



**ÜLSERATİF KOLİT TEDAVİSİNE YÖNELİK MESALAZİN VE
EKSOZOMUN MİKROAKIŞKAN TABANLI SİSTEM İLE
ENKAPSÜLASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

Ceyda KÖROĞLU ÖZMEN

Eskişehir 2024

ÜLSERATİF KOLİT TEDAVİSİNE YÖNELİK MESALAZİN VE
EKSOZOMUN MİKROAKIŞKAN TABANLI SİSTEM İLE
ENKAPSÜLASYONU

Ceyda KÖROĞLU ÖZMEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Gülay BÜYÜKÖROĞLU

Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Temmuz 2024

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No. TYL-2023-1873)

Bu çalışmaya ait Etik Kurul Onayı, 10 Kasım 2022 tarihinde 21 Nolu kararı ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı tarafından verilmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ceyda KÖROĞLU'nun "Ülseratif Kolit Tedavisine Yönelik Mesalazin ve Eksozomun Mikroakışkan Tabanlı Sistem İle Enkapsülasyonu" başlıklı tezi 03/07/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU	
Üye	: Prof. Dr. Emine ŞALVA	
Üye	: Doç. Dr. Behiye ŞENEL	

Prof. Dr. Saime ÖNCE

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

ÜLSERATİF KOLİT TEDAVİSİNE YÖNELİK MESALAZİN VE EKSOZOMUN MİKROAKIŞKAN TABANLI SİSTEM İLE ENKAPSÜLASYONU

Ceyda KÖROĞLU ÖZMEN

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Temmuz 2024

Danışman: Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

Bu tez çalışmasında, kolon ve rektumda iltihaplanma ve ülserler ile karakterize inflamatuvar bağırsak hastalığı olan ülseratif kolitte (ÜK) meydana gelen enflamasyonu azaltmak ve rejenerasyonu arttırmak amacı ile oral uygulanacak bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, özellikle kolon epitel hücreleri üzerinde topikal anti-enflamatuar etkiye sahip olduğu bilinen kimyasal bir etkin madde olan mesalazin ile doku rejenerasyonu ve onarımı kapasiteleri bilinen insan göbek kordonu bağ dokusu (Wharton jeli) kök hücrelerinden elde edilen eksozomlar (hWJ-MKH exo), yeni bir sistem olan damlacık mikroakışkan metodu kullanılarak oluşturulan yağ içinde su emülsiyonu sistemi ile kombin ve ayrı ayrı olmak üzere enkapsüle edilmiş, kolona hedeflenebilmesi için enterik kaplı kapsüllere doldurularak liyofilize edilmiştir.

Hazırlanan sistem üzerinde ve içeriğindeki ki mesalazin ve eksozomlar için karakterizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Mesalazin için UPLC kullanılarak analitik yöntem geliştirme ve validasyon çalışmaları, eksozomlar için hem elde edilme hem elde edildikten sonra hem de formülasyon geliştirildikten sonra TEM, SEM görüntüleri, hücre içine alımı analizleri, enterik kapsül için ise salım çalışmaları yapılmıştır.

Enterik kapsül içeriğindeki mesalazin ve eksozom içeren ve içermeyen liyofilize yağ içinde su emülsiyonunun toksisitesi MTT analiz yöntemi ile incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mezankimal kök hücre, Eksozom, Mesalazin, Mikroakışkan teknoloji, Ülseratif kolit

ABSTRACT

ENCAPSULATION OF MESALAZINE AND EXOSOME WITH MICROFLUIDIC-BASED SYSTEM FOR THE TREATMENT OF ULCERATIVE COLITIS

Ceyda KÖROĞLU ÖZMEN

Department of Pharmaceutical Biotechnology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2024

Supervisor: Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

This thesis aimed to develop an orally administered drug delivery system to reduce inflammation and increase regeneration in ulcerative colitis (UC), an inflammatory bowel disease characterized by inflammation and ulcers in the colon and rectum. For this purpose, mesalazine, a chemically active ingredient known to have topical anti-inflammatory effects especially on colonic epithelial cells, and exosomes (hWJ-MKH exo) obtained from human umbilical cord connective tissue (Wharton jelly) stem cells, known to have tissue regeneration and repair capacities, were encapsulated separately and in combination with a water-in-oil emulsion system created using a new system called droplet microfluidic method and were filled into enteric-coated capsules and lyophilized for targeting to the colon.

Characterization studies were carried out for the prepared system and for the mesalazine and exosomes in it. For mesalazine, an analytical method development and validation studies were conducted using UPLC, for exosomes that during and after their obtaining procedures and after its formulation TEM, SEM image studies, and cellular uptake analyses were performed, and for enteric capsules release studies were conducted.

Toxicity studies of the enteric capsule content forming by lyophilized oil-water emulsion and its forms containing mesalazine and exosome were investigated by MTT analysis method.

Keywords: Mesenchymal stem cell, Exosome, Mesalazine, Microfluidic technology, Ulcerative colitis

TEŞEKKÜRLER

Sadece tez çalışmamı yürüttüğüm bu süreçte değil hayatımın pek çok noktasında çalışmalarımın yanı sıra her türlü konuda desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli bilgilerini ve tecrübelerini sunan, benim için bir aile olan sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na, aklımdaki en ufak soru işaretinde her zaman varlığıyla bile beni güvende hissettiren, desteği, bilgisi ve ilgisiyle her zaman yanımda olan sevgili hocam Doç. Dr. Behiye ŞENEL'e,

Lisans eğitimimden geldiğim şu noktaya kadar mesleğime dair kazandığım bilgileri bana öğreten, mesleğimi bana sevdiren ve böyle bir bölümde yer aldığım için her gün mutlu olmama sebep olan tüm Eczacılık Teknolojisi Bölümü hocalarıma, Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL'e, Prof. Dr. Ebru BAŞARAN'a, Prof. Dr. Evrim AKYIL'a, Prof. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK'a, Doç. Dr. Ahmet Alper ÖZTÜRK'e,

Yüksek lisans tezim ve çalışma hayatıma başladığım andan itibaren laboratuvar çalışmalarım esnasında, bana bilimsel bilgilerini aktarmakla kalmayıp her zaman manevi destekleriyle yanımda olan çok değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Sinan ÖZER'e, Araş. Gör. Kadir AYKAÇ'a, Araş. Gör. Kaan YALÇINKAYA'ya,

Laboratuvar çalışmaları esnasında iyi bir çalışma arkadaşının ne kadar büyük bir şans olduğunu bana gösteren, her başım sıkıştığında sorunları çözebilmek için yanımda olan Ecz. Ömer Faruk KARACA'ya,

Tez çalışmam sırasında laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan ve bilimsel desteklerini esirgemeyen başta Prof. Dr. Ayla EKER SARIBOYACI'ya, Dr. Öğr. Üyesi Onur UYSAL'a, Dr. Öğr. Üyesi Sibel GÜNEŞ BAĞIŞ'a, Dr. Bahar DEMİR CEVİZLİDERE'ye, Dr. Burcugül ALTUĞ TASA'ya ve Uzm. Mol. Bio. Merve Nur SOYKAN'a olmak üzere tüm ESOGU-ESTEM ekibine,

Tez çalışmam esnasında yaptığım Flow Sitometri analizlerimdeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK'e, Taramalı Mikroskop Analizindeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Murat ERDEM'e

Doğduğum günden beri her zaman elimden tutarak beni daha ileriye taşıyan canım aileme; sevgili annem Hayriye KÖROĞLU'na, babam Atila KÖROĞLU'na, abim Vedat KÖROĞLU'na, ablam Pınar KÖROĞLU'na ve yeğenim Uygur KÖROĞLU'na,

Daha mutlu bir yaşamın mümkün olduğunu hayatıma girdiğinden beri bana her zaman kanıtlayan, her zaman yanımda olan en büyük destekçim eşim Mehmet Esat ÖZMEN'e,

Yüksek lisans tezimin TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2210-A Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında bana sağladıkları destek için TÜBİTAK kurumuna, **SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.**



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

.. / .. / 2024

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

.....

İmza

Ceyda KÖROĞLU ÖZMEN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜRLER	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	2
2.1. ÜLSERATİF KOLİT.....	2
2.1.1. Semptomları ve çeşitleri	2
2.1.2. Patofizyolojisi	3
2.1.3. Tedavi seçenekleri	4
2.1.4. Ülseratif için kullanılan yeni ilaç taşıyıcı sistemler	5
2.1.4.1. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler.....	6
2.1.4.1.1. Boyut aracılı hedefleme.....	6
2.1.4.1.2. Yüzey yükü hedefleme	7
2.1.4.1.3. Redox potansiyeline duyarlı hedefleme	7
2.1.4.1.4. pH duyarlı hedefleme	7
2.1.4.1.5. Ligand aracılı aktif hedefleme.....	8
2.1.4.1.6. Zaman duyarlı hedefleme	8
2.1.4.1.7. Ön ilaç (Prodrug) ile hedefleme	9
2.1.4.1.8. Polisakkarit matrisleri aracılığı ile hedefleme.....	9
2.2.MESALAZİN	9
2.3. MEZANKİMAL KÖK HÜCRELER VE EKSOZOMLAR	11
2.4. MİKROAKIŞKAN TEKNOLOJİSİ	17

3. GEREÇLER	21
3.1. KULLANILAN MADDELER	21
3.2. KULLANILAN CİHAZLAR	22
4.YÖNTEM.....	24
4.1. FORMÜLASYON GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI	24
4.1.1. <i>Mesalazin için analitik yöntem geliştirme</i>	24
4.1.1.3. Mesalazin için validasyon çalışmaları	25
4.1.1.3.1 Çalışma aralığı.....	25
4.1.1.3.2. Doğrusallık	26
4.1.1.3.3. Doğruluk.....	26
4.1.1.3.4. Kesinlik	26
4.1.1.3.5. Duyarlılık.....	27
4.1.1.3.6.. Seçicilik	27
4.1.2. <i>Eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu</i>	27
4.1.2.1. Etik bildirim	27
4.1.2.2. Wharton jeli kökenli mezankimal kök hücrelerin izolasyonu ve	
kültürü.....	28
4.1.2.3. Eksozom izolasyonu	29
4.1.2.4. Eksozomların karakterizasyonu	29
4.1.2.4.1. NanoDrop spektrofotometrisi ile eksozom protein miktar	
tayini.....	29
4.1.2.4.2. BCA Protein Assay Kit ile eksozom protein miktar tayini ..	29
4.1.2.4.3. Eksozom yüzey belirteçlerinin akış sitometrisi ile analizi ...	31
4.1.2.4.4. Eksozomların geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile	
karakterizasyonu	32
4.1.2.4.5. Eksozomların taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile	
karakterizasyonu	32
4.1.2.4.6. Nanopartikül izleme analizi (NTA).....	32
4.1.2.4.7. Zetasizer ile boyut analizi.....	33
4.1.3. <i>Mesalazin ve eksozom içeren formülasyonların geliştirilmesi</i>	33
4.1.3.1. Mesalazin içeren formülasyonun geliştirilmesi	33
4.1.3.2. Eksozom içeren formülasyonun geliştirilmesi	38

4.1.4. Mesalazin ve eksozom içeren formülasyonların karakterizasyonu ...	40
4.1.4.1. Fiziksel görünüm.....	40
4.1.4.2. Mesalazin içeren formülasyonların karakterizasyonu.....	40
4.1.4.2.1. Etkin madde miktar tayini	40
4.1.4.2.2. Etkin madde salım çalışması	42
4.1.4.3. Eksozom içeren formülasyonun karakterizasyonu	45
4.1.4.3.1. Eksozomların geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile karakterizasyonu	45
4.1.4.3.2. Eksozomların taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyonu	45
4.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI	45
4.2.1. Sitotoksite çalışması.....	45
4.2.2 Eksozomların hücre içine alınma analizi	47
5. BULGULAR VE YORUM.....	48
5.1.MESALAZİNE AİT ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRME VE VALIDASYON ÇALIŞMALARI.....	48
5.1.1. Analitik yöntem geliştirme	48
5.1.2. Validasyon çalışmaları	48
5.1.2.1. Doğrusallık.....	48
5.1.2.2. Doğruluk	49
5.1.2.3. Kesinlik	50
5.1.2.4. Duyarlılık	51
5.1.2.5. Seçicilik.....	51
5.2. KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI	52
5.2.1. Fiziksel görünüş.....	52
5.2.2. Mesalazin içeren formülasyonların karakterizasyonu	53
5.2.2.1. Etkin madde miktar tayini.....	53
5.2.2.1. Etkin madde salım çalışması.....	54
5.2.3. Eksozomların ve eksozom içeren formülasyonun karakterizasyonu..	56
5.2.3.1. Eksozomların total protein konsantrasyonunun belirlenmesi	56
5.2.3.1.1. NanoDrop Spektrofotometrisi ile protein miktar tayini	56
5.2.3.1.2. BCA Protein Assay Kit ile protein miltar tayini	56

5.2.3.2. Eksozom yüzey belirteçlerinin akış sitometrisi ile analizi.....	57
5.2.3.3. Eksozomların elektron mikroskopu ile karakterizasyonu.....	59
5.2.3.3.1. Eksozomların geçirimli elektron mikroskopu (TEM) ile karakterizasyonu	59
5.2.3.3.2. Eksozomların taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile karakterizasyonu	60
5.2.3.4. Eksozomların Partikül analizi	61
5.2.3.4.1. Nanopartikül izleme analizi (NTA).....	61
5.2.3.4.2. Zetasizer ile boyut analizi.....	63
5.2.4. Hücre kültürü çalışmaları	64
5.2.4.1. Sitotoksite çalışması	64
5.2.4.2. Eksozomların hücre içine alınma analizi	66
6. TARTIŞMA	68
6.1. ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRME VE VALİDASYON ÇALIŞMALARI	68
6.2. FORMÜLASYON GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI	68
6.3. KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI	71
6.3.1. Fiziksel görünüş.....	71
6.3.2. Etkin madde miktar tayini.....	71
6.3.3. Etkin madde salım çalışması	72
6.3.4. Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu.....	75
6.4. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI	77
7. SONUÇ.....	79
KAYNAKÇA	80
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Oral Uygulama Yoluyla FDA Tarafından Onaylanan Güncel İlaçlar ve Kullandığı Mekanizmalar	6
Tablo 4.1. UPLC çalışma koşulları	25
Tablo 4.2. 0.5-1 µg/mL konsantrasyonlarında BSA standardının hazırlanması.....	30
Tablo 4.3. 1-10 µg/mL konsantrasyonlarında BSA standardının hazırlanması.....	30
Tablo 4.4. Salım çalışması için kullanılan ortamlar.....	43
Tablo 4.5. Salım çalışması için kullanılan ortamların içerikleri	43
Tablo 4.6. Salım çalışmasında örnek alma saatleri	44
Tablo 5.1. Mesalazin doğrusallık sonuçları	49
Tablo 5.2. Mesalazin doğruluk çalışması sonuçları	50
Tablo 5.3. Mesalazinin kesinlik çalışması sonuçları	50
Tablo 5.4. Saptama ve tayin sınırları	51
Tablo 5.7. pH 3 ve pH 7.5 CMC çözeltisi kullanılarak hazırlanan kapsüllerde yapılan etkin madde miktar tayini ve konsantrasyon sonuçları	54
Tablo 5.6. pH3 CMC çözeltisi ile hazırlanan formülden zamana karşı salınan kümülatif Mesalazin miktarı	55
Tablo 5.7. pH7.5CMC çözeltisi ile hazırlanan formülden zamana karşı salınan kümülatif Mesalazin miktarı	55
Tablo 5.8. NTA analiz sonuçları	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Ülseratif kolit fenotipleri	2
Şekil 2.2. Sağlıklı durumda ve ülseratif kolitte bağırsak bağışıklık sistemine genel bakış.	3
Şekil 2.3. Kolonda tutulum derecelerine göre ÜK çeşitleri ve kullanılabilir mesalazin preperatları	5
Şekil 2.4. Kullanılan ön ilaç sistemleri.....	9
Şekil 2.5. Mesalazinin kolon mukozasında önerilen etki mekanizması.....	10
Şekil 2.6. Hücre dışı veziküllerin biyogenezi ve yapısı (eksozomlar ve mikro veziküller)	14
Şekil 2.7. Ülseratif kolitte mezankimal kök hücre eksozomlarının düzensiz bağışıklık sistemi bileşenleri üzerindeki modülatör etkisi.....	16
Şekil 2.8. Damlacık mikroakışkanlarının cihaz geometrileri. (a) Akış odaklı, (b) eş akış (c) T kavşağı geometrileri	18
Şekil 4.1. 15 mg mesalazin 5 mL distile su ile hazırlanmış karışımının elastik boruya çöküşü.....	34
Şekil 4.2. CMC içeren çözeltilerinde hazırlanmış mesalazin süspansiyonları (soldan sağa % 1, % 2, % 3, % 5).....	34
Şekil 4.3. Sirkülasyonlu su banyosu ile oluşturulan ısıtıcı düzenek	35
Şekil 4.4. Hazırlanan ısıtıcı düzeneğin şırınga pompasındaki kullanımı	35
Şekil 4.5. Mikroakışkan çip ile oluşturulmuş sistem	36
Şekil 4.6. Emülsiyon oluşturmak için kullanılan PDMS çip.....	36
Şekil 4.7. İki fazın da 48 µL/dk olarak verildiğinde oluşan damlacıkların ışık mikroskobu görüntüsü (40X).....	37
Şekil 4.8. Oluşan damlacıkların kakao yağı donduktan sonraki ışık mikroskobu görüntüsü (40X).....	37
Şekil 4.9. 15 mg/mL mannitol içeren su fazı ile oluşturulan damlacıkların ışık mikroskobu görüntüsü (40X).....	39
Şekil 4.10. Kapsülünden soyulan formülasyonun görünümü	41
Şekil 4.11. Salım çalışması ve etkin madde miktar tayini deney düzeneği	42
Şekil 4.12. Etkin madde tayini için oluşturulan sistem	42
Şekil 4.13. Mesalazin madde miktar tayini ve salım çalışması için kullanılan düzenek..	44
Şekil 5.1. Mesalazine ait kromatogram piki	48

Şekil 5.2. Doğrusallık Eğrisi	49
Şekil 5.3. UPLC kromatogramları	52
Şekil 5.4. Mesalazin içeren kapsül içeriğine ait ışık mikroskobu görüntüleri	52
Şekil 5.5. Eksozom içeren kapsül içeriğine ait ışık mikroskobu görüntüleri	53
Şekil 5.6. Mesalazin ve eksozom içeren kapsül içeriğine ait karşılaştırmalı ışık mikroskop görüntüleri	53
Şekil 5.7. pH 7.5 CMC ve pH 3 CMC çözeltisi ile hazırlanmış formüllerden Mesalazinin salım grafiği.....	56
Şekil 5.8. BCA kiti doğrusallık eğrisi (0.5-1 µg/mL)	57
Şekil 5.9. BCA kiti doğrusallık eğrisi (1-10 µg/mL)	57
Şekil 5.10. hWJ-MKH'lerden izole edilmiş eksozomların flow sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonu (CD9 yüzey belirteci için)	58
Şekil 5.11. hWJ-MKH'lerden izole edilmiş eksozomların flow sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonu (CD81 yüzey belirteci için).....	58
Şekil 5.12. hWJ-MKH'lerden elde edilen eksozom süspansiyonu TEM görüntüsü.....	59
Şekil 5.13. hWJ-MKH'lerden elde edilen eksozomlarla yapılan formülasyonun dissolüsyon ortamından elde edilen süspansiyonun TEM görüntüsü	60
Şekil 5.14. hWJ-MKH'lerden elde edilen eksozomların SEM görüntüsü	60
Şekil 5.15. Kakao yağı kristalleri üzerinde yer alan eksozomların SEM görüntüsü.....	61
Şekil 5.16. Kakao yağı kristalleri üzerinde yer alan eksozomların SEM görüntüsü ve boyutu.....	61
Şekil 5.17. Eksozomlara ait Konsantrasyon / Boyut Grafiği	62
Şekil 5.18. Eksozomlara ait Ortalama konsantrasyon / Boyut Grafiği	62
Şekil 5.19. Yoğunluk / Boyut grafiği	63
Şekil 5.20. Zetasizer ile eksozomların boyut analizi grafiği.....	64
Şekil 5.21. Mesalazin ve mesalazin içeren formüllerin uygulandığı hücrelerin canlılığı.....	64
Şekil 5.22. Eksozom ve eksozom içeren formüllerin uygulandığı hücrelerin canlılığı....	65
Şekil 5.23. FITC işaretli siRNA içeren eksozomların hücre içine alınma mikroskop görüntüleri.....	66
Şekil 5.24. PKH26 boyası ile boyanan eksozomların hücre içine alınmasını gösteren mikroskop görüntüsü.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

5-ASA	5 Aminosalisilik asit
Ampl	Amplitude
BCA	Bikinkoninik asit
BSA	Bovin serum albümini
CMC	Karboksi Metil Selüloz
DCM	Diklorometan
Exo	Eksozom
FBS	Fetal bovin serum
hWJ-MKH exo	İnsan Wharton jeli mezankimal kök hücresi
IL	İnterlökin
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu
KLN	Katı Lipid Nanopartikül
LOD	Saptama Sınırı
LOQ	Tayin Sınırı
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür)
NTA	Nanopartikül izleme analizi
PBS	Fosfat tamponu
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SH	Standart Hata
SS	Standart Sapma
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
Th	T Helper
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
UPLC	Ultra Basıncılı/Performans Sıvı Kromatografisi
USP	Amerikan Farmakopesi
ÜK	Ülseratif kolit

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Ülseratif kolit, kolon ve rektumda iltihaplanma ve ülserler ile karakterize kronik idiyopatik inflamatuvar bağırsak hastalığıdır.

Mezenkimal kök hücre tedavisi, mezankimal kök hücrelerin güçlü immünomodülasyon ve doku rejenerasyonu ve onarımı kapasiteleri nedeniyle, ülseratif kolit gibi aşırı immün yanıtı hastalıklar için yeni bir tedavi stratejisi olarak gündemdedir. Mevcut bilgilere göre, mezenkimal kök hücrelerin terapötik etkinliğine büyük ölçüde, hücre dışı veziküllerin (EV'ler) aracılık ettiği bulunmuştur. EV olarak da ifade edilen eksozomlar, mezenkimal kök hücrenin direkt nakli ile ilişkili riskleri azaltmanın yanı sıra, içerikleri nedeniyle biyolojik tedavide yeni bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır.

Mesalazin, hafif ila orta dereceli ülseratif kolitli hastalar için birinci basamak tedavi olan bir 5-aminosalisilik asit bileşiğidir. Kolon epitel hücreleri üzerinde topikal bir anti-enflamatuvar etkiye sahip olduğu ve terapötik aktivitesinin enflamatuvar yolların inhibisyonuna bağlı olabileceği düşünülmektedir. Topikal etkisinden dolayı temel amaç, etkilenen kolona ilaç dağıtımını optimize etmek ve sistemik absorpsiyonu en aza indirmektir.

Damlacık mikroakışkan sistemleri, mikrokanallar içindeki karışmaz çok fazlı akışlar yoluyla ayrı damlacıklar üretir. Bu sayede kapsüllenmek istenen her türlü materyal, materyalin bozunmasına sebep olabilecek her türlü fiziksel ve kimyasal dış etmenlerden uzak bir şekilde kapsüllenebilir.

Bu tez kapsamında hastalık kaynaklı oluşan enflamasyonu tedavi etmek için mikroakışkan teknolojisi kullanılarak hazırlanan insan göbek kordonu kaynaklı mezankimal kök hücre eksozomları ve kimyasal kaynaklı bir antienflamatuvar olan mesalazini içeren yağ içinde su emülsiyonunun enterik kaplı kapsüllere doldurularak hazırlanmıştır. Enterik kapsüller sayesinde geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemin kolona ulaşmasının sağlanması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1. Ülseratif Kolit

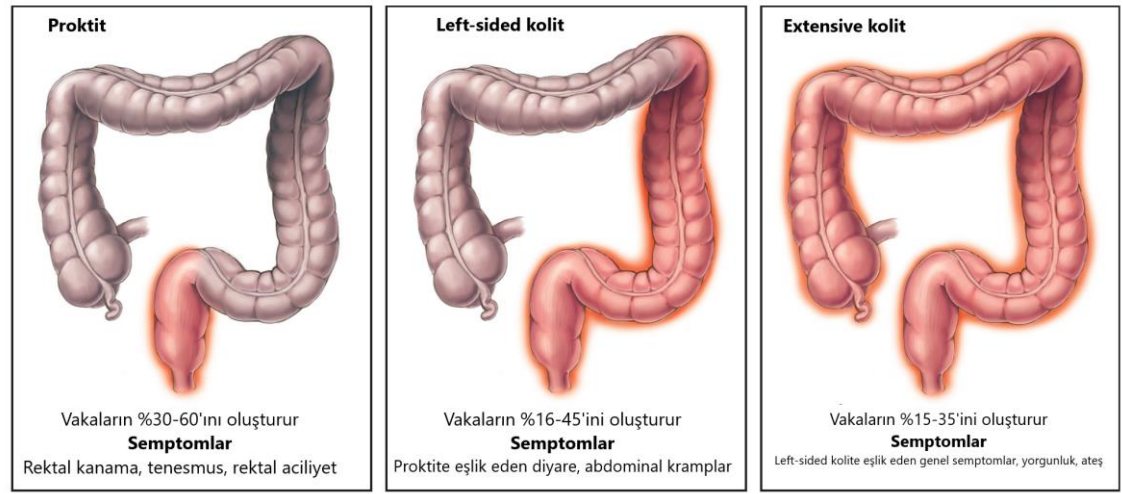
Ülseratif kolit, etiyolojisi ve patogenezi henüz tam olarak anlaşılamayan, multifaktöriyel kökenli, kolonu etkileyen bir kronik inflamatuvar bağırsak hastalığıdır (Karagozian vd., 2007; Kucharzik vd., 2020; Ungaro vd., 2017).

Ülseratif kolit kolonu ve rektumun en iç tabakası olan mukozayı etkiler, sürekli iltihaplanma ve ülserasyon alanları olarak ortaya çıkar (Head & Jurenka, t.y.; Ungaro vd., 2019) .

2.1.1. Semptomları ve çeşitleri

Ülseratif kolit, kolonu rektumdan çekuma kadar uzanan değişken boyutlarda etkileyebilir ve kolonik tutunumun boyutu klinik olarak önemlidir (Gajendran vd., 2019; Torres vd., 2012).

Kolonun yalnızca en distal kısmı olan rektumun enflamasyonuna ülseratif proktit; rektum, sigmoid ve çıkan kolonun enflamasyonuna “left sided” kolit; tüm kolonun enflamasyonuna “extensive” kolit denir (Bkz. Şekil 2.1) (Head & Jurenka, t.y.; Karagozian vd., 2007; Satsangi vd., 2006).



Şekil 2.1. Ülseratif kolit fenotipleri (Ungaro vd., 2017)

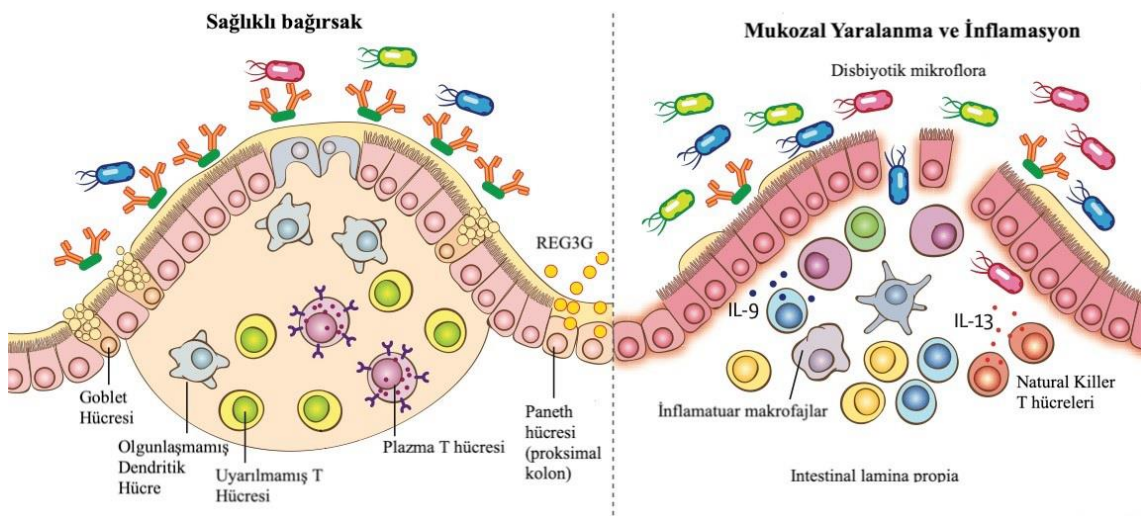
Ülseratif kolit, sessiz başlangıçlı olabileceği gibi, semptomların kademeli olarak başlamasıyla veya atak akut başlangıçlı da olabilir (Gajendran vd. Hastalığın hafif semptomları arasında dışkılama isteğinde artış, karın krampları ve ishal yer alır. Hastalık hafiften ağıra doğru ilerledikçe, hasta ayrıca kilo kaybı, yorgunluk, besin eksikliklerine yol açabilen iştahsızlık, dışkıda mukus, şiddetli rektal kanama, ateş ve anemi yaşayabilir

(Carter vd., t.y.; Gajendran vd., t.y.; Langan vd., t.y.; Ungaro vd., 2017) . Ülseratif kolitin klasik belirtileri, mukuslu veya mukussuz kanlı ishal, rektal aciliyet, tenesmus ve genellikle dışkılama ile rahatlayan değişken derecelerde karın ağrısını içerir (Gajendran vd.). Kolon tutulumunun boyutu, her zaman olmasa da genellikle hasta tarafından sergilenen semptomatolojinin derecesine göre tahmin edilebilir; daha şiddetli semptomlar genellikle pankolit ile ilişkilidir (Karagozian & Burakoff, 2007; Langan vd., t.y.; Ungaro vd., 2019).

2.1.2. Patofizyolojisi

Ülseratif kolitin patofizyolojisindeki genel prensip, normal bağışıklık sisteminin, uzun süreli mukozal inflamatuvar yanıtı yol açan antijenik bir tetikleyiciye karşı düzensizliğidir (Karagozian et al., 2007).

Sağlıklı durumda ve ülseratif kolit sırasında bağırsak bağışıklık sistemine genel bakış Şekil 2.2'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Sağlıklı durumda ve ülseratif kolitte bağırsak bağışıklık sistemine genel bakış (Ungaro vd., 2017)

Sağlıklı bireylerde, gastrointestinal sistemin bariyer işlevi, mukus tabakası ve epitel hücreleri tarafından korunur. Mukozanın epitel olarak bilinen en dış tabakası, ilk savunma hattını sağlayan kalın bir mün tabakası ile kaplıdır. Ek olarak IgA ve Reg3G (Regenerating islet-derived protein 3 gamma) gibi antimikrobiyal faktörler luminal mikroflorayı mukozal bağışıklık sisteminden uzaklaştırır. Dendritik hücreler (DH) gibi özelleşmiş antijen sunan hücreler, antijeni, lenf düğümleri içindeki T ve B hücrelerine işler ve sunar; bu, toleranslı bir fenotipe dönüşür. Doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık

hücrelerinin koordineli aktivitesi, bağırsak mukozasında kararlı durumdaki homeostazı korur (Torres vd., 2012; Ungaro vd., 2017).

Ülseratif kolit, mukozal bariyerin (iç kısım) hasar görmesi ile ilişkilidir ve sürekli engellenmemiş bir inflamatuvar yanıtın tetiklemesi sonucunda oluşur (Ungaro vd., 2017). Epiteldeki hasar, mukozanın patojenlere karşı geçirgenliğinin artmasına yol açar, bu da bu antijenlerin alımının artmasına ve bağırsak bağışıklık sisteminin potansiyel uyarılmasının artmasına neden olur (Heller vd., 2005). Bağışıklık sisteminde meydana gelen bu aktivasyon duyarlılıkta artışa neden olur. Artışta dendritik hücrelerin önemli rolü bulunur (Torres vd., 2012). Oluşan inflamatuvar basamaklar, başta tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), interlökinler (IL) 12 ve 23 olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin üretimiyle sonuçlanır (Eckmann vd., 2012). Sitokinler de epitel hasarına katkıda bulunur. ÜK ayrıca, düzenleyici T hücreleri ile efektör T hücreleri, özellikle efektör T-yardımcı (Th) 2 hücreleri arasındaki dengesizlik ile adaptif bağışıklık sisteminin düzensizliği ile de karakterize edilir. Th2 yanıtı, kolondaki doğal öldürücü T hücrelerini aktive eder; bu hücreler, stimülasyonu takiben epitelyal hücrelerin apoptozunu indükleyen ve sıkı bağlantıları kesintiye uğratan IL-13 de dahil olmak üzere bir dizi sitokin salgılar (Heller vd., 2005). Dolaşımdaki lökositler de iltihaplı mukozaya toplanır, inflamatuvar yanıtı daha da güçlendirmektedir (Torres vd., 2012).

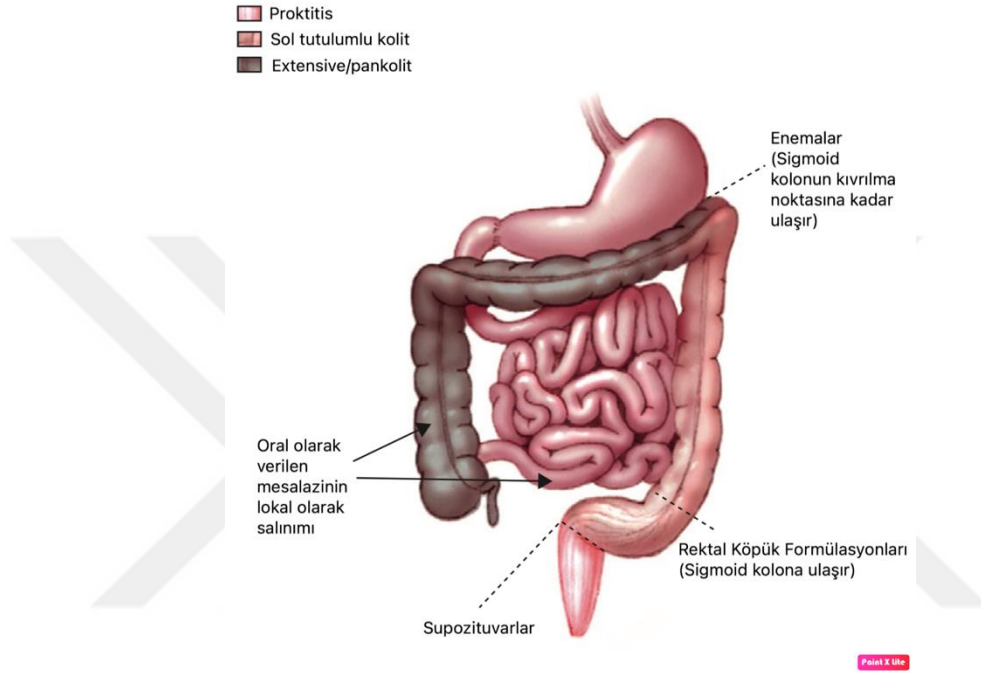
Mukozal hasar ve hasar disbiyoz ile ilişkilidir, bu da belki de inflamatuvar kaskadına katkıda bulunur. Kolon epitel hücreleri (kolonositler), mukoza bariyeri ve epitel bariyer kusurları, ülseratif kolitin patogenezinde güçlü bir şekilde rol oynar (Ungaro vd., 2017).

2.1.3. Tedavi seçenekleri

Ülseratif kolitin tedavi hedefi klinik remisyonun sağlanması ve sürdürülmesi, semptomatik tedavi, yaşam kalitesinin iyileştirilmesi, hastane yatışlarının önlenmesidir (Eckmann vd., 2012; Ungaro vd., 2017; Yasmin vd., 2022). Ülseratif kolit tedavileri arasında monoklonal antikor gibi biyolojik kaynaklı tedaviler (adalimumab, infliximab, vedolizumab, golimumab, ustekinumab), kortikosteroidler, azatiyoprin veya 6-merkaptopurin ve 5-aminosalisilik asitler (5-ASA; mesalazin olarak da bilinir) yer alabilir. Hafif ila orta derecede ülseratif koliti olan hastalar için, 5-ASA'lar ve kortikosteroidler, remisyonun başlatılması için standart tedavidir (Guo vd., 2022; Sutherland & MacDonald, 2006a). İlk basamak tedavisi olarak özellikle hafif ila orta dereceli ülseratif kolitlerde aminosalisilatlar kullanılır fakat tedavi yaklaşımı

semptomların şiddetine ve kolonun tutulum derecesine bağlı olarak değişebilir (Karagozian vd., 2007; Ungaro vd., 2017). Ülseratif kolit tedavisi temel olarak bir aminosalisilat olan mesalazin, kortikosteroidler, immünsüpresif ilaçlar ve TNF- α 'ya karşı monoklonal antikorlardan oluşur (Eckmann vd., 2012).

Kolonda tutulum derecelerine göre kullanılabilen farklı salım özelliklerine sahip farklı formülasyonları Şekil 2.3'de şematik olarak gösterilmiştir (Eckmann vd., 2012).



Şekil 2.3. Kolonda tutulum derecelerine göre ÜK çeşitleri ve kullanılabilir mesalazin preparatları

2.1.4. Ülseratif için kullanılan yeni ilaç taşıyıcı sistemler

Ülseratif kolit tedavisinde geleneksel olarak başta oral olmak üzere parenteral ve rektal dozaj uygulama yolları kullanılır (Bkz. Tablo 2.1) (Lautenschläger vd., 2014). Ancak özellikle oral yolla verişlerde, sistemik ilaç reaksiyonları ve degradasyonu, ilacın hedef bölgesine ulaşma oranındaki düşüklük gibi sorunlarla karşılaşılır (Yasmin vd., 2022). Aynı zamanda hastalıklı kolonda iltahaplı bölgelerin değişken ve aralıklı olması, salınan etkin maddelerin sağlıklı ve iltahaplı mukozal duvardan sistematik dolaşıma emilmesiyle oluşan sistematik ilaç reaksiyonlarına ve yalnızca etkilenen bir gastrointestinal bölüme ilaç dağıtımının yapılamamasına (Lautenschläger vd., 2014) neden olabilir. Ayrıca, ilacın bağırsak hareketliliği, zaman, pH ve mikrobiyal ve enzimatik bozunma gibi kararsız parametrelerle karşılaşması gibi durumlar (Singh vd., 2015), bu standart tedavi yöntemlerini yetersiz hale getirmiştir (Yasmin vd., 2022). Terapötik etkinliği ve olumsuz yan etki riskini dengelemek, hedef dokulara lokal bir

dağıtım sağlamak, ilacın biyoyararlanımını arttırmak ve hastanın uyumunu artırarak ilaç alım sıklığını azaltmak için yeni ilaç taşıyıcı sistemler araştırılmaktadır (Yasmin et al., 2022).

Tablo 2.1. *Oral Uygulama Yoluyla FDA Tarafından Onaylanan Güncel İlaçlar ve Kullandığı Mekanizmalar (M. Zhang & Merlin, 2018)*

Etkin madde	Marka	Formülasyon	Mekanizmalar
Aminosalisilat (5-ASA)	Azulfidine	5-ASA, azo bağıyla Sülfapiridine bağlı	Enzimatik indirgeme
	Asacol	Eudragit-S ile kaplanmış 5-ASA	pH duyarlı
	Asacol HD	Eudragit-S ile kaplanmış 5-ASA	pH duyarlı
	Apriso	Eudragit-L100 ile kaplanmış 5-ASA, poliakrilat dispersiyonu, povidon K, simetikon	pH duyarlı
	Colazal	5-ASA, 4-aminobenzoil-β-alanin'e azo bağıyla bağlı	Enzimatik indirgeme
	Colazide	5-ASA, 4-aminobenzoil-β-alanin'e azo bağıyla bağlı	Enzimatik indirgeme
	Claversal	Eudragit-L ile kaplanmış 5-ASA	pH duyarlı
	Calitoflak	Eudragit-L100 ile kaplanmış 5-ASA	pH duyarlı
	CODES	pH'a duyarlı polimer kaplamayla birleştirilmiş polisakkarit kaplama	pH'a duyarlı + bakteri tarafından bozulma
	Dipentum	Azo bağıyla bağlanan 5-ASA dimer	Enzimatik indirgeme
	Lialda	Lipofilik ve hidrofilik matrislere sahip Multi Matix sistemi ile kaplanmış 5-ASA	pH'a duyarlı + zaman gecikmeli
	Mezevant	Lipofilik ve hidrofilik matrislere sahip Multi Matix sistemi ile kaplanmış 5-ASA	pH'a duyarlı + zaman gecikmeli
	Pentasa	Etilselülozla kaplanmış 5-ASA mikrogranülleri	Zamana bağlı
	Salazopyrin	5-ASA, azo bağıyla Sülfapiridine bağlı	Enzimatik indirgeme
Budesonide	Salofalk	Eudragit-L ile kaplanmış 5-ASA	pH duyarlı
	SalofalkGranu-Stix	Eudragit-L100 ile kaplanmış 5-ASA, poliakrilat dispersiyonu, povidon K, simetikon	pH duyarlı
Budesonide	Entocord EC	Etil selüloz matrisli Eudragit-L kaplı boncuklar	pH'a duyarlı + zamana bağlı (time-dependent)
	Uceris	Eudragit-S içeren bir matris çekirdeği içeren çoklu Matris sistemi	pH'a duyarlı + zaman gecikmeli (time-delayed)
Beclometazon	Clipper	Eudtagit-L 100-55 kaplı tablet	pH duyarlı

2.1.4.1. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler

2.1.4.1.1. Boyut aracılı hedefleme

Enflamasyon esnasında, enflamasyonlu bölgelere nanopartiküllerin geçişinin arttırıcı etkisi (EPR-enhanced permeability and retention) gözlenir (Tolstanova vd., 2012). Ayrıca, hastalıklı bölgede artan mukus salgısı kalın bir mukus tabakasına yol açar ve 10-200 nm boyutları arasında değişen mukoza lifi ağları nanopartiküllerin tutulmasını kolaylaştırır (Yasmin vd., 2022).

Yapılan bir çalışmada, sağlıklı ve inflamatuvar bağırsak hastalığına sahip insan deneklerde 250 nm ve 3 nm boyutunda floresan etiketli PLGA nanopartiküllerinin rektal mukozaya penetrasyonu araştırıldığında; mukozal yüzeyde önemli ölçüde daha fazla 3

nm'lik partiküllerin biriktiğini, 250 nm'lik partiküllerin çoğunun ise serozal yüzeye taşındığı gösterilmiştir (Schmidt vd., 2013).

2.1.4.1.2. Yüzey yükü hedefleme

Kolon mukozası, negatif yüklü karbonhidrat molekülleri, sülfatlar, sialik asit ve kolonik müsinlerden oluşur (Yasmin vd., 2022).

Ülseratif kolit esnasında kolon mukozasının inflamatuvar süreci esnasında epitel hasar görür ve epitel yüzeyinde transferrin, eozinofil katyonik proteinler gibi pozitif yüklü proteinler birikir (Antoni vd., 2014). Bu, negatif yüzey yüküne sahip nanopartiküllerin, elektrostatik etkileşim nedeniyle pozitif yüklü mukozal yüzeye yapışmasını sağlar (Yasmin vd., 2022).

Jubeh vd.(2004), kolite sahip sıçanlardan alınan sağlıklı ve iltihaplı kolon eksplantlarında anyonik, nötr ve katyonik lipozomların çeşitli yapışmasını araştırdılar. Anyonik lipozomların iltihaplı mukozaya yapışma olasılığının nötr veya katyonik lipozomlara göre 2 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Sağlıklı kolonik mukozada katyonik lipozomlar, nötr veya anyonik lipozomlardan 3 kat daha yüksek olan tercihli bağlanma sergilemiştir.

2.1.4.1.3. Redox potansiyeline duyarlı hedefleme

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile antioksidan savunma sistemlerindeki azalma arasındaki dengesizlik olarak tanımlanmıştır (Yasmin vd., 2022).

Endojen reaktif oksijen türlerinin (ROS), oksijenin fizyolojik metabolizması nedeniyle üretilir. Ülseratif kolit hastalarında, inflamasyon bölgesinde ROS üretiminde artış gözlenir. Bu artış bağırsak mukozasında bulunan nötrofiller ve makrofajlar gibi inflamatuvar hücrelerin yüksek miktarda salgılanmasından kaynaklanmaktadır (Yasmin vd., 2022; M. Zhang & Merlin, 2018).

Vong vd (2012), iltihaplı bağırsak bölgelerindeki ROS'u tüketen ve böylece iltihabı azaltan nitroksit radikallerinden (RNPO) oluşan NP'ler geliştirdiler. Bir hafta boyunca oral RNPO ile tedavi edilen fare grubu, mesalazin uygulanan gruba kıyasla hastalık aktivitesinde azalma gösterdi.

2.1.4.1.4. pH duyarlı hedefleme

pH duyarlı hedefleme sistemleri, hazırlanan nanopartiküllerin mide ve ince bağırsakta yaygın olan asidik koşullar altında kargolarını tutmasına ve korumasını sağlayarak, kolonun daha yüksek pH'lı ortamında ilacın salınmasına olanak tanıyabilir (Gugulothu

vd., 2014). Aynı zamanda uygulanan enterik kaplama etkin maddeleri asitlik faktörünün dışında safra asitleri mikrobiyal bozunma gibi çevresel diğer etmenlere karşı da korur (Lautenschläger vd., 2014).

pH'a duyarlı nanopartiküller, düşük pH'ta çözünmeyen yüksek pH değerlerinde çözünen ve/veya şişen akrilatlar ve anyonik polimerler gibi malzemelerden yapılmıştır örneğin (metakrilik asit kopolimerleri (Eudragit)) (M. Zhang & Merlin, 2018).

Piyasada pH'a duyarlı polimerlerle kaplanmış 5-ASA'nın peroral dozaj formları bulunmaktadır (Claversal®, Salofalk®, Asacol® ve Pentasa®) (Lautenschläger vd., 2014)

Makhlof vd (2009), poli-(laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) ve Eudragit S100 kullanılarak hazırlanan budesonid ile yüklenen pH'a duyarlı nanopartiküller, kolit modeline sahip hayvanlarda yapılan deneylerde, budesonid yüklü nanopartiküllerin formüle edilmemiş budesonidden daha fazla terapötik etkinliğe sahip olduğunu gösterdi.

2.1.4.1.5. Ligand aracılı aktif hedefleme

Hücre yüzeyinde inflamatuvar belirteçlerin aşırı ekspresyonu, NP'lerin sabitlenmesi ve reseptör aracılı endositoz ile alınabilmesi için moleküler hedefler sağlar (Yasmin vd., 2022; M. Zhang & Merlin, 2018)

Örneğin, glikoprotein CD98'in ekspresyonu, ÜK'nin iltihaplı durumunda kolonik epitel hücrelerinde ve bağışıklık hücrelerinde (örn. makrofaj hücreleri) artar (Yasmin vd., 2022; M. Zhang & Merlin, 2018).

Xiao vd (2014), CD98 Fab antikorları taşıyan PLA NP'ler ve CD98 antikoru ile modifiye edilmiş kitosan/polietilenimin NP'leri geliştirip bu nanopartikülleri kolitli fareler üzerine uygulamışlar ve koliti tedavi etmek için ligandla modifiye edilmiş sistemlerin umut vadecici olduklarını göstermişlerdir.

2.1.4.1.6. Zaman duyarlı hedefleme

Zamana duyarlı hedefleme yapan salım sistemleri, sirkadiyen ritim bağımlı tedaviler veya kolonik ilaç dağıtımı için kullanılabilir. Gastrointestinal sistemin pH'ındaki bireysel farklılıklardan veya bağırsak bakterilerinin varlığından etkilenmeyen bu sistemler, ilaçlarını şişme, ozmoz veya her ikisinin kombinasyonu gibi farklı mekanizmalar kullanılarak sağlanabilir (Lautenschläger vd., 2014).

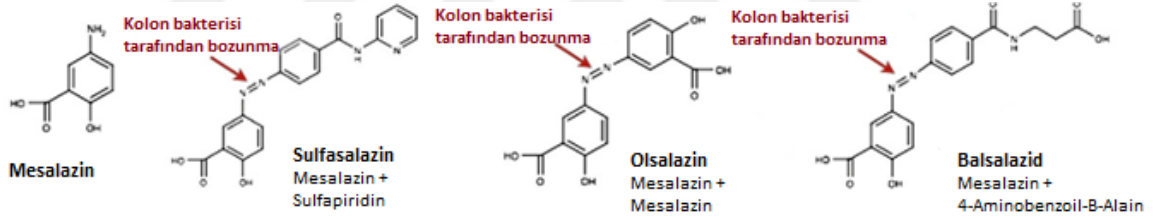
TIME CLOCK®, 5-ASA içeren piyasada yer alan distal bağırsak veya iltihaplı kolona zamana bağlı salım yapabilen ilaç taşıyıcı sistemdir. TIME CLOCK® sistemi, hidrofobik

malzeme ve yüzey aktif madde dispersiyonu ile kaplanmış bir tablet çekirdeğinden oluşur. Dispersiyon, filmin kalınlığıyla orantılı bir sürede sulu bir ortamda yeniden hidratlanma ve yeniden dağılma kapasitesini korur (Pozzi vd., 1994).

2.1.4.1.7. Ön ilaç (Prodrug) ile hedefleme

İlaç dağıtımına yönelik diğer bir strateji, aktif ajanların istenen bağırsak bölümlerine salınması için in vivo biyotransformasyon gerektiren, farmakolojik olarak aktif olmayan bileşikler olarak ön ilaçların sentezidir (Lautenschläger vd., 2014). Ön ilaç sistemlerinde, etkin madde, hedef dokulardaki enzimlere maruz kaldığında biyoaktivite kazanan, geçici olarak aktif olmayan bir formda korunur (Yasmin vd., 2022). Ön ilaç yaklaşımı, etkin madde ve taşıyıcı moleküller arasında kovalent bir bağlantı olması sonucunda ön ilaç formunun midede, jejunumda ve ileumda açılmayıp kolonda açılması esastır (Lautenschläger vd., 2014).

Kolona seçici dağıtım için ön ilaç olarak çeşitli 5-ASA'nın azo konjugatları formülasyonları kullanılmıştır, örneğin sülfasalazin, olsalazin ve balsalaziddir (Bkz. Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Kullanılan ön ilaç sistemleri

2.1.4.1.8. Polisakkarit matrisleri aracılığı ile hedefleme

Amiloz, guar zımkı, pektin, kitosan, inülin, siklodekstrinler, kondroitin sülfat, dekstranlar ve keçiyoynuzu zımkı gibi polisakkaritler mide ve ince bağırsağın fizyolojik ortamında stabil kalır. Polisakkarit matrislerinin bozunmasına kolonik bakteri florası neden olur, dolayısıyla ilacın salınımı yalnızca kolonda dağıtım için sağlanır (Lautenschläger vd., 2014).

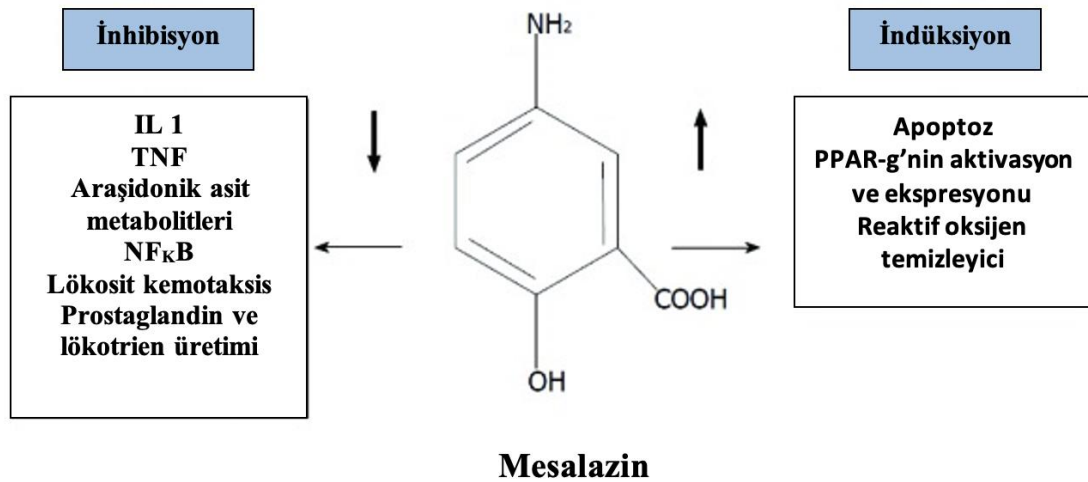
2.2.Mesalazin

ÜK'li hastalar için tedavi, klinik yanıt ve remisyon sağlamak için kullanılan ajanlar (indüksiyon ajanları) ve klinik remisyonu sürdürmek için kullanılan ajanlar (idame ajanları) olarak ikiye ayrılır; ancak bazı ajanlar her iki durum için de kullanılabilir.

ÜK'nin bilinen bir 'tedavisi' olmadığından çoğu hasta, hastalığın tekrarını önlemek için idame tıbbi tedavisini alır (Ham & Moss, 2012).

ÜK'li hastalar için önerilen tedavinin türü ve formülasyonu hem hastalığın konumuna hem de ciddiyet derecesine bağlıdır (Karagozian vd., 2007). Topikal tedavilerin başarılı olamadığı ilerlemiş ÜK için ABD ve Avrupa profesyonel kuruluşları mesalazin, hidrokortizon veya budesonid ile tedaviyi önermektedir (EBSCOhost | 16017261 | *Ulcerative Colitis Practice Guidelines in Adults.*, t.y.). Tüm ÜK hastalarının % 88'inden fazlası 5-ASA ile tedavi görmektedir (Ham & Moss, 2012).

Mesalazin, ÜK'nin indüksiyon ve idame tedavisinde kullanılan 5-aminosalisilik asit bileşiği (5-aminosalisilat veya 5-ASA) bileşiğidir (Ham & Moss, 2012; Ye & Langenberg, 2015). Beyaz toz görünümünde ve kristal yapıdadır. Suda, alkolde az çözünür; sıcak suda ve asidik ortamda ise çözünürlüğü artar. Mesalazinin ÜK'deki etki mekanizması belirsizdir, ancak topikal bir etkiye sahip olduğu görülmektedir. 5-ASA'nın hasarlı epitel ile etkileşime girdiğine, asetil-5-ASA'ya (aktif olmayan asetillenmiş form) dönüştürüldüğüne ve daha sonra emilip idrarla veya dışkıyla atıldığına inanılmaktadır. 5-ASA'nın önerilen başka bir etki mekanizması, periferik mono nükleer hücrelerde IL-2 üretiminin inhibisyonu ve dolayısıyla T hücresi çoğalmasının engellenmesi, hücre yapışma ekspresyon modelinin değiştirilmesi, antikor üretiminin ve mast hücre salınımının engellenmesi ve makrofaj ve nötrofile müdahale edilmesidir (Bkz. Şekil 2.5) (Ham & Moss, 2012; Ye & Langenberg, 2015).



Şekil 2.5. Mesalazinin kolon mukozasında önerilen etki mekanizması. IL: İnterlökin; NF κ B: Nükleer faktör κ B; PPAR: Peroksizom proliferatif aktive edilmiş reseptör; TNF: Tümör nekroz faktörü. (Ye et al., n.d.)

Ülseratif kolit için yapılan bir çalışmada, sekiz çalışma (1555 katılımcı), plaseboya kıyasla oral 5-aminosalisilik asidin etkinliğini değerlendirilmiştir. Çalışmalar, oral 5-aminosalisilik asidin klinik veya endoskopik remisyonu sürdürmede plasebodan daha etkili olduğunu göstermiştir (Sutherland & MacDonald, 2006b).

Değiştirilmemiş formdaki oral mesalazin, neredeyse tamamen ince bağırsaklar tarafından emilir ve çok az bozulmamış ilaç kolona ulaşır. Bu nedenle, şu anda piyasada bulunan çeşitli formülasyonların temel amacı, etkilenen kolona ilaç dağıtımını optimize etmek ve sistemik absorpsiyonu en aza indirmektir. Bu, mümkün olan en düşük dozda maksimum terapötik etkinliği sağlayarak yan etkilerin azaltır (Ye vd., t.y.).

Mesalazin, oral uygulamadan sonra bağırsakta metabolize edilen ve baskın etkilerini burada gösteren bağırsaklara özgü bir aminosalisilatıdır. Kolon epitel hücreleri üzerinde topikal bir anti-enflamatuar etkiye sahip olduğundan, daha az yan etkiye sahiptir. Mesalazin'in terapötik aktivitesinin lipoksijenaz veya birkaç enflamatuar aracının inhibisyonuna bağlı olabileceği düşünülmektedir. Mesalazin'in en yaygın yan etkileri gastrointestinal ilişkili veya aşırı duyarlılık reaksiyonlarıdır (Lee vd., t.y.).

Mesalazinin etkinliğinin doza bağımlı olduğu düşünüldüğünde, hafif-orta distal aktif hastalık için 4,8 g/gün ve idame tedavisi için 2,4 g/gün optimal dozlar olarak gösterilmiştir. Günde 4,8 g mesalazin ile tedavi edilen orta derecede aktif ülseratif koliti olan hastalarda, günde 2,4 g mesalazin ile tedavi edilen hastalara kıyasla 6. haftada genel iyileşme elde etme olasılığı önemli ölçüde daha yüksektir (Karagozian & Burakoff, 2007).

2.3. Mezankimal Kök Hücreler ve Eksozomlar

Çok hücreli organizmalardaki hücrelerin hem kendi içinde hem de hücreler arasındaki görevlerini gerçekleştirebilmeleri için mesafeye bağlı olarak hücrelerarası iletişimden yararlanırlar. Bu iletişim araçlarında salgılanan çeşitli veziküller ve moleküller bu iletişimde ön planda yer almaktadır (Akbari vd., t.y.; Yamashita vd., 2018). Hücreler, hücre dışı veziküller (ekstraselüler vesiküller; EV) veya mikro-veziküller olarak adlandırılan endozomal ve plazma zarı kökenli zarla çevirili vezikül tiplerini hücre dışı ortama hücreler arası iletişim için salarlar (Raposo vd., t.y.). Bu hücre dışı veziküller, hücreler arasında transfer için araçlar olarak hizmet ederek önemli bir hücreler arası iletişim aracını temsil eder (Raposo vd., t.y.; Tkach vd., t.y.). Hücre dışı veziküller, transmembran proteinleri içeren ve sitozolik proteinleri ve RNA'yı çevreleyen bir çift

tabakalı lipitten oluşur ve hücrelerin zarından tomurcuklanarak salınırlar. 100 nm ile 1000 nm arasında çeşitli boyutlarda bulunabilirler. Tüm hücre dışı vesiküller, alıcı hücrelere hedeflenmelerine izin veren yüzey molekülleri taşır. Hücre dışı moleküller bir hedef hücreye bağlandıktan sonra, reseptör-ligand etkileşimi yoluyla sinyal iletimini indükleyebilir veya endositoz ve/veya fagositoz ile içselleştirilebilir veya hatta içeriklerini sitozolüne iletmek için hedef hücrenin zarıyla birleşerek alıcı hücrenin fizyolojik durumunu değiştirebilir (Tkach vd., t.y.).

Bu veziküller kargo içeriğine, boyutlarına, plazma membranından oluşum ve salgılanmalarına göre apoptozomlar, mikroveziküller, eksozomlar, retrovirüs benzeri veziküller olarak dörde ayrılmaktadır. Eksozomlar bu veziküllerin en küçük alt grubunu oluşturmaktadır (Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi vd., t.y.). Yaklaşık 40–100 nm çapa sahip eksozomlar, hücreler tarafından salgılanan biyolojik nano ölçekli küresel lipid çift katmanlı veziküllerdir (Y. Zhang vd., 2020).

Mezenkimal kök hücreler (MSc), birçok yetişkin dokusundan izole edilebilen heterojen bir stromal kök hücre alt kümesidir. Adipositler, osteositler ve kondrositler gibi mezodermal soyun hücrelerine ve ayrıca diğer embriyonik soyların hücrelerine farklılaşabilirler (Uccelli vd., t.y.). Diğer hücre türlerinden türetilen eksozomlara benzer şekilde, mezankimal kök hücrelerden türetilen eksozomlar, hücreler arası iletişime katılır ve proteinleri, mRNA'yı ve mikroRNA'yı (miRNA) hedef hücrelere taşır. Bugüne kadar, mezankimal kök hücre türevli eksozomlarda 850'den fazla benzersiz gen ürünü ve 150 miRNA tanımlanmıştır (Mendt vd., t.y.).

İnsan mezenkimal kök hücrelerine (MSc'ler) dayalı tedavilerin güvenliği ve etkinliği, kas-iskelet sistemi, kardiyovasküler, otoimmün, nörodejeneratif ve gastrointestinal dahil olmak üzere çeşitli bozukluklar için artan sayıda klinik çalışmada araştırılmaktadır. Bu tür çalışmaların çoğundan elde edilen ilk sonuçlar, bu tedavilerin tekrarlanamayan klinik veriler vakalarında önemli derecede değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak klinik tekrarlanabilirliği artırmayı hedefleyen, bildirilen değişkenliği en aza indirmeye yardımcı olmak için aktif araştırmalar yürütülmektedir. (Sanjurjo-Rodriguez vd., 2019).

Mezenkimal kök hücre tedavisi, MSc'lerin güçlü immünomodülasyon ve immün baskılama özellikleri ve doku rejenerasyonu ve onarımı kapasiteleri nedeniyle, kanser ve

ülseratif kolit gibi aşırı immün yanıtı çok çeşitli hastalıklar için yeni bir tedavi stratejisidir (Guo vd., 2022). Mezenkimal kök hücreler, son zamanlarda, farklılaşma ve kendini yenileme kapasiteleri, parakrin etkileri ve immünomodülatör özellikleri yoluyla çeşitli insan hastalıklarını tedavi etmede umut verici yaklaşımlar olarak araştırmacıların büyük ilgisini çekmiştir (Huldani vd., t.y.; R. Lai vd., t.y.). Bununla birlikte, bu hücrelerin terapötik uygulamaları, tümörjenik özellikleri, düşük proliferatif kapasiteleri ve hücre içerikleri nedeniyle sınırlandırılmıştır. Ayrıca, mezenkimal kök hücrelerin çoğalma ve farklılaşma yeteneği, donör dokunun mevcudiyeti, durumu, yaşı, sağlığı ve genetiği ile ilişkilidir. Bu nedenle, hücre nakli yapılmadan mezenkimal kök hücrelerin faydalı kapasitesini hastalıkların tedavisinde kullanmak için yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmuştur (Huldani vd., t.y.).

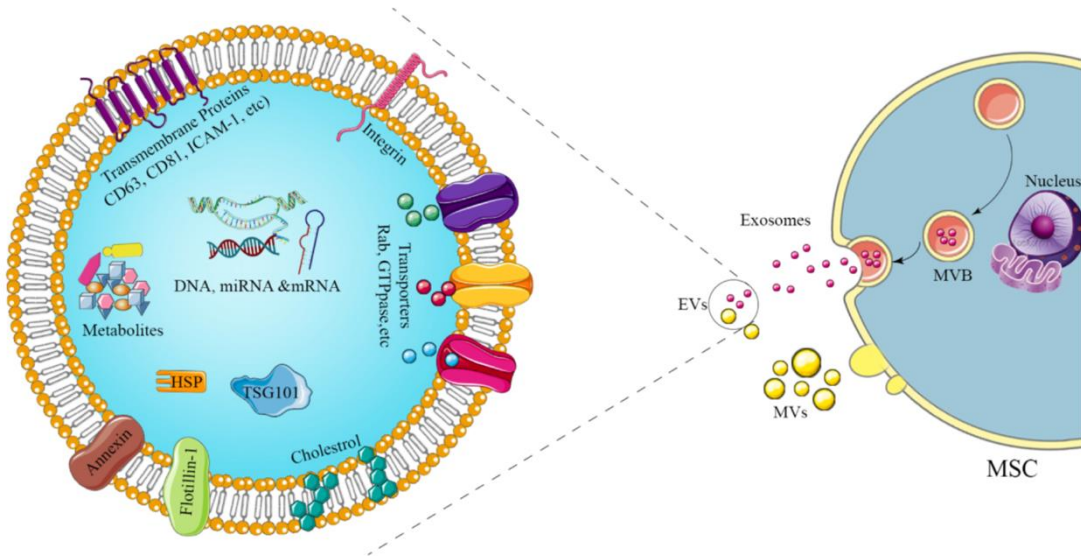
MSC'lerin terapötik mekanizması temel olarak hücreden hücreye etkileşime ve parakrin aktivitelere odaklanır. Potansiyel terapötik fırsatlardan biri, güçlü immünomodülatör etkiler sergileyen bir tür parakrin etkileşimi olarak tanımlanan MSC'den türetilen eksozomlara (MSC-Exo) odaklanabilir. Son çalışmalar, MSC'lerin terapötik etkisinin büyük ölçüde eksozomlara bağlı olduğunu göstermektedir (Guo et al., 2022).

Mevcut bilgilere göre, mezenkimal kök hücrelerin terapötik etkinliğine büyük ölçüde, EV'ler tarafından salınan proteinler, lipidler, miRNA'lar ve mRNA'lar dahil olmak üzere parakrin faktörler aracılık ettiği bulunmuştur. Hücre dışı veziküller, hücreler arası iletişimin önemli araçları olarak tanınan lipid zarla ayrılmış parçacıklardır. EV'ler harika bir güvenlik profili sergiler ve ebeveyn mezenkimal kök hücrelerine kıyasla işlevini kaybetmeden saklanabilirler. Sonuç olarak, bu EV'ler, farklı hastalıkların tedavisinde hücre içermeyen potansiyel terapötik adaylar olarak büyük önem taşımaktadır (Huldani vd., t.y.).

Son zamanlarda, mezenkimal kök hücrelerin mikroveziküller (0.1-2 µm) ve eksozomlar (30-150 nm) dahil olmak üzere çok sayıda EV serbest bıraktığı gösterilmiştir (Huldani vd., t.y.; Mendt vd., t.y.). Mezenkimal kök hücrelerden türetilen eksozomların fenotipinin ve işlevinin, mezenkimal kök hücrenin kaynağına bağlı olarak değişebileceğini gösterilmektedir. Bu durum mezenkimal kök hücrenin kaynağının,

eksozomun klinik etkinliklerinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Mendt vd., t.y.).

İçsel özelliklerine ek olarak, MSC'den türetilen eksozomlar, terapötik genler, ilaçlar, enzimler veya RNA dahil olmak üzere molekülleri hedef hücelere taşımak ve iletmek için ideal araçlardır. Çift lipidli bir zar vezikül olarak, eksozomlar yalnızca büyük bir kargo yükü taşıma kapasitesine sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda içeriği parçalayıcı enzimlerden veya kimyasallardan korur (Bkz. Şekil 2.6). Birkaç çalışma, MSC'den türetilen eksozomların endositoz yoluyla hücre içi alımlarını kolaylaştırdığını göstermektedir (R. C. Lai vd., 2011; Mendt vd., t.y.). Örneğin, mezankimal kök hücrelerden elde edilen eksozomlarındaki protein ve RNA, lipid membran bozunmadığı sürece, tripsin ve RNaz tarafından bozulmaya karşı korunmuştur. Ayrıca, -20°C'de 6 ay boyunca potansiyel olarak toksik kriyoprezervatifler olmadan depolamanın, mezankimal kök hücre eksozomlarının etkilerinden veya bunların biyokimyasal aktivitelerinden ödün vermediğini bulunmuştur (R. C. Lai vd., 2011).



Şekil 2.6. Hücre dışı veziküllerin biyogenezi ve yapısı (eksozomlar ve mikro veziküller). MSC, mezenkimal kök hücre; MVB, multivesiküler cisimler; MV'ler, mikro parçacıklar; EV'ler, hücre dışı veziküller (Huldani vd., t.y.).

Eksozomların ilk olarak yaklaşık 50 yıl önce koyun retikülositleri tarafından salgılandığı bulunmuştur. O zamandan beri B hücreleri, dendritik hücreler, mast hücreleri, T hücreleri, trombositler, Schwann hücreleri, tümör ve sperm dahil birçok hücre tipi tarafından salgılandıkları gösterilmiştir. Normal idrar, plazma ve bronşiyal lavaj sıvısı gibi pek çok fizyolojik sıvılarda bulunurlar. Eksozomların, antijen sunan

hücreler (Antigen Presenting Cell'ler) tarafından salgılandıklarında fonksiyonel peptit-MHC kompleksleri taşıdıkları gözlemlendiğinde, ilk kez 1996'da immün iletişime aracılık ettikleri belgelenmiştir. Bu aynı zamanda eksozomların terapötik olarak kullanılabileceğini gösterilmiştir. (R. C. Lai vd., 2011).

Eksozomlar, mezenkimal kök hücrenin direkt nakli ile ilişkili riskleri azaltmanın yanı sıra, büyüme faktörleri, kemokinler, sitokinler, transkripsiyon faktörleri, genler ve RNA'lar gibi küçük çözünür biyolojik faktörlerin kullanımıyla ilgili bazı zorlukların üstesinden gelebilir (R. C. Lai vd., 2011; Mendt vd., t.y.).

Mezankimal kök hücrelerden türetilen eksozomların tedavisi, özellikle enflamatuvar bir bileşene sahip olanlar olmak üzere birçok hastalığın tedavisi için umut verici bir strateji olarak ortaya çıkmaktadır. Genetik materyali taşıma, onu hücre dışı bozulmadan koruma ve alıcı hücrelere oldukça seçici bir şekilde iletme konusundaki doğuştan gelen yetenekleri, bu eksozomların, kanser ve potansiyel olarak rejeneratif tıp için gen terapilerinin yanı sıra küçük moleküller için ideal bir dağıtım sistemi olduğunu göstermektedir (Mendt vd., t.y.).

Son zamanlarda, kök hücrelerden elde edilen ekstraselüler vesiküllerin, terapötik etkileri inflamatuvar barsak hastalığı (IBD) modellerinde incelenmiştir. IBD, bu hastalarda yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen ülseratif kolit ve Crohn hastalığını içeren inatçı bir otoimmün hastalıktır. Örneğin, Heidari ve arkadaşları (2023), dekstran sülfat sodyumun (DSS) neden olduğu kolitin akut formunun fare modelinde yağ dokusu kök hücrelerinden elde edilen eksozomlarla tedavisinin potansiyelini değerlendirdi. Eksozomların intravenöz uygulaması fonksiyonel iyileşmeyi destekleyebilir, enflamasyonu azaltabilir ve epitel rejenerasyonunu iyileştirmenin yanı sıra bağırsak bariyeri bütünlüğünü koruyabilir olduğu gösterilmiştir. Ayrıca insan göbek bağı kök hücrelerinden elde edilen eksozom türevli miR-378a-5p'nin intravenöz transplantasyonunun koliti onarabileceği ve IBD'yi hafifletebileceği yapılan araştırmalarla gösterilmiştir (Huldani vd., t.y.).

Klinik öncesi çalışmalarda, kemik iliği kaynaklı MSC'ler (BM-MSK'ler), adipoz kaynaklı MSC'ler (AD-MSK'ler), insan göbek kordonu kaynaklı MSC'ler (hUC-MSK'ler), amniyon kaynaklı MSC'ler (AM-MSK'ler) ve bademcik kaynaklı MSC'ler

Kemik iliği kök hücre eksozomları, OE-MS-Exo:Olfaktori Ekto kök hücre eksozomları, hAD-MS-Exo: İnsan adipoz doku kök hücre eksozomları) İnsan göbek kordonu eksozomları Th2 hücrelerinin anti-inflamatuar aktivitesini desteklerken inflamatuvar makrofajları inhibe eder, aşırı aktif Th1/Th17 hücreleri baskılanabilir, aşırı eksprese edilen proinflamatuvar sitokinleri azaltabilir (Guo vd., 2022).

2.4. Mikroakışkan Teknolojisi

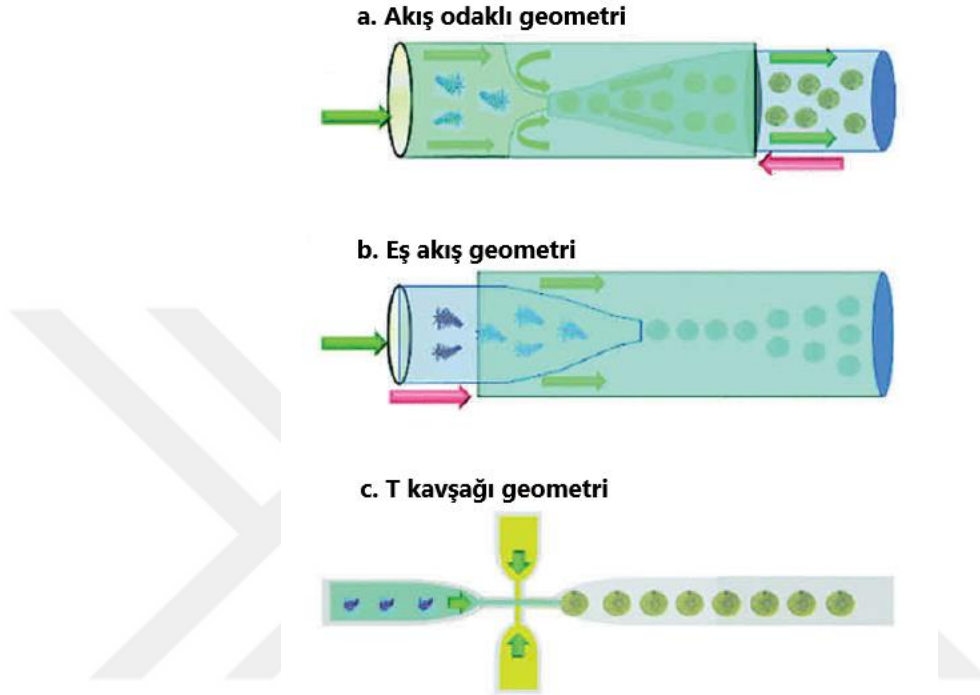
Mikroakışkan teknoloji, içinden küçük miktarlarda sıvının (genellikle 10^{-9} ila 10^{-18} L) sistematik olarak kontrol edilen, tasarlanmış konfigürasyonlarda akabildiği mikro ölçekte (onlarca ila yüzlerce μm) entegre kanallara sahip sistemlerin bilimi ve teknolojisidir (Liu vd., 2022; Shang vd., 2017a; Y. Wang vd., 2020). Son birkaç yılda mikroakışkanlardaki yoğun aktivite ve ilerleme, akışkanlar mekaniği, termodinamik, uygulamalı fizik, kimya, malzeme bilimi, imalat, biyokimya, biyoteknoloji ve tıp gibi çeşitli alanlarda uzmanlığa sahip araştırmacıların ortak çabalarının bir sonucudur.

Mikroakışkan tekniklerin giderek artan popülaritesi ile mikroakışkan çip, biyotıp, ilaç taşıyıcı sistem oluşturma, gıda, tarım gibi birçok alanda tercih edilen yöntemlerden biri haline geldi. Ayrıca, minimum numune ve reaktif tüketimi, basitleştirilmiş işlem, hızlı tespit ve oldukça düşük maliyetler, mikroakışkan teknolojinin önem kazanmasını sağlamıştır (Ji vd., 2022; Y. Wang vd., 2020).

Mikroakışkan sistemler, çözücü ve çözücü olmayan fazlar arasındaki karışım oranının kontrolüne izin vererek, NP'lerin hazırlanmasında çok sayıda avantaja sahiptir. Üretim sürecinin minyatürleştirilmesi reaktiflerin tüketiminde önemli bir azalmaya olanak tanır. Ayrıca, çeşitli bileşen sıvıları için yüksek uygulanabilirlik, farklı kimyasal bileşimlere sahip yüksek derecede monodispers kolloidlerin hazırlanmasına olanak sağlar. Yukarıda belirtilen tüm avantajları bir araya getirerek, mikroakışkan teknik, gelişmiş ilaç dağıtım sistemlerinin imalatında bir paradigma değişikliğini temsil etmektedir (Martins vd., 2018).

Mikroakışkan sistemlerde iki faz arasındaki arayüzey geriliminin etkisi damlaların oluşmasına yol açar. Bir emülsiyon damlacığı üzerine kayma geriliminin uygulanması onun uzamasını ve dolayısıyla kopmasını teşvik eder. Bu süreçte yer alan fiziksel mekanizmalar, genellikle mikroakışkan cihazların geometrileriyle güçlü bir şekilde ilişkilidir (Martins vd., 2018).

Basit emülsiyon, birbiriyle karışmayan iki sıvının birinin diğerinin içinde dağılmasıyla oluşan bir karışımdır. Mikroakışkan sistemlerde basit emülsiyonların üretimi için üç ana geometri kullanılır: akış odaklama, ortak akış ve T-kavşağı (Bkz. Şekil 2.8)(Martins vd., 2018; Um vd., 2008; Y. Wang vd., 2020).



Şekil 2.8. Damlacık mikroakışkanlarının cihaz geometrileri. (a) Akış odaklı, (b) eş akış (c) T kavşağı geometrileri (Martins vd., 2018)

Akış odaklı geometride, iki karışmayan sıvı karşıt taraflarından akar ve damlacıkların oluşturulduğu iç kılcal damarın ağzında buluşur (Bkz. Şekil 2.8 (a)) (Martins vd., 2018; Y. Wang vd., 2020).

Birlikte akış geometrisinde, dağınık ve sürekli fazların akışkanları paralel akışlar halinde akar (Bkz. Şekil 2.8 (b)).

T-kavşak geometrisi basitliği nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tür cihazlarda iki farklı kanal dik açıyla buluşur; ana kanal sürekli fazı taşıırken ortogonal kanal dağılan fazı sisteme verir (Bkz. Şekil 2.8 (c)).

Damlacık çapı, teknik parametreler (örn. akış hızı, akışkan viskozitesi ve mikrokanal geometrisi) değiştirilerek mikron düzeyinde düzenlenebilir ve böylece damlacık hacminin deneysel gereksinimlere göre kontrol edilebilmesi sağlanır.

Mikroakışkanların bir alt dalı olan damlacık mikroakışkanları, mikrokanallar içindeki karışmaz çok fazlı akışlar yoluyla ayrı damlacıklar üretir (Shang vd., 2017a; Y. Wang vd., 2020). Damlacık oluşumunun temel süreci, harici bir enjeksiyon pompası yoluyla bir mikrokanalda sürekli fazlı bir sıvı akışının üretilmesini ve ardından akış sürecinde kesme kuvveti sağlanarak dağılmış fazlı sıvının bir dizi mikro damlacıklara bölünmesini içerir (Liu vd., 2022). Uygulamalar açısından, teori ve tekniklerin bu tür ilerlemeleri sayesinde, damlacık mikroakışkanları, biyo(kimyasal) analiz ve malzemelerin nano ve mikro ölçekli üretimi dahil olmak üzere geniş bir değer taşır (Shang vd., 2017a; Um vd., 2008; L. Wu vd., 2013). Damlacık bazlı mikroakışkanlar, karışmayan yağ ile ayrılmış sulu damlacıklardaki tek tek hücrelerin fiziksel ve kimyasal izolasyonunu sağlar (L. Wu vd., 2013).

Damlacık bazlı mikroakışkanların en kritik özelliği, bir sıvının farklı hacimlerinin üretildiği ve esnek, hareketli arayüzlerle birlikte başka bir karışmaz taşıyıcı sıvıda süspanse edildiği çok fazlı bir akış sisteminde tek dağılmış damlacıklar üretme yeteneğidir (Y. Wang vd., 2020). Damlacıkların boyutu, karışmayan sıvıların akış hızlarını basitçe değiştirerek kontrol edilebilir (Um vd., 2008).

Mikroakışkanlar ile nanopartikül sentezinde, reaksiyon kinetiği ve termodinamik parametreler üzerindeki üstün kontrol, ayarlanabilir bir boyut ve kristal yapıya sahip Nano partiküller (NP)'rin elde edilmesini sağlar. Üretim verimliliği ve partikül monodispersitesi, geleneksel emülsifikasyon yöntemlerine göre çok daha yüksektir. Genel olarak, damlacık mikroakışkanları, yüksek oranda kontrol edilebilir fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip nano ve mikro ölçekli malzemelerin sentezi için güçlü araçlar sağlar. Bu sentez yaklaşımları arasında mikroakışkan yöntemi, minyatürleştirme, gelişmiş kütle ve ısı transferi ve azaltılmış zaman ve reaktif tüketimi dahil olmak üzere içsel avantajlarıyla öne çıkmaktadır (Shang vd., 2017a). Damlacık bazlı mikroakışkanlara olan ilgi, esas olarak kalibre edilmiş emülsiyon damlalarını yüksek oranda oluşturma ve manipüle etmenin mümkün olması nedeniyle yayılmıştır (Bremond & Bibette, 2012).

Bu tez çalışmasında, yukarıda literatür bilgileri ışığında, UC hastalığının daha etkin bir şekilde tedavisine yönelik yeni bir sistem geliştirilmek istenmiştir. Bu sistem, hastalığın tedavisinde kullanılan Mesalazin etkin maddesinin daha etkin bir şekilde kolona ulaştırılması, göstereceği anti-enflamatuvar etkinin eksozomların hem yara iyi edici etkisi hem de immün sistemi regüle etme etkisi ile üstünlük gösterebileceği

hipoteziyle geliştirilmiştir. Eksozomların oral alımını mümkün kılabilmek ve taşıyıcı sistem içerisinde kararlılığını koruyabilmesi için enkapsülasyonunun sağlanması için ise yeni teknolojilerden biri olan damlacık bazlı mikroakışkan sistemi kullanılmıştır. Yapılan literatür taramalarından tez çalışmamıza benzer bir yaklaşımın bulunmadığı belirlenmiştir.



3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

Madde Adı	Firma Adı
Kakao yağı	: Doğa İlaç, Türkiye
Soya Lesitini	: Thermo Scientific, Almanya
CMC	: Sigma-Aldrich, Almanya
Mannitol	: Doğa İlaç, Türkiye
PBS	: gibco, ABD
Metanol	: Merck, Almanya
Fosforik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum Fosfat monobasic	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum Klorür	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum Hidroksit	: Sigma-Aldrich, Almanya
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	: Capricorn, Almanya
Low Glucose DMEM	: Sigma-Aldrich, Almanya
MSC Nutristem® XF Basal Medium	: Sartorius, Almanya
MSC Nutristem XF Supplement	: Sartorius, Almanya
Fötal sığır serumu	: Capricorn, Almanya
Stabil L- Glutamin	: Glutamax, Sigma, Almanya
MTT boyası	: Serva, Almanya
PE anti-human CD9 antibody	: Biolegend, ABD
PE anti-human CD81 antibody	: Elabscience, ABD
Ultra-LEAF Purified anti-human CD63 antibody	: Biolegend, ABD
PE Mouse IgG1 κ Isotype Antibody	: Biolegend, ABD
CML Latex Beads	: Invitrogen, Almanya
PKH26 Kit	: Merck, Almanya
Acridin Oranj Tuzu	: Santa Cruz, ABD
BCA Protein Assay Kit	: Thermo Scientific, Almanya
UPLC Kolonu	: CNW Athena C18-WP, 4,6 x 250 mm, 5 μ m
Trypsin EDTA	: Merck, Almanya
Etanol	: ISOLAB, Almanya

Mesalazin	: Nobel ilaç, Türkiye
0,22 µm şırınga filtresi	: Sartorius, Almanya
10 mL şırınga	: Setocoject, Türkiye
Karbon kaplı 200 meshli bakır gridler	: Agar Scientific, İngiltere
Uranil asetat solüsyonu - UA-Zero EM Stain	: Agar Scientific, İngiltere

3.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Firma Adı
Buzdolabı	: Liebherr, Almanya
Dondurucu (-20°C)	: Liebherr, Almanya
Dondurucu (-80°C)	: New Brunswick Sci., Amerika
Manyetik Karıştırıcı	: Heidolph, MR 3001 K, Almanya
Otomatik Mikropipetler	: Eppendorf, Almanya
pH Metre	: OHAUS, Starter 3100, ABD
Hassas Terazı	: Mettler Toledo, ABD
Vorteks karıştırıcı	: Velp Scientifica, İtalya
Orbital Karıştırıcı	: Stuart SSL1, İngiltere
Büyük kapasiteli santrifüj	: Hettich, Rotina 420 R, Almanya
Mikrosantrifüj	: Eppendorf, 5417R, Almanya
Ultrasantrifüj	: Beckman coulture Optima XPN, Amerika
Çoklu Manyetik Karıştırıcı	: IKA, Almanya
Invert Floresan mikroskop	: Leica DMI400B, Almanya
Güç kaynağı	: Consort E861, Belçika
Taramalı Elektron Mikroskobu - Carl Zeiss Ultra	: Carl Zeiss, Almanya
Plus FESEM (Field Emission Scanning EM)	
Geçirimli Elektron Mikroskobu	: Hitachi HT7800, Japonya
Ultra Basınçlı Sıvı Kromatografisi	: Agilent Technologies, ABD
CO ₂ 'li İnkübatör Etüv	: Binder, ABD
Cytation 5 plaka okuyucu	: BioTek, ABD
Laminar akış kabini	: Kojair, Biowazard, Finlandiya
Flow Sitometri	: Agilent, Novocyte 3005, ABD

NTA NanoSight NS300	: Malvern Panalytical, ABD
NanoDrop One C	: Thermo Scientific. ABD
Ultrasonik Su Banyosu	: Elma, Transsonic 470/H, Almanya
Sirkülasyonlu Su Banyosu	: Lab Companies, RW-0525G, ABD
Şırınga pompası	: IPS, 14R, ABD
Zeta potansiyel ve parçacık boyutu ölçer	: Malvern, ABD
Prob Sonikatör	: Sonics, VCX 130PB, ABD
Liyofilizatör	: Operon, Kore



4.YÖNTEM

4.1. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

Ülseratif kolite sahip hastalarda oluşacak enflamasyonu tedavi etmek için kimyasal kaynaklı bir antienflamatuar olan mesalazini ve insan göbek kordonu kaynaklı mezankimal kök hücre eksozomları içeren yağ içinde su emülsiyonu formülasyonu geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Mikroakışkan çip içerisinde oluşturulmak istenen yağ içinde su emülsiyonunun sistem geliştirdikten sonra daha stabil bir form sağlaması amaçlandığı için katı lipid özelliği gösterebilecek bir yağ seçilmesi uygun görülmüştür. Bunun için kolondaki enflamasyonu daha da tetiklemeyecek biyouyumlu bir yağ olan kakao yağı tercih edilmiştir. Yüzey etkin madde olarak lesitin kullanılmıştır. Lesitin yağ fazına eklenerek manyetik karıştırıcı üzerinde kakao yağının akışkanlığının sağlanması ve lesitinin karışması için ısıtılmıştır.

Su fazı için öncelikle mesalazinin sudaki çözünürlüğü araştırılmış, çözünürlüğün çok düşük olduğu görüldükten sonra çökmeyen süspansiyon oluşturmak amacıyla karboksi metil selüloz (CMC) çözeltileri hazırlanarak mesalazin bu faz içinde dağıtılmıştır.

Eksozom formülasyonları için ise sulu faz olarak kriyoprotektan madde (mannitol) içeren PBS sulu faz olarak belirlenmiştir.

Elde edilen basit emülsiyonlar enterik kapsül içerisinde toplanmış daha sonrasında kapsüller liyofilize edilmiştir.

Her iki etkin madde ile yapılan formülasyon çalışmaları detaylı bir şekilde Bölüm 4.1.4.1 ve Bölüm 4.1.4.2’de anlatılmıştır ve hem kimyasal hem de biyolojik kaynaklı etkin maddeyi içerecek olan bu taşıyıcı sistemin karakterizasyonları ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

Formülasyonların karakterizasyonu öncesinde mesalazin için analitik yöntem geliştirilmesi ile eksozomun eldesi ve karakterizasyonu için çalışmalar yürütülmüştür.

4.1.1. Mesalazin için analitik yöntem geliştirme

Mesalazin etkin maddesi için yapılacak tüm miktar tayini analizlerinde Agilent Technologies markasına ait Ultra Basınçlı/Performans Sıvı Kromatografisi (UPLC) cihazı kullanılmıştır. Etkin maddeye ait analitik yöntem geliştirilirken, farklı pH’a sahip

mobil fazlar (pH 3 10 mM fosfat tamponu, pH 3 20 mM fosfat tamponu, pH 4 10 mM fosfat tamponu, pH 4 20 mM fosfat tamponu, pH3 10 mM asetat tamponu, pH 3 20 mM asetat tamponu, pH 4 10 mM asetat tamponu, pH 4 20 mM asetat tamponu), organik çözücüler (% 10 Asetonitril, % 5 asetonitril, % 10 metanol, % 5 metanol), farklı sıcaklıklar (20 °C, 30 °C), farklı kolonlar (CNW Technologies Athena c18 250 mm, GraceSmart c18 150 mm), dalga boyları (240 nm, 300nm) denenmiştir. Değişkenler kontrollü değiştirilerek pik şekli, etkin maddenin alıkonulma süresi, alıkonma faktörü (k'), düşük gürültü sinyalleri açısından değerlendirilmiş ve optimum parametreler seçilmiştir.

Etkin maddeye ait oluşturulan analitik metodun validasyon çalışmaları yapılmıştır. Analiz koşulları Tablo 4.1’de gösterildiği gibidir.

Tablo 4.1. UPLC çalışma koşulları

Cihaz:	Agilent Technologies 1290 Infinity LC Systems
Kolon:	CNW Athena C18-WP, 4,6 x 250 mm, 5 μ m
Kolon Sıcaklığı:	20 °C
Mobil Faz:	Ultra Saf Su: Metanol (90:10)
Dedektör:	Max-Light Cartridge Cell – DAD Dedektör
Dalga Boyu:	300 nm
Akış Hızı:	0.600 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi:	20 μ L

4.1.1.3. Mesalazin için validasyon çalışmaları

Mesalazin etkin maddesi için geliştirilen analitik yöntemin doğruluk, güvenilirlik ve geçerliliğinin kanıtlanabilmesi için validasyon çalışmaları yapılmıştır. Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (ICH- The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) tarafından oluşturulan yönergede belirtilen analitik yöntemlerin valide edilmesinde kullanılacak prosedüre uygun olarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

4.1.1.3.1 Çalışma aralığı

Çalışma aralığı, analizler boyunca kullanılacak prosedürün doğrusallık, doğruluk ve kesinliğinin kanıtlandığı maksimum ve minimum derişim aralığını içerir.

Mesalazinin % 0.1 fosforik asit içeren ultra saf su içerisinde ana stok ve ana stoktan oluşturulan ara stoğun seri dilüsyonu ile 0.5 µg/mL ile 10 µg/mL aralığında 11 farklı derişim analiz edilmiştir.

4.1.1.3.2. Doğrusallık

Doğrusallık çalışması, çalışma aralığı içerisinde seçilen farklı derişimlerdeki örneklerden elde edilen değerlere karşılık gelen analiz sonuçlarının birbiri ile doğru orantılı olarak arttığını ifade etme amacı ile yapılmaktadır.

ICH tarafından belirlenen kılavuzda bu analizin belirlenen şartlara uyabilmesi için en az 5 farklı derişime karşılık gelen analiz sonuçları değerlendirilmelidir (ICH, 2005).

Doğrusallık parametreleri değerlendirilirken regresyon hesaplamaları kullanılmıştır. Mesalazine ait standart regresyon eğrisinin elde edilmesi için UPLC yöntemi kullanılarak 0.5-10 µg/mL aralığında 11 farklı derişim kullanılmıştır. Her derişim için 6 seri örnek hazırlanmıştır. Her bir derişime karşılık gelen eğri altında kalan değer derişime karşılık değerlendirilmiştir.

4.1.1.3.3. Doğruluk

Doğruluk, analiz sonucunda elde edilen bir değer gerçekte kabul edilen referans değer ile olan yakınlığını temsil etmektedir. Doğruluğun kanıtlanması için doğrusallığın kanıtlandığı çalışma aralığından 3 farklı derişim seçilir. Bu 3 farklı derişim için en az 3'er örnek analiz edilir. Analitlerden elde edilen analiz sonuçları % geri kazanım ve serilere ait bağıl standart sapma ile değerlendirilir (ICH, 2005).

Bu çalışmaya ait doğruluk analizi için seçilen 3 farklı konsantrasyonda seri dilüsyon yöntemi ile hazırlanan (1.5 µg/mL, 5.5 µg/mL, 9.5 µg/mL) mesalazin analitleri her bir konsantrasyon için 3'er örnek olarak analiz edilmiştir.

4.1.1.3.4. Kesinlik

Kesinlik, farklı derişimlerde hazırlanan analitlerden, belirli koşullar altında aynı örnekten alınan tekrarlı analizlerinden elde edilen sonuçların yakınlığını ifade eder.

Geliştirilen bu analitik yöntemin kesinliğinin kanıtlanması için seçilen 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan (1.5 µg/mL, 5.5 µg/mL, 9.5 µg/mL) mesalazin analitleri 3'er kez analiz edilmiştir. Tekrarlanabilirlik değerlendirilebilmesi için analizler farklı günlerde yapılmıştır. Analizler sonucunda elde edilen derişimler standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri ile incelenmiştir.

4.1.1.3.5. Duyarlılık

Duyarlılık, geliştirilmiş olan analitik yöntemin analit içinde yer alan maddenin saptayabilme ve tayin edebilme yeteneğidir.

Saptama sınırı (LOD), geliştirilen analitik metot kullanılarak analit içerisinde etkin maddenin saptanabildiği en düşük derişimi ifade eder. LOD hesaplanırken ICH kılavuzunda bulunan Eşitlik 4.1 kullanılmaktadır.

$$LOD = \frac{3.3 \sigma}{S}$$

$$\sigma : \text{Standart Sapma}; S : \text{Eğim} \quad (4.1)$$

Tayin sınırı (LOQ) ise analitte bulunan etkin maddenin doğru ve kesin bir kantitatif değerle tespit edilebildiği en düşük derişim değeridir. LOQ hesaplanırken ICH kılavuzunda bulunan Eşitlik 4.2 kullanılmaktadır.

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{S}$$

$$\sigma : \text{Standart Sapma}; S : \text{Eğim} \quad (4.2)$$

4.1.1.3.6.. Seçicilik

Seçicilik, alitik yöntemin analiz edilecek etkin maddeye özgül ve seçici olduğunun gösterilmesine denir. Formülasyon hazırlanırken kullanılacak diğer maddelerin analiz esnasında etkin maddeye girişim yapmadığı gösterilmelidir.

Geliştirilen analitik yöntemle, formülasyon geliştirirken kullanılacak maddeler hem teker teker hem de formülasyonda bulunacakları kombinasyonlara göre analiz edilmiştir.

4.1.2. Eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu

Eksozom izolasyonu için, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hücresel Tedavi Kök Hücre Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi (ESTEM)’den temin edilen Wharton Jeli Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (WJ-MKH) kullanılmıştır.

4.1.2.1. Etik bildirim

Eksozomların eldesinde kullanılan hWJ-MKH’ler, ESTEM’de Doç. Dr. Ayla Eker Sarıboyacı sorumluluğunda yürütölmekte olan ‘Wharton Jeli Kökenli Mezenkimal

Kök Hücrelerin (WJ-MKH) İmmünomodulator Özelliği' başlıklı çalışma kapsamında elde edilen hücrelerdir. Bu çalışmaya ait Etik Kurul Onayı, 10 Kasım 2022 tarihinde 21 Nolu kararı ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı tarafından verilmiştir. Hücrelerin eldesi için kullanılan göbek kordonu ham dokusu, seroloji test sonuçları uygun bulunan ve 35 yaş altı sağlıklı vericilerden, hasta onam formu imzalatılarak, sezaryen doğum sonrası alınmıştır.

4.1.2.2. Wharton jeli kökenli mezankimal kök hücrelerin izolasyonu ve kültürü

Alınan dokunun, aynı gün izolasyon işleminin yapılabilmesi için uygun sıcaklık ve steril koşullar altında steril biyogüvenlik kabini (Laminar air flow-class II: LAF) içerisine aktararak eksplant kültürü yapılmıştır. Doku örneği kalsiyum ve magnezyum iyonu içermeyen Fosfat Tamponlu Salin (dPBS) 1x ile yıkanmıştır. Pens yardımı ile petri kaplarında kan damarlarından ayrılan doku, yaklaşık 1 cm³ olacak şekilde parçalara ayrılmış ve her bir parça, boyuna kesi açılarak petri kapları içerisine konmuştur. Örneklerin Wharton Jeli olarak bilinen kısmının petriye temas edecek şekilde yerleştirilmesinin ardından, kurumaları için yaklaşık 5 dk beklenmiş ve üzerlerine dokuları kaldırmayacak şekilde MSC NutriStem XF bazal (%2 insan serumu, %0.5 100 U/mL Penisilin, 100 µg/mL Streptomisin içeren) ve % 0.6 MSC NutriStem XF Supplement Mix besiyeri karışımı konmuştur. Daha sonra bu petriler, hücrelerin dokulardan çıkması için 72 saat süresince %5 CO₂ içeren 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Dokulardan çıkan ve yüzeye yapışarak büyüyen hücrelerin kontrolü mikroskop ile yapılmıştır ve besiyeri değişimi 4-5 günde bir gerçekleştirilmiştir. Göbek kordonu eksplantları, hücrelerin petri kabını %70-80 oranında kaplaması sonrasında ortamdan alınmıştır. Hücreleri pasajlamak için ortamdaki besiyeri pipet yardımı ile alınmış, kalsiyum ve magnezyum iyonu içermeyen dPBS 1x ile yıkanmış ve tripsin/EDTA eklenerek hücrelerin petri yüzeyinden kaldırılması sağlanmıştır. Hücreler, insan serumu (human AB serum) eklenerek petriden pipet yardımı ile alınmış ve konik santrifüj tüpünde 400xg'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Hücreler pasaj sayısı 3 oluncaya kadar aynı besiyeri ve inkübasyon ortamı kullanılarak flasklarda çoğaltılmıştır.

Sonrasında planlanan deneylerde kullanılmak için kriyotüplere konulan hücreler -196°C sıvı azot tankında kademeli olarak dondurularak saklanmıştır.

4.1.2.3. Eksozom izolasyonu

Eksozom izolasyonu için Bölüm 4.1.2.2’de anlatıldığı gibi ESTEM’in laboratuvarlarında elde edilen hücreler kullanılmıştır. Bu hücrelerin çoğaltılması ve eksozom izolasyonu yine aynı merkezde gerçekleştirilmiştir. Kriyotüplerde saklanmış olan hücreler pasajlanmış ve % 70 yoğunluğa ulaştıktan sonra fetal FBS içermeyen, % 0.2 (mL/mL) primosin ve % 1 (mL/mL) stabil L- Glutamin (Glutamax, Sigma, Almanya) içeren, DMEM-F12 besiyeri ile 16 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında besiyeri toplanmış ve 3000xg’de 30 dk. santrifüj edilerek olası hücre ve hücre parçaları uzaklaştırılmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatantlar +4°C’de 110.000xg’de 90 dk. santrifüj edilmiştir. Oluşan eksozom pelletlerinin alınabilmesi için süpernatant uzaklaştırılarak eksozom pelleti yaklaşık olarak 200 µL PBS ile resüspande edilmiştir. Resüspande hWJ-MKH eksozomları daha sonra kullanılacak miktarlara göre alikotlanarak -80°C’de analizlere kadar saklanmıştır (Han vd., 2021).

4.1.2.4. Eksozomların karakterizasyonu

4.1.2.4.1. NanoDrop spektrofotometrisi ile eksozom protein miktar tayini

Ultrasantrifüj ile elde edilen eksozomların protein konsantrasyonunu ölçmek için izolasyondan hemen sonra Nanodrop One C cihazı kullanılarak analiz yapılmıştır. Proteinin 280 nm’deki absorbans ayarı açılarak baseline düzeltme ayarı 320 nm olarak ayarlanmıştır. Ultrasantrifüj ile elde edilen pelletler PBS ile resüspande edildiği için blank ayarı yaparken PBS kullanılmıştır. Eksozom içeren örnek cihaza konularak ölçümü yapılmıştır.

4.1.2.4.2. BCA Protein Assay Kit ile eksozom protein miktar tayini

Elde edilen eksozomların miktar tayini için total protein konsantrasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Eksozomların total proteinin kolorimetrik tespiti ve miktarının belirlemek için Mikro BCA Kit kullanılmıştır. Ticari olarak kullanıma sunulan bu kit, proteinin alkali bir ortamda Cu^{+2} ’nin Cu^{+1} ’e indirgenmesi sonucunda tespit reaktifi olarak kullanılan bikinkoninik asit (BCA) molekülünün Cu^{+1} iyonu ile suda çözünür bir kompleks oluşturmaya dayanır. Bu kompleks protein konsantrasyonu miktarı ile doğrusal olarak 562 nm’de absorbans sergiler.

Standart eğrisi hazırlamak için kitin içinde yer alan 2 mg/mL bovin serum albümini (BSA) ve seyreltmek için ise protokole göre % 0.9 NaCl çözeltisi kullanılmıştır. Bu kitle minimum 0.5 µg/mL, maksimum 20 µg/mL konsantrasyonlarda proteinlerin analiz edilebileceği bilgisi protokolde yer almaktadır. Analiz edilecek örneklerin düşük miktarlarda protein içeriğine sahip olacağı ihtimaline karşın 0.5-1 µg/mL ve 1-10 µg/mL aralıklarında iki standart eğri denklemi oluşturulmuştur.

0.5-1 µg/mL aralığında oluşturulacak eğri için 2000 µg/mL BSA stoğundan 100 µL alınıp 1000 µL'ye % 0.9 NaCl ile tamamlanarak 1. Ara Stok (200 µg/mL) oluşturulmuş ve pipetaj yardımıyla homojen olması sağlanmıştır. 1. Ara Stoktan 100 µL alınıp 1000 µL'ye % 0.9 NaCl ile tamamlanarak 2. Ara Stok (20 µg/mL) oluşturulmuştur. 1-10 µg/mL aralığında oluşturulacak eğri için sadece 1. Ara stok hazırlanmıştır. Seyreltmeler Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'te belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Tablo 4.2. 0.5-1 µg/mL konsantrasyonlarında BSA standardının hazırlanması

BSA 2. Ara Stoğu (20 µg/mL)	Çözücü (% 0.9 NaCl)	Konsantrasyon (µg/300µL)
25 µL	125 µL	0.5
30 µL	120 µL	0.6
35 µL	115 µL	0.7
40 µL	110 µL	0.8
45 µL	105 µL	0.9
50 µL	100 µL	1

Tablo 4.3. 1-10 µg/mL konsantrasyonlarında BSA standardının hazırlanması

BSA 1. Ara Stoğu (200 µg/mL)	Çözücü (% 0.9 NaCl)	Konsantrasyon (µg/300µL)
5 µL	145 µL	1
10 µL	140 µL	2
15 µL	135 µL	3
25 µL	125 µL	5
35 µL	115 µL	7
40 µL	110 µL	8
45 µL	105 µL	9
50 µL	100 µL	10

Mikro BCA kit'in uygulanma basamakları

1. Yukarıdaki tablolarda belirtildiği şekilde seyreltilerek 150 µL olarak hazırlanan standart çözeltileri 96 kuyucuklu plakaya konulmuştur.
2. Standart konulan kuyucuklara 150 µL Mikro BCA çalışma reaktifi ilave edilerek mikropipet yardımıyla karıştırılmıştır (Mikro BCA çalışma reaktifi kitin protokolünde belirtildiği şekilde reaktif MA, reaktif MB, reaktif MC kullanılarak hazırlanmıştır.).
3. Plaka çalkalayıcı yardımı ile 30 saniye çalkalanmış ve etüvde 37°C'de 2 saat inkubasyonda bırakılmıştır.
4. Etüvden çıkartılan plaka oda sıcaklığında soğutulmuştur.
5. Absorbans değerleri 562 nm'de ölçülmüştür.
6. Kör olarak 150 µL %0.9 NaCl çözeltisi ve 150 µL mikro BCA reaktifi kuyucuğa konulup ölçülmüştür. Kör için okunan absorbans değeri örneklerin absorbans değerlerinden çıkartılmıştır.
7. Standart eğri grafiği ve doğru denklemi oluşturulmuştur.

4.1.2.4.3. Eksozom yüzey belirteçlerinin akış sitometrisi ile analizi

hWJ-MKH'lerden, eksozomlar izole edilip saklandıktan sonra kademeli olarak çözündürülmüş ve eksozoma özgü yüzey belirteçleri olan CD9 ve CD81 ile flow sitometride analizi yapılmıştır. Eksozomların boyutlarının flow sitometride görüntülenemeyecek kadar küçük boyutlarda olması nedeniyle latex boncuklar ile kaplanması gerekmektedir. Bu amaçla, 40 µL eksozom (NTA analizleri sonucunda 1.20×10^{11} partikül/mL olduğu bulunmuş) eksozomlara özgü bir yüzey belirteci olan CD63'e bağlanabilen 'paired antikor' boncuk solüsyonu ile +4 °C'de gece boyunca rotator cihazında döndürülerek kaplanmıştır. Bu solüsyon üzerinde non-spesifik bağlanmaları önlemek için 5 µL 100 mM BSA çözeltisi ile blokaj yapılmıştır. Hazırlanan boncuk-antikor solüsyonu eksozomla +4 °C'de gece boyunca rotator cihazında döndürülerek inkübe edilmiştir ve bu sayede boncukların eksozomla kaplanması sağlanmıştır. Kaplanmış eksozomlara 1'er µL CD9 ve CD81 yüzey belirteçleri eklenerek işaretleme yapılmıştır (Faruqu vd., 2018). CD9 ve CD81 antikorlarıyla işaretli eksozomlar izotip antikorlarına göre analizi Flow sitometri cihazı ile okutulmuş ve NovoExpress 6.0 programı ile analizi yapılmıştır.

4.1.2.4.4. Eksozomların geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile karakterizasyonu

Eksozomların hem boyutlarının hem de zar yapısının görüntülenmesi için geçirimli elektron mikroskobu ile (Transmission electron microscopy; TEM) görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Bu görüntüleme hWJ-MKH'lardan ultrasantrifuj ile elde edilmiş eksozom süspansiyonu karbon kaplı 200 meshli bakır gridler üzerine yaklaşık 200 µL alınarak adsorbe edilmesi ve beklenerek kurutulması sağlanmıştır. Ardından saf su ile yıkama işlemi yapılmış ve yaklaşık %3 Uranil asetat içeren solüsyon ile boyanmıştır. Kuruyan gridler direkt olarak geçirimli elektron mikroskobu ile 120 kV altında görüntülenmiştir. Geçirimli elektron mikroskobu ile karakterizasyonu, Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (ARUM)'nde hizmet alımı ile yaptırılmıştır.

4.1.2.4.5. Eksozomların taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyonu

Elde edilen eksozomların yüzey morfolojisinin ve üç boyutlu yapısının incelenmesi taramalı elektron mikroskobu ile yapılmıştır. Eksozomların formülasyon geliştirme basamakları süresince yapısının bozulup bozulmadığını görüntülemek üzere formülasyon örnekleri de incelenmiştir. hWJ-MKH'lerden elde edilen eksozomlar, liyofilizasyon ile kurutma işlemi yapılacağı için 15 mg/mL mannitol içeren PBS ile seyreltilmiştir. Karbon bant yapıştırılmış örnek stub'ının üzerine damlatılmış ve sonrasında liyofilizasyon işlemi ile kurutulmuştur. Son olarak da elektriksel iletkenliği sağlamak için nano ölçekte Au/Pd ile kaplanarak yüksek vakumda, 5 kV hızlandırma gerilimi altında görüntülenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu ile karakterizasyon çalışmaları, Prof. Dr. Murat ERDEM'in yardımları ile Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesinde gerçekleştirilmiştir.

4.1.2.4.6. Nanopartikül izleme analizi (NTA)

İzole edilmiş eksozomlar kullanılarak NanoSight NS300 cihazıyla Nanopartikül İzleme Analizi (NTA) ölçümleri yapılmıştır. Eksozomlar PBS ile 1:10, 1:100, 1:1000 oranında seyreltilmiştir. Parçacık boyutu dağılımı ve izole edilmiş eksozom veri konsantrasyonu, NTA 3.4.003 yazılımı ile analiz edilmiştir. Tüm işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Nanopartikül İzleme Analizi, hizmet alımı ile Hacettepe

Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜNİTEK)'nde yaptırılmıştır.

4.1.2.4.7. Zetasizer ile boyut analizi

hWJ-MKH'lerden elde edilen eksozomların partikül boyutu analizi Malvern Zetasizer cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Eksozom süspansiyonundan 10 µL alınarak PBS ile 1 ml'ye tamamlanmış ve zeta hücresine alınan bu dispers ortam cihaza verilmiştir. PBS'in herhangi bir partikül içermediğinin kontrolü yapılmak üzere öncesinde aynı analiz yöntemi ile PBS analiz edilmiştir (Kesimer & Gupta, 2015). Analiz edilen çözeltinin sıcaklığını oda ısı ile dengelemek için numunelerin her ölçümden önce sıcaklığı 2 dakika boyunca optimize edilmiştir (Ruzicka-Ayoush vd., 2023).

4.1.3. Mesalazin ve eksozom içeren formülasyonların geliştirilmesi

4.1.3.1. Mesalazin içeren formülasyonun geliştirilmesi

İki fazdan oluşan mikroakışkan sistem geliştirilirken, % 2 lesitin içeren yağ fazı olarak kakao yağı karışımı hazırlanmıştır. 100 °C sıcaklığa ayarlanan manyetik karıştırıcı üzerinde 30 dakika boyunca sıvılaştıran kakao yağı ile lesitin karışması sağlanmıştır. Bu işlem sonucunda kakao yağının viskozitesi sıcaklık ile çok değiştiğinden manyetik karıştırıcının sıcaklığı 50 °C'ye düşürülerek bir süre o şekilde sıcaklığı düşmesi için karışması sağlanmıştır.

Su fazı hazırlamak adına öncelikle mesalazinin sudaki çözünürlüğü denenmiştir. Sıcak su, soğuk su, etanolde yapılan deneylerde 50 mL içerisinde 100 mg maddeden fazlasının çözünemediği gözlenmiştir. Isıtma karıştırma gibi işlemlerle bu oran arttırılamamıştır. Çip ile yapılan denemelerde, mesalazinin sadece suda sonikatör yardımı ile dağıtılarak hazırlanan karışımların çok hızlı bir şekilde çöktüğü gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.1).



Şekil 4.1. 15 mg mesalazin 5 mL distile su ile hazırlanmış karışımının elastik boruya çöküşü

Hızlı çökmenin önlenmesi için süspansiyon yapılmasına karar verilmiştir. Bunun için değişik oranlarda karboksi metil selüloz (CMC) içeren çözeltiler (% 1, % 2.5, % 3.5, % 5) hazırlanmıştır. 250'şer mg mesalazin hazırlanan CMC çözeltilerinde prob sonikatör yardımı ile (% 80 ampl) 30 saniye karıştırılarak dağıtılmış ve çökme oranları gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.2).

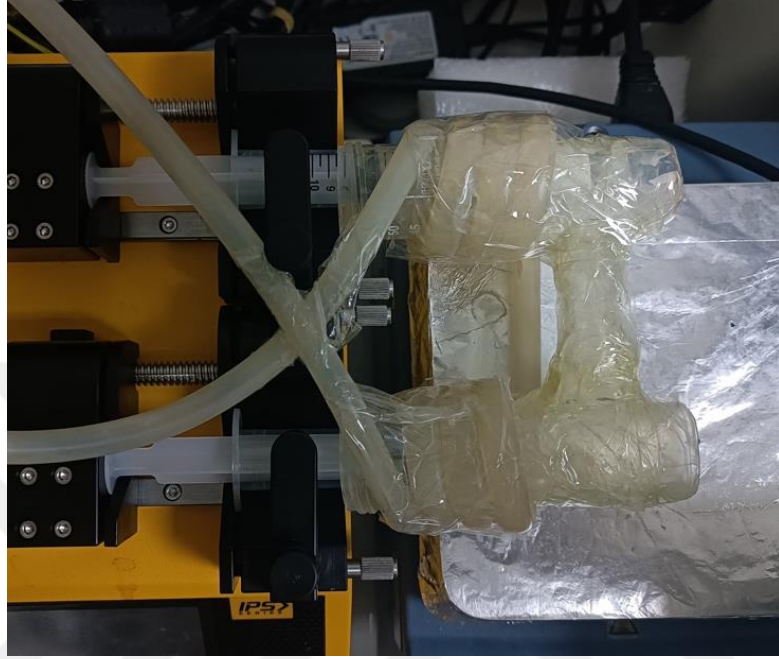


Şekil 4.2. CMC içeren çözeltilerinde hazırlanmış mesalazin süspansiyonları (soldan sağa % 1, % 2, % 3, % 5).

Viskozite, CMC içeriği ve çökme süreleri göz önünde bulundurulduğunda % 2.5 CMC içeren ultra saf su ile hazırlanan çözeltinin mesalazin ile süspansiyon hazırlanarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan yağ fazı (kakao yağı + % 2 lesitin) ve su fazı (% 2.5 CMC içeren çözelti ile hazırlanmış mesalazin süspansiyonu) çipe verilerek iki fazın akış hızları değiştirilmiş ve damlacık oluşup oluşmayacağı gözlenmiştir. Bu aşamada değişik akış hızları denenmiş ve mikroskop altında damlacık oluşup oluşmadığı gözlenmiş, oluşan damlacıklar ise bir lam üzerine damlatılarak stabilite ve yapısı incelenmiştir. Sıcaklığın viskoziteyi, viskozitenin de oluşan damlacıkların stabilitesi ve boyutunu etkilediği gözlemlenmiştir. Ayrıca çalışma esnasında boruda ve çip içinde kakao yağının donduğu görülmüş, donma sorunun çözmek ve daha stabil akış sağlayabilmek adına sirkülizasyonlu su banyosu kullanılmaya başlanmıştır. 50 mL'lik

falkonlara sirkülizasyonlu su banyosuna ait borular dolandırılarak, şırınga pompa üzerinde şırıngaları ısıtacak ceketli bir ısıtıcı oluşturulmuştur (Bkz. Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).



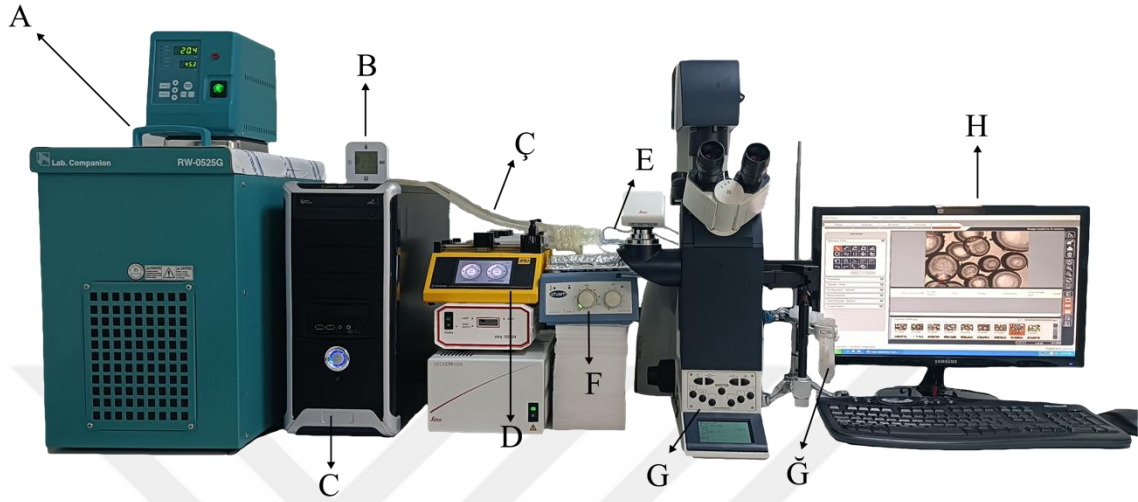
Şekil 4.3. Sirkülasyonlu su banyosu ile oluşturulan ısıtıcı düzenek



Şekil 4.4. Hazırlanan ısıtıcı düzeneğin şırınga pompasındaki kullanımı

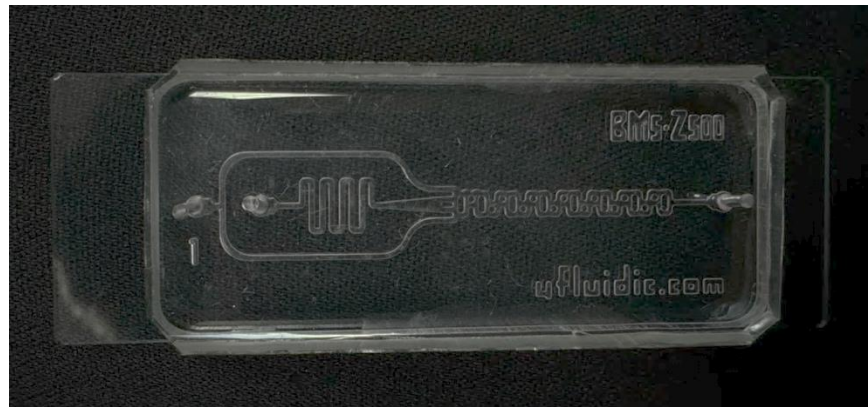
Hazırlanan ısıtıcı 50 °C'ye ayarlanarak hem su fazının hem de yağ fazının aynı sıcaklığa getirilmesi sağlanmıştır. Bu sayede daha kontrollü bir akış oluşturulmuştur. Su fazında yer alan süspansiyondaki mesalazinin çökmesini yavaşlatmak adına şırınganın içine küçük bir balık atılıp şırınganın altına manyetik karıştırıcı konulmuştur. Böylelikle

akış boyunca çipten daha stabil bir etkin madde geçişi sağlanmaya çalışılmıştır. Formülasyon geliştirmek için oluşturulan bu sistem Şekil 4.5'te ayrıntılı olarak verilmiştir.

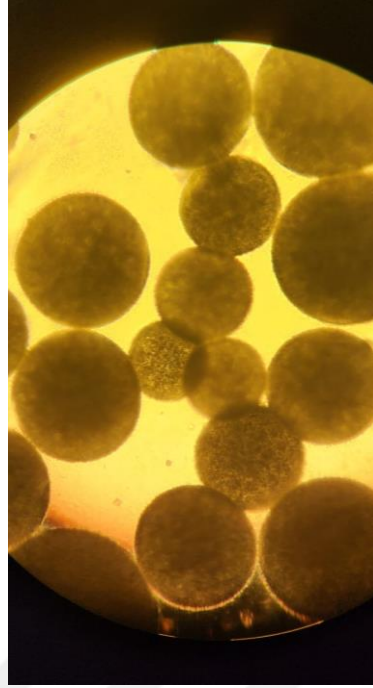


Şekil 4.5. Mikroakışkan çip ile oluşturulmuş sistem (A: sirkülasyonlu su banyosu, B:oda ısısını kontrol etmek için termometre, C: bilgisayar, Ç: sirkülasyonlu su banyosuna ait ısıtıcı borular, D: şırınga pompası, E: mikroakışkan çipten çıkan elastik borular, F: ısıtıcı manyetik karıştırıcı, G: mikroskop, Ğ: emülsiyon toplama kabı, H: monitör)

Yukarıda bahsedilen düzenlemeler yapıldıktan sonra Şekil 4.6'da yer verilen çiple iki fazın da 48 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış ile verilmesi sağlanarak damlacıklar oluşturulmuştur (Bkz. Şekil 4.7). Bu optimum akış hızını bulabilmek için değişik akış hızlarında denemeler yapılmıştır.

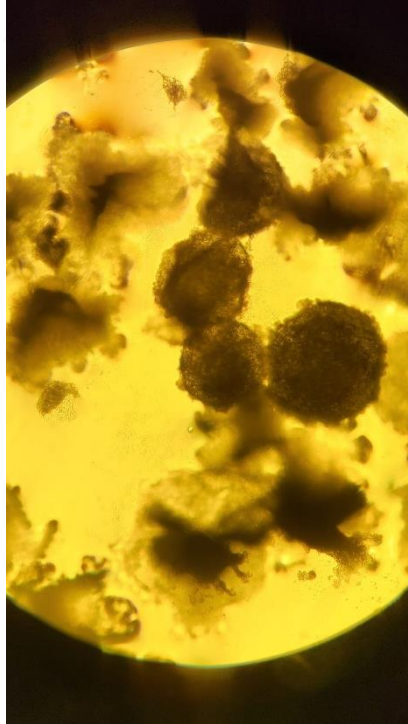


Şekil 4.6. Emülsiyon oluşturmak için kullanılan PDMS çip



Şekil 4.7. İki fazın da 48 $\mu\text{L}/\text{dk}$ olarak verildiğinde oluşan damlacıkların ışık mikroskobu görüntüsü (40X)

Oluşan damlacıklar mikroskop altında incelendiğinde kakao yağı donduktan sonra parçalandığı görülmüştür (Bkz. Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Oluşan damlacıkların kakao yağı donduktan sonraki ışık mikroskobu görüntüsü (40X)

Bu sorunun üstesinden gelebilmek için ilk olarak kullanılan lesitin oranı % 4'e çıkarılmıştır. Damlalarda donma sonrası oluşan bozunma yeniden gözlenmesi bu durumun yağı ısıtırken uygulanan yüksek sıcaklıkların yağın kristal yapısını bozmasından kaynaklanabileceğini düşündürdüğünden yağ 50 °C'de eritilerek hazırlanmıştır. Oda ısısında ve aniden -20 °C'ye maruz bırakma yolu ile doldurulan formüllerde damlalarda herhangi bir bozulma gözlenmemiştir.

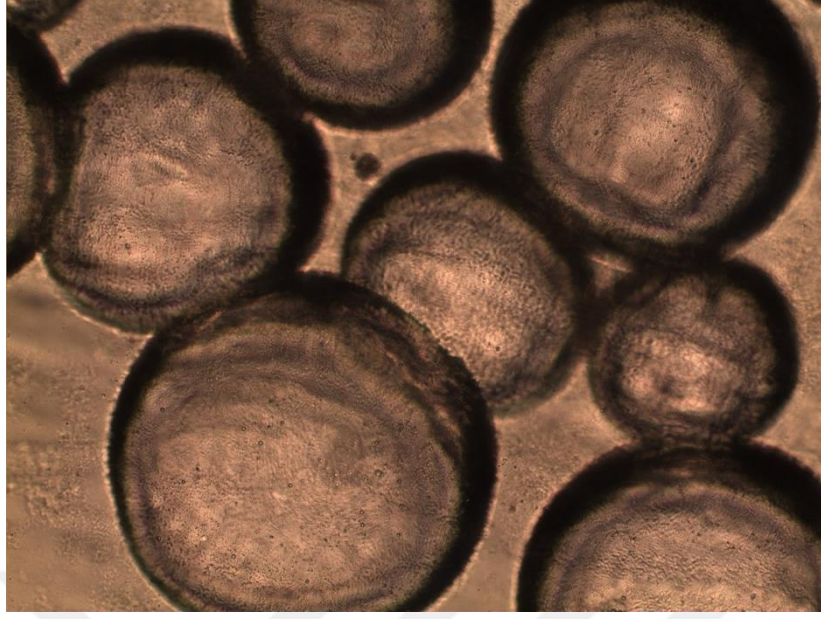
Su fazı olan 125 mg mesalazin % 2.5 CMC çözeltisi (5 mL); 48 µL/dk, yağ fazı olan % 4 lesitin içeren kakao yağı; 48 µL/dk akış hızı ile mikroçipe verilmiş, ısıtıcı ile fazlar çipe verilmeden 50 °C'ye ısıtılmıştır. Oluşan emülsiyon direkt olarak enterik kaplı kapsüllere doldurulmuş, kapsüllerin eş miktarda formül ile doldurulabilmesi için dolum esnasında süre tutulmuştur. Eş sürede doldurulan kapsüller -20 °C'de 4 saat bırakılarak dondurulmuş ve 9.4 mBar basınç altında -110 °C'de 36 saat liyofilize edilmiştir.

4.1.3.2. Eksozom içeren formülasyonun geliştirilmesi

Eksozom içeren emülsiyon sistem geliştirilirken yağ fazı, diğer emülsiyon sistemi ile aynı dış faza sahip olması için Bölüm 4.1.3.1'de anlatılan ve seçilen yağ fazının birebir aynısı olacak şekilde % 4 Lesitin içeren kakao yağı kullanılmıştır.

Formülasyon geliştirme aşaması liyofilizasyon prosesi içerdiği için donma esnasında eksozomların zar yapısının bozulmaması ve agrege olmalarını minimize etmek için kriyoprotektan kullanılmasına karar verilmiştir. Kullanılacak mannitol, 5 mg/mL, 9 mg/mL, 15 mg/mL olacak şekilde 3 farklı konsantrasyonda formülasyonda oluşacak damlacıkların boyutlarını ve stabilitesini nasıl etkilediğini anlamak için denenmiştir (*Method for lyophilizing exosome*, 2020). Bu denemeler için hazırlanan PBS ile istenilen oranlarda mannitol oda ısısında karıştırıcı yardımı ile çözündürülüp ve sonrasında 0.22 µm filtreden süzümüştür. Formülasyon çalışması eksozom içermeyen PBS içerisinde çözündürülmüş mannitol ile denemeler yapılmıştır.

Her konsantrasyonda damlacık oluşumu sağlanmasına rağmen kakao yağının donması ile birlikte en stabil damlacık formunun korunmasını sağlayan su fazı 15 mg/mL mannitol içeren su fazı olduğu bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.9). Bu sebeple eksozomları içerecek su fazı olarak 15 mg/mL mannitol içeren PBS kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.9. 15 mg/mL mannitol içeren su fazı ile oluşturulan damlacıkların ışık mikroskobu görüntüsü (40X)

Mesalazin içeren formülasyonun hazırlanması için kullanılan sistem eksozom içeren formül için de kullanılmıştır (Bkz. Şekil 4.5). Mesalazin içeren formülasyon geliştirilirken sirkülasyonlu ısıtıcı ile hem su hem de yağ fazı 50 °C'ye ısıtılırken, eksozom içeren formül için yalnızca yağ fazı ısıtılmıştır. Eksozomlar 50 °C sıcaklıkta bozulacağından eksozom içeren su fazında ısıtma işlemi yapılamamıştır. Böyle bir durumda oda sıcaklığı çok önemli bir hale gelir. Oda sıcaklığında çalışıldığında, 50 °C'ye ısıtılan yağ fazı ile oda ısısında olan su fazı karşılaştığında meydana gelen damlacıkların stabilitesinin düşük ve şekillerinin bozuk olduğu ayrıca çip içerisinde soğuyan kakao yağının donduğu gözlenmiştir. Oda bir ısıtıcı yardımı ile 32 °C'ye ısıtılarak damlacıkların stabil hale gelmesi ve akışın kesintisiz bir hale gelmesi sağlanmıştır.

Mesalazin içeren formülasyonun hazırlanması için kullanılan, Şekil 4.6'da yer verilen çip kullanılmış ve su fazından 48 µL/dk akış, yağ fazından 48 µL/dk verilerek formülasyon oluşturulmuştur. Formül enterik kaplı kapsüllere eş sürede doldurulmuştur. Kapsüller -20 °C'de dondurulup sonrasında liyofilize edilmiştir.

4.1.4. Mesalazin ve eksozom içeren formülasyonların karakterizasyonu

4.1.4.1. Fiziksel görünüm

Hazırlanan formülasyonların damlacıkların boyutları gözle görüntülenebilir olduğundan hem in-proses kontrol olarak da hem de formülasyon tamamlandıktan sonra organoleptik olarak incelenmiştir.

4.1.4.2. Mesalazin içeren formülasyonların karakterizasyonu

4.1.4.2.1. Etkin madde miktar tayini

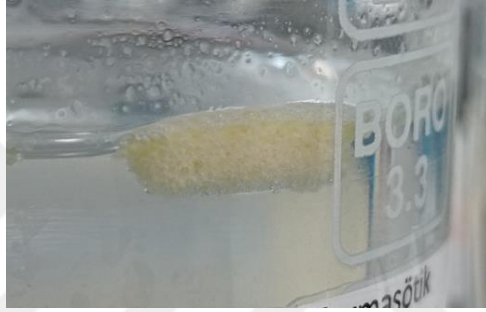
Mesalazin etkin maddesi için yapılacak etkin madde miktar tayini analizlerinde Ultra Basınçlı/Performans Sıvı Kromatografisi (UPLC) cihazı kullanılmıştır. Etkin madde miktar tayini için, mesalazin içeren iç fazla doldurulan kapsüller üzerinde analiz yapılmıştır. pH etkisinin formülasyona yüklenen total etkin madde miktarına etkisini analiz edebilmek adına iç faz olarak kullanılacak çözeltisinin pH 3 ve pH 7.5'a ayarlanmış formları ile hazırlanan formülasyonlar analiz edilmiştir.

Mesalazinin çözünürlük sorunu nedeniyle iç faz olarak hazırlanan süspansiyondan etkin maddenin formülasyon oluşturma aşamasında çökmesi ihtimali ile kapsüllere yüklenen etkin madde miktarının değişip değişmediğinin analizinin yapılması için kapsüllerin dolum sırası analiz edilmek istenmiştir. Bu sebeple 3 farklı dolum esnasında farklı dolum sıraları ile doldurulan kapsüller ayrı ayrı analiz edilmiştir. Analiz edilmeden önce her kapsülün ağırlığı tartılmıştır fakat formülasyon direkt olarak kapsüle dolum yapılarak hazırlandığından tartım dolum yapılan alt kapsül ile birlikte yapılmıştır. Kapsül içine dolum yapılan emülsiyon formülasyonun ağırlığını bulabilmek adına 10 ayrı enterik kaplı kapsülün kapaksız ağırlığı da tartılmış ve ortalaması alınarak bu değer formülasyonlu kapsüllerden çıkartılmıştır.

Yapılan ilk denemede liyofilize edilen kapsüllerin kapsül kısmı soyulup donmuş halde bulunan emülsiyon çıkartılmış ve 5 mL diklorometan (DCM) içerisinde yağın çözünmesi sağlanmıştır. Mesalazini su fazına alabilmek için 40 mL % 0.1 fosforik asit içeren ultra saf su eklenmiş ve çalkalayıcı karıştırıcı kullanılarak iyice karıştırılmıştır. İki faz arasındaki ayrımın iyice yapılabilmesi için 40 °C'ye ayarlanmış santrifüj cihazında 11.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte toplanan su fazından örnekler alınarak 0.22 µm şırınga filtrelerden süzülüş ve UPLC'de analiz edilmiştir. Bu deneme başarısız olmuştur. Bunun sebepleri, mesalazin içeren su fazının yağ fazı ara yüzeyinde toplanmış

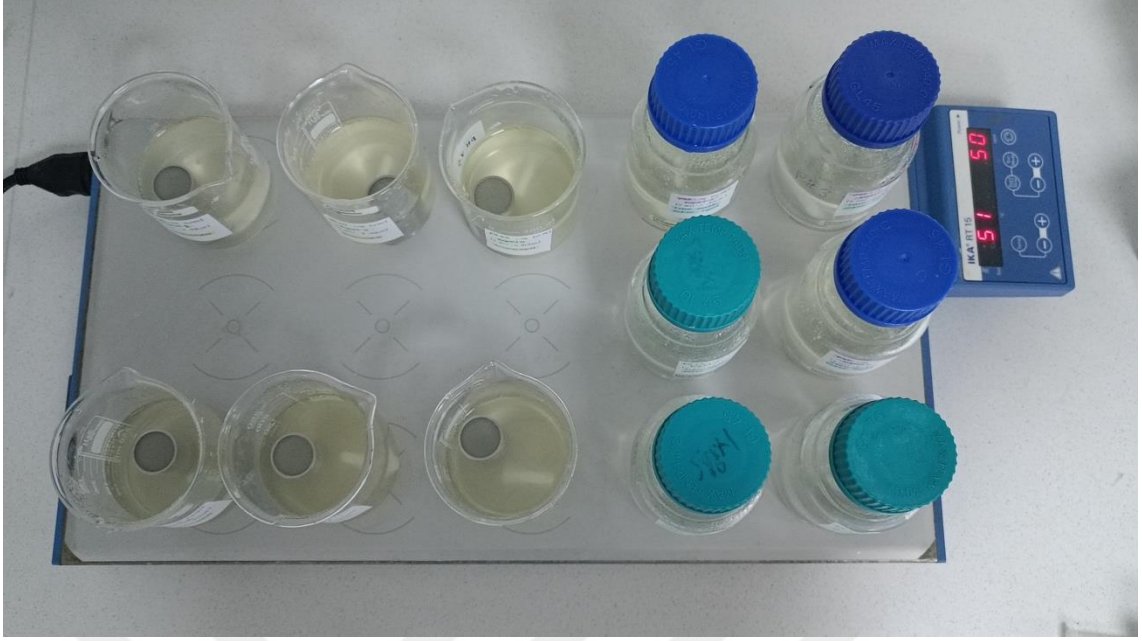
olabileceği gibi 40 mL su fazının etken maddede çözme için yeterli gelmemiş olasılığı değerlendirilmiştir.

Yapılan ikinci denemede DCM ile yağ fazının çözündürülmesi sonucunda başarılı sonuç alınamayınca kapsüllerinden soyulan formülasyonlar kakao yağının sıvılaşabilmesi için 150 mL Tampon I dissolusyon ortamında 50 °C'ye ayarlanan manyetik karıştırıcı yardımı ile yüksek rpm'de karıştırılmıştır. Formülasyon Şekil 4.10'da görüldüğü gibi hızlıca dağılmış, 6. ve 26. saatlerde örnekler alınıp 0.22 µm şırınga filtrelerden süzölmüş ve UPLC'de analiz edilmiştir. 6. ve 26. saatler arasında kümülatif etkin madde miktarı açısından önemli bir fark olmadığı görölmüş, bu durum, yüksek sıcaklık ve rpm'de formülasyonun hızlı dağılmasına bağlanmıştır.



Şekil 4.10. Kapsülünden soyulan formülasyonun görünümü

Etkin madde miktar tayini analizinin daha doğru sonuçlar verebilmesi için kapsülleri ve etken maddeyi birbirinden ayırmanın pek doğru olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu sebeple etkin madde miktar tayini 150 mL Tampon I dissolusyon ortamı kullanılarak soyulmamış bütün kapsüller üzerinde yapılmıştır. Aynı zamanla etkin maddenin uzun süre 50 °C gibi bir sıcaklıkta bulunmasının bozunma gibi bir duruma neden olup olmayacağını anlayabilmek adına bu çalışma dissolüsyonla eş zamanlı olarak 37 °C'de gerçekleştirilmiştir. pH 6 tampon ortamı kapaklı cam bir şişeye alınarak 37 °C'ye ayarlanmış (Bkz. Şekil 4.11), İçine atılan bir manyetik karıştırıcı yardımı ile kapsülün karışması, pH etkisi ile açılması ve sonrasında vücut sıcaklığı ile kakao yağının dağılması sağlanmıştır (Bkz. Şekil 4.12). Örnekler alınıp UPLC ile analiz edildikten sonra 11., 24. ve 50. saatlerde alınan örnek sonuçları, 24. saatte etkin madde miktarının hemen hemen hepsinin ortama salınmış olduğunu göstermiştir. Yapılan ikinci denemede görünen 6 saatte etkin maddenin tümünün salınmasının, yüksek sıcaklık ve rpm'e bağlı olduğu gözlenmiş ve daha standardize sonuçlar elde edebilmek adına bu son yöntemin kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.11. Salım çalışması ve etkin madde miktar tayini deney düzeneği



Şekil 4.12. Etkin madde tayini için oluşturulan sistem

4.1.4.2.2. Etkin madde salım çalışması

In vitro salım çalışmalarında; pH etkisinin mesalazinin formülasyondan salım profiline etkisini analiz edebilmek adına iç faz olarak kullanılacak CMC çözeltisinin pH 3 ve pH 7.5'a ayarlanmış formları ile hazırlanan formülasyonlara ait salım çalışması yapılmıştır. Toplanan örnekler UPLC kullanılarak analiz edilmiştir.

Mesalazin ile hazırlanan bu formülasyon ülseratif kolit hastaları için kullanılacağından kolona ulaşması hedeflenerek hazırlanmıştır. Bu nedenle gastrointestinal sistemi mimik etmek adına farklı pH'larda hazırlanan 4 çözünme ortamı kullanılmıştır (Bkz. Tablo 4.4). Dissolüsyon ortamları Tablo 4.5'te yer alan içeriklerle hazırlanmıştır.

Tablo 4.4. *Salım çalışması için kullanılan ortamlar*

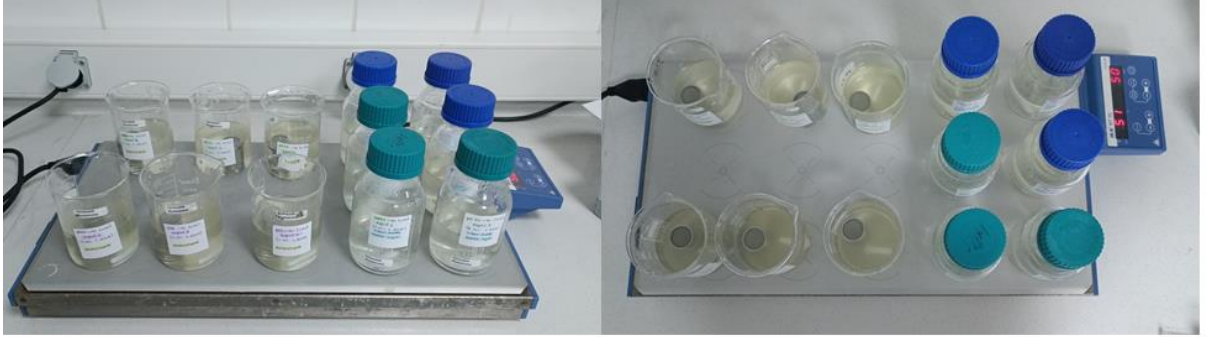
	Mimike ettiği GIS sıvısı	Süre	pH	Rpm
Asit aşaması	Mide sıvısı	2 saat	1.2	100
Tampon aşaması I	Duodenum	1 saat	6	100
Tampon aşaması II	İleum	90 dakika	7.2	50
Tampon aşaması III	Kolon	48 saat	6.5	50

Tablo 4.5. *Salım çalışması için kullanılan ortamların içerikleri*

Asit aşaması	Mide sıvısı	2 g NaCl 80 mL 1 M HCl Distile su km 1000 mL
Tampon aşaması I	Duodenum	43.35 g monobasik potasyum fosfat 1.65 g NaOH Distile su km 2000 mL
Tampon aşaması II	İleum	Tampon I, Çözelti B (133,6 g NaOH; distile su km 2000 mL) kullanılarak pH 7.2'ye ayarlanır.
Tampon aşaması III	Kolon	Tampon II, fosforik asit kullanılarak pH 6.5'a ayarlanır.

Mide sıvısını mimik eden ortam hazırlandıktan sonra 150 mL ortam beherlere konularak 37 °C'ye getirilmiş ve enterik kaplı kapsüllere doldurulan liyofilize edilmiş formüller, mide sıvısını mimik eden ortama atılmıştır (Türk Farmakopesi syf 882). Kapsüllerin yüzmemesi bir kafes yardımıyla sağlanmış, behere manyetik karıştırıcı atılarak ortamın sürekli karıştırılması sağlanmıştır. 2 Saat sonunda, duodenum ortamı için hazırlanan pH 6'daki tampon I, mide ortamı ile aynı hacimde 37 °C'ye getirilmiş, mide ortamında deforme olmayan enterik kapsüller ortamdan çıkartılıp bir havlu kâğıt yardımı ile nazikçe kurulandıktan sonra tampon I ortamına atılmıştır. Aynı şekilde kafes ve manyetik karıştırıcı kullanılarak ortam koşulları optimize edilmiştir. Kapsüller açılmaya başladığından 3. ortam olan ileumu mimik edecek tampon ortamının pH 7.2'ye ayarlamak için USP'de yer alan çözelti B kullanılmıştır. Bu alanda feçes yoğunluğunun artması söz konusu olduğundan rpm 50'ye düşürülmüştür. Tampon III aşamasına geçmek için pH

6.5'e ayarlamasında fosforik asit kullanılmıştır. Sıcaklık ve rpm analiz boyunca aynı tutulmuş, dissolüsyon ortamının buharlaşmasını önlemek için beherlerin ağızları parafilm ile kapatılmıştır (Bkz. Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Mesalazin madde miktar tayini ve salım çalışması için kullanılan düzenek.

Tablo 4.6. Salım çalışmasında örnek alma saatleri

Salım ortamı	Ortamda bulunduğu süre	Toplam Süre
Mide Vasatı	120 dk	120 dk (2. saat)
Tampon aşaması I	30 dk	150 dk
	60 dk	180 dk (3. saat)
Tampon aşaması II	30 dk	210 dk
	60 dk	240 dk
	90 dk	270 dk
Tampon aşaması III	30 dk	300 dk (5. saat)
	60 dk	330 dk
	90 dk	360 dk
	120 dk	390 dk
	240 dk	510 dk
	360 dk	630 dk
	450 dk	720 dk (12. saat)
	630 dk	900 dk
	1260 dk	1530 dk (25 saat 30 dk)
	1550 dk	1820 dk
	1770 dk	2040 dk
	2880 dk (48. saat)	3150 dk (52,5. saat)

Tablo 4.6'da belirtilen sürelerde 2'şer mL örnek toplanmış; toplanan örnekler 0.22 µm şırınga filtreden süzülerek UPLC'de analiz edilmiştir.

4.1.4.3. Eksozom içeren formülasyonun karakterizasyonu

Formülasyon içerisindeki eksozomların yapısının bozulup bozulmadığının belirlenmesi için, diğer yöntemler için yeterli bütçe bulunmadığından, sadece TEM ve SEM analizleri yapılmıştır.

4.1.4.3.1. Eksozomların geçirimli elektron mikroskopu (TEM) ile karakterizasyonu

Eksozom içeren kapsüllerdeki eksozomların TEM analizi, formüle edildikten sonra kapsüllerin dağılması ve çözünmesi sonucunda ortama salınan eksozomları içeren süspansiyon için yapılmıştır. Formüllerin 37 °C'ye getirilmiş PBS ortamında manyetik bir karıştırıcı yardımı ile dağılması sağlanmıştır. Özellikle formülasyonun çözündürülmesi sonucunda toplanan örneğin formülasyon kaynaklı kirlilikleri elimine etmek adına 20000 G'de 15 dakika olmak üzere 2 kez santrifüj edilmiş sonrasında süpernatantlar toplanmıştır. Eksozomları yoğun bir şekilde görüntüleyebilmek adına toplanan süpernatantlar ultrasantrifüjde +4°C'de 110.000xg'de 90 dk santrifüj edilmiştir. Pellet toplanmış ve PBS ile seyreltilmiştir. Örnekler daha sonra Bölüm 4.1.2.4.4.'de anlatıldığı gibi TEM cihazı ile analiz edilmiştir.

4.1.4.3.2. Eksozomların taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile karakterizasyonu

Formülasyon içerisinde eksozomların incelenebilmesi için mikroakışkan sisteminde oluşturulan formülasyon direkt olarak karbon bant yapıştırılmış stub'ının üzerine damlatılmış ve sonrasında liyofilizasyon işlemi ile kurutulmuştur ve Bölüm 4.1.2.4.5'de anlatıldığı gibi SEM cihazı ile görüntülenmiştir.

4.2. Hücre kültürü çalışmaları

Yapılan hücre kültürü çalışmaları hem mesalazinin, hem de mesalazin ve eksozom yüklenmiş kapsül içeriğinin hücreler üzerinde toksisitesini belirlemek, eksozomun hücreler üzerinde etkinliğini tespit etmek ve elde edilen eksozomların hücreler tarafından alındığının ispatı için gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada İnsan Göbek Damar Endotel Hücreleri HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) hücre hattı kullanılmıştır.

4.2.1. Sitotoksikite çalışması

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) tetrazolyum tahlili, canlı hücrelerin metabolik aktivitesini tahmin etmede popüler bir araçtır. Test, açık renkli suda çözünen tetrazolyum tuzunun, spektrofotometrik olarak ölçülebilen yoğun

mor-mavi renkli suda çözünmeyen formazana enzimatik olarak indirgenmesine dayanmaktadır. Bu işlem canlı hücrelerde mitokondriyel aktiviteyle gerçekleşir ve suda çözünmeyen formazan hücre zarında geçemeyeceği için canlı hücrelerde birikirler. Uygun şekilde optimize edilmiş koşullar altında elde edilen absorbans değeri, canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır (Fotakis & Timbrell, 2006; Grela vd., 2018).

Bu tez çalışmasında geliştirilmiş olan formülasyonların, etkin maddelerin ve kullanılan yardımcı maddelerin canlı hücreler üzerindeki toksik etkisinin tespit edilmesi amacıyla MTT testi uygulanmıştır. Çalışmada kullanılmak üzere 96 kuyucuklu plakaya her kuyuda 2×10^4 /mL hücre olacak şekilde DMEM ile hazırlanmış hücre süspansiyonu ile ekim yapılmıştır. 24 saat sonra kuyucuklardaki besiyeri çekilmiş ve belirlenen konsantrasyonlara sahip formüller ve etkin maddeler 5 farklı konsantrasyonda ve $n=3$ olacak şekilde hücrelerin üzerine eklenmişlerdir. Plakalar 37°C , %5 CO_2 ve % 95 hava içeren atmosfer koşullarında 24 ve 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi dolan plakalardaki besiyeri çekildikten sonra PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Her kuyuya MTT boyasından (5mg/mL) 20 μL ilave edilmiştir. 37°C 'de 3 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında MTT boyası kuyucuklardan uzaklaştırılıp her bir kuyucuğa 200 μL DMSO eklenerek formazan tuzunun çözünmesi sağlanmıştır. Renk oluşumunun gözlenebilmesi için tekrardan 37°C 'de 30 dakikalık inkübasyona bırakılmıştır. Plakalardaki canlı hücre konsantrasyonu Cytation 5 cihazı aracılığıyla 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Hücre canlılıklarını kıyaslamak için hücrelere hem mesalazinli hem de eksozomlu formüllerden uygulanmıştır. Saf meselazin, mesalazin içeren formülasyon ve plasebo formülasyon için 10 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları seçilmiş, bu konsantrasyonda mesalazin içerecek şekilde hücrelere uygulanacak çözeltiler hazırlanmıştır. Bunun için gerekli miktarda formül DMEM besiyerine eklenmiş 37°C 'ye ısıtılmış ve kakao yağının dağılması sağlanmıştır. Karıştırarak iç fazdaki mesalazinin besiyerinde çözündürülmesi sağlanmış ve gerekli seyreltmeler yapılmıştır. Meselazin de aynı bu şekilde 37°C 'ye ısıtılmış besiyerine eklenerek aynı işlemlerden geçirilerek çözündürülmüştür.

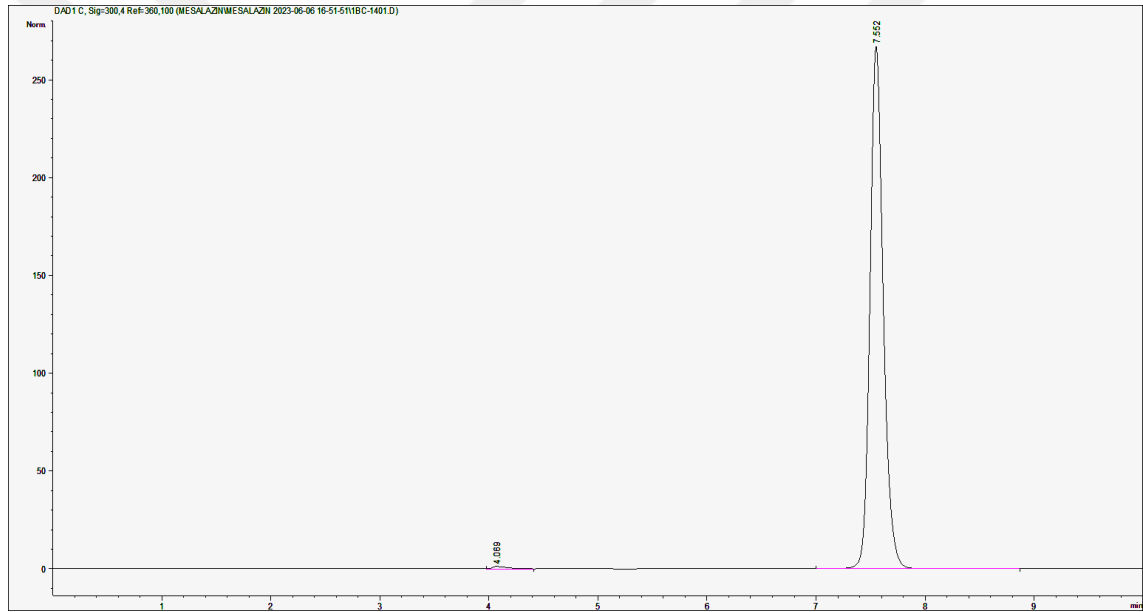
Saf eksozom, eksozom içeren formülasyon ve plasebo formülasyon için konsantrasyon belirlenmek istenirken eksozomlar üzerinde gerçekleştirilen protein miktar analizinde elde edilen değerden yararlanılmıştır. 45 $\mu\text{g/mL}$, 112.5 $\mu\text{g/mL}$, 225 $\mu\text{g/mL}$, 450 $\mu\text{g/mL}$, 900 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda protein içeriğine sahip olacak şekilde

5. BULGULAR VE YORUM

5.1.Mesalazine Ait Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları

5.1.1. Analitik yöntem geliştirme

Geliştirilen sistem için mesalazin etkin maddesine ait miktar tayininin gerçekleştirilebilmesi için yeni UPLC metodu geliştirilmiştir. Metoda ait farklı parametreler değiştirilerek en uygun yöntem bulunmuştur. Buna göre, 20 °C’de Ultra Saf Su : Methanol (90:10) mobil faz ile 0.600 mL/dk akış hızı ile kolona sürüklenen Mesalazinin 300 nm dalga boyunda 7.446. dakikada pik verdiği belirlenmiştir (Bkz. Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. Mesalazine ait kromotogram piki

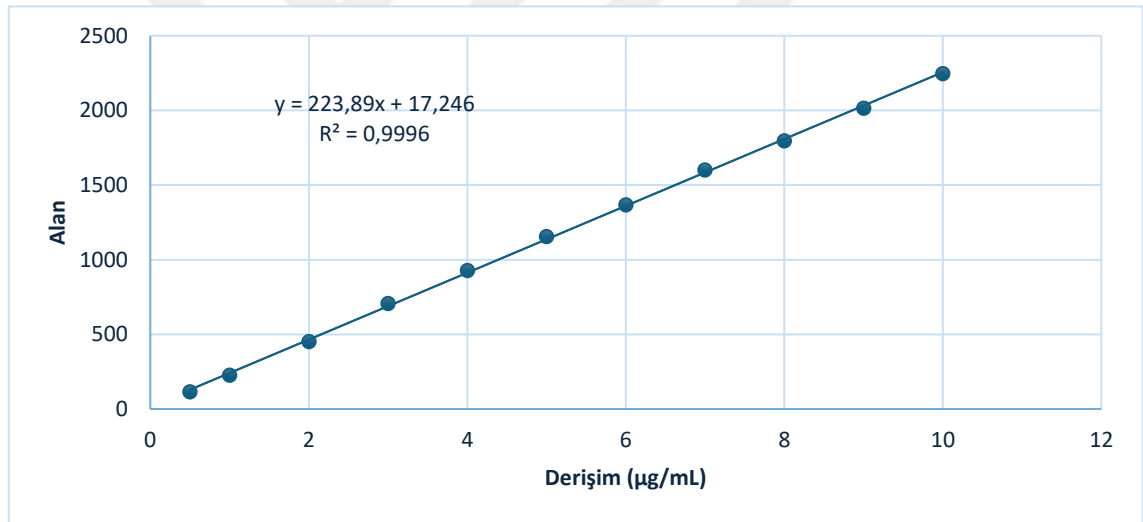
5.1.2. Validasyon çalışmaları

5.1.2.1. Doğrusallık

Mesalazin etkin maddesinin % 0,1 fosforik asit içeren ultra saf su içerisinde hazırlanan 0.5-10 µg/ml derişimlerdeki örneklerine karşılık gelen eğri altında kalan alan değerleri kullanılarak etkin maddeye ait kalibrasyon eğrisi bulunmuştur. Doğrusallık sonuçları Tablo 5.1’de, oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 5.2’de verilmiştir. Doğru denklemi $y = 223.9x + 17.246$ olarak bulunmuş ve $R^2 = 0.9996$ olarak belirlenmiştir. Korelasyon sayısının 1’e yakın olması yöntemin doğruluğunu göstermiştir.

Tablo 5.1. Mesalazin doğrusallık sonuçları

Derişim µg/mL	Alan						Ortalama	SS	SH
	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Seri 4	Seri 5	Seri 6			
0.5	114.057	116.419	116.360	113.661	115.984	115.511	115.332	1.193	0.689
1	228.976	227.582	226.431	223.219	227.232	227.113	226.758	1.928	1.113
2	455.174	453.040	455.205	454.727	455.186	446.089	453.238	3.599	2.078
3	685.772	685.772	721.574	721.574	718.414	714.342	707.053	15.723	9.078
4	928.127	916.592	919.386	939.996	936.383	928.253	928.122	9.149	5.282
5	1154.84	1157.01	1157.08	1156.35	1154.540	1154.440	1155.710	1.242	0.717
6	1368.900	1370.051	1364.710	1373.000	1362.860	1370.800	1368.472	3.887	2.244
7	1595.020	1600.360	1606.020	1602.320	1604.150	1598.376	1601.041	4.548	2.626
8	1806.740	1809.680	1782.050	1808.050	1805.980	1771.730	1797.327	16.205	9.356
9	1987.680	2020.350	2031.270	2024.440	2013.240	2015.240	2015.370	15.041	8.684
10	2250.10	2247.930	2248.910	2248.850	2241.340	2247.640	2247.462	3.121	1.802

**Şekil 5.2.** Doğrusallık Eğrisi (0.5-1 µg/mL)

5.1.2.2. Doğruluk

Mesalazin'in çalışma aralığı içerisinde yer alan 3 konsantrasyonu (1.5 µg/mL, 5.5 µg/mL, 9.5 µg/mL), 3'er kez analiz edilmiştir. Hesaplanan derişim miktarları teorik derişimle karşılaştırılmıştır. % geri kazanım verileri üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Doğruluk çalışmasına ait sonuçlar aşağıda Tablo 5.2'de yer almaktadır.

Tablo 5.2. Mesalazin doğruluk çalışması sonuçları

Derişim (µg/mL)	1.5	5.5	9.5
	1.4644	5.4682	9.5003
Elde Edilen Derişim (µg/mL)	1.4830	5.6079	9.3128
	1.4732	5.4238	9.3768
% Geri Kazanım	97.6298	99.4233	100.0042
	98.8676	101.9619	98.0300
	98.2140	98.6161	98.7033
Ortalama % Geri Kazanım	98.2371	100.0004	98.9124
Standart Sapma	0.6192	1.7459	1.0003
Standart Hata	0.3575	1.0080	0.5794

ICH kılavuzlarına göre geliştirilen analitik yöntemin doğru olarak kabul edilebilmesi için yüzde geri kazanım değerinin kabul aralığı % ± 2 'dir. Yapılan analiz sonuçları değerlendirildiğinde, çalışmadaki tüm % geri kazanım değerleri istenilen aralıkta bulunmuştur.

5.1.2.3. Kesinlik

Mesalazin'in çalışma aralığı içerisinde yer alan 3 konsantrasyonu (15 µg/mL, 5.5 µg/mL, 9.5 µg/mL), 3 farklı günde 3'er kez analiz edilmiştir. Kesinlik için varyasyon katsayısı üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 5.3 yer almaktadır.

Tablo 5.3. Mesalazinin kesinlik çalışması sonuçları

	1. Gün	2. Gün	3. Gün
1.5 µg/mL	1.4827	1.4669	1.4354
	1.4711	1.4723	1.4211
	1.4822	1.4734	1.4245
Ortalama	1.4787	1.4709	1.4270
Standart Sapma	0.0065	0.0034	0.0074
Varyasyon Katsayısı	0.4412	0.2372	0.5227
5.5 µg/mL	5.4820	5.5362	5.5604
	5.5490	5.5489	5.7039

	5.6125	5.5058	5.7185
Ortalama	5.5478	5.5303	5.6609
Standart Sapma	0.0652	0.0221	0.0873
Varyasyon Katsayısı	1.1759	0.4004	1.5432
9.5 µg/mL	9.3431	9.6573	9.3500
	9.3676	9.4881	9.3731
	9.3476	9.4926	9.4198
Ortalama	9.3528	9.5460	9.3810
Standart Sapma	0.0130	0.0963	0.0355
Varyasyon Katsayısı	0.1390	1.0097	0.3790

Elde edilen kesinlik sonuçlarına göre hesaplanan varyasyon katsayısının % 2’den küçük olması gerekmektedir (ICH, 2005). Tablo 5.3’te verilen analiz sonuçları incelendiğinde, tüm derişimler için elde edilen değerler kabul edilen sınırlar içinde yer almakta ve yöntemin kesinliğini kanıtlamaktadır.

5.1.2.4. Duyarlılık

LOD ve LOQ değerleri ‘4.1.2.5. Duyarlılık’ başlığı altında yer alan Eşitlik 4.1 ve Eşitlik 4.2 yardımıyla hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 5.4’te gösterilmektedir.

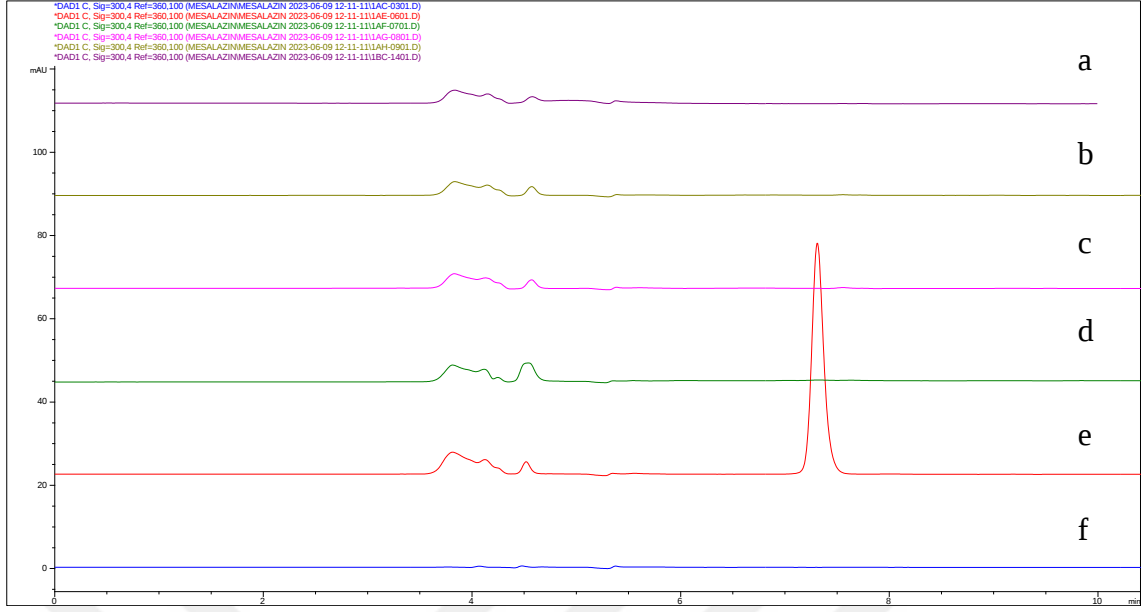
Tablo 5.4. Saptama ve tayin sınırları

Sınır	Derişim
LOD (Saptama sınırı)	0.053271
LOQ (Tayin sınırı)	0.017579

Analitik yöntem validasyonu için kullanılan en düşük Mesalazin derişimi 0.5 µg/mL’dir. LOD ve LOQ değerlerinin 0.5 µg/mL’den daha küçük olması, analitik yöntemin duyarlılığının kanıtıdır.

5.1.2.5. Seçicilik

Oluşturulan formül ve analiz ortamlarında bulunabilecek diğer maddeler UPLC’de etkin madde ile aynı koşullarda analiz edilmiştir. Kromotogramlara Şekil 5.3’te yer verilmiştir.

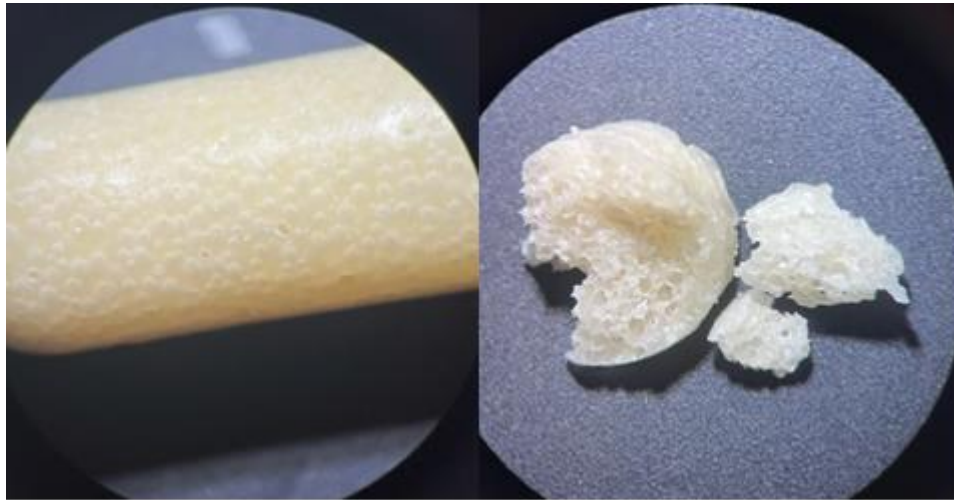


Şekil 5.3. UPLC kromotogramları. PBS (a), Kakao yağı (b), Lesitin (c), CMC (d), Mesalazin (e), Fosforik asit (f)

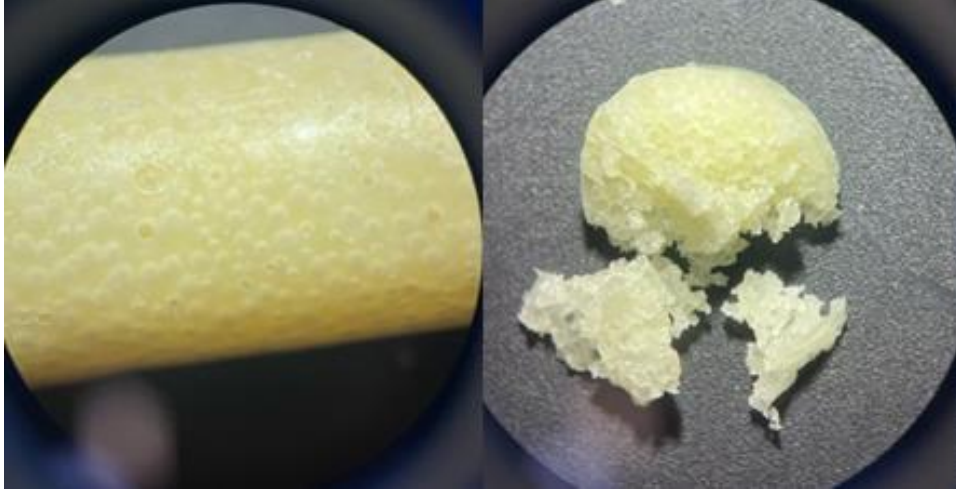
5.2. Karakterizasyon Çalışmaları

5.2.1. Fiziksel görünüş

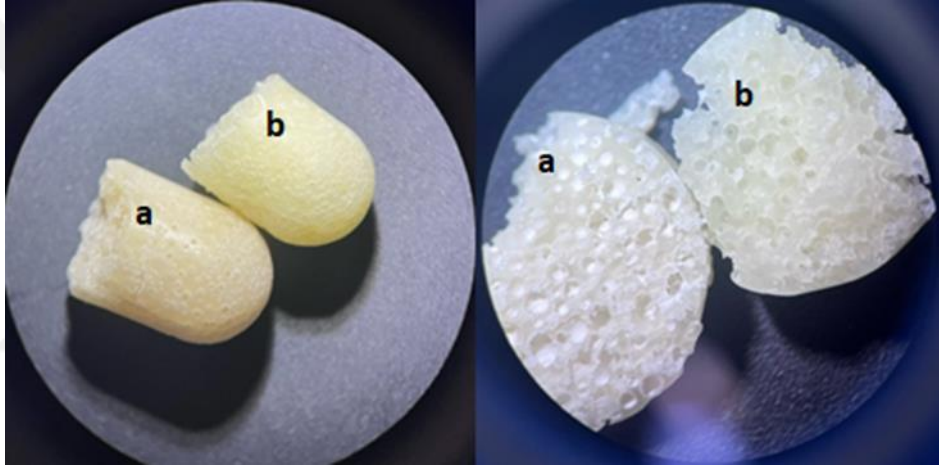
Formülasyon geliştirme basamakları tamamlanıp formüller oluşturulduktan sonra kontrolleri yapılmak üzere formüller liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon işlemi sonrasında enterik kapsüller bir jilet yardımı ile kesilerek soyulmuş ve binoküler stereo mikroskop altında damlacıklar incelenmiştir. Formülasyon kırılarak damlacıkların yapısına ışık mikroskopu ile bakılmıştır (Bkz. Şekil 5.4, Şekil 5.5 ve Şekil 5.6).



Şekil 5.4. Mesalazin içeren kapsül içeriğine ait ışık mikroskobu görüntüleri



Şekil 5.5. Eksozom içeren kapsül içeriğine ait ışık mikroskobu görüntüleri



Şekil 5.6. Mesalazin ve eksozom içeren kapsül içeriğine ait karşılaştırmalı ışık mikroskop görüntüleri;
a:mesalazin, b:eksozom

5.2.2. Mesalazin içeren formülasyonların karakterizasyonu

5.2.2.1. Etkin madde miktar tayini

Bölüm 4.1.4.2.1’de de belirtildiği gibi; 5 ayrı enterik kaplı kapsülün kapaksız ağırlığı tartılmıştır (51.2, 54.2, 55.7, 53, 55.7 mg) ve ortalaması 53.96 mg bulunmuştur. Etkin madde miktarının belirlenmesi çalışmalarında bir kapsül içerisinde yer alan formülasyon miktarından bu değer çıkarılarak hesaplamalar yapılmıştır. Formülasyonların etkin madde miktar tayinleri Tablo 5.5’te gösterilmiştir.

Su fazı olarak 5 mL % 2.5 CMC çözeltisi içinde süspande edilmiş 125 mg mesalazin ve yağ fazı olan % 4 lesitin içeren kakao yağı pompa yardımı ile 48 µL/dk akış hızları ile çipe verilmiştir. Bir kapsülün doldurulması için süre 4 dakika 25 saniye olarak sabit tutulmaya çalışılmıştır. Bu durumda teorik olarak kapsüllere yüklenmesi beklenen

mesalazin miktarı 5300 µg olarak hesaplanmıştır. Her bir kapsül içerisindeki etkin madde miktarı UPLC ile belirlenmiştir ve bu değerler teorik hesaplanan etkin madde miktarı ile karşılaştırılmıştır. pH 3 CMC çözeltisi kullanılarak hazırlanan kapsüller için yüklenen miktarların ortalaması 5285.383 µg, pH 7.5 CMC çözeltisi kullanılarak hazırlanan kapsüller için yüklenen ortalama mesalazin miktarı 4873.479 µg olarak belirlenmiştir. Bu da yüklenen mesalazin miktarının teorik hesaplanan miktarlara oldukça yakın olduğunu göstermektedir. pH 7.5 CMC için bulunan değerin düşük olması çalışmanın mesalazinin düşük pH'daki çözünürlüğünün daha fazla olmasına (Budavari, 2001) bağlı olduğu düşünülmüştür.

Tablo 5.5. pH 3 ve pH 7.5 CMC çözeltisi kullanılarak hazırlanan kapsüllerde yapılan etkin madde miktar tayini ve konsantrasyon sonuçları

	pH 3 CMC çözeltisi kullanılarak hazırlanan kapsüller			pH 7.5 CMC çözeltisi kullanılarak hazırlanan kapsüller		
	K2 (2. Dolum)	K3 (1. Dolum)	K4 (3. Dolum)	K2 (2. Dolum)	K3 (1. Dolum)	K4 (3. Dolum)
Çözünme ortamındaki etkin madde konsantrasyon (µg)	5534.883	4921.820	5399.446	4717.277	5008.290	4894.920
Kapsül + formülasyon ağırlığı (mg)	271.800	288.020	281.130	277.060	275.340	274.580
Ortalama etkin madde konsantrasyonu (µg)	5285.383 µg			4873.479		
% Verim	%99.724			%91.952		

5.2.2.1. Etkin madde salım çalışması

Salım çalışması esnasında, Bölüm 4.1.4.2.2'de yer alan Tablo 4.4'te de gösterildiği gibi 3150 dakika boyunca örnek toplanmıştır. Fakat salımın 1530. dakikada % 100'e ulaştığı gözlemlendiğinden sadece bu verilere yer verilmiştir.

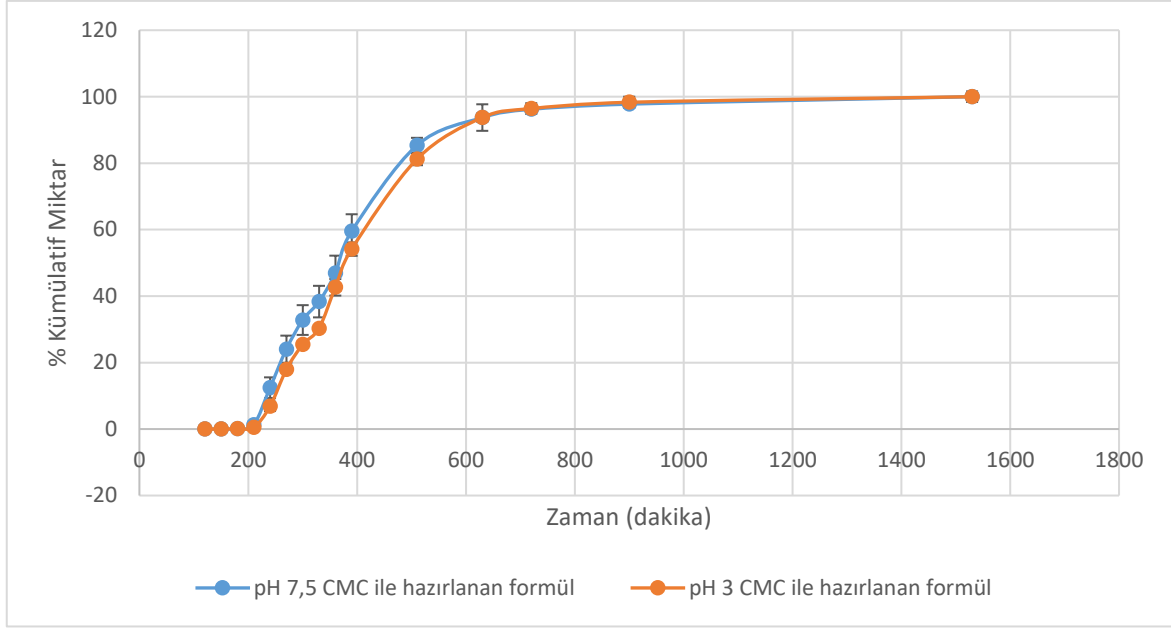
Mesalazin formülasyonlarının *in vitro* salım profili Tablo 5.6 ve Tablo 5.7'de, salım profilinin grafiksel gösterimi Şekil 5.7'de sunulmuştur.

Tablo 5.6. pH3 CMC çözeltisi ile hazırlanan formülden zamana karşı salınan kümülatif Mesalazin miktarı

	Zaman (dakika)	% Etkin Madde	SH
Mide vasatı	120	0	0
Buffer Stage I	150	0	0
	180	0,10	0
Buffer Stage II	210	0,53	±0,09
	240	6,82	±1,4
	270	17,90	±0,21
Buffer Stage III	300	25,40	±0,27
	330	30,30	±0,31
	360	42,65	±2,49
	390	54,14	±2,01
	510	81,24	±1,85
	630	93,72	±3,99
	720	96,42	±1,61
	900	98,32	±1,67
	1530	100	±1,59

Tablo 5.7. pH7.5 CMC çözeltisi ile hazırlanan formülden zamana karşı salınan kümülatif Mesalazin miktarı

	Zaman (dakika)	% Etkin Madde	SH
Mide vasatı	120	0	0
Buffer Stage I	150	0	0
	180	0,10	0
Buffer Stage II	210	1,24	±0,17
	240	12,43	±3,12
	270	24,02	±4,07
Buffer Stage III	300	32,80	±4,47
	330	38,34	±4,74
	360	46,90	±5,27
	390	59,52	±5,10
	510	85,37	±2,25
	630	93,70	±1,26
	720	96,20	±0,60
	900	97,76	±0,61
	1530	100	±2,48



Şekil 5.7. pH 7.5 CMC ve pH 3 CMC çözeltisi ile hazırlanmış formüllerden
Mesalazinin salım grafiği

5.2.3. Eksozomların ve eksozom içeren formülasyonun karakterizasyonu

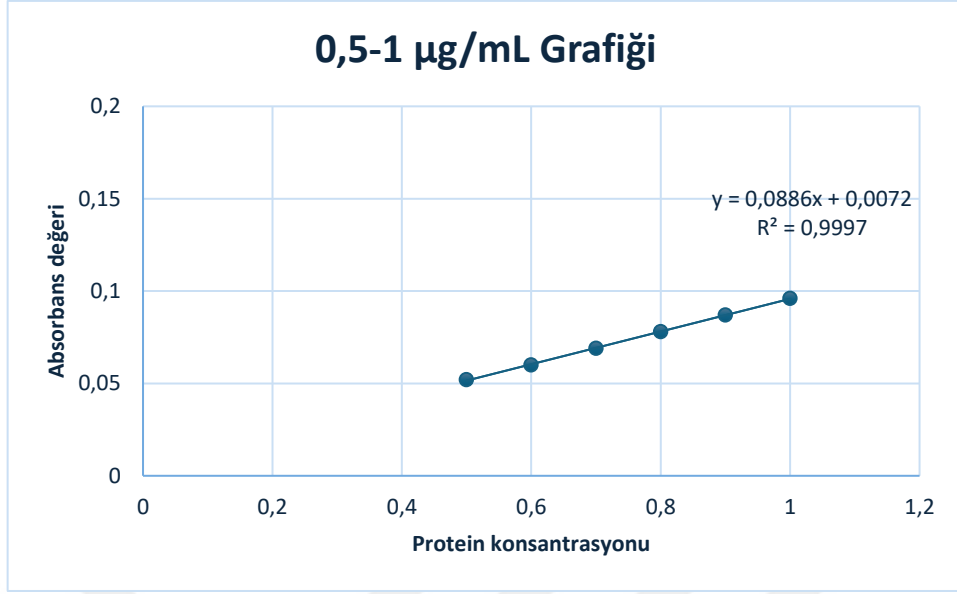
5.2.3.1. Eksozomların total protein konsantrasyonunun belirlenmesi

5.2.3.1.1. NanoDrop Spektrofotometrisi ile protein miktar tayini

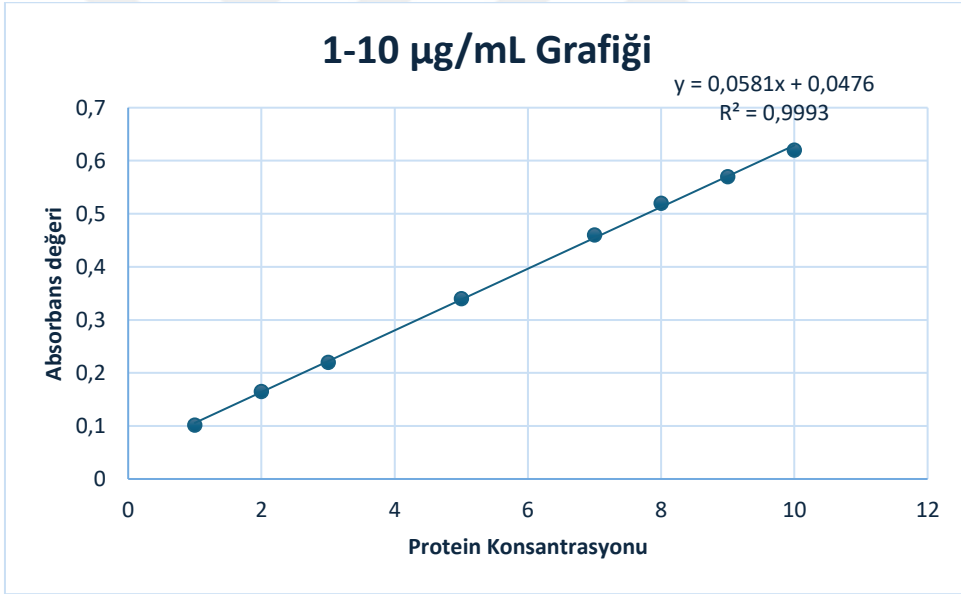
hWJ-MKH'lerden ultrasantrifuj ile elde edilen eksozomların total protein miktarı, NanoDrop spektrofotometresi kullanılarak yapılmıştır ve analiz sonucunda total protein miktarı 1687 mg/mL bulunmuştur.

5.2.3.1.2. BCA Protein Assay Kit ile protein miktar tayini

hWJ-MKH'lerden ultrasantrifuj ile elde edilen eksozomların protein konsantrasyonu, BCA protein assay kit ile belirlenmiştir. 570 nm de ölçülen absorbans değeri BSA stoğunun seri dilüsyonu ile elde edilen eğri üzerinde yerine konularak örneğin protein miktarına ulaşılmıştır. BSA doğrusallık grafiği ve ona ait denklemler Şekil 5.8 ve Şekil 5.9'da verilmiştir. Eksozoma ait protein miktarı 1476 mg/mL bulunmuştur.



Şekil 5.8. BCA kiti doğrusallık eğrisi (0.5-1 µg/mL)

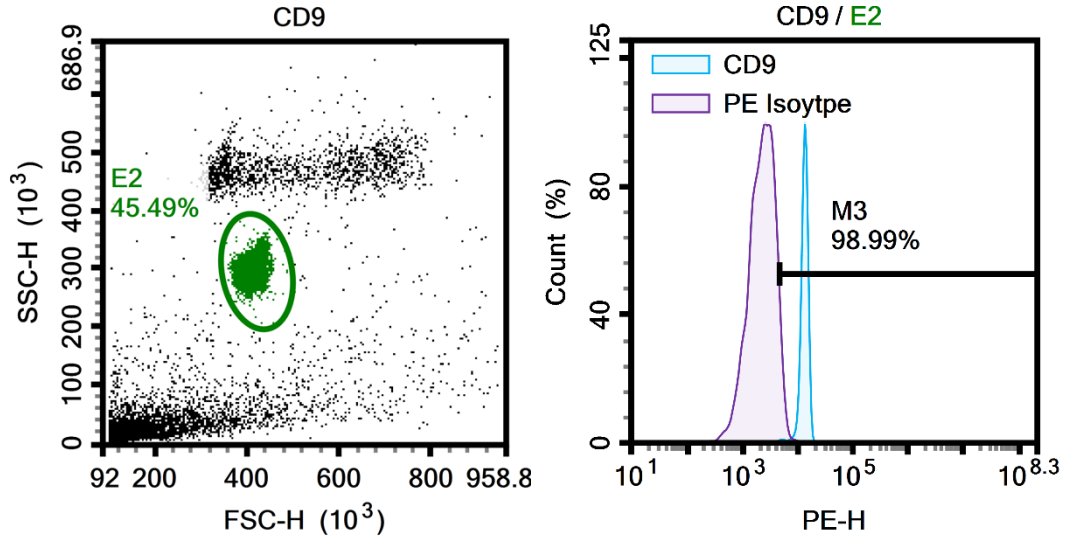


Şekil 5.9. BCA kiti doğrusallık eğrisi (1-10 µg/mL)

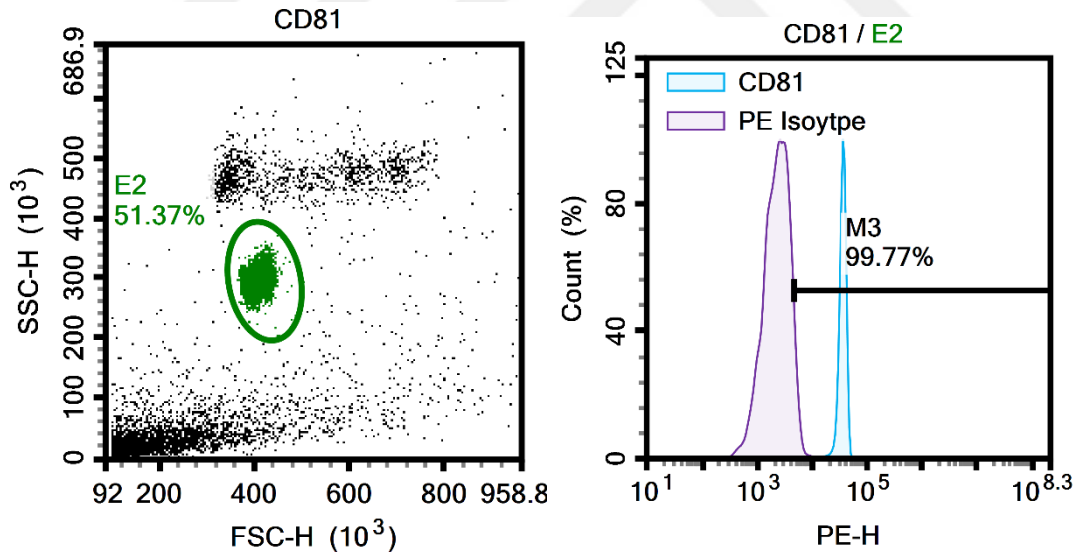
5.2.3.2. Eksozom yüzey belirteçlerinin akış sitometrisi ile analizi

Eksozomlar izole edilip saklandıktan sonra kademeli olarak çözündürülmüş ve eksozoma özgü yüzey belirteçleri olan ve CD81 ile flow sitometride analizi yapılmıştır. Yapılan flow sitometrik analizde antikorların izotip kontrollerine göre örneklerin %

98.99'unun CD9, % 99.77'sinin CD81 yüzey belirtecine sahip olduğu sonucu Şekil 5.10 ve Şekil 5.11'de gösterilmiştir.



Şekil 5.10. hWJ-MKH'lerden izole edilmiş eksozomların flow sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonu (CD9 yüzey belirteci için).

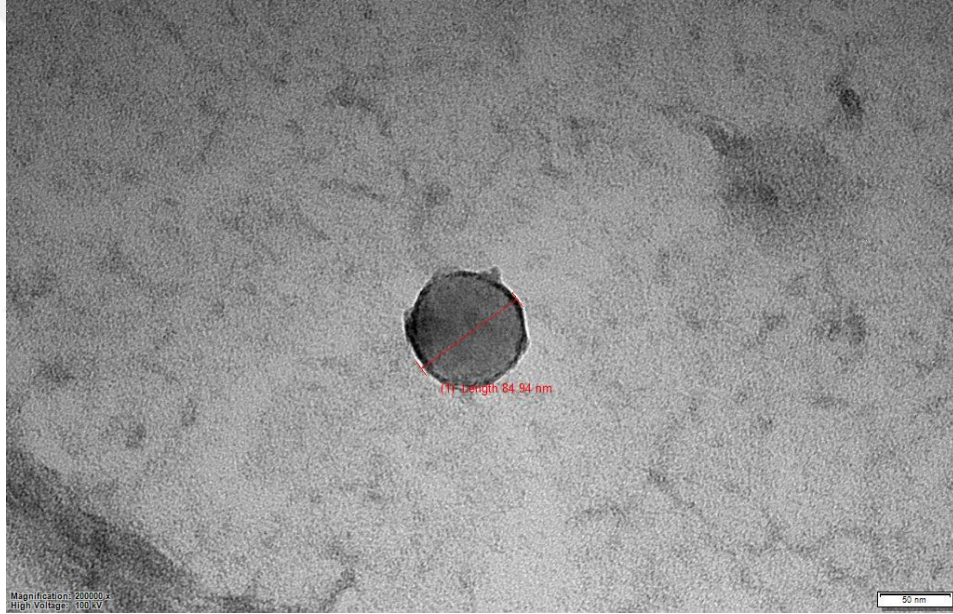


Şekil 5.11. hWJ-MKH'lerden izole edilmiş eksozomların flow sitometrisi ile immunofenotipik karakterizasyonu (CD81 yüzey belirteci için).

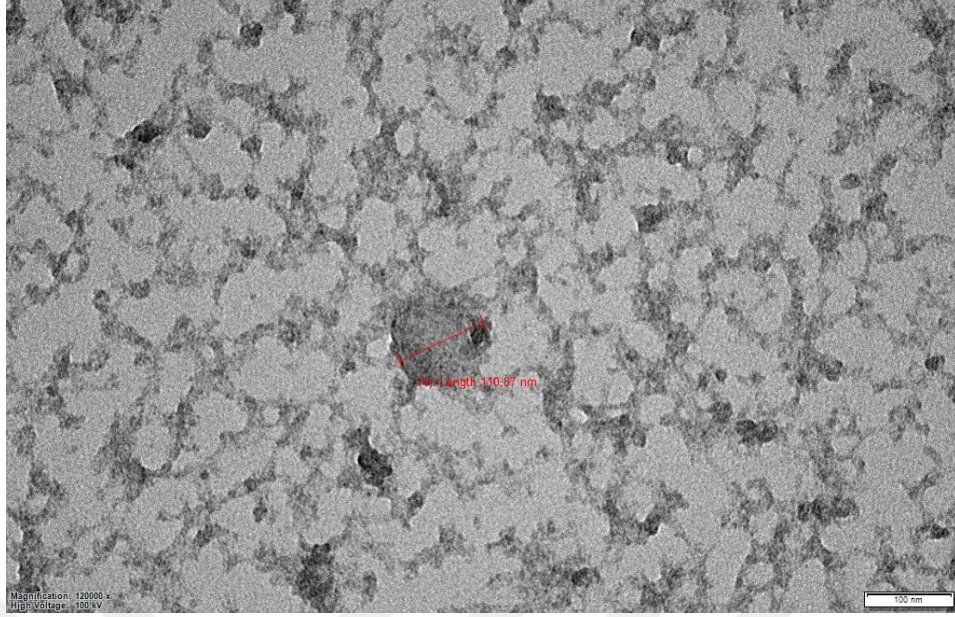
5.2.3.3. Eksozomların elektron mikroskopu ile karakterizasyonu

5.2.3.3.1. Eksozomların geçirimli elektron mikroskopu (TEM) ile karakterizasyonu

hWJ-MKH'lerden elde edilen eksozomlar ve oluşturulan formülasyondan dissolüsyon ortamına salınan eksozomlar için Yüksek kontrastlı Transmisyon Elektron Mikroskopu (TEM) ile alınan görüntüler Şekil 5.12 ve Şekil 5.13'te yer almaktadır. Formülasyonun çözündürülmesi sonucunda toplanan örnekler yıkanmasına rağmen formülasyon kaynaklı kirlilikler içermesi nedeni ile daha kirli bir arka plana sahiptir. Belirlenen eksozom boyutlar 84.94 nm ve 110.87 nm'dir ve bu boyutlar eksozom boyutları ile uyumludur. Formülasyon oluşturma sürecinde yapılan işlemler ve depolama koşullarının eksozomun yapısını bozmadığı gözlenmiştir.



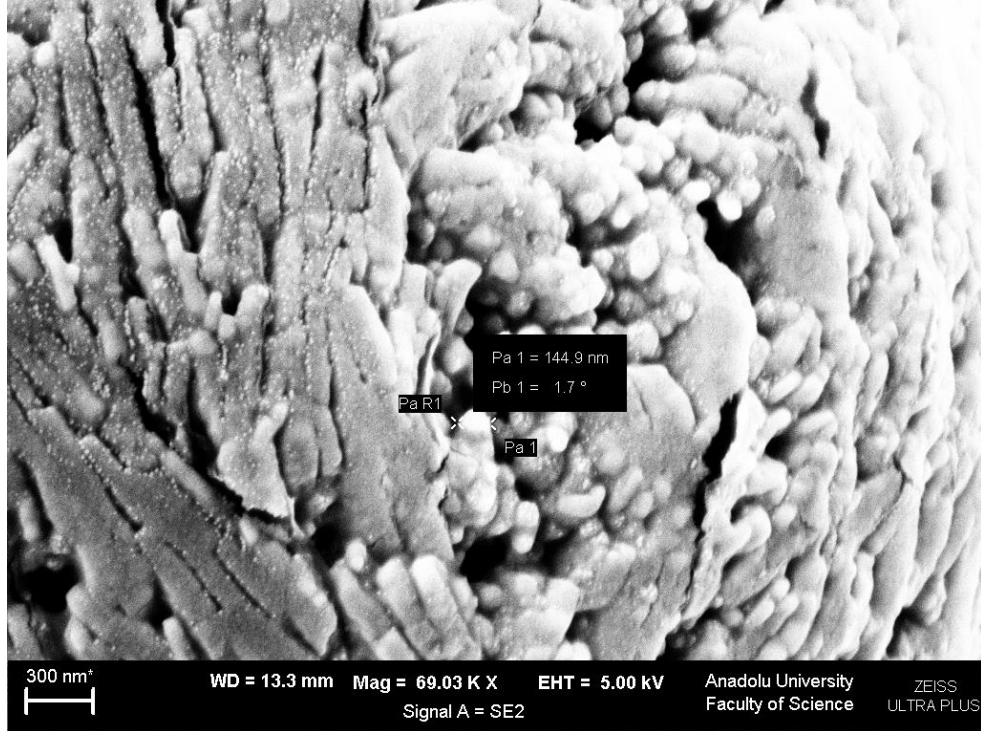
Şekil 5.12. hWJ-MKH'lerden elde edilen eksozom süspansiyonuna ait TEM görüntüsü



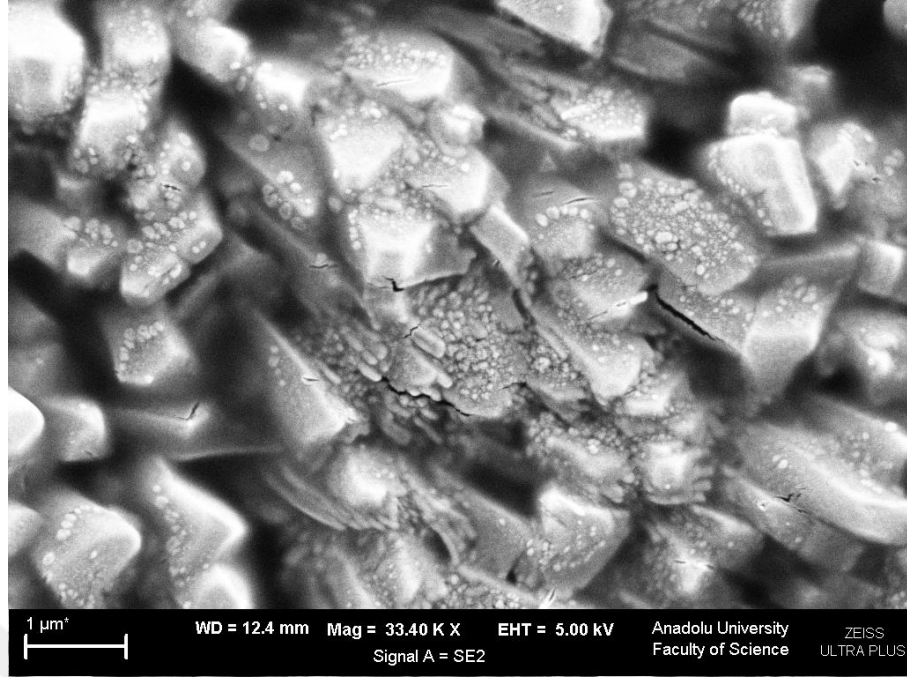
Şekil 5.13. hWJ-MKH'lerden elde edilen eksozomlarla yapılan formülasyonun dissolüsyon ortamında çözündürülmesi ile elde edilen süspansiyonda yer alan eksozoma ait TEM görüntüsü

5.2.3.3.2. Eksozomların taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile karakterizasyonu

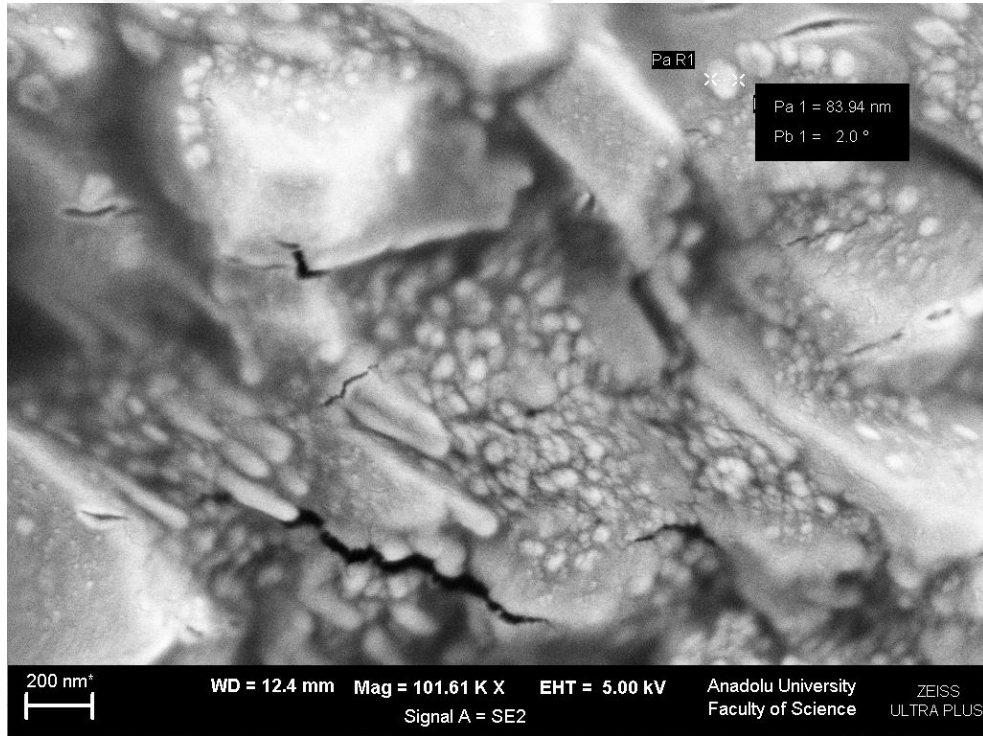
Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile alınan görüntüler, hWJ-MKH'lerden elde edilen eksozomlar Şekil 5.14'te ve oluşturulan formülasyonda liyofilizasyon işlemi sonrasında su-yağ fazı yüzeyinde kakao yağı kristallerine yapışan eksozomlar Şekil 5.15 ve Şekil 5.16'da sunulmuştur.



Şekil 5.14. hWJ-MKH'lerden elde edilen eksozomların SEM görüntüsü



Şekil 5.15. *Kakao yağı kristalleri üzerinde yer alan eksozomların SEM görüntüsü*



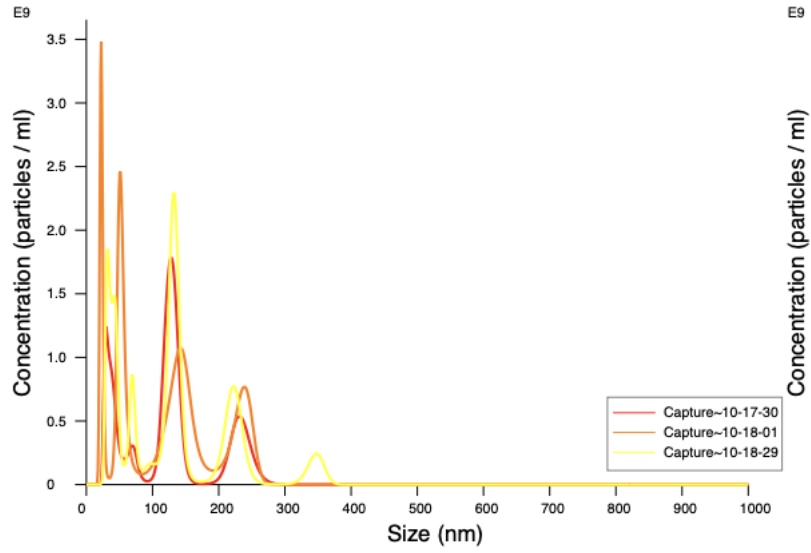
Şekil 5.16. *Kakao yağı kristalleri üzerinde yer alan eksozomların SEM görüntüsü ve boyutu*

5.2.3.4. Eksozomların Partikül analizi

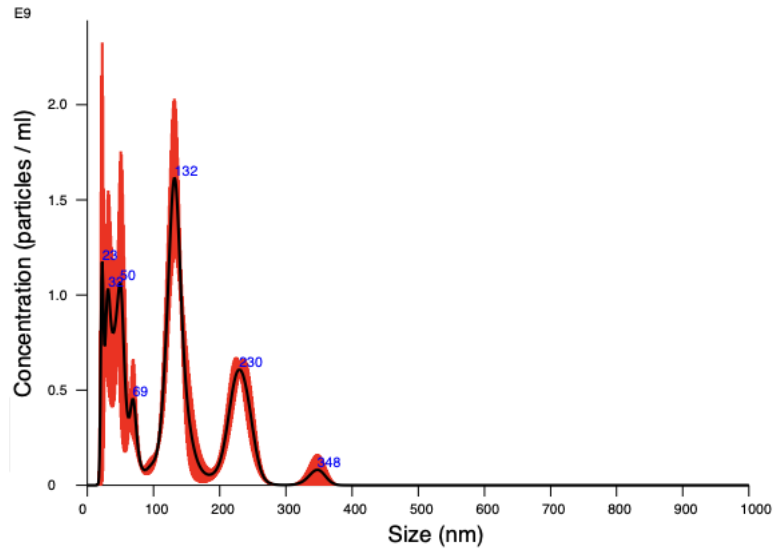
5.2.3.4.1. Nanopartikül izleme analizi (NTA)

NanoSight NS300 cihazı kullanılarak ölçümleri alınan analiz sonuçlarında elde edilen veriler Şekil 5.17, Şekil 5.18, Şekil 5.19 ve Tablo 5.9’da verilmiştir.

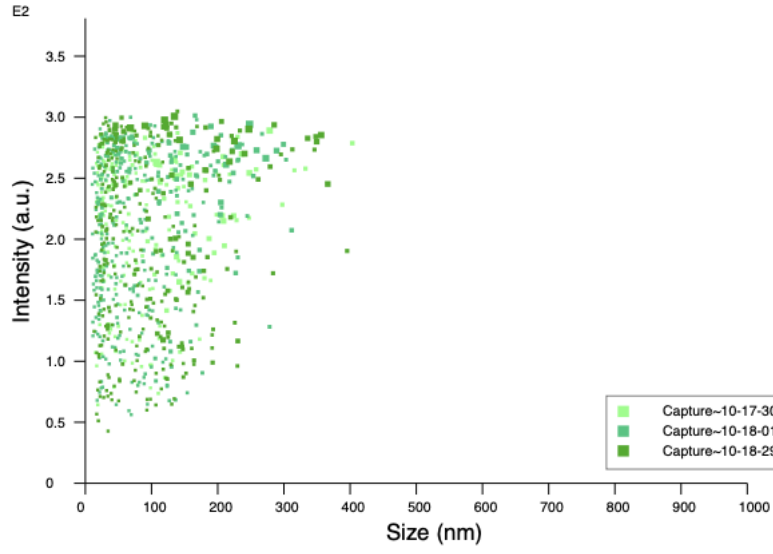
Şekil 5.18 ve Şekil 5.19’da, örnekte yer alan partiküllerin boyutlarının 23 ile 348 nm aralığında değiştiği gösterilmektedir. Tablo 5.8’de görüldüğü üzere partiküllerinin ortalama boyutu 126.1 ± 3.3 nm, modu 94.2 ± 36.0 nm’dir. D10, 30.8 ± 3.5 nm; D50, 127.2 ± 0.9 nm; D90, 234.8 ± 1.3 nm’dir. Partiküllerin konsantrasyonları ise $1.20 \times 10^{11} \pm 1.17 \times 10^{10}$ partikül/ml olarak ölçülmüştür.



Şekil 5.17. Eksozomlara ait Konsantrasyon / Boyut Grafiği



Şekil 5.18. Eksozomlara ait Ortalama konsantrasyon / Boyut Grafiği



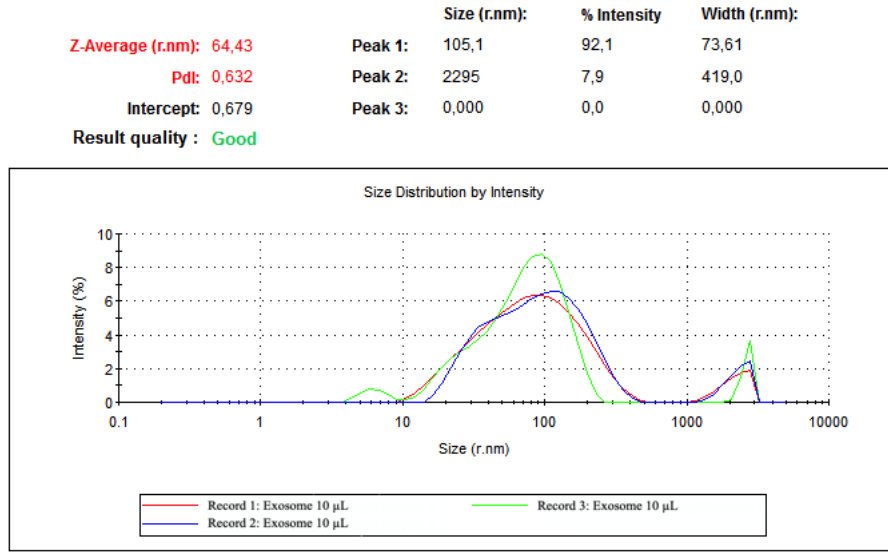
Şekil 5.19. Yoğunluk / Boyut grafiği

Tablo 5.8. NTA analiz sonuçları

Bulgular (Veri ± Standart Hata)	
Ortalama (Mean)	126.1 ± 3.3 nm
Mod (Mode)	94.2 ± 36.0 nm
Standart Sapma	76.0 ± 4.4 nm
D10	30.8 ± 3.5 nm
D50	127.2 ± 0.9 nm
D90	234.8 ± 1.3 nm
Konsantrasyon	1.20 x 10 ¹¹ ± 1.17 x 10 ¹⁰ partikül/ml

5.2.3.4.2. Zetasizer ile boyut analizi

Malvern Zetasizer cihazı kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde eksozom süspansiyonunun ortalama boyutu 64.43 nm olarak bulunmuştur. Süspansiyonda yer alan partiküllerin büyük bir çoğunluğunun 30 ile 200 nm aralığında olduğu Şekil 5.20.'de görülmektedir.

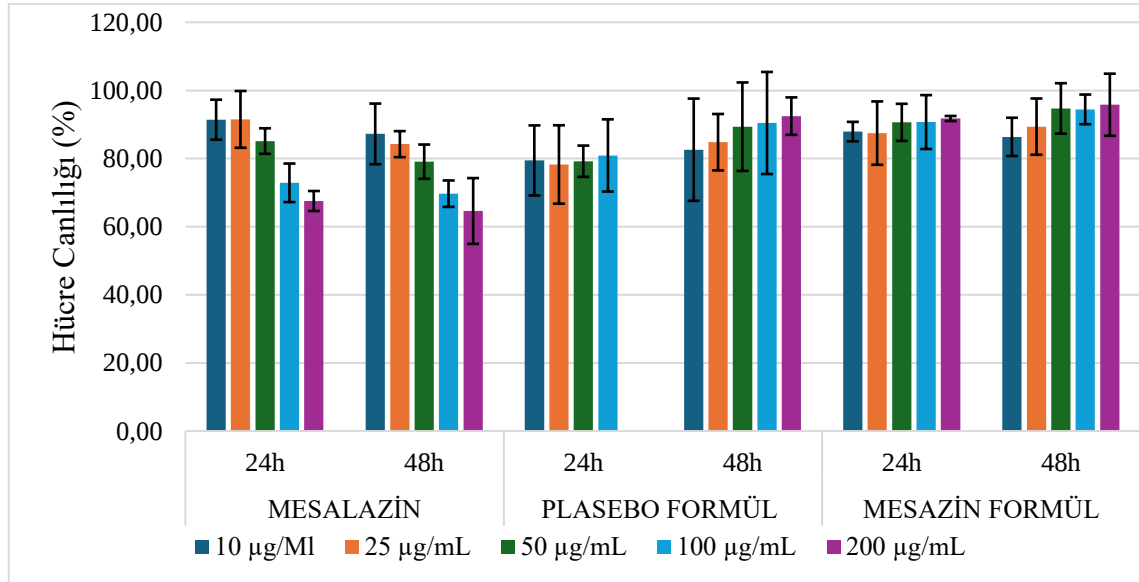


Şekil 5.4. Zetasizer ile eksozomların boyut analizi grafiği

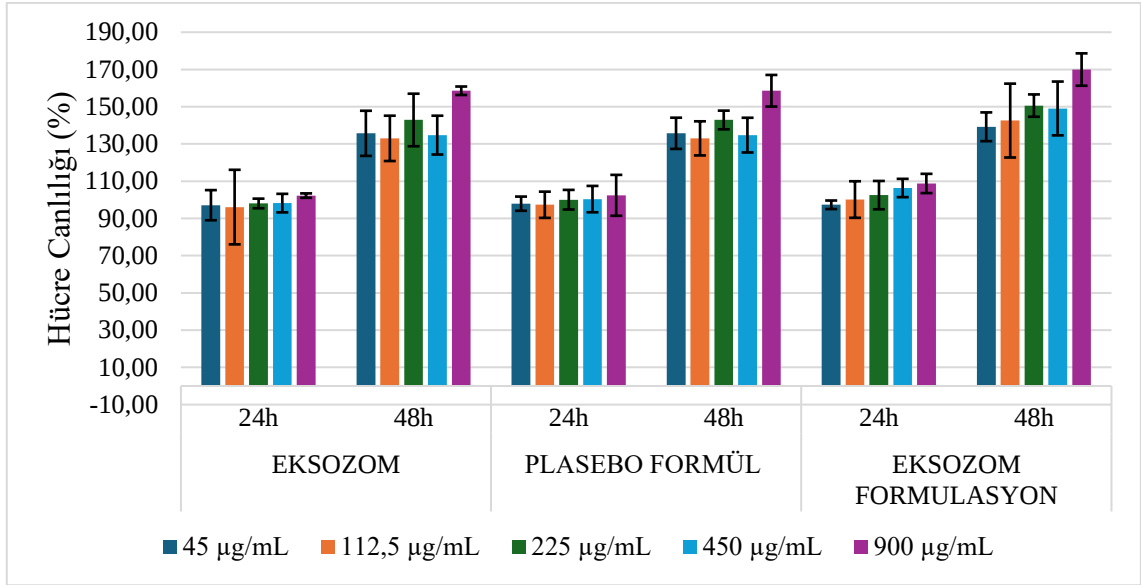
5.2.4. Hücre kültürü çalışmaları

5.2.4.1. Sitotoksite çalışması

Etkin maddelerin ve formülasyonların toksisitesinin araştırılması için 96 kuyulu plakaya ekilen HUVEC hücrelerine formülasyonlar uygulanmıştır. 24 ve 48 saat sonunda hücre canlılığı değerlendirilmiştir, Şekil 5.21 ve 5.22’de gösterilmiştir.



Şekil 5.215. Mesalazin ve mesalazin içeren formüllerin uygulandığı hücrelerin canlılığı



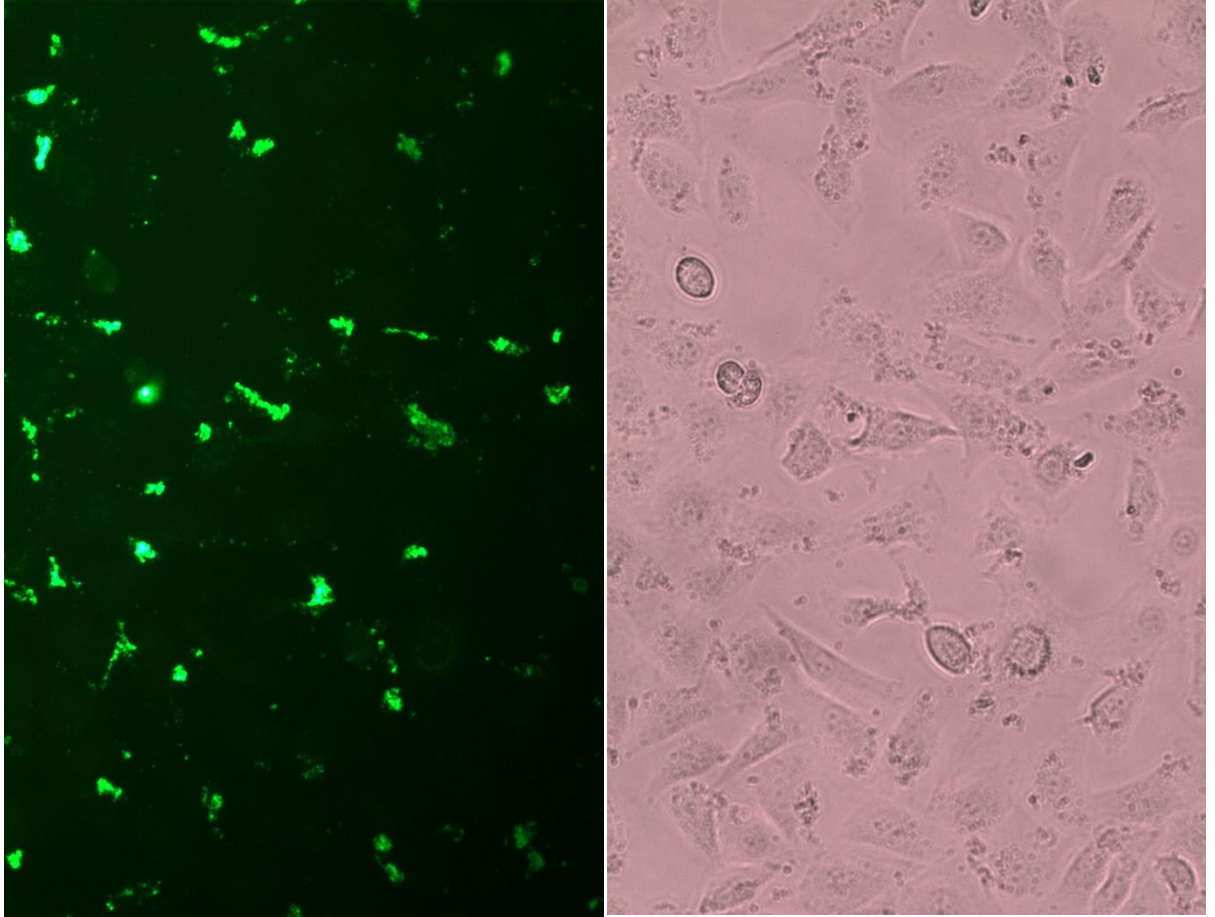
Şekil 5.22. Eksozom ve eksozom içeren formüllerin uygulandığı hücrelerin canlılığı

Şekil 5.21’de görüldüğü gibi mesalazinin, hücrelere uygulanan konsantrasyon değeri arttıkça hücre canlılığını en yüksek konsantrasyonda 24 saatte %67.54’e, 48 saatte %64.61’e düştüğü gözlenmiştir. Fakat mesalazini yüklediğimiz formülasyona ait veriler incelediğinde 24 ve 48 saatlik sonuçlarda hücre canlılığının %80’in altına düşmediği görülmüştür. Buradan çıkarak ilaç yüklemek için seçilen yardımcı maddelerin toksik etkili olmadığı sonucuna varılmıştır. Artan konsantrasyonlar da hücre canlılığını etkilememiştir. Mesalazin içeren formülasyon incelendiğinde hücre canlılığının %86 ile %95 arasında olduğu görülmüştür. Buradan mesalazinin sahip olduğu düşük miktardaki toksik etkinin formülasyon ile birleştiğinde azaldığı sonucuna varılmıştır.

Şekil 5.22’de verildiği üzere hem eksozom hem de formülasyonlarında artan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında artış gözlenmiştir. Sadece eksozom uygulanan hücrelerde, 24 saatte hücre canlılığı uygulanan en düşük konsantrasyonda %97,11 iken 48 saatte %135,71 ; uygulanan en yüksek konsantrasyon ile 24 saatte %102,25 iken 48 saatte 158,57 olduğu görülmüştür. Plasebo ve eksozom içeren formülasyonlarda da her konsantrasyonda hücre canlılığı %97’nin üstünde kalmış ve artan konsantrasyonlarla beraber hücre canlılığı artmıştır. Eksozom ve eksozom içeren formülasyonların sitotoksik olmadığı ve hücre proliferasyonunu arttırdığı sonucuna varılmıştır.

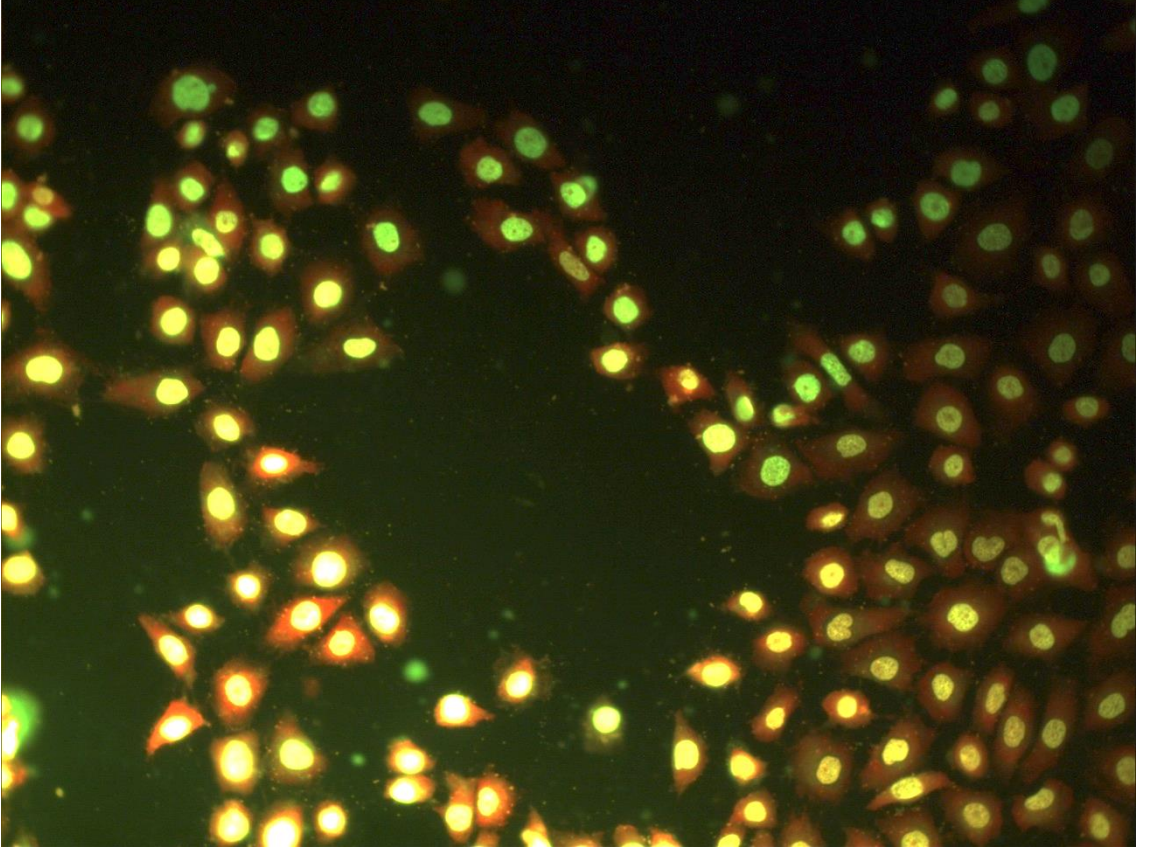
5.2.4.2. Eksozomların hücre içine alınma analizi

FITC işaretli siRNA yüklenmiş eksozomların HUVEC hücreleri üzerine uygulandıktan 1 gün sonra alınan görüntüler Şekil 5.23'te verilmiştir ve eksozomların hücre içine alındıkları gözlenmiştir.



Şekil 5.23. FITC işaretli siRNA içeren eksozomların hücre içine alınma mikroskop görüntüleri

PKH26 boyası ile boyanan eksozomların 3 saatlik inkübasyon sonrasında hücrelerine geçişi Şekil 5.24'te gösterilmiştir



Şekil 5.24 PKH26 boyası ile boyanan eksozomların hücre içine alınmasını gösteren mikroskop görüntüsü

6. TARTIŞMA

6.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları

Oluşturulan formülasyon içerisine yüklenen mesalazin etkin maddesinin miktar tayini ve salım profillerinin belirlenmesi için UPLC analiz yöntemi kullanılmıştır. UPLC, kullanılabilen yüksek basınç sayesinde daha kısa kolonlar kullanılmasına olanak sağlayarak daha düşük miktarlarla daha verimli sonuçlar alınmasına imkân sunduğu için tercih edilmiştir (Gumustas vd., 2013). Geliştirilen analitik yöntem üzerinde validasyon çalışması yapılmıştır. Gerçekleştirilen doğrusallık analizleri sonucunda korelasyon sayısının $R^2 > 0.999$ olduğu, doğrusallık analizlerinde geri kazanılabilirliğin ve kesinlik analizinde varyasyon katsayısının $\pm\% 2$ sınırları içerisinde olduğu gözlenmiştir. Formülasyon çalışmalarında kullanılan yardımcı maddelerin, çözünme ortamı hazırlanırken kullanılacak kimyasal maddelerin analiz koşullarında girişim yapıp yapmadığı incelenmiş ve herhangi bir girişim gözlenmemiştir. Tez kapsamında yapılan tüm çalışmalar LOQ değeri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntem, salım profillerinin çıkartılması ve etken madde miktar tayini için kullanılmıştır.

6.2. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

Geliştirilmek istenen formülasyonlarda terapötik etkinliği olan mesalazin ve eksozomun kapsülasyonun gerçekleştirilmesi ile oral kullanılabilirliğinin sağlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla geliştirilmek istenen sistemin daha yüksek kimyasal ve fiziksel stabilite, gelişmiş biyoyararlanım ve kapsüle edilen moleküllerin çevresel etkilere karşı korunmasını sağlayabilmek için katı lipid kullanılmasına karar verilmiştir. Polimerik olarak kullanılan katı matriksler, toksik monomerler ve solventler içerebilmeleri ve toksik bozunma ürünleri oluşturmaları (B. Do Kim vd., 2005) biyolojik bir materyal olan eksozomları kapsüle etmek üzere kullanımının uygun olmaması nedeni ile tercih edilmemiştir.

Bu çalışmada yağ fazı olarak kullanılmak üzere kakao yağı seçilmiştir. Kakao yağı, yarı sentetik lipitlere göre daha iyi biyoyumluluğa ve daha düşük in vivo toksisiteye sahiptir ve % 40 veya daha fazla doymamış yağ asitleri içeren teobroma kakao tohumundan kolaylıkla elde edilebilir bir bileşendir (B. Do Kim vd., 2005). Daha önce yapılmış çalışmalarda katı lipit nanaopartiküler (KLN) sistemler geliştirilirken saf olarak veya başka lipitlerle karıştırılarak hazırlanmış kakao yağı kullanılmıştır (Shtay vd., 2018).

Kakao yağı ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanan çalışmalar da vardır. Kim ve ark. (2005), kakao yağını bir katı lipid kullanarak KLN'ler geliştirmişlerdir. Oluşturdukları sistemin pH değerinin düşürülmesi yoluyla yüzey etkin madde olarak kullanılan ve bakteri tarafından üretilen bir polisakkarit olan curdların fiziksel özelliklerinin değiştirilmesiyle KLN'lerin oluşumu sağlamışlardır (B. Do Kim vd., 2005). Qian ve diğerleri. (2013), kakao yağı ve hidrojenize palm yağı, sürfektan olarak Tween 80 ve su kullanarak lipit fazının erime sıcaklığının aşıldığı noktada birlikte homojenleştirilmesi ve soğutulması yoluyla su içinde yağ nanoemülsiyonları hazırlamışlardır (Qian vd., 2013). Kim ve diğerleri (2004), etkin madde ile ısıtılmış kakao yağını homojenizatörde karıştırarak, polisakkarit çözeltisine damlatma yöntemi ile katı lipit boncuklar oluşturmuşlardır (E. H. Kim & Choi, 2004). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçların ortak özelliği, kakao yağı ile oluşturulan bu sistemlerin toksik özellik göstermemesidir.

Oluşturulmak istenen yağ içinde su emülsiyonlarında damlacıkların formülasyon işlemleri sırasında ve sonrasında bozulmaması için yüzey etkin madde kullanılmasına ihtiyaç duyulmuştur. Emülsifiye edici ajan olarak biyouyumlu bir bileşen olan lesitin seçilmiştir. Lesitinler, diğer adı ile fosfotidilkolin, glikolipid, fosfolipid içeren bir karışımdır. Lesitin, yüzey aktif bir fosfolipit karışımı olan yağlı bir madde olmasına rağmen mükemmel bir ıslatma ve emülsifiye edici madde olarak performans gösterir (Joshi vd., 2006). Lesitinin ilaç taşıyıcı sistemlerde yüzey etkin madde olarak kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Pan vd., 2013; Schubert & Müller-Goymann, 2005; Thakur vd., 2007)

Biyolojik materyal olan eksozomların bir emülsiyon sistemi içerisinde kapsüllenmek istenmesi biyolojik materyalin bozulacağı; sıcaklık, yüksek rpm'lerde karıştırma, ultrasonik homojenizerler gibi diğer fiziksel parçalayıcı faktörlerden uzak kalmayı gerekli kılmıştır.

Mikroakışkanlar, küçük miktarlardaki sıvıları (10^{-9} ila 10^{-18} L) işlemek veya manipüle etmek için küçük (mikrometre ölçeğinde) kanalların kullanıldığı disiplinler arası bir alandır (Shao et al., 2022; Weibel & Whitesides, 2006). Damlacık mikroakışkanları, mikro boyutlu damlacıkların (çapı birkaç mikrondan yüzlerce mikrona kadar) birbiri ile karışmayan sıvı fazlar arasındaki viskoz stres ve ara yüzey geriliminin dengelenmiş etkileri altında art arda oluşabildiği, mikroakışkanların önemli bir dalıdır (Shang vd., 2017b; J. T. Wang vd., 2011). Damlacık mikroakışkanları teknolojisi,

mikrodamlacıkların kontrol edilebilir üretimi için yeni bir platform sağlar. Özellikle, yüksek verimli üretim yeteneği ve bu malzemelerin boyutunun, yapısının ve fonksiyonunun biyomoleküllere zarar vermeden kontrol edilebilir olması nedeniyle, damlacık mikroakışkanları, mikro taşıyıcıların hazırlanmasında benzersiz avantajlar sunar (Shao vd., 2022).

Gao ve diğerleri (2021), yaptıkları çalışmada damlacık mikroakışkan teknolojisi kullanarak polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilmiş bir protein yüzey aktif madde ile stabilize edilmiş, bir su içinde yağ mikro damlacık formülasyonu oluşturmuşlar ve PEG ile edilmiş proteinin yüzey kaplamasına bağlı olarak aylarca birleşmeye karşı stabil kaldığını bildirmişlerdir (Gao vd., 2021). Damlacık mikroakışkan sistemler kullanılarak pek çok çalışma yapılmıştır (Shah vd., 2008; H. Wang vd., 2021).

Yağ içinde su emülsiyonu oluşturabilmek adına akış odaklı geometri ile çalışan bir PDMS çip kullanılmıştır.

Yağ fazı olarak oda sıcaklığında katı halde bulunan kakao yağının, emülsifiye edici ajan olarak kullanılacak lesitin ile karıştırılabilmesi için öncelikle kakao yağı 100 °C sıcaklıkta eritilmiştir ve karıştırılmıştır. Fakat oluşturulan damlacıkların kakao yağı donduktan sonra patladığı gözlemlendiğinden, yağı ısıtırken uygulanan yüksek sıcaklıkların yağın kristal yapısını uzun süreli bozmasından kaynaklanabileceğini düşünülmüş ve yağ 50 °C’de eritilerek hazırlanmıştır. Düzeltme gözlenmesine rağmen bazı damlacıkların şekillerinde gözlenen bozulmalar lesitin oranının da % 2’den % 4’e çekilmesi ile çözülmüştür.

Çözünürlük sorunu olan mesalazin için hazırlanacak olan su fazında, su ve mesalazin kullanıldığında, formülasyon oluşturulması esnasında mesalazinin çip ve boru içine çöktüğü gözlemlendiğinden süspansiyonunun hazırlanmasına karar verilmiştir. Değişik oranlarda CMC ve poloksomer çözeltileri ile süspansiyon yapılmış ve zamanla çökme oranları kontrol edilmiştir. En uygun olarak 5 mL % 2.5 CMC çözeltisi seçilmiş ve 125 mg mesalazinin prob sonikatör yardımı ile 30 saniye karıştırılması ile süspansiyon oluşturulmuştur.

Eksozom içeren su fazı hazırlanırken, fosfolipid zar yapısına sahip eksozomların zar yapısının bozulmaması için PBS tercih edilmiştir. Liyofilizasyon işlemi uygulanacağı

için de kriyoprotektan olarak mannitol kullanılmıştır. Değişik oranlarda mannitol denenmiş uygun oran seçilerek eksozomlar PBS içinde çözünmüş mannitol içerisinde disperse edilerek su fazı hazırlanmıştır.

Her iki formülasyon da geliştirilirken fazlar 10 mL'lik şırınga pompalara doldurulmuş, yağ fazı ceketli ısıtıcı ile 50 °C'ye ısıtılmış ve fazlar şırınga pompası yardımı ile 48 µL/dk akış hızı ile çipin içine elastik borular yardımı ile verilmiştir. Oda sıcaklığı 32 °C'de tutulmuş bu sayede çip içinde farklı sıcaklıklarda karşılaşan fazların donmaması ve daha tekdüze damlacıklar oluşturması sağlanmıştır. Oluşan emülsiyon çıkış borusundan direkt olarak enterik kapsüllere doldurulmuştur. Tekdüze içerik miktarı oluşturabilmek adına her kapsüler 4 dakika 25 saniye dolum yapılmıştır.

6.3. Karakterizasyon Çalışmaları

6.3.1. Fiziksel görünüş

Formülasyon geliştirme esnasında akış çip içerisinde devam ederken mikroskopa ihtiyaç olmadan gözle sürekli kontrol edilmiş ve damlacıkların oluşup oluşmadıkları gözlenmiştir. Damlacıklar oluşuktan sonra çipin toplama borusundan çıkan emülsiyon bir lam üzerine damlatılmış mikroskop altında şekilleri ve boyutları incelenmiştir. Formülasyona ait damlaların şekillerinin düzgün formda oldukları gözlenmiştir. Lam üzerinde kakao yağının donması beklenmiş sonrasında mikroskop altında damlaların formları yeniden incelenmiştir. Damlaların şekillerini stabil olarak korudukları gözlenmiştir.

Formülasyon geliştirilirken kullanılan akış hızlarının, yardımcı madde oranlarının, ortam koşullarının, formülasyon için uygun olduğuna karar verildikten sonra formül kapsüllere doldurulup sonrasında liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen örnekler kapsüllerden çıkartılıp stereo mikroskop altında incelendiğinde formülasyonun homojen olduğu, damlacıkların şekillerini koruduğu ve birleşmedikleri gözlenmiştir (Bkz. Şekil 5.4. ve Şekil 5.5).

6.3.2. Etkin madde miktar tayini

Etkin madde miktar tayini yapılırken iki farklı parametrenin kapsüllere yüklenen mesalazin miktarını etkileyip etkilemeyeceklerinin analizinin yapılması istenmiştir. Mesalazinin çözünürlük sorunu nedeniyle hazırlanan CMC süspansiyonun pH'ları

değiştirilerek farklı pH'lardaki su fazları ile kapsüller doldurulmuştur. Bu deneme ile su fazının pH'ının mesalazin çözünürlüğü üzerindeki etkisine bakarak bir kapsüle yüklenen etkin madde miktarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Merck Index'inde, mesalazin, HCl'de çözünür, soğuk su ve alkolde az çözünür ve sıcak suda daha fazla çözünür olarak listelenir. Mesalazinin çözünürlük-pH profili için $\text{pH} < 2.0$ ve $\text{pH} > 5.5$ 'te artar ve $\text{pH} 2.0$ 'dan 5.5 'e düşer bulgusu mevcuttur (Budavari, 2001). Hazırlanan kapsüllerde etkin madde miktar tayini analizleri gerçekleştirildiğinde $\text{pH} 3$ su fazına sahip olan emülsiyon içeren kapsüllerde bulunan ortalama mesalazin miktarı $5285.383 \mu\text{g}$, $\text{pH} 7.5$ su fazına sahip olan kapsüllerde $4873.479 \mu\text{g}$ bulunmuştur. Sonuç olarak $\text{pH} 3$ 'de ki çözünürlüğünün $\text{pH} 7.5$ 'e göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Kapsüllere dolum yapılırken su fazı olarak her zaman 5 mL CMC çözeltisi içinde dağıtılmış 125 mg mesalazin stok çözeltisi kullanılmış ve her stok çözeltisi ile yaklaşık 4 kapsül doldurulmuştur, bunlardan ilk, ikinci ve üçüncü dolum alınan analiz edilmiştir. Mesalazinin süspansiyon içerisinde zamanla çökme ihtimalinin etkin madde tekdüzeliğine olan etkisini araştırabilmek adına kapsüller doldurulmuş sonrasında da dolum sırasına göre adlandırılarak analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına bakıldığında anlamlı bir artış veya azalış gözlenmemiştir. Bu da mesalazin içeren yağın kapsüle standart olarak yüklenebildiğini göstermektedir.

6.3.3. Etkin madde salım çalışması

Mesalazin, korumasız bir ilaç taşıyıcı sistem ile oral olarak uygulandığında, aktif ilaç üst gastrointestinal (GI) kanalda hızlı bir şekilde emilir, bu da sistemik olarak emilen ilacın çok az klinik etkiye ve daha yüksek yan etkiye sahip olmasına neden olur (Rasmussen vd., 1982; Schellekens vd., 2007). Mesalazinin lokal olarak da terapötik etkisinin olduğu bilindiğinden ve ülseratif kolitin bağırsaktaki lokalizasyonunun değişik olacağı göze alındığında hazırlanan formülasyonun salım profili büyük önem kazanmaktadır (Schellekens vd., 2007). Yapılan çalışmalar, bağlanmamış veya kaplanmamış mesalazinin üst jejunumda kolayca emildiğini ve terapötik konsantrasyonlarda ileum veya kolona ulaşmadığını göstermiştir (Myers vd., 1987). Dissolüsyon testi sırasında formülasyon, sırasıyla mide, duodenum, ileum ve proksimal kolonu simüle eden dört aşamaya maruz bırakılmıştır (Schellekens vd., 2007).

Gastrointestinal sistemin pH'ı hem kişiler arası hem de kişi içi değişikliklere tabidir. Diyet, hastalık durumu ve gıda alımı gastrointestinal sıvının pH'ını etkiler. Mide sıvısı

için pH olarak 1.2, duodenum için 6, ileum için 7.2, kolon için 6.5 seçilmiştir(Patel & Bhatt, 2011). ÜK tanısı alan hastalarda kolonik pH, mukozal bikarbonat sekresyonunun azalması, mukozal ve bakteriyel laktat üretiminin artması ve kısa zincirli yağ asidi emilimi ve metabolizmasının bozulması nedeniyle pH 7'den daha düşük seviyelerde gözlenmiştir (Nugent vd., 2001) .

Oral olarak alınan bir ilacın gastrik geçiş süresi 2 saattir, bu sebeple mide sıvısı ortamı için dissolüsyon süresi 2 saat olarak tutulmuştur (Dressman vd., 1998). İnce bağırsaktan geçiş süresinin dozaj formundan, egzersizden ve beslenme durumundan bağımsız olduğu ve 1-3 saat arasında değiştiği görülmektedir (Dressman vd., 1998; Schellekens vd., 2007). Bu sebeple duodenumda kalış süresi 1 saat, ileumda kalış süresi 1.5 saat olacak şekilde ayarlanmıştır. Kolonda, su emiliminin artmasına bağlı olarak viskozitede artış gözlenir ve bu durumun salım üzerindeki etkisi belirsizdir (Schellekens vd., 2007). Bu sebeple salım mümkün olduğunca uzatılmış ve formülasyonun davranışı kontrol edilmiştir. Farmakopeye göre sisteme ait dakikadaki devir sayısı 50-150 aralığında olmalıdır ("Mesalamine Delayed-Release Tablets Monograph", 2020). Mide sıvısında ve duodenum ortamında 100 rpm kullanılırken, feçes yoğunluğunun artması nedeniyle ileum ve kolonda rpm 50'ye düşürülmüştür.

Mide ortamı Türk Farmakopesi 2017 sayfa 882'de belirtildiği şekilde hazırlanmış ve pH'ı 2'ye ayarlanarak salım çalışmaları yapıldığında, formülasyonların yüklendiği enterik kapsüllerin çözünmediği ve formülasyonu salım ortamına karşı koruduğu görülmüştür. Kapsüller çözünmediği için 2 saat sonrasında, ortamdan alınan kapsüller USP 31'de yer alan monografında ("Mesalazine Delayed-Release Tablets Monograph," 2020) belirtilen, duodenumu mimik edecek, pH 6'ya ayarlanmış Tampon Aşaması I'e aktarılmıştır. Bu ortamda 1 saat süresinde örnek toplanmıştır ve enterik kapsülün pH6'da tam olarak açılmadığı ve etkin maddenin salımına izin vermediği görülmüştür. pH 3 ve pH 7,5 CMC ile hazırlanan iki formülasyonda da 1 saat sonunda kümülatif çözünen etkin madde miktarının % 0.1'de kaldığı görülmüştür. İleumu mimik eden 2. Fosfat tamponu ortamına geçebilmek için hazırlanan 'çözelti B' ile pH 7.2'ye yükseltilmiş ve bu aşamada 90 dakika boyunca örnek toplanmıştır (Chuong vd., 2008). Bu aşamada etkin madde salımı 210. dakikadan itibaren başlamıştır ve 270. Dakikada pH 3 ile hazırlanan formülün % 17.9, pH 7,5 ile hazırlanan formülün % 24 salımın gerçekleştiği gözlenmiştir. Son olarak kolonu mimik edecek 3. tampon ortamına geçiş yapılırken fosforik asit kullanılarak pH 6.5'a düşürülmüştür. Burada etkin maddenin 390. dakikada yani 6.5

saatin sonunda her iki formülde de etkin maddenin % 50'nin üzerinde salım gösterdiği görülmüştür. 3. Tampon ortamında her iki formül için de 25.5 saat sonunda salımın % 100'e ulaştığı görülmüştür.

Salım çalışmalarından elde edilen sonuçlar dikkate alındığında, kapsül içerisindeki mesalazinin 6 saat sonunda ~% 60'nın, 8 saat sonunda ~% 80'nin ve 12-24 saat arasında da ~% 100'ünün salındığı görülmüştür.

Tablo 4.4 incelenip ona göre yorum yapıldığında duodenumu mimike eden ortamda (tampon aşaması I)'de kapsül açılmadığından 1 saatte salım olmamış, ileumu mimike eden ortamda (tampon aşaması II) 90 dakikada etkin maddenin yaklaşık ~%20'si salınmıştır. Kolonu mimik eden tampon aşaması III ortamında 2 saatte ~%55, 21 saatte ise % 100 salım olmuştur. Tenjarla vd., (2015), dünya genelinde piyasada hali hazırda bulunan mesalazin formülasyonlarından 6 tanesi üzerinde etkin madde salım çalışması yapmışlardır. Asit ve tampon aşaması I'de test edilen her formülasyon için salımın %1'den düşük olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuç geliştirdiğimiz formülasyon ile uyumludur. pH 7.2'de hazırladıkları tampon II aşamasında formülasyonların birbirlerinden farklı salım gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Hollanda'da piyasada kullanımda olan iki farklı firmaya ait tabletler tampon II aşamasında 1 saatte, Almanya'ya ait 2 ve İspanya'ya ait 1 formülasyonun ise 2 saatte etkin maddenin tamamının salındığını göstermişlerdir. Amerika'da kullanımda olan multimatriks mesalazin formülasyonunun ise 7 saatte etkin maddenin tamamını saldığı görülmüştür (Tenjarla, 2015) . Bu literatür ince bağırsakta ve kolonda kalış süreleri değerlendirilerek incelendiğinde, test edilen 5 formülasyonun kolona geçmeden ileumda salındığı sonucuna varılabilir. Geliştirdiğimiz formülasyonda etkin maddenin tampon II aşamasında %20, kolonu mimik eden tampon III aşamasına geçtikten sonra 6 saatte % 93 salındığı yapılan çalışma ile gösterilmiştir. Geliştirdiğimiz sistemle mesalazinin kolona ulaşabildiği ve piyasada yer alan diğer preparatlara göre kontrollü bir salınım yaptığı görülmektedir.

Zhang vd., (2022), sürdürdükleri bir çalışmada enterik kaplı bir ürün ile piyasada yer alan Salofalk isimli tabletin farmakokinetik özelliklerini karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. Bizim çalışmamızla tutarlı bir sonuç olarak 2 saatlik asit aşamasında iki preparat için de mesalazin salımı gözlenmemiştir. Tampon aşaması I'e alınan formüller içerisinde salofalk 30 dakika sonra etkin madde salmaya başlarken bizim çalışmamızla tutarlı olarak enterik kaplı formülasyondan etkin madde salımı olmamıştır. Tampon aşaması II'de pH 7.2'ye yükselince iki preparatta da hızlı bir salım başlamıştır. Tampon

II’de 1.5 saatlik süre sonunda iki preparatın tamamının salındığı görülmüştür (Y. Zhang vd., 2022). Enterik kaplı formülasyon ile yapılmış bu çalışma da tarafımızca geliştirilen enterik kaplı kapsülle hazırlanmış formülün kontrollü bir salım yaptığını göstermektedir.

6.3.4. Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Eksozom eldesinde kullanmak üzere kullanılacak olan insan göbek kordonu wharton jeli kaynaklı mezankimal hücrelerin kültüre edilebilmesi için doku petriye ekilmiş ve hücreler MSC NutriStem XF bazal besiyeri içerisinde üretilmiştir. Hücrelerin gelişimi ve pasaj sonrası durumlarını gözlenebilmesi için sıklıkla mikroskop yardımı ile kontrolleri yapılmıştır. Hücreler istenen çoğunluğa ulaştığında FBS içermeyen DMEM besiyerinde inkübe edilip besiyerleri toplanmıştır. Sonrasında ultrasantrifuj metodu ile eksozomlar toplanmış ve -80 °C’de dondurulmuştur. Karakterizasyonları yapılmıştır.

Eksozomlara ait protein konsantrasyonunu belirlemek için hem NanoDrop Spektrofotometrisi hem de mikro BCA protein assay kitten yararlanılmıştır. İkisi de birbiriyle orantılı sonuçlar vermişlerdir: NanoDrop, 1687 mg/mL, BCA Assay Kit, 1476 mg/mL konsantrasyon sonucu vermiştir. Bu sonuçlar, hWJ-MKH’lerden elde edilen eksozomların doz belirlenmesinde her iki yöntemin de kullanılabileceğini göstermektedir.

hWJ-MKH’lerden ultrasantrifuj ile elde edilen pelletin içerisinde eksozomların yer aldığını görebilmek adına antikor ve beadler kullanılarak flow sitometri analizleri yapılmıştır (Clayton vd., 2001). Elde edilen sonuçlara göre resüspande edilen pelletlerde yer alan partiküllerde eksozomlara ait spesifik yüzey belirteçleri olan CD9 ve CD81’in % 99 oranında bulunduğu gösterilmiştir. Bu durum da ultrasantrifuj ile besiyerinden elde edilen pelletin yüksek oranda eksozoma sahip olduğunu kanıtlamıştır.

Eksozomların boyutlarını ve morfolojisini incelemek için SEM ve TEM görüntülerinden yararlanılmış, boyut verileri NTA ve zetasizer kullanılarak desteklenmiştir.

Eksozomların küçük boyutları ve örnek hazırlama kolaylığı nedeniyle TEM, eksozom morfolojisini incelemek için altın standart yöntemdir. TEM’in çözünürlüğü yaklaşık 1 nm’dir ve negatif boyama prosedürü basit ve hızlıdır ve yalnızca 2-3 saat sürer. SEM, TEM’deki gibi geniş bir ışın kullanmak yerine, numuneleri satır satır tarayan ince noktali bir ışın kullanır. Bu nedenle SEM, TEM tarafından oluşturulan iki boyutlu görüntü

yerine, eksozomların üç boyutlu görüntüsünü sağlamak için numunelerin yüzeyine odaklanır (Zhou vd., 2020).

Moradi-Chaleshtori vd. (2021), MiR-33 içeren eksozomların makrofaj polarizasyonunu değiştirip değiştiremeyeceğini belirlemek için, 4T1 meme kanseri hücrelerinden izole edilen eksozomları TEM ve SEM kullanarak incelemişlerdir. Tez çalışmamızda, hWJ-MKH'lerden elde edilen eksozomlar ilk olarak formülasyondan ayrı olarak görüntülenmiştir. Sonrasında formüle edilmiş kapsüller çözündürülerek ekstrakte edilen eksozomlar görüntülenerek; formülasyon geliştirme basamaklarının, depolama koşullarının ve çözünme işleminin eksozoma zarar verip vermediği gözlenmek istenmiştir.

TEM ile alınan görüntülerde eksozomların yapısının bozulmadan kaldığı gözlenmiştir. Eksozom boyutları 110.87 nm ve 84.94 nm olarak ölçülmüştür. SEM görüntülerinde liyofilize edilmiş formülasyon üzerinde; kakao yağı kristalleri üzerinde eksozomların yapısı bozulmadan varlıklarını sürdürdükleri gözlenmiştir. Eksozom boyutları 144.9 nm ve 83.94 nm olarak ölçülmüştür. Bu iki bulgu, elde edilmiş olan eksozomların boyutlarının aynı sınırlar içerisinde olduğunu işaret etmektedir.

Nanopartikül izleme analizi (NTA) nanopartikülleri boyutlandırabilen ve sayabilen bir teknolojidir. Nanopartikül izleme analizi, herhangi bir sıcaklıkta, nanopartiküllerin çözelti içindeki Brownian hareket hızının yalnızca boyutlarına göre belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Bu yöntemde lazer ışığı kesecik süspansiyonuna sabit bir açıyla yönlendirilir ve saçılan ışık bir mikroskop ve yüksek hassasiyetli kamera kullanılarak yakalanır. Yazılım, bireysel nanopartiküllerin zaman içindeki hareketini izleyerek konsantrasyonlarını ve boyutlarını hızla hesaplar (Oosthuyzen vd., 2013). Elde edilen NTA analizi sonucunda, süspansiyonda yer alan partiküllerin boyutlarının eksozomlarla uyumlu olduğu, SEM ve TEM analizleri sonuçlarına benzer boyut gösterdikleri ve BCA ile NanoDrop ile ölçülen konsantrasyonun da (1476 mg/mL - 1687 mg/mL) uygunluğunu göstermiştir.

Zetasizer, dinamik ışık saçılımı tekniğini ile parçacığın Brownian hareketinin neden olduğu sabit bir açıda (173°) saçılan ışık yoğunluğunun dinamik dalgalanmalarını ölçerek parçacık hareketinin hız dağılımını analiz eder. NTA'nın yanında zetasizer da

eksozomların boyutunu ölçmek için kullanılır (Kesimer & Gupta, 2015; Ruzicka-Ayoush vd., 2023).

Zetasizer ile yapılan ölçümlerde, numunede yer alan partiküllerin %92'sinin 30 ile 200 nm aralığında olduğu gözlenmiştir. NTA ile yapılan çalışmada da Şekil 5.20'de görüldüğü üzere partiküllerin büyük çoğunluğunun 23 ile 250 nm aralığında bulunduğu gözlenmiştir. İki analiz birbiri ile uyumlu sonuçlar vermiştir. Ayrıca TEM ve SEM görüntülerinden elde edilen boyut sonuçlarının da bu değerler aralığında yer alması boyut sonuçlarının eksozomla uyumlu oluşunun bir başka göstergesidir.

Ruzicka-Ayoush vd (2023), farklı sıcaklıklarda eksozomları depolamış ve bu çevresel faktörün boyut dağılımı üzerinde etkisini incelemek için hem NTA hem de DLS analizleri yapmışlardır. NTA ile elde ettikleri değerlerin DLS ile yapılan boyut ölçümlerine çok yakın olduğunu göstermişlerdir (Ruzicka-Ayoush vd., 2023). Bu çalışma bizim sonuçlarımız arasındaki tutarlılığa benzerlik göstermektedir.

6.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

Yapılan hücre kültürü çalışmaları için HUVEC hücre hattı kullanılmıştır. Eksozomlar üzerinde yapılacak olan sitotoksikite ve hücre içine alım çalışmalarında HUVEC hücre hattı sıklıkla kullanılmıştır. Valipour vd. (2022), yaptıkları çalışmada insan endometriyal mezenkimal kök hücreleri kaynaklı eksozomların ve atorvastatinin, HUVEC hücrelerinin çoğalmasını MTT tahlili kullanılarak araştırmışlardır (Valipour vd., 2022). Matsuura vd (2019), hepatoselüler karsinom hücrelerinden elde edilen eksozomların, HUVEC hücreleri ile 72 saatlik inkübasyonu ile hücre büyümesinin inhibisyonunu MTT kullanarak tahlil etmişlerdir (Matsuura vd., 2019).

Yapılan sitotoksikite çalışmasında hem mesalazin hem de eksozom içeren formülasyonların plasebo formülasyonlarının sitotoksik özelliğinin olmadığı ve özellikle eksozom formülasyonuna ait plasebo formülasyonun hücre proliferasyonunu 48 saatte çok arttırdığı gözlenmiştir. Eksozom içeren formülasyonda yardımcı madde olarak mesalazin içeren formülasyondan farklı olarak mannitol içermesi göz önünde bulundurulduğunda, mannitolün hücre canlılığını arttırdığı düşünülmüştür. Burdon vd., (1989) yaptığı çalışmada, mannitolün serumdan yoksun hücrelerin çoğalmasını arttırdığını göstermişlerdir.

Mesalazin için yapılan sitotoksosite çalışmalarında Forsati vd., (2022), K562 hücre hattında yaptıkları MTT deneyi sonuçlarında mesalazinin 72 saatlik inkübasyon verilerinde IC₅₀ değerini 54 µM olarak bulmuşlardır. Swami vd., (2022), MCF-7 hücre hattı üzerinde yaptıkları MTT testinde 24 saatlik mesalazin uygulanması sonucunda IC₅₀ değeri 6.358 µM olarak bulunmuştur. Chaudhary vd., (2020), CCD-841 hücre hattında mesalazin ile yaptıkları MTT testinde 48 saatlik inkübasyon sonucunda IC₅₀ değeri bulamamışlardır.

HUVEC hücrelerine uygulanacak olana mesalazin konsantrasyonları belirlenirken yukarıda verilen literatürlerde bulunmuş IC₅₀ değerleri dikkate alınarak konsantrasyonlar belirlenmiş ve 24 ile 48 saatlik sonuçlar alınmıştır. En yüksek konsantrasyonda bile hücre canlılığının 48 saatte % 64'e düştüğü gözlenmiştir. Mesalazin içeren formülasyona ait plasebo formülasyonun hücre canlılığını her konsantrasyon ve inkübasyon süresinde % 80'in altına düşürmediği gözlenmiştir. Mesalazin içeren formülasyon incelendiğinde, formülasyonun mesalazinin hücre proliferasyonunda gösterdiği azaltmayı elimine ettiği görülmüştür ve taşıyıcı sistem geliştirilirken kullanılan kako yağı ile lesitin ve CMC içeriğinin hücreler için toksik olmadığı belirlenmiştir.

Abas vd., (2022), sitotoksosite testi yapmak amacıyla Wharton jeli kök hücrelerinden elde ettikleri eksozomları için, insan rahim ağzı kanseri hücresi Hela ve L929 fare fibroblastları üzerinde MTT testi yapmışlardır. Hücre canlılığını azaltmadıklarını hatta artan konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu hem 24 saatte hem de 48 saatte arttırdığı gözlenmiştir (Abas vd., 2022) Elde edilen sonuçlar çalışmamız tarafından elde edilen sonuçlar ile uyumluluk göstermiştir. Hücrelere uygulanan eksozomun en düşük konsantrasyonunda 24 saatte % 98 canlılık, 48 saatte % 136 canlılık görülmüştür. En yüksek eksozom konsantrasyonunda ise 24 saatte % 102 canlılık, 48 saatte % 159 canlılık görülmüştür. Artan konsantrasyon ve inkübasyon süresi ile birlikte hücre proliferasyonunda artış olduğu belirlenmiştir.

Eksozomların hücre içine alınması çalışmalarında HUVEC hücreleri 24'lü plakalara ekilmiş ve 1 günlük inkübasyon sonrasında işaretlenmiş eksozomlar uygulanmıştır. HUVEC ile hücre içine alım çalışması yapmış pek çok araştırma bulunmaktadır.

FITC işaretli siRNA yüklenmiş eksozomlar yolu ile hücre içine alım analizi yapıldığında eksozomların başarı ile hücre içine alınabildiği görülmüştür. FITC işaretli insulin yüklenmiş eksozomlarla yapılan benzer bir çalışma bulunmaktadır (Rodr guez-Morales vd., 2021) ve eksozomların hücre içine alımı kapsamında çalışmamızla benzer özellik gösterdiği belirlenmiştir.

PKH26 boyası kullanılarak işaretlenen eksozomların hücre içine alım analizleri başarı ile yapılmıştır. Ghorbanian vd., (2019) ve Zhang vd., (2022), seçtikleri hücre hatlarından elde ettikleri eksozomları PKH26 boyası kullanarak işaretlemişler sonrasında da HUVEC hücre hattı ile 12 ve 48 saat inkübe edildikten sonra eksozomların hücre içerisine alındığını gözlemişlerdir, bu açıdan bu yöntemde çalışmalar benzerlik göstermektedir.

7. SONUÇ

Yürütülen tez çalışmamızda, K tedavisinde kullanılmak için alternatif bir yaklaşım sunulmaya çalışılmıştır. Enterik kaplı kapsül içeriğinde bulunan mesalazin ve eksozomların, bu geliştirilen taşıyıcı sistem içerisinde hapsedildiği, hedef bölge olan kolana ulaşıncaya kadar sistem içerisinde korunduğu bulgusu elde edilmiştir. Kullanılan kapsül boyutunun küçük olması, mesalazinin terapötik dozunun yklenememesine neden olmuştur. Ancak, eksozom yüklü kapsül ile kombine kullanımı ile düşük dozdaki mesalazinin K için sinerjik etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Eksozomun yağ içerisinde enkapsüle edilmesi ile elde edilen formlasyonlarımızın, kapsüle doldurma, dondurma ve liyofilize etme aşamalarından sonra yapılacak karakterizasyon çalışmaları için yaklaşık 2 gün oda sıcaklığında bekletilmesine rağmen, eksozom yapılarını koruduğu belirlenmiştir. Bu durum, eksozomun bozunmadan, -20 °C’de saklama gibi özel koşullar kullanılmadan saklanabilmesinin mümkün olabileceğine işaret etmektedir.

Yapılan literatür incelemesi sonucunda, tezimizin hipotezinin ve tez kapsamında geliştirilen sistemin ilk defa bizim tarafımızdan geliştirildiği belirlenmiştir. Bu çalışmanın *in vivo* alışmaları ile desteklenmesi ve etkinliğinin aydınlatılması, eksozomların bu sistem içerisinde ne kadar süre kararlı kalabileceğinin araştırılması daha sonraki çalışmalarımız kapsamında planlarımız dahilindedir.

KAYNAKÇA

- Abas, B. I., Demirbolat, G. M., & Cevik, O. (2022). Wharton jelly-derived mesenchymal stem cell exosomes induce apoptosis and suppress EMT signaling in cervical cancer cells as an effective drug carrier system of paclitaxel. *PLOS ONE*, 17(9), e0274607. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0274607>
- Akbari, A., Jabbari, N., Sharifi, R., Ahmadi, M., sciences, A. V.-L., & 2020, undefined. (t.y.). Free and hydrogel encapsulated exosome-based therapies in regenerative medicine. *Elsevier*. Geliş tarihi 04 Nisan 2023, gönderen <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320520301958>
- Antoni, L., Nuding, S., Wehkamp, J., & Stange, E. F. (2014). Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. <http://www.wjgnet.com/>, 20(5), 1165-1179. <https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I5.1165>
- Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, C., Kampüsü, U., Ersöz, E., Burak Can, O., Uzunoğlu, S., Bayar Üniversitesi, C., Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Öğrencisi Manisa-Türkiye, S. A., Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Araştırma Görevlisi Manisa-Türkiye, T. A., Fakültesi ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Öğretim Üyesi Manisa-Türkiye, T. A., & yazar, S. (t.y.). Eksozomların kanserdeki rolü. *dergipark.org.tr*. Geliş tarihi 04 Nisan 2023, gönderen <https://dergipark.org.tr/en/pub/cbusbed/issue/22332/239313>
- Bremond, N., & Bibette, J. (2012). Exploring emulsion science with microfluidics. *Soft Matter*, 8(41), 10549-10559. <https://doi.org/10.1039/C2SM25923K>
- Budavari, S. , O. M. J. , S. A. , H. P. E. , Eds. (2001). *The Merck Index: C. 13th ed.*
- Carter, M., Lobo, A., Gut, S. T.-, & 2004, undefined. (t.y.). Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *gut.bmj.com*. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.043372>
- Chuong, M. C., Christensen, J. M., & Ayres, J. W. (2008). New Dissolution Method for Mesalamine Tablets and Capsules. *Dissolution Technologies*, 15(3), 7-14. <https://doi.org/10.14227/DT150308P7>
- Clayton, A., Court, J., Navabi, H., Adams, M., Mason, M. D., Hobot, J. A., Newman, G. R., & Jasani, B. (2001). Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based

- on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 247(1-2), 163-174. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00321-5](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00321-5)
- Dressman, J. B., Amidon, G. L., Reppas, C., & Shah, V. P. (1998). Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms. *Pharmaceutical Research*, 15(1), 11-22. <https://doi.org/10.1023/A:1011984216775/METRICS>
- EBSCOhost | 16017261 | *Ulcerative Colitis Practice Guidelines in Adults*. (t.y.). Geliş tarihi 22 Nisan 2024, gönderen <https://eds.p.ebscohost.com/abstract?site=eds&scope=site&jrnl=00029270&AN=16017261&h=81INUxS%2bH9P4o4vOqwBNOPRSUGu6LFEITOUMQq%2fHixOzwuaLAEmuDQhyaTeOD2UPk2jxoNAnknitnWX3L%2fsJlg%3d%3d&crl=c&resultLocal=ErrCrlNoResults&resultNs=Ehost&crlhashurl=login.aspx%3fdirect%3dt rue%26profile%3dehost%26scope%3dsite%26authtype%3dcrawler%26jrnl%3d00029270%26AN%3d16017261>
- Eckmann, L., Sandborn, W. J., Sandborn, W. J., Ordás, I., Eckmann, L., Talamini, M., & Baumgart, D. C. (2012). Seminar Ulcerative colitis. *www.thelancet.com*, 380, 1606-1625. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60150-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60150-0)
- Faruqu, F. N., Xu, L., & Al-Jamal, K. T. (2018). Preparation of Exosomes for siRNA Delivery to Cancer Cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2018(142), e58814. <https://doi.org/10.3791/58814>
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171-177. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2005.07.001>
- Gajendran, M., Loganathan, P., Jimenez, G., Catinella, A. P., Ng, N., Umapathy, C., Ziade, N., & Hashash, J. G. (2019). A comprehensive review and update on ulcerative colitis,. *Disease-a-Month*, 65(12), 100851. <https://doi.org/10.1016/J.DISAMONTH.2019.02.004>
- Gajendran, M., Loganathan, P., Jimenez, G., Disease-a-month, A. C.-, & 2019, undefined. (t.y.). A comprehensive review and update on ulcerative colitis. *Elsevier*. Geliş tarihi 04 Nisan 2023, gönderen <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011502919300318>

- Gao, Y., Zhao, C. X., & Sainsbury, F. (2021). Droplet shape control using microfluidics and designer biosurfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 584, 528-538. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2020.09.126>
- Grela, E., Kozłowska, J., & Grabowiecka, A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochemica*, 120(4), 303-311. <https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2018.03.007>
- Gugulothu, D., Kulkarni, A., Patravale, V., & Dandekar, P. (2014). pH-Sensitive Nanoparticles of Curcumin–Celecoxib Combination: Evaluating Drug Synergy in Ulcerative Colitis Model. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(2), 687-696. <https://doi.org/10.1002/JPS.23828>
- Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B., & Ozkan, S. A. (2013). UPLC versus HPLC on drug analysis: Advantageous, applications and their validation parameters. *Chromatographia*, 76(21-22), 1365-1427. <https://doi.org/10.1007/S10337-013-2477-8/TABLES/2>
- Guo, G., Tan, Z., Liu, Y., Shi, F., & She, J. (2022). The therapeutic potential of stem cell-derived exosomes in the ulcerative colitis and colorectal cancer. *Stem Cell Research and Therapy*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S13287-022-02811-5>
- Ham, M., & Moss, A. C. (2012). Mesalamine in the treatment and maintenance of remission of ulcerative colitis. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 5(2), 113-123. <https://doi.org/10.1586/ECP.12.2>
- Head, K. A., & Jurenka, J. S. (t.y.). *Inflammatory Bowel Disease Part I: Pathophysiology and Conventional and Alternative Treatment Options*.
- Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A. H., Bürgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W., & Schulzke, J. D. (2005). Interleukin-13 Is the Key Effector Th2 Cytokine in Ulcerative Colitis That Affects Epithelial Tight Junctions, Apoptosis, and Cell Restitution. *Gastroenterology*, 129(2), 550-564. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2005.05.002>
- Huldani, H., Jasim, S., ... D. B.-I., & 2022, undefined. (t.y.). Application of extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells as potential therapeutic tools in autoimmune and rheumatic diseases. *Elsevier*. Geliş tarihi 10 Nisan 2023, gönderen <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576922001187>

- Ji, J., Yan, S., Jiang, D., Liu, S., & Tang, W. (2022). Fabrication and Manipulation of Non-Spherical Particles in Microfluidic Channels: A Review. *mdpi.com*. <https://doi.org/10.3390/mi13101659>
- Joshi, A., Paratkar, S. G., & Thorat, B. N. (2006). Modification of lecithin by physical, chemical and enzymatic methods. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(4), 363-373. <https://doi.org/10.1002/EJLT.200600016>
- Karagozian, R., & Burakoff, R. (2007). *Therapeutics and Clinical Risk Management ISSN: (Print) (The role of mesalamine in the treatment of ulcerative colitis*. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S12160468>
- Karagozian, R., Burakoff, R., Brigham, R. B., & Women's Hospital, H. (2007). The role of mesalamine in the treatment of ulcerative colitis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 3(5), 893. <https://doi.org/10.24292/01.mf.0321.7>
- Kesimer, M., & Gupta, R. (2015). Physical characterization and profiling of airway epithelial derived exosomes using light scattering. *Methods*, 87, 59-63. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2015.03.013>
- Kim, B. Do, Na, K., & Choi, H. K. (2005). Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles (SLN) made of cacao butter and curdlan. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24(2-3), 199-205. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2004.10.008>
- Kim, E. H., & Choi, H. K. (2004). Preparation of Various Solid-Lipid Beads for Drug Delivery of Enrofloxacin. *Drug Delivery*, 11(6), 365-370. <https://doi.org/10.1080/10717540490265414>
- Kucharzik, T., Koletzko, S., Kannengießer, K., & Dignaß, A. (2020). Colitis ulcerosa - Diagnostische und therapeutische Algorithmen. *Deutsches Arzteblatt International*, 117(33-34), 564-573. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2020.0564>
- Lai, R. C., Chen, T. S., & Lim, S. K. (2011). Mesenchymal stem cell exosome: A novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regenerative Medicine*, 6(4), 481-492. <https://doi.org/10.2217/RME.11.35>
- Lai, R., Yeo, R., biology, S. L.-S. in cell & developmental, & 2015, undefined. (t.y.). Mesenchymal stem cell exosomes. *Elsevier*. Geliş tarihi 04 Nisan 2023, gönderen <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952115000440>

- Langan, R., Gotsch, P., ... M. K.-A. family, & 2007, undefined. (t.y.). Ulcerative colitis: diagnosis and treatment. *aafp.org*. Geliş tarihi 04 Nisan 2023, gönderen <https://www.aafp.org/afp/2007/1101/p1323.html>
- Lautenschläger, C., Schmidt, C., Fischer, D., & Stallmach, A. (2014). Drug delivery strategies in the therapy of inflammatory bowel disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 71, 58-76. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2013.10.001>
- Lee, C., Engorn, B., SCALE, J. F.-G. C., & 2018, undefined. (t.y.). Drug dosages. *academia.edu*. Geliş tarihi 04 Nisan 2023, gönderen https://www.academia.edu/download/39171543/Harriet_Lane_Handbook__The_-_Engorn__Branden__SRG_.pdf#page=732
- Liu, D., Sun, M., Zhang, J., Hu, R., Fu, W., Xuanyuan, T., & Liu, W. (2022). Single-cell droplet microfluidics for biomedical applications. *Analyst*, 147(11), 2294-2316. <https://doi.org/10.1039/D1AN02321G>
- Martins, J. P., Torrieri, G., & Santos, H. A. (2018). The importance of microfluidics for the preparation of nanoparticles as advanced drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 15(5), 469-479. <https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1446936>
- Matsuura, Y., Wada, H., Eguchi, H., Gotoh, K., Kobayashi, S., Kinoshita, M., Kubo, M., Hayashi, K., Iwagami, Y., Yamada, D., Asaoka, T., Noda, T., Kawamoto, K., Takeda, Y., Tanemura, M., Umeshita, K., Doki, Y., & Mori, M. (2019). Exosomal miR-155 Derived from Hepatocellular Carcinoma Cells Under Hypoxia Promotes Angiogenesis in Endothelial Cells. *Digestive Diseases and Sciences*, 64(3), 792-802. <https://doi.org/10.1007/S10620-018-5380-1/TABLES/2>
- Mendt, M., Rezvani, K., transplantation, E. S.-B. marrow, & 2019, undefined. (t.y.). Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use. *nature.com*. Geliş tarihi 04 Nisan 2023, gönderen <https://www.nature.com/articles/s41409-019-0616-z>
- Mesalamine Delayed-Release Tablets Monograph. (2020). İçinde *USP 31. Method for lyophilizing exosome*. (2020).
- Myers, B., Evans, D. N. W., Rhodes, J., Evans, B. K., Hughes, B. R., Lee, M. G., Richens, A., & Richards, D. (1987). Metabolism and urinary excretion of 5-amino salicylic acid in healthy volunteers when given intravenously or released for absorption at different sites in the gastrointestinal tract. *Gut*, 28(2), 196-200. <https://doi.org/10.1136/GUT.28.2.196>

- Nugent, S. G., Kumar, D., Rampton, D. S., & Evans, D. F. (2001). Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosaliculates and other drugs. *Gut*, 48(4), 571-577. <https://doi.org/10.1136/GUT.48.4.571>
- Oosthuyzen, W., Sime, N. E. L., Ivy, J. R., Turtle, E. J., Street, J. M., Pound, J., Bath, L. E., Webb, D. J., Gregory, C. D., Bailey, M. A., & Dear, J. W. (2013). Quantification of human urinary exosomes by nanoparticle tracking analysis. *The Journal of Physiology*, 591(23), 5833-5842. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2013.264069>
- Pan, Y., Tikekar, R. V., & Nitin, N. (2013). Effect of antioxidant properties of lecithin emulsifier on oxidative stability of encapsulated bioactive compounds. *International Journal of Pharmaceutics*, 450(1-2), 129-137. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2013.04.038>
- Patel, A., & Bhatt, N. (2011). *Colon Targeted Drug Delivery System: A Review System*.
- Pozzi, F., Furlani, P., Gazzaniga, A., Davis, S. S., & Wilding, I. R. (1994). The time clock system: a new oral dosage form for fast and complete release of drug after a predetermined lag time. *Journal of Controlled Release*, 31(1), 99-108. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(94\)90255-0](https://doi.org/10.1016/0168-3659(94)90255-0)
- Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J. (2013). Impact of lipid nanoparticle physical state on particle aggregation and β -carotene degradation: Potential limitations of solid lipid nanoparticles. *Food Research International*, 52(1), 342-349. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2013.03.035>
- Raposo, G., Biology, W. S.-J. of C., & 2013, undefined. (t.y.). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *rupress.org*. Geliş tarihi 04 Nisan 2023, gönderen <https://rupress.org/jcb/article-abstract/200/4/373/37234>
- Rasmussen, S. N., Bondesen, S., Hvidberg, E. F., Hansen, S. H., Binder, V., Halskov, S., & Flachs, H. (1982). 5-Aminosalicylic Acid in a Slow-Release Preparation: Bioavailability, Plasma Level, and Excretion in Humans. *Gastroenterology*, 83(5), 1062-1070. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(82\)80075-9](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(82)80075-9)
- Rodríguez-Morales, B., Antunes-Ricardo, M., & González-Valdez, J. (2021). Exosome-Mediated Insulin Delivery for the Potential Treatment of Diabetes Mellitus. *Pharmaceutics* 2021, Vol. 13, Page 1870, 13(11), 1870. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13111870>

- Ruzycka-Ayoush, M., Nowicka, A. M., Kowalczyk, A., Gluchowska, A., Targonska, A., Mosieniak, G., Sobczak, K., Donten, M., & Grudzinski, I. P. (2023). Exosomes derived from lung cancer cells: Isolation, characterization, and stability studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 181, 106369. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2022.106369>
- Sanjurjo-Rodriguez, C., James, S., Jones, E., & Correa, D. (2019). Mesenchymal stem cell functionalization for enhanced therapeutic applications. *liebertpub.com*, 25(1), 55-77. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2018.0118>
- Satsangi, J., Silverberg, M. S., Vermeire, S., & Colombel, J. F. (2006). The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*, 55(6), 749-753. <https://doi.org/10.1136/GUT.2005.082909>
- Schellekens, R. C. A., Stuurman, F. E., van der Weert, F. H. J., Kosterink, J. G. W., & Frijlink, H. W. (2007). A novel dissolution method relevant to intestinal release behaviour and its application in the evaluation of modified release mesalazine products. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(1), 15-20. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2006.09.004>
- Schmidt, C., Lautenschlaeger, C., Collnot, E. M., Schumann, M., Bojarski, C., Schulzke, J. D., Lehr, C. M., & Stallmach, A. (2013). Nano- and microscaled particles for drug targeting to inflamed intestinal mucosa—A first in vivo study in human patients. *Journal of Controlled Release*, 165(2), 139-145. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2012.10.019>
- Schubert, M. A., & Müller-Goymann, C. C. (2005). Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 61(1-2), 77-86. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2005.03.006>
- Shah, R. K., Kim, J. W., Agresti, J. J., Weitz, D. A., & Chu, L. Y. (2008). Fabrication of monodisperse thermosensitive microgels and gel capsules in microfluidic devices. *Soft Matter*, 4(12), 2303-2309. <https://doi.org/10.1039/B808653M>
- Shang, L., Cheng, Y., & Zhao, Y. (2017a). Emerging Droplet Microfluidics. *Chemical Reviews*, 117(12), 7964-8040. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.6B00848>
- Shang, L., Cheng, Y., & Zhao, Y. (2017b). Emerging Droplet Microfluidics. *Chemical Reviews*, 117(12), 7964-8040.

- https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.6B00848/ASSET/IMAGES/MEDIUM/C-R-2016-00848E_0047.GIF
- Shao, C., Chi, J., Shang, L., Fan, Q., & Ye, F. (2022). Droplet microfluidics-based biomedical microcarriers. *Acta Biomaterialia*, 138, 21-33. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2021.10.037>
- Shtay, R., Tan, C. P., & Schwarz, K. (2018). Development and characterization of solid lipid nanoparticles (SLNs) made of cocoa butter: A factorial design study. *Journal of Food Engineering*, 231, 30-41. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2018.03.006>
- Singh, D., Srivastava, S., Pradhan, M., Kanwar, J. R., & Singh, M. R. (2015). Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Causative Factors, Issues, Drug Treatment Strategies, and Delivery Approaches. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 32(3), 181-214. <https://doi.org/10.1615/CRITREVTHERDRUGCARRIERSYST.2015011095>
- Sutherland, L. R., & MacDonald, J. K. (2006a). Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000544.PUB2/ABSTRACT>
- Sutherland, L. R., & MacDonald, J. K. (2006b). Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000544.PUB2>
- Tenjarla, S. (2015). Dissolution of commercially available mesalamine formulations at various pH levels. *Drugs in R and D*, 15(2), 211-215. <https://doi.org/10.1007/S40268-015-0097-5/TABLES/3>
- Thakur, R. K., Villette, C., Aubry, J. M., & Delaplace, G. (2007). Formulation–composition map of a lecithin-based emulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 310(1-3), 55-61. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2007.05.066>
- Tkach, M., Cell, C. T., & 2016, undefined. (t.y.). Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Elsevier*. Geliş tarihi 04 Nisan 2023, gönderen <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867416300575>
- Tolstanova, G., Deng, X., French, S. W., Lungu, W., Paunovic, B., Khomenko, T., Ahluwalia, A., Kaplan, T., Dacosta-Iyer, M., Tarnawski, A., Szabo, S., & Sandor,

- Z. (2012). Early endothelial damage and increased colonic vascular permeability in the development of experimental ulcerative colitis in rats and mice. *Laboratory Investigation*, 92(1), 9-21. <https://doi.org/10.1038/LABINVEST.2011.122>
- Torres, J., Billioud, V., Sachar, D. B., Peyrin-Biroulet, L., & Colombel, J. F. (2012). Ulcerative colitis as a progressive disease: the forgotten evidence. *Inflammatory bowel diseases*, 18(7), 1356-1363. <https://doi.org/10.1002/IBD.22839>
- Uccelli, A., Moretta, L., immunology, V. P.-N. reviews, & 2008, undefined. (t.y.). Mesenchymal stem cells in health and disease. *nature.com*. Geliş tarihi 04 Nisan 2023, gönderen https://idp.nature.com/authorize/casa?redirect_uri=https://www.nature.com/articles/nri2395&casa_token=4H_iwTdi3Z4AAAAA:TXkZyDLGbh24jDb6OWCbNknQrjr--PAxHUNNF8eyWtPVlbDi1r9GSCm6N_HZsQeL-mbNZK7aLmDOr1z_
- Um, E., Lee, D. S., Pyo, H. B., & Park, J. K. (2008). Continuous generation of hydrogel beads and encapsulation of biological materials using a microfluidic droplet-merging channel. *Microfluidics and Nanofluidics*, 5(4), 541-549. <https://doi.org/10.1007/S10404-008-0268-6>
- Ungaro, R., Colombel, J. F., Lissos, T., & Peyrin-Biroulet, L. (2019). A Treat-to-Target Update in Ulcerative Colitis: A Systematic Review. *American Journal of Gastroenterology*, 114(6), 874-883. <https://doi.org/10.14309/AJG.0000000000000183>
- Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B., Peyrin-Biroulet, L., & Colombel, J. F. (2017). Ulcerative colitis. *Lancet (London, England)*, 389(10080), 1756-1770. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32126-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32126-2)
- Valipour, E., Ranjbar, F. E., Mousavi, M., Ai, J., Malekshahi, Z. V., Mokhberian, N., Taghdiri-Nooshabadi, Z., Khanmohammadi, M., & Nooshabadi, V. T. (2022). The anti-angiogenic effect of atorvastatin loaded exosomes on glioblastoma tumor cells: An in vitro 3D culture model. *Microvascular Research*, 143, 104385. <https://doi.org/10.1016/J.MVR.2022.104385>
- Wang, H., Jiang, G., Han, Q., & Cheng, Y. (2021). Formation of magnetic ionic liquid-water Janus droplet in assembled 3D-printed microchannel. *Chemical Engineering Journal*, 406, 126098. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2020.126098>

- Wang, J. T., Wang, J., & Han, J. J. (2011). Fabrication of Advanced Particles and Particle-Based Materials Assisted by Droplet-Based Microfluidics. *Small*, 7(13), 1728-1754. <https://doi.org/10.1002/SMLL.201001913>
- Wang, Y., Chen, Z., Bian, F., Shang, L., ... K. Z.-E. O. on D., & 2020, undefined. (2020). Advances of droplet-based microfluidics in drug discovery. *Taylor & Francis*, 15(8), 969-979. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1758663>
- Weibel, D. B., & Whitesides, G. M. (2006). Applications of microfluidics in chemical biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(6), 584-591. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2006.10.016>
- Wu, L., Chen, P., Dong, Y., Feng, X., & Liu, B. F. (2013). Encapsulation of single cells on a microfluidic device integrating droplet generation with fluorescence-activated droplet sorting. *Biomedical Microdevices*, 15(3), 553-560. <https://doi.org/10.1007/S10544-013-9754-Z>
- Wu, Y., Qiu, W., Xu, X., Kang, J., Wang, J., ... Y. W.-A. journal of, & 2018, undefined. (t.y.). Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate inflammatory bowel disease in mice through ubiquitination. *ncbi.nlm.nih.gov*. Geliş tarihi 18 Nisan 2023, gönderen <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6079129/>
- Yamashita, T., Takahashi, Y., Bulletin, Y. T. P., & 2018, undefined. (2018). Possibility of exosome-based therapeutics and challenges in production of exosomes eligible for therapeutic application. *jstage.jst.go.jp*, 41(6), 835-842. https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/41/6/41_b18-00133/_article/-char/ja/
- Yasmin, F., Najeeb, H., Shaikh, S., Hasanain, M., Naeem, U., Moeed, A., Koritala, T., Hasan, S., & Surani, S. (2022). Novel drug delivery systems for inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 28(18), 1922. <https://doi.org/10.3748/WJG.V28.I18.1922>
- Ye, B., gastrointestinal, D. van L.-W. journal of, & 2015, undefined. (t.y.). Mesalazine preparations for the treatment of ulcerative colitis: Are all created equal? *ncbi.nlm.nih.gov*. Geliş tarihi 04 Nisan 2023, gönderen <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4635154/>
- Ye, B., & Langenberg, D. R. van. (2015). Mesalazine preparations for the treatment of ulcerative colitis: Are all created equal? *World Journal of Gastrointestinal*

- Pharmacology and Therapeutics*, 6(4), 137.
<https://doi.org/10.4292/WJGPT.V6.I4.137>
- Zhang, M., & Merlin, D. (2018). Nanoparticle-Based Oral Drug Delivery Systems Targeting the Colon for Treatment of Ulcerative Colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 24(7), 1401-1415. <https://doi.org/10.1093/IBD/IZY123>
- Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., ... S. D.-I. journal of, & 2020, undefined. (2020). Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. *Taylor & Francis*, 15, 6917-6934.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S264498>
- Zhang, Y., Wo, S. K., Leng, W., Gao, F., Yan, X., & Zuo, Z. (2022). Population pharmacokinetics and IVIVC for mesalazine enteric-coated tablets. *Journal of Controlled Release*, 346, 275-288.
<https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2022.04.024>
- Zhou, M., Weber, S. R., Zhao, Y., Chen, H., & Sundstrom, J. M. (2020). Methods for exosome isolation and characterization. *Exosomes: A Clinical Compendium*, 23-38.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816053-4.00002-X>

EK-1

Etik Kurul Onayı



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

Sayı : E-80558721-050.99-413733

01.12.2022

Konu : 2022 - 30 Karar

Sayın Doç.Dr.Ayla EKER SARIBOYACI
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Hücrel Tedavi Kök Hücre Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi ESTEM

Karar Tarihi: 10 Kasım 2022
Karar Sayısı: 21

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hücrel Tedavi Kök Hücre Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi ESTEM Doç.Dr.Ayla EKER SARIBOYACI sorumluluğunda yürütülecek olan *"Wharton Jeli Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (WJ-MKH) İmmünomodulator Özellikleri"* başlıklı araştırmanın/çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini saygı ile rica ederim.

Prof. Dr. Hüseyin YILDIRIM
Kurul Başkanı

Ek: 1- Etik Kurul Görüş ve Karar Formları

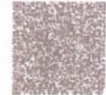
Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu : bqAap0wa172

Belge Doğrulama Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/esogu-ebys>

Adres : Meselik Kampüsü 26040 Odunpazarı
Telefon : 0222 2393750 Faks: 0222 2291418
İnternet Adresi : www.ogu.edu.tr
KEP adresi : esk.osmangaziunirek@hs01.kep.tr

Bilgi için : Aysun SERTTAŞ
Telefon : 0222 2392979-4690
E-posta : aserttas@ogu.edu.tr



Doç.Dr.Ayla EKER SARIBOYACI'nın 27.10.2022 tarihli yazısı

06 Ekim 2022 tarihli Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Görüş ve Önerileri:

1- Çalışmaya dahil edilmesi planlanan anneler için gerekli olan örneklem hacmi hesabının yapılması gerekmektedir. Çalışmamızda 12 anneden elde edilen kordon kan örneğinin yeterli olduğu istatistiksel olarak belirlenmelidir.

Çalışmanın uyarılara göre düzenlendikten sonra, başvuru formlarında gerekli görülen düzeltmeler yapıp yeniden başvurulması gerekmektedir.

Çalışmada yapılan düzeltme:

06 Ekim 2022 tarihli Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Görüş ve Önerileri doğrultusunda Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ve Biyoistatistik Anabilim Dalı ile gerçekleştirdiğimiz toplantı sonucu çalışmamızda insanlar üzerinde değil, insanlardan izole edilecek insan Wharton jeli kökenli mezenkimal kök hücreler (WJ-MKH'ler) kullanılarak araştırma yapılacağı ve tek bireyden çok sayıda kök hücre elde edilebileceği gibi in vitro (hücre kültürü) ortamda kök hücrelerin gerekli miktarda çoğaltılabileceği durumu gözönüne alındığında sonuçların istatistiksel güç analizi ile değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmadığı tespit edilmiştir. Örneklem sayısı bireyler üzerinden değil elde edilecek kök hücreler üzerinde belirlenecektir. Bu nedenle çalışmamızda çok sayıda gönüllü gerekmemektedir. Çalışmada hücre kaynağı olarak 6 (n=6) birey ve 6 yedek olmak üzere toplamda 12 birey olması bu çalışmanın yapılması için yeterlidir.

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BAŞKANLIĞI
KARAR FORMU**

Karar Tarihi: 10 Kasım 2022
Karar Sayısı: 21

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hücresel Tedavi Kök Hücre Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi ESTEM Doç.Dr.Ayla EKER SARIBOYACI sorumluluğunda yürütülecek olan **"Wharton Jeli Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (WJ-MKH) İmmünomodulator Özellikleri"** başlıklı araştırmanın/çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.

Çalışmamızda başarılar dileriz.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Wharton Jeli Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (WJ-MKH) İmmünomodulator Özellikleri"
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu - Eskişehir
	TELEFON	0 222 239 29 79 – Dahili: 4690
	FAKS	-
	E-POSTA	etikkurul@tm.ogu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ

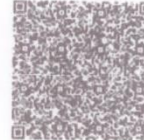
KOORDİNATOR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Ayla EKER SARIBOYACI			
KOORDİNATOR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji			
KOORDİNATOR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hücrel Tedavi Kök Hücre Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi ESTEM			
VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
DESTEKLEYİCİ	- TÜBİTAK 1001 - Üniversite / BAP			
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	Yük.Lis.Öğr.Bio.Fıdan GAKHIYEVA (Yüksek Lisans Tez Sahibi)			
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
	FAZ 2	☐		
	FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐		
	Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
	Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
	In vitro tıbbi tam cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
	İlaç dışı klinik araştırma	☒		
Diğer ise belirtiniz: Preklinik, Yüksek Lisans Tezi				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Hüseyin YILDIRIM
İmza:

E-imzalıdır

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.
Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu : EgnFoeSS199



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Wharton Jeli Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (WJ-MKH) İmmünomodulator Özellikleri"
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	01.09.2022	01
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (Gönüllülerden Alınacak Kan Örneği)	01.09.2022	01	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (Gönüllülerden Alınacak Atık Doku Olan Wharton Jeli Doku Örneği)	01.09.2022	01	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama
		SİGORTA
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒ 01.09.2022 imza tarihli Bütçe Formu
	BİYolojik MATERYEL TRANSFER FORMU	☐
	İLAN	☐
	YILLIK BİLDİRİM	☐
	SONUÇ RAPORU	☐
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐
	DİĞER:	☒ 1. İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi ve Pediatrik Popülasyonda Yürütülen Klinik Araştırmalarda Etik Yaklaşımlara İlişkin Kılavuzdaki tüm hususlara uyulacağına dair Taahhütname 2. Araştırma sırasında gönüllüye veya SGK'ya ek yük getirecek hiçbir işlem uygulanmayacağına dair Taahhütname 3. Araştırmanın daha önce başka bir Etik Kurulda değerlendirilmediği, sunulup sunulmadığı ve Etik Kurul onayı alınmaksızın çalışmaya başlanmayacağı ile ilgili Taahhütname 4. İleratörler 5. Araştırmaya dahil edilen araştırma merkezleri ve araştırma ekibinde yer alacak araştırmacılar: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hücrel Tedavi Kök Hücre Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi ESTEM Doç.Dr.Ayla EKER SARIROYACI (Yüksek Lisans Tez Danışmanı), Yak.Las.Öğr.Bio.Fidan GAKHİYEVA (Yüksek Lisans Tez Sahibi), Dr.Öğr.Uy.Omur UYSAL, Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı - Doç.Dr.Melih VELİPAŞAOGLU, Hücrel Tedavi Kök Hücre Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi ESTEM - Dr.Öğr.Uy.Sibel GÜNEŞ BAĞIŞ, Dr.Emilia EKENEL, Dr.Süleyman GÖKHAN KARA (Eskişehir Şehir Hastanesi), Uzm.Mol.Bio.Merve Nur SOYKAN 6. Özgeçmiş Formları

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 21	Tarih: 10.11.2022
Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekece, amaç, yaklaşımı ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına teyidatıyla katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.		

Etik Kurul Başkanının

Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Hüseyin YILDIRIM

İmza:

E-imzalıdır

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu : EgnFoeSS199

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Wharton Jeli Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (WJ-MKH) İmmünomodulator Özellikleri"
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	-

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Hüseyin YILDIRIM

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Hüseyin YILDIRIM	Göğüs Hastalıkları	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Prof.Dr.Nurdan ACAR	Acil Tıp	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Acil Tıp AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Doç.Dr.Nilüfer DEMİRSOY	Tıp Tarihi ve Etik	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Prof.Dr.Dündü ÜSKÜDAR CANSU	İç Hastalıkları / Romatoloji	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD / Romatoloji BD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Prof.Dr.Özge AYDEMİR	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları / Neonatoloji	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağ. ve Hast. AD / Neonatoloji BD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Doç.Dr.Pınar YILDIZ	İç Hastalıkları	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Doç.Dr.Semra YIGİTASLAN	Farmakoloji	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Doç.Dr.Seçkin TUNCER	Biyofizik	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Doç.Dr.Mustafa Emin ÇANAKÇI	Acil Tıp	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Doç.Dr.Ömer DEREÇİ	Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi	Eskişehir Osmangazi Üniv. Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cer. AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	-
Doç.Dr.Erol ŞENER	Analitik Kimya	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	-
Dr.Öğr.Üy.Nazmiye ÖZENBAŞ BOYDAĞ	Hukuk	Anadolu Üniversitesi Hukuk Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	-
Dr.Öğr.Üy.Muzaffer BILGIN	Biyostatistik	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyostatistik AD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	e-imza
Av. Berçem ÇELİK	Hukuk	Avukat	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	-

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Hüseyin YILDIRIM
İmza:

E-imzalıdır
Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Belge Doğrulama Kodu : EqnFoeSS199

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı

: Ceyda KÖROĞLU ÖZMEN

Eğitim:

- Yüksek Lisans: Eylül 2022- halen, Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Farmasötik Biyoteknoloji ABD.
- Lisans: 2016-2021, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
- Lise: 2012-2016, Eskişehir Anadolu Lisesi

Mesleki Geçmiş:

- Mart 2022-halen, Araştırma Görevlisi, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Teknolojisi Bölümü, Farmasötik Biyoteknoloji ABD.
- Şubat 2021- Mayıs 2021, Araştırma Geliştirme Stajyeri, DEVA Holding A.Ş.
- Ekim 2020- Aralık 2020, Stajyer Eczacı, Tuğçe Eczanesi

Mesleki Birlik/Dernek/Kuruluş Üyelikleri:

- 2019-2021, Eskişehir Eczacı Odası Öğrenci Komisyonu, Yönetim kurulu, Dergi editörlüğü, Eskişehir