. 2012. 978-1-4377-1528-6

4. Lauren Sompayrac. How the Immune System Works(e-book). John Wiley&Sons, 2012. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data 978-O-470-6729-4

5. Lorrie Klosterman. Immune System. The Amazing Human Body(e-book). Marshall Cavendish Benchmark. 2009 ISBN 978-D7614-3054-4

6. Türk İmmünoloji Derneği web sitesi. Turkish Journal of Immunology, 2015.(http://www.turkimmunoloji.org.tr)

7. İmmunogenetics web sitesi. The international İmmunogenetics information system. İmmunoglobulines et Lymphocytes B, 2011. (http://www.imgt.org).

8. Apoorva Sethi, Neeraja Kulkarni, Sandip Sonar, Girdhari Lal. Role of miRNAs in CD4 T cell plasticity during inflammation and tolerance. Front. Genet., 31 January 2013. doi: 10.3389/fgene.2013.00008

9. D. K. Meena, Pronob Das, Shailesh Kumar, S. C. Mandal, A. K. Prusty, S. K. Singh, M. S. Akhtar, B. K. Behera, Kundan Kumar, A. K. Pal, S. C. Mukherjee. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture. Fish Physiol Biochem. Springer Science+Business Media B.V. 2012. DOI 10.1007/s10695-012-9710-5.

10. L.G. Wade. Organic Chemistry Fifth Edition(e-book). 1995-2002 by Prentice-Hall, Inc.

11. Fidancı, U.R. Karbonhidratlar (internet). Mart 2009. (http://www.docstoc.com)

12. Jiezhong CHEN, Robert SEVIOUR. Medicinal importance of fungal β-(1-3),(1-6)-glucans. Mycological research 111(2007)635–652

13. Formula Medical Group web sitesi. Formula For Life. All The Different Fiber. last reviewed January 11, 2006 (http://www.formulamedical.com/)

14. Luca Vannucci, Jiri Krizan, Petr Sima, Dmitry Stakheev, Fabian Caja, Lenka Rajsiglova et al. İmmunıstimulatory properties and antitumor activities of glucans(Review). International Journal of Oncology. 357-364 DOI: 10.3892/ijo.2013.1974

15. Beta Glucan Research web sitesi. Beta Glucan Research – Saccharomyces cerevisiae. 2015 Beta Glucan Research Organization Last modified: 03/25/15 (http://betaglucan.org/)

16. Mario S. Mantovani, Marilanda F. Bellini, Jose Pedro F. Angeli, Rodrigo J. Oliveira, Ariane F. Silva, Lucia R. Ribeiro. β-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. Science Direct Mutation Research 658 (2008) 154–161.

17. Algal Scientific web sitesi. USA, Algal scientific Corporation, 2015. (http://www.algalscientific.com/)

18. Sandeep Rahar, Gaurav Swami, Navneet Nagpal, Manisha A. Nagpal, Gagan Shah Singh. Preparation, characterization, and biological properties of b-glucans (Review). Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research, 2011. DOI: 10.4103/2231-4040.82953

19. Onur KESER, Tanay BILAL. Beta-Glukanın Hayvan Beslemede Bagısıklık Sistemi ve Performans Üzerine Etkisi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 5(2) 107-119, 2008.

20. Helen S. Goodridge, Andrea J. Wolf, David M. Underhill. β-glucan recognition by the innate immune system. Immunological Reviews 2009 Vol. 230: 38–50

21. Dalia Akramienė, Anatolijus Kondrotas, Janina Didžiapetrienė, Egidijus Kėvelaitis. Effects of b-glucans on the immune system. Medicina (Kaunas) 2007; 43(8)

22. Jiezhong CHEN, Robert SEVIOUR. Medicinal importance of fungal β-(1-3),(1-6)-glucans. Mycological research 111(2007)635–652

23. Godfrey Chi-Fung Chan, Wing Keung Chan and Daniel Man-Yuen Sze. The effects of β-glucan on human immune and cancer cells. Journal of Hematology & Oncology, 2009, **2**:25 doi:10.1186/1756-8722-2-25

24. Vlatka PETRAVIĆ-TOMINAC, Vesna ZECHNER-KRPAN, Slobodan GRBA, Siniša SREČEC, Ines PANJKOTA-KRBAVČIĆ, Lana VIDOVIĆ. Biological Eff ects of Yeast β-Glucans. Agriculturae Conspectus Scientifi cus | Vol. 75 (2010) No. 4 (149-158)

25. Chunjian Qi, Yihua Cai, Lacey Gunn, Chuanlin Ding, Bing Li, Goetz Kloecker et al. Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived β-glucans. The American Society of Hematology. April 29, 2011; DOI 10.1182/blood-2011-02-339812.

26. Bing Li, Yihua Cai, Chunjian Qi, Richard Hansen, Chuanlin Ding, Thomas C. Mitchell, and Jun Yan. Orally Administered Particulate β-Glucan Modulates Tumor-Capturing Dendritic Cells and Improves Antitumor T-Cell Responses in Cancer. American Association for Cancer Research. September 20, 2010; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0820

27. Said Gharby, Hicham Harhar, Dominique Guillaume, Aziza Roudani, Samira Boulbaroud, Mohamed Ibrahimi et al. Chemical investigation of Nigella sativa L. seed oil produced in Morocco. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2014, 1658-077X (http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2013.12.001)

28. Mustafa Kiralana, Gülcan Özkan, Ali Bayrak, Mohamed Fawzy Ramadan. Physicochemical properties and stability of black cumin(Nigella sativa) seed oil as affected by different extraction methods. Industrial Crops and Products 57 (2014) 52–58

29. Herman Lutterodt, Marla Luther, Margaret Slavin, Jun-Jie Yin, John Parry, Jin-Ming Gao,Liangli (Lucy) Yu. Fatty acid profile, thymoquinone content, oxidative stability, and antioxidant properties of cold-pressed black cumin seed oils. LWT - Food Science and Technology 43(2010)1409-1413

30. Salma Cheikh-Rouhou, Souhail Besbes, Basma Hentati, Christophe Blecker, Claude Deroanne, Hamadi Attia. *Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. Science direct Food Chemistry 101 (2007) 673–681

31. Helvacızade Gıda İlaç Kimya San. Tic. A.Ş. 2013 Zade Vital web site. (http://www.zadevital.com/neden-zade-vital/soguk-pres-ile-gelen-saglik).

32. Acartürk F., Ağabeyoğlu I., Çelebi N. ve arkadaşları (2009) "Modern Farmasötik Teknoloji", Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayınları 2.Baskı.

33. Nurşin Gönül. Çok Fazlı Sistemler 2 Süspansiyon ve Emülsiyon Teknolojisi. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2000, Yayın No:82

34. Megazyme web sitesi. Megazyme International Co., Ireland. http://secure.megazyme.com/

35. Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), 2003.

36. Automated test for use with TEMPO, for the enumeration of Total viable count in 40-48 hours in food products, Biomerieux TEMPO® TVC, 80 007, 2009.

37. Automated test for use with TEMPO, for the enumeration of Yeasts, mold in 72-76 hours in food products, Biomerieux TEMPO® YM, 80 001, 2010.

38. Automated test for use with TEMPO, for the enumeration of Escherichia coli in 22-27 hours in food products, Biomerieux TEMPO® EC, 80 004, 2009.

39. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), 2001.

40. European Pharmacopoeia 6th Edition 2007; 529-530.

EK-1

KUZEYKİMYA
SANAYİ VE TİCARET LİMİTED ŞİRKETİ

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name: Yeast Beta D Glucan
Botanical Name: Yeast
Batch Number: JC120803
Quantity: 50kg

Origin of Material: China
Part Used: Mycelium
Date of Manufacture: 2012/08/03
Date of Analysis: 2012/08/05

Item	Specification	Result	Testing Method
Assay(Beta 1,3/1,6 D-Glucan)	70% Min.	75.9%	Enzyme solution-UV
Physical & Chemical Control			
Appearance	White Fine Powder	Complies	Visual
Odor	Characteristic	Complies	Organoleptic
Tasted	Characteristic	Complies	Organoleptic
Sieve Analysis	100% pass 100 mesh	Complies	100mesh screen
Loss on Drying	5% Max.	3.9%	5g/100℃/2.5hrs
Ash	5% Max.	3.3%	2g/525℃/3hrs
Heavy Metal	10ppm Max	Complies	AAS
As	1ppm Max	0.253ppm	AAS
Pb	2ppm Max	0.367ppm	AAS
Hg	0.1ppm Max.	Complies	AAS
Pesticides Residues	1ppm Max.	Not Detected	GC
Microbiological			
Total Plate Count	1000/g Max.	Complies	CP2010
Yeast & Mould	25/g Max	Complies	CP2010
Salmonella	Negative	Complies	CP2010
E.Coli	Negative	Complies	CP2010
Staphylococcus	Negative	Complies	CP2010
Conclusion	Complies with specification		
Storage	In cool & dry place. Keep away from strong light and heat.		
Shelf life	2 years when properly stored.		
Packing	25KG/drum, Pack in paper-drums and two plastic-bags inside.		

ÖZGEÇMİŞ

20 Aralık 1988 İzmir doğumluyum. 2006-2011 yılları arasında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimi aldım. 2012 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladım. Yüksek lisans süresince ilk iki yıl Ege Üniversitesi ARGEFAR Ürün Geliştirme Laboratuvarında çalıştım. Yaklaşık bir senedir de ARGEFAR Çevre ve Gıda Laboratuvarlarında çalışmaktayım.